

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MUTANT SOYA BİTKİLERİNİN TUZLULUK STRESİNE CEVAPLARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Türkan Hazal TURAN

2200006607

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çimen ATAK

TEMMUZ 2025

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MUTANT SOYA BİTKİLERİNİN TUZLULUK STRESİNE CEVAPLARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Türkan Hazal TURAN

2200006607

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çimen ATAK

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Özgür ÇAKIR

Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN

TEMMUZ 2025

ÖNSÖZ

Yüksek lisans yolculuğum boyunca çok değerli fikirlerini ve tecrübelerini paylaşarak bana destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Çimen ATAĞ'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans süresince hiçbir sorumu yanıtsız bırakmayan, mümkün olan her koşulda gerek bilgisiyle gerek güler yüzüyle bana her zaman destek olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyeleri'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında tecrübeleriyle destekçim olup laboratuvar çalışmalarımın sorunsuz ilerlemesini sağlayan çok sevgili hocalarım Dr. Öğr. Gör. Sinan MERİÇ ve Ar. Gör. Tamer GÜMÜŞ'e ve değerli sınıf arkadaşlarım Tuğçe AYDIN ile Burcu GÜNDÜZ'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında ellerinden gelen her şekilde yardımcı olup beni yalnız bırakmayan sevgili yavru ördek stajyer arkadaşlarım Ersin Durmaz, Berk Baber, Ece Öz, Ayşegül Özmutafoğlu, Batur Alp Özbakır ve Halit Emre Civelek'e tüm emekleri için gönülden teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın ilk gününden beri her konuda destekçim olan çok sevgili annem Kiraz YILAN'a ve hiç bıkmadan yılmadan sevgisini desteğini her zaman hissettiren sevgili kız kardeşim Arsu Hayal BÜYÜKTEPE'ye içtenlikle teşekkür ederim.

Tanıştığımız günden beri attığım her adımda yanımda olan ve varlığıyla hayatımı güzelleştiren, bütün zor zamanlarımın sıkıntısını benimle çeken ve elimi hiç bırakmayan sevgili erkek arkadaşım Mert Can Culha'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL ve BİRİM LİSTESİ.....	x
KISA ÖZET.....	xii
MUTANT SOYA BİTKİLERİNİN TUZLULUK STRESİNE CEVAPLARI.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
RESPONSES TO SALINITY STRESS OF MUTANT SOYBEAN PLANTS...	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1 SOYA (Glycine Max.).....	4
2.1.1 Soyanın Kullanım Alanları.....	6
2.1.2 Soya Bitkisinin Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri	9
2.1.3 Soyanın Genomik Özellikleri	11
2.2 BİTKİDE STRES FAKTÖRLERİ	12
2.2.1 BİYOTİK STRES FAKTÖRLERİ.....	14
2.2.2 ABİYOTİK STRES.....	15
2.3 PROTEOMİK.....	27
3. MATERYAL VE METOD.....	31
3.1 BİTKİ MATERYALİNİN SEÇİMİ.....	31
3.2 SOYA ÇEŞİT ve MUTANT HATLARINDA TUZLULUK STRESİ UYGULAMASI.....	31
3.3 BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	33
3.3.1 Lipid Peroksidasyon Birikimi Tayini	33
3.3.2 Prolin Konsantrasyonu Tayini	34
3.3.3 Fotosentetik Pigment Miktarı Tayini	34
3.3.4 Ozmolit Birikimi Miktarı Tayini	35
3.4 PROTEİN İZOLASYONU VE KONSANTRASYON TAYİNİ.....	36
3.4.1 Protein İzolasyonu.....	36

3.4.2	Protein İzolatlarının Rehidrasyonu.....	37
3.4.3	Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Tayini.....	37
3.4.4	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ile Örnek Kalitesinin İncelenmesi.....	38
3.5	İKİ BOYUTLU (2D) JEL ELEKTROFOREZİ.....	40
3.5.1	Protein Örneklerinin İzoelektrik Odaklanmaları ve 2D Jel Elektrophorezi	40
3.5.2	2D Jellerin Analizi ve Spotların Kesilmesi.....	42
3.5.3	Zip-Tip Protein Saflaştırma	43
3.6	LC-MS/MS ANALİZİ.....	43
3.7	İSTATİKSEL ANALİZLER.....	45
4	SONUÇLAR.....	46
4.1	TUZ STRESİNİN BİTKİ BÜYÜMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ...46	
4.2	BİYOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI.....	50
4.2.1	Lipid Peroksidasyon (MDA) Tayini Analizine Ait Sonuçlar	50
4.2.2	Prolin Konsantrasyonu Tayini Analizine Ait Sonuçlar	52
4.2.3	Fotosentetik Pigment Miktarı Tayini Analizine Ait Sonuçlar	53
4.2.4	Osmolit Ölçümü Analizine Ait Sonuçlar.....	57
4.3	İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZ ANALİZİNE AİT SONUÇLAR.....	58
5	TARTIŞMA.....	79
	KAYNAKLAR.....	86

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Soya (Glycine max.) büyüme evreleri	10
Şekil 2.2 Bitkilerde ROS oluşum mekanizması ve üretim yerleri	23
Şekil 2.3 Tuz stresine karşı oluşturulan tolerans sırasında hormonlar ve sinyal molekülleri arasındaki etkileşim ağı	25
Şekil 2.4 Prolinin dış ve iç sentez mekanizmaları ve stres toleransı oluşturma yolları	26
Şekil 2.5 Farklı bitki türlerinin büyümesini ve verimliliğini artırmak için tuza dayanıklı türlerin geliştirilmesinde farklı omik yaklaşımların kullanılması	27
Şekil 4.1614 günlük Ataem-07, Üstün ve mutant hatların bitki gelişimleri. A- Kontrol grubu bitkiler B- Stres grubu bitkileri	46
Şekil 4.2710 günlük tuz stresi uygulanan bitkilerin tuz stresine cevapları. C- Kontrol grubu bitkileri D- Stres grubu bitkileri	47
Şekil 4.38Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların taze ağırlıkları üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır	48
Şekil 4.49Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların bitki boyları üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır	49
Şekil 4.510Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların kök boyları üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır	50
Şekil 4.611Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların MDA üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır	51
Şekil 4.712Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların prolin üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır	53
Şekil 4.813Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların klorofil A ve klorofil B üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır	56
Şekil 4.914Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların total klorofil üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır	56
Şekil 4.1015Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların ozmolit değeri üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır	58
Şekil 4.116Soya hatlarının 2D jel görüntüleri A) Ataem hattı kontrol grubu C) Üstün hattı kontrol grubu E) 150-43 hattı kontrol grubu G) 405-1 hattı kontrol grubu	60
Şekil 4.127Soya hatlarının 2D jel görüntüleri B) Ataem hattı 180 mM NaCl uygulanan grup D) Üstün hattı 180 mM NaCl uygulanan grup F) 150-43 hattı 180 mM NaCl uygulanan grup H) 405-1 hattı 180 mM NaCl uygulanan grup	61
Şekil 4.138Ataem hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve azalmış (sol) ve 3 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği	62

Şekil 4.149	Ataem hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve azalmış (sol) ve 5 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği	62
Şekil 4.1520	Üstün hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve azalmış (sol) ve 3 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği	63
Şekil 4.1621	Üstün hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve azalmış (sol) ve 5 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği	63
Şekil 4.1722	150-43 hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve azalmış (sol) ve 3 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği	64
Şekil 4.1823	150-43 hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve azalmış (sol) ve 5 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği	64
Şekil 4.1924	405-1 hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve azalmış (sol) ve 3 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği	65
Şekil 4.2025	405-1 hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve azalmış (sol) ve 5 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği	65
Şekil 4.216	Ataem-07 çeşidi ve 150-43 mutant hattı ile yapılan karşılaştırmalı PD-Quest analizine ait sütun grafikleri	68
Şekil 4.227	Üstün çeşidi ve 405-1 mutant hattı ile yapılan karşılaştırmalı PD-Quest analizine ait sütun grafikleri	69
Şekil 4.238	Ataem-07 ve Üstün çeşitleri ile mutant 150-43 ve 405-1 ile yapılan karşılaştırmalı analize ait PD-Quest sütun grafikleri	70
Şekil 4.24	Elde edilen protein spotlarının String analizi	77
Şekil 4.250	String analizindeki çizgi ifadeleri	77
Şekil 4.2631	KEGG yolak analiziyle belirlenen fotosentez yolağı şeması. Yeşil renkle vurgulanan protein erişim numaraları tuzluluk ve kuraklık toleransı ile ilişkilendirilmiştir.	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.11Küresel soya üretim miktarları	5
Tablo 2.2 Soya tohumunun besin değeri içeriği.....	8
Tablo 3.1 Hoagland besin solüsyonu içeriği ve litredeki miktarları	32
Tablo 4.14180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama taze ağırlıkları ve standart sapma değerleri	47
Tablo 4.25180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama bitki boyları	48
Tablo 4.36180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama kök uzunlukları.....	49
Tablo 4.47180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama MDA değerleri	51
Tablo 4.58180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama prolin değerleri	52
Tablo 4.69180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama klorofil A değerleri	54
Tablo 4.710180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama klorofil B değerleri.....	55
Tablo 4.811180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama total klorofil değerleri	55
Tablo 4.912180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama ozmolit birikim değerleri.....	57
Tablo 4.1013İki boyutlu jel elektroforezi ile elde edilen deney gruplarına ait protein spotlarının sayısı	59
Tablo 4.1142 boyutlu jel elektroforezlerinden seçilen ve kesilen spotların LC-MS/MS analizi sonuçları	72
Tablo 4.115Devamı 2 boyutlu jel elektroforezlerinden seçilen ve kesilen spotların LC-MS/MS analizi sonuçları.....	73
Tablo 4.116Devamı 2 boyutlu jel elektroforezlerinden seçilen ve kesilen spotların LC-MS/MS analizi sonuçları.....	74
Tablo 4.117Devamı 2 boyutlu jel elektroforezlerinden seçilen ve kesilen spotların LC-MS/MS analizi sonuçları.....	75

KISALTMA LİSTESİ

2D	: İki boyutlu
ABA	: Absisik asit
ABC	: ATP bağlayıcı kaset
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AGC	: Otomatik kazanç kontrol
ANOVA	: Varyans analizi
APS	: Amonyum persülfat
APX	: Askorbat peroksidaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Bovine serum albumin
bZIP	: Temel lösin fermuarı
CAT	: Katalaz
CHAPS	: 3-[(3- kolamidopropil)dimetilamonyo]-1-propansülfonat
CHI	: Şalkon izomeraz
CRISPR	: Düzenli aralıklarla tekrarlanan kısa palindromik tekrar kümeleri
DFR	: Dihidroflavonol-4-redüktaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DREB	: Dehidrasyon yanıtı elementine bağlanan protein
DTT	: Dithiothreitol
ETC	: Elektron taşıma zinciri
FDA	: America yiyecek ve ilaç idaresi
GA	: Giberellik asit
HKT	: Yüksek afiniteli potasyum taşıyıcısı
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HSP	: Isı şok proteini
IAA	: İndoleasetik asit

IFR	: İzoflavon redüktaz
IPG	: Hareketsiz pH gradyanı
LC	: Sıvı kromatografi
LEA	: Geç embriyogenez proteinleri
LTP	: Lipid transfer proteinleri
MAPK	: Mitojenle aktif olan protein kinaz
MDA	: Malondialdehit
MKK2	: Mitojenle aktif olan protein kinaz kinaz 2
MS	: Kütle spektrofotometresi
MTP	: Metal tolerans proteini
MYB	: Miyeloblastosis
NAC	: NAM, ATAF, CUC transkripsiyon faktörü ailesi
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-hidrojen
NHX	: Sodyum-hidrojen değıştirici
OEC	: Oksijen değıştirici kompleks
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PEG	: Polietilen glikol
PS I	: Fotosistem I
PS II	: Fotosistem II
qPCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
QTL	: Kantitatif özellik bölgesi
RCF	: Göreceli santrifüj kuvveti
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RuBisCo	: Ribuloz 5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz
SA	: Salisilik asit

SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SnRK2	: SNF1 ile ilişkili kinaz 2
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOS	: Tuza aşırı hassasiyet
TA	: Taze ağırlık
TAGEM	: Tarımsal araştırmalar ve politikalar genel müdürlüğü
TBA	: Tiobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
UO	: Ürat oksidaz
TEMED	: Tetrametiletildiamin
WGD	: Tüm genom duplikasyonu
XOD	: Ksantin oksidaz

SEMBOL ve BİRİM LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
Ca	: Kalsiyum
cm	: Santimetre
cm ³	: Santimetre küp
Cu	: Bakır
Da	: Dalton
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
Fe	: Demir
g	: Gram
Gy	: Grey
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
HCl	: Hidroklorik asit
K	: Potasyum
kDa	: Kilo Dalton
kg	: Kilogram
M	: Molar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
Mo	: Molibden

mOsmol	: Miliosmol
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
O ₂	: Oksijen
O ²⁻	: Süperoksit
¹ O ₂	: Singlet oksijen
OH	: Hidroksil
P	: Potasyum
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
V	: Volt
Zn	: Çinko

Üniversite: T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi
Enstitü: Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çimen ATAĞ
Tez Türü ve Tarihi: Yüksek Lisans – TEMMUZ 2025

KISA ÖZET

MUTANT SOYA BİTKİLERİNİN TUZLULUK STRESİNE CEVAPLARI

Türkan Hazal Turan

Günümüzde artan çevresel baskılar, özellikle tuzluluk gibi abiyotik stres faktörleri, tarımsal üretimi tehdit eden en önemli unsurlar arasında yer almaktadır. Bu bağlamda, ekonomik ve besinsel açıdan büyük öneme sahip olan soya bitkisi (*Glycine max* L.), tuz stresine karşı duyarlılığı nedeniyle önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Soya; yüksek protein ve yağ içeriği sayesinde hem insan hem de hayvan beslenmesinde, ayrıca biyoyakıt, kozmetik ve ilaç sanayilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak verimli üretimi engelleyen tuz stresine karşı soya türlerinde direnç geliştirilmesi, sürdürülebilir tarım için kritik bir hedef olarak öne çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, mutasyon ıslahı yoluyla elde edilen soya mutant hatlarının tuzluluk stresine karşı verdiği fizyolojik, biyokimyasal ve proteomik yanıtların incelenmesidir. Bu kapsamda, Ataem-07 ve Üstün anaç hatları gama radyasyonuna (150–250 Gy) maruz bırakıldıktan sonra mutasyon ıslahı ile elde edilen 150-43 ve 405-1 mutant hatları kullanılmıştır. Tuz stresine yanıtları değerlendirmek amacıyla bitkiler 180 mM NaCl ile strese maruz bırakılmış ve 10 gün boyunca stres koşullarında büyümeleri sağlanmıştır.

Fizyolojik analizler kapsamında gövde uzunluğu, kök uzunluğu ve bitki taze ağırlıkları ölçülmüş; biyokimyasal olarak ise lipid peroksidasyon düzeyi (MDA analizi), prolin konsantrasyonu, fotosentetik pigment miktarları ve ozmolit birikimi değerlendirilmiştir. Ayrıca, iki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE) ve LC-MS/MS proteomik analizleri ile protein düzeyinde ifade değişimleri ortaya konmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre, mutant hatlar, tuz stresi altında daha az büyüme geriliği göstermiş ve kontrol gruplarına kıyasla daha düşük MDA birikimi ve daha yüksek prolin seviyeleri sergilemiştir. Fotosentetik pigmentlerin daha az azalması da stres toleransının göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Proteomik analizlerde ise tuz stresine karşı duyarlılığı ve toleransı etkileyen proteinlerin ifade düzeylerinde anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma, mutant soya hatlarının tuzluluk stresine karşı gösterdiği çok yönlü tepkileri ortaya koyarak, bu hatların genetik çeşitlilik ve stres toleransı açısından potansiyel taşıdığını göstermiştir. Elde edilen veriler, hem temel bilimsel anlayışa katkı sunmakta hem de tuz stresine dayanıklı soya çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik ıslah çalışmalarına bilimsel bir temel sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Glycine max, tuz stresi, mutant hatlar, gama radyasyonu, 2D jel elektroforezi, proteomik



University: Istanbul Kultur University
Institute: Institute of Graduate Studies
Department: Molecular Biology and Genetics
Programme: Molecular Biology and Genetics
Supervisor: Prof. Dr. Çimen ATAÇ
Degree Awarded and Date: MSc. – JULY 2025

ABSTRACT

RESPONSES TO SALINITY STRESS OF MUTANT SOYBEAN PLANTS

Türkan Hazal Turan

Abiotic stress factors, particularly salinity, pose serious threats to agricultural productivity in the context of global climate change and soil degradation. Among economically and nutritionally important crops, soybean (*Glycine max L.*) has received increased attention due to its sensitivity to salinity. Soybean is widely cultivated for its high protein and oil content, making it a key crop for human and animal nutrition as well as industrial uses such as biodiesel, pharmaceuticals, cosmetics, and food additives. However, the development of salt-tolerant soybean cultivars is essential for maintaining sustainable crop yields in saline-prone areas.

This thesis aims to evaluate the physiological, biochemical, and proteomic responses of salt stress in gamma-ray-induced soybean mutant lines. For this purpose, the parental lines Ataem-07 and Üstün were subjected to gamma radiation at doses of 150, 200, and 250 Gy, resulting in the development of mutant lines 150-43 and 405-1. Plants from these lines were exposed to salt stress using a 180 mM NaCl solution for 10 days under controlled growth conditions.

Physiological parameters such as shoot length, root length, and plant fresh biomass were measured. In addition, several biochemical markers were analyzed, including lipid peroxidation levels (via MDA assay), proline content, chlorophyll concentrations, and osmolyte accumulation. To investigate the protein-level responses, two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was employed for proteomic profiling.

The results revealed that mutant lines displayed greater tolerance to salinity stress compared to the parental lines. These plants exhibited smaller reductions in growth parameters, lower malondialdehyde (MDA) levels indicating reduced oxidative damage, and significantly increased proline accumulation. Additionally, the decrease in photosynthetic pigment concentrations was less pronounced in the mutant lines, indicating better maintenance of photosynthetic efficiency under stress.

Proteomic analysis further supported these findings by identifying several proteins with altered expression in response to salt stress.

In conclusion, this study demonstrates that gamma-induced mutant soybean lines exhibit enhanced tolerance to salt stress at multiple levels. The findings not only deepen our understanding of plant stress responses but also offer valuable insights for future breeding programs aimed at improving crop resilience to adverse environmental conditions. These mutant lines may serve as promising genetic resources in the development of new soybean varieties suitable for cultivation in salt-affected soils.

Keywords: Glycine max, salt stress, mutant lines, gamma irradiation, proteomics, 2D-PAGE



1. GİRİŞ

Kullanım alanlarının çok çeşitli olmasından dolayı soya bitkisi özellikle 20. yüzyıldan itibaren en çok ticareti yapılan gıda ürünlerinden biri olmuştur. Soya, keşfinin ilk zamanlarında hayvanlar için yüksek kaliteli yem ve insanlar için de önemli bir protein kaynağı olarak tüketilmiştir. Zengin besin içeriğinin keşfedilmesi ve buna bağlı olarak kullanım alanlarının genişlemesi soya tüketiminin artış göstermesine sebep olmuştur. Artan tüketim talebini karşılayabilmek amacıyla soyanın üretim alanları ve kapasitesi genişletilmiştir. Bu genişlemeye bağlı olarak soya üretiminde yeni zorluklar ortaya çıkmıştır (Pagano ve Miransari, 2016).

Bitki ıslah teknikleri, yüzyıllardır gıda üretiminde karşılaşılan sorunların çözülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bitki ıslahı, istenen özelliklere sahip tarım ya da süs bitkileri elde etmek için insan eliyle uygulanan eşleştirme ve seçme yöntemlerine verilen genel isimdir. Eski çağlarda bitki ıslahı fiziksel olarak dayanıklı bitkileri seçme yöntemiyle başlamış olup günümüzde genetik araştırmalarla, hibrit tohum üretimleriyle ve omik çalışmalarla devam ettirilmektedir (Collard ve Mackill, 2008). Küresel iklim değişiklikleri, nüfus artışı ve toprak kalitesindeki bozulmalar gibi faktörler, tarımsal üretimi tehdit eden çevresel baskıları her geçen gün artırmaktadır. Özellikle tarımsal alanların sınırlı olması ve mevcut alanlarda görülen tuzluluk, kuraklık ve ağır metal kirliliği gibi abiyotik stres faktörleri, dünya genelinde bitkisel üretimde ciddi verim kayıplarına yol açmaktadır. Bu nedenle, çevresel stres koşullarına dirençli bitki türlerinin geliştirilmesi, sürdürülebilir tarım açısından kaçınılmaz bir gereklilik haline gelmiştir. Bu bağlamda, dünya genelinde yaygın üretimi yapılan ve çok yönlü kullanım alanlarına sahip olan soya bitkisi (*Glycine max* L.), stres biyolojisi ve moleküler tarım araştırmalarında odak noktalarından biri haline gelmiştir (Pagano ve Miransari, 2016).

Soya, yüksek protein ve yağ içeriği sayesinde hem insan hem de hayvan beslenmesinde vazgeçilmez bir tarım ürünüdür. Ayrıca biyodizel, kozmetik, ilaç ve

plastik gibi sanayi dallarında da geniş uygulama alanı bulmaktadır. Soya tohumu, esansiyel amino asitler bakımından zengin içeriğiyle tam bir protein kaynağı olmasının yanı sıra, sağlık üzerine olumlu etkileri olan fitoöstrojenler ve izoflavonlar içermektedir. Bu nedenle, soyanın üretim kapasitesinin artırılması ve çevresel streslere karşı daha dayanıklı çeşitlerinin geliştirilmesi, gıda güvenliği ve ekonomik sürdürülebilirlik açısından kritik önemdedir.

Ancak soya, diğer birçok kültür bitkisi gibi tuzluluk stresine karşı oldukça hassastır. Toprakta biriken çözünmüş tuzlar, bitkinin ozmotik dengesini bozarak su alımını engeller ve iyonik stres oluşturarak toksik etkilere yol açar. Bunun sonucunda fotosentez oranı düşer, büyüme yavaşlar, yapraklarda kloroz ve nekroz gibi fizyolojik bozulmalar meydana gelir ve nihayetinde ürün verimliliği ciddi şekilde azalır. Bu olumsuz etkiler, özellikle kurak ve yarı kurak iklim kuşaklarında yer alan ülkelerde soya tarımının geleceğini tehdit etmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, ekilebilir tarım arazilerinin yaklaşık %20'si tuzluluktan etkilenmiş durumdadır. Bu oran, sulama yapılan alanlarda %50'ye kadar çıkmaktadır.

Tuzluluk stresine karşı bitkilerin geliştirdiği savunma mekanizmaları oldukça karmaşıktır. Bitkiler, hücre içi iyon dengesini korumak, ozmotik stresle başa çıkmak ve oksidatif hasarı azaltmak amacıyla çeşitli biyokimyasal ve moleküler tepkiler verirler. Bu tepkiler arasında prolin gibi ozmolitlerin birikimi, antioksidan enzim aktivitelerinin artması (SOD, CAT, APX), ısı şok proteinlerinin (HSP) ve geç embriyogenez bolluk proteinlerinin (LEA) sentezlenmesi ve transkripsiyon faktörlerinin (DREB, MYB, NAC, bZIP) aktive edilmesi yer alır. Son yıllarda gelişen omik teknolojiler sayesinde, bu yanıtların protein düzeyinde detaylı şekilde analiz edilmesi mümkün hale gelmiştir. Proteomik yaklaşımlar, çevresel streslerin etkisiyle ifade düzeyi değişen proteinlerin tespit edilmesini sağlayarak bitkisel adaptasyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sunmaktadır.

Geleneksel ıslah yöntemleriyle stres toleransı geliştirmek zaman alıcı ve sınırlı başarıya sahip olabilirken, mutasyon ıslahı, genetik varyasyonun artırılmasına yönelik etkili bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Gama ışını gibi fiziksel mutajenlerin

kullanıldığı bu yöntemle, bitkilerde rastgele ancak kalıcı genetik değişiklikler meydana getirilmekte, ardından bu varyantlar stres toleransı açısından fenotipik ve moleküler düzeyde taranarak yeni genotipler elde edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan Ataem-07 ve Üstün anaç hatları, gama radyasyonu ile 150, 200 ve 250 Gy dozlarında ışınlanarak mutasyonlara uğratılmış ve elde edilen yeni hatlar (150-43 ve 405-1) kontrollü koşullarda tuzluluk stresine karşı test edilmiştir. Bu çalışmada 150-43 ve 405-1 soya mutant hatlarının tuz stresine karşı gösterdikleri fizyolojik, biyokimyasal ve proteomik tepkilerin karşılaştırılması olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 180 mM NaCl konsantrasyonundaki tuz stres uygulamasında büyüyen bitkilerde; taze ağırlık, kök ve gövde boyu ölçümleri, lipid peroksidasyon düzeyleri (MDA analizi), prolin birikimi, fotosentetik pigment miktarları (klorofil a, klorofil b ve total klorofil), ozmolit düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca 2 boyutlu (2D) jel elektroforezi ve sıvı kromatografisi/kütle spektrofotometresi (LC-MS/MS) teknikleri ile bitkilerin proteomik yanıtları incelenmiş ve stres altında farklı ifade düzeyine sahip proteinler belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında ele alınan mutant soya hatlarının tuzluluk stresine karşı geliştirdiği yanıtlar çok yönlü olarak değerlendirilmiştir (Acar ve ark., 2022).

2. GENEL KISIMLAR

2.1 SOYA (*Glycine Max.*)

Soya fasülyesi (*Glycine max.*, L. Merr.) Fabaceae familyasından kökenlenen tek yıllık bir bitki olup 6.000 yıl önce Çin başta olmak üzere Doğu Asya'da (Çin, Kore, Japonya) keşfedilmiş bir baklagil çeşididir ve günümüzde 2500'den fazla alt türü olduğu bilinmektedir. (Kim ve ark., 2022). Bunların yanında ilk keşfedilmiş olan soya türünün yabani tip *Glycine soja* olduğu ve *Glycine max.* türünün *Glycine soja* türünden ıslah edildiği bilinmektedir *Glycine* cinsi, Soja ve *Glycine* olmak üzere iki alt türe ayrılır. (Zhang ve ark., 2022a).

Kuzey Amerika'ya ilk kez 18. yüzyılda getirilmiş ancak bu kıtada tarımı 20. yüzyılda önem kazanmıştır. Soya, başlangıçta yem bitkisi olarak kullanılmış, daha sonra yağ ve protein içeriğinden dolayı çok yönlü bir ürün olarak öne çıkmıştır. Soya, çok eski zamanlardan beri Çin ve Doğu Asya'da temel bir tarım bitkisi olarak yetiştirilmiştir. Geleneksel olarak Asya mutfağında ve tarım sistemlerinde çok yönlü bir ürün olarak kullanılmış olan bu bitki, 18. yüzyılda Avrupa ve Kuzey Amerika'ya tanıtılmıştır. Kuzey Amerika'ya ilk kez 18. yüzyılda getirilmiş olmasına rağmen bu kıtada tarımı 20. yüzyılda önem kazanmıştır. Avrupa'da uygun olmayan iklimsel koşullar ve toprak verimliliği nedeniyle sınırlı bir üretim elde edilebilmiştir ancak Kuzey Amerika'daki üretimi koşulların daha uygun olmasından dolayı gitgide yaygın hale gelmeye başlamıştır. Soyanın Kuzey Amerika'daki üretimi ticari önemi, 20. yüzyılın başlarında yağ üretimi ve hayvan yemi olarak kullanılmasıyla artmıştır. Kuzey Amerika'daki bu artışın en önemli sebepleri, transgenik çeşitler de dahil olmak üzere soyanın üretim kolaylığı, bileşimindeki moleküllerin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımının keşfedilmesi ve bu keşiflerin büyük çoğunluğunun Amerika Yiyecek ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanması olarak ifade edilebilir (Goyal ve ark., 2021).

1995 yılında yayınlanan bir araştırmaya göre, modern soya çeşitlerinde bulunan germplazmın %80'i, çok sınırlı bir atasal havuzdan gelmektedir (Lorenzen ve ark.,

1995). Günümüzde ilk sıradaki üretim yeri yıllık üretimin %39'u ile Brezilya olarak bilinmekte ve Brezilya'yı Amerika ile Arjantin takip etmektedir. Tablo 2.1'de ülkelerin yıllık üretim miktarları metrik ton ve küresel üretimin %'lik dilimi olarak gösterilmiştir (United States Department of Agriculture, 2024).

Tablo 2.11 Küresel soya üretim miktarları (United States Department of Agriculture, 2021)

Market	Küresel Üretimdeki Yüzdesi	Toplam Üretim (Metrik Ton)
Brezilya	%39	153 Milyon
A.B.D.	%29	113,27 Milyon
Arjantin	%12	48,21 Milyon
Çin	%5	20,84 Milyon
Hindistan	%3	11,88 Milyon
Paraguay	%3	11 Milyon
Kanada	%2	6,98 Milyon
Rusya	%2	6,8 Milyon
Ukrayna	%1	5,2 Milyon
Bolivya	%0,96	3,8 Milyon

Dünya çapında bu kadar yüksek üretim oranına sahip olan soyanın ürün kalitesini ve üretim kapasitesini azaltan negatif etmenler de bulunmaktadır. Değişen iklim koşulları ve giderek artan popülasyon soyanın gelişimi ve üretimi açısından sorunlar doğurmaktadır. Dünya nüfusunun ürün talebini karşılayacak kadar yüksek ekim alanları oluşturulması sorunlardan biridir ve her geçen gün yeni ekim stratejileri geliştirilmektedir. Bir diğer sorun ise değişen iklim koşulları ve iklim koşullarının beraberinde getirdiği stres faktörleridir. Stres, bitkiler için ürün verimliliğini düşüren veya tamamen sonlanmasına sebep olan başlıca nedendir ve birden fazla şekilde bitkilere etki etmektedir (Acar ve ark., 2022).

2.1.1 Soyanın Kullanım Alanları

Soya, ilk olarak Çin’de ıslah edilmiş olan soya, geniş kullanım alanına sahip olmasıyla bütün coğrafyalara yayılmış ve yetiştirilmeye başlanmıştır. Yüksek besin değerlerinin (%30-48 protein, %17-26 yağ, %20-25 karbonhidrat, vitaminler) keşfi ile dünya çapında soya üretimi son 75 yılda mevcut üretimin 15 katına ulaşmıştır (Akmalovna, 2022). Dünyadaki temel bitkisel protein kaynaklarından olan soya, besin endüstrisi başta olmak üzere birçok endüstride yüksek oranlarda kullanılmaktadır (Grassini ve ark., 2021). Soyanın besin değerleri (Tablo 2.2) kalite ve içerik bakımından diğer tek yıllık baklagillerden daha yüksektir ve besin içeriğinin ortaya konmasıyla birlikte gıda endüstrisinde kullanımı diğer endüstrilerde kullanımına göre büyük ölçüde artmıştır (Miransari, 2016; United States Department of Agriculture, 2021; Voora ve ark., 2024). Soyanın yıllık toplam üretiminin %85’i yiyecek ve yağ ürünleri olarak tüketilmektedir. Yiyecek ürünleri olarak ifade edilen ürünlerin %98’ini hayvansal yemler oluştururken yağ üretiminin de %95’i yenilebilir yağlardan oluşmaktadır (Goyal ve ark., 2021). Buna ek olarak soyanın toplam yiyecek kullanımının %2’sini oluşturan insansal besin olarak kullanımı büyük çoğunlukla soya proteini olarak kullanılmaktadır. Zira soya proteini, bütün esansiyel aminoasitleri içermesi ve bütün yaş gruplarında kullanıma uygunluğu dolayısıyla insansal besin olarak yetişkin protein tozlarından bebek mamalarına kadar geniş bir yelpazede kullanılabilir (Desta ve ark., 2022). Bu üretim-tüketim dengesi gözetildiğinde soyanın temel besin kategorisinde değerlendirilmesi ve üretim oranının korunmasıyla birlikte kullanım alanlarındaki dengenin de gözetilmesi dünya ekonomisi açısından önemli bir etken olmaktadır.

Soya, dünya çapında en çok yetiştirilen bitkilerden biri haline gelmesi ile fermente ve kurutulmuş gıdalarda (soya sütü, tofu, soya ezmesi, soya sosu vb.), endüstriyel olarak kâğıt, plastik, ilaç, mürekkep, boya, vernik, böcek ilacı, kozmetik ve biyodizel üretiminde kullanılabilir (Modgil ve ark., 2020).

Soya (*Glycine max.*), hem tarımda toprak sağlığını iyileştirme hem de ekonomik değeri yüksek ürünler sağlama açısından kritik bir bitkidir. *Bradyrhizobium japonicum* bakterileriyle simbiyotik ilişkisi sayesinde toprağa azot kazandırarak ekim süresince verimlilik ve hastalık kontrolü gibi avantajlar sağlar. Ancak protein yapısındaki kükürt içeren amino asit eksiklikleri ve tripsin inhibitörleri gibi faktörler dezavantaj sağlamaktadır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak amacıyla hem klasik hem de moleküler ıslah çalışmaları yürütülmüş ve büyük ölçüde giderilmiştir. Soya fasulyesi yağı, insan gıdasından biyoyakıt ve plastik gibi endüstriyel ürünlere kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir. Omega 3, 6 ve 9 yağ asitleri bakımından zengin olan soya yağı, modern biyoteknolojik yaklaşımlarla daha geniş uygulamalara uygun hale getirilmiştir. Özellikle CRISPR ve RNAi gibi gen düzenleme teknolojileri, yağ profillerinin geliştirilmesi ve ürün kalitesinin artırılmasında kullanılmaktadır (Anderson ve ark., 2019).

Tablo 2.2 Soya tohumunun besin değeri içeriği (*United States Department of Agriculture, 2021*)

Besin içeriği	Soyadaki miktarı	Besin içeriği	Soyadaki miktarı
Karbonhidrat	30,16 g	Mineraller	
Toplam lif	9,3 g	Ca	277 mg
Toplam şeker	7,33 g	Fe	15,7 mg
Protein	36,49 g	Mg	280 mg
Amino asitler		P	704 mg
Triptofan	0,591 g	K	1,797 g
Treonin	1,766 g	Na	2 mg
İzolösin	1,971 g	Zn	4,89 mg
Lösin	3,309 g	Cu	1,658 mg
Lizin	2,706 g	Mn	2,517 mg
Metionin	0,547 g	Se	17,8 µg
Sistin	0,655 g	Vitaminler	
Fenilalanin	2,122 g	Vitamin C	6 mg
Tirozin	1,539 g	Tiyamin	0,875 mg
Valin	2,029 g	Ribofilavin	0,87 mg
Arjinin	3,153 g	Niyasin	1,623 mg
Histidin	1,097 g	Pantotenik asit	0,793 mg
Alanin	1,915 g	Vitamin B ₆	0,377 mg
Aspartik asit	5,112 g	Toplam folat	0,375 µg
Glutamik asit	7,874 g	Toplam kolin	115,9 mg
Glisin	1,88 g	Betain	2,1 mg
Prolin	2,379 g	Vitamin B ₁₂	0 µg
Serin	2,357 g	Vitamin A	1 µg
Toplam lipid	19,94 g	Retinol	0 µg
Yağ asitleri		β-Karoten	13 µg
Toplam doymuş yağ	2,884 g	Vitamin E	0,85 mg
Miristik asit(C14:0)	0,055 g	Vitamin K	47 µg
Palmitik asit(C16:0)	2,116 g		
Stearik asit(C18:0)	0,712 g		
Toplam 2tekli	4,404 g		
Palmitoleik	0,055 g		
Oleik asit(C18:1)	4,348 g		
Toplam çoklu	11,255 g		
Linoleik asit(C18:2)	9,925 g		
Linoleik asit(C18:3)	1,33 g		
Toplam trans yağ	0 g		
Fitosterol	0,161 g		

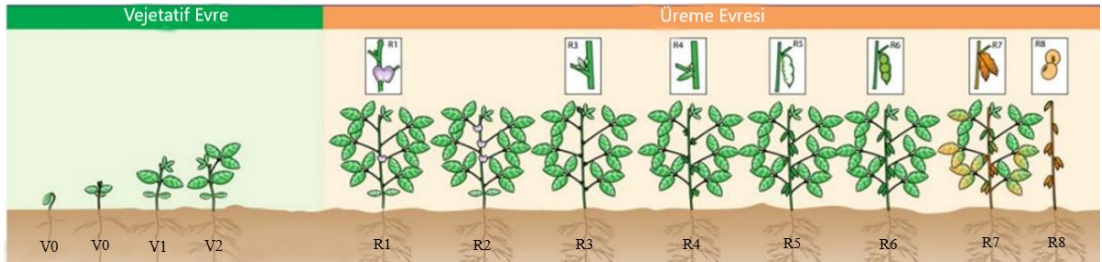
2.1.2 Soya Bitkisinin Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Soya, genel yapısı itibariyle kısmen sarılıcı dikey bir bitki olup ana gövdesinden dallanan yaprakları bulunmaktadır. Soya, kazık köklü bir bitkidir ve kazık kökten gelişen kuvvetli saçak köklere sahiptir. Ortalama bir soyanın gövde uzunluğu 30-200 cm arasında değişiklik göstermektedir. Boyuna bağlı olarak gövde kalınlığı da değişmekle birlikte 3 mm'den başlayan gövde kalınlığının bazı türlerde 22 mm'ye kadar arttığı gözlemlenmiştir (Akmalovna, 2022).

Soya bitkisinin fizyolojik gelişimi, bitkinin genetik yapısı ile çevresel şartların ve tarımsal uygulamaların neden olduğu etkilerin bir kombinasyonu olarak ortaya çıkmaktadır. Gelişim evrelerinin iyi bilinmesi ve doğru şekilde yönetilmesi üretim başarısı için kritik olduğu gibi bilimsel incelemeler için de anahtar bir özellik olmaktadır (Endres ve Kandel, 2015). Soyanın gelişim evreleri, vejetatif ve generatif olmak üzere iki ana başlıkta incelenebilmektedir. Vejetatif evre, tohumun çimlenmesi ile başlayıp yaprak ve gövde oluşumuna kadar devam eden gelişimi kapsamaktadır (Çırak ve Esenal, 2005). Vejetatif evre de kendi içinde 5 alt başlığa ayrılmaktadır. Birinci vejetatif evre; çimlenme evresidir. Soyanın ilk kök sisteminin oluşmasını ve 7-10 gün süren çimlenme evresini kapsamaktadır. Çimlenme evresinde olan bir soya bitkisinde fotosentetik bir aktivite görülmediğinden ışığa ihtiyaç duymamaktadır. İkinci vejetatif evre; kotiledon evresidir ve kotiledonların toprak yüzeyine çıkışını ifade etmektedir. Soya bitkisi bu evrede fotosentetik aktivitesine başlamıştır ancak besin ihtiyacını hala kotiledonlardan sağlamaktadır. Üçüncü vejetatif evre; ilk yaprak (V1) evresidir ve ilk üçlü yaprakların oluşumunu ifade etmektedir. Bu evrede sonra soya kendi besinini üretmeye başlar ve sonrasında da kendi besinini üretmeye devam eder. Dördüncü vejetatif evre; vejetatif yaprak (Vn) evresidir. Bitki her 3-4 günlük periyotta yeni bir üçlü yaprak üretmeye devam eder ve kök sistemi gelişerek saçak köklerin oluşumu başlar. Beşinci ve son vejetatif evre; nodülasyon evresidir. Soyada azot fiksasyonunun başladığı evre olarak bilinmektedir. Generatif evre ise çiçeklenme, bakla oluşumu ve tohum üretimi olmak üzere üç alt başlıktan oluşmaktadır ve soyanın üreme dönemini ifade etmektedir. Çiçeklenme evresi (R1), genellikle bitkinin alt

dallarında oluşan ilk çiçekler ile başlamaktadır ve çevresel koşullara duyarlı bir evredir. Tam çiçeklenme (R2) ile bu evre sona ermektedir. Bakla oluşumu evresi (R3), bitkinin bütün enerjisini tohum gelişimine aktarmaya başladığı evredir ve bu evrede ilk küçük baklalar oluşmaya başlamaktadır. Tohum üretimi evresi, baklaların içerisinde tohumların belirginleşmesi ve hacim kazanmasıyla başlamaktadır. Tohumun gelişimiyle birlikte bitkinin yapraklarında yaşlanma belirtileri görülmeye başlar. Bu evre baklaların kuruyarak renk değiştirmesiyle ve tohumların tamamen kurumasıyla sonlanmaktadır (Endres ve Kandel, 2015). Soyanın gelişim evreleri Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

Kullanılacak olan soya hattına ve stres koşuluna göre değişiklik göstermekle birlikte laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda stres uygulamasının genellikle erken vejetatif evrelerde yapılması gerekmektedir. İlerleyen evrelerde uygulaması yapılacak olan bir abiyotik stresin genomik, transkriptomik ve proteomik yanıtlarını görmek ilk evrelerde yapılan uygulamaya göre daha zorlayıcı olacaktır (Erol ve ark., 2023). Doğal ortamdaki stres koşullarının etkisi ise generatif evrelerde kendini göstermektedir. Çimlenme ve üreme arası geçen dönemde çevresel faktörlerin etkisi sağlıklı bir büyüme için elzemdir ancak üreme evresini etkilemeyeceğinden tolere edilebilir bir durumda olabilmektedir. Bunun yanı sıra üreme evresindeki çevresel özelliklerin stabilitesi üreme kalitesini ve bitki fizyolojisini yüksek oranda etkilemektedir. Özellikle sıcaklık ve toprak nemi bütün üreme sistemini etkilemekte ve elverişsiz çevresel koşullar görüldüğü takdirde ürün veriminde düşüşe sebep olabilmektedir (Alsajri ve ark., 2022).



Şekil 2.1 Soya (Glycine max.) büyüme evreleri (Carneiro, ve diğerleri, 2019)

2.1.3 Soyanın Genomik Özellikleri

Soya bitkisinin genomu, 2010 yılında Schmutz ve ark. tarafından dizilenmiştir ve 1,1 milyar baz çiftinden, 20 çift kromozomdan ve 46,430 protein kodlayan gen bölgesinden oluşmaktadır. Genomik yapısı itibariyle diğer tek yıllık baklagillere (*Fabaceae*) kıyasla nispeten daha küçük bir genoma sahiptir (Schmutz ve ark., 2010; Song ve ark., 2016). Dizileme işlemi Williams 82 hattı referans alınarak yapılmıştır ve dizileme sonucunda soya bitkisine ait referans bir genom bilgisi elde edilmiştir. Williams 82 referans genom dizisi, soyanın 60 milyon yıl içerisinde en az iki kez tüm genom duplikasyonu (WGD) geçirdiğini göstermektedir. Duplikasyon, soyanın genlerinin yaklaşık %75'inin çoklu kopya halinde bulunması ile sonuçlanmıştır. Aynı zamanda tüm genom duplikasyonu sonucu paralogların %50'sinin fonksiyonlarının kopya genler arasında bölüştürülmüş hale geldiği tespit edilmiştir. Bunun dışında duplike olmuş genlerin sadece küçük bir bölümünün işlevsiz hale geldiği de görülmektedir. Bu incelemeler sonucu, tüm genom duplikasyonlarının regülatör düzeyde olabileceği sonucuna varılmıştır (Roulin ve ark., 2012). Soya araştırmaları için bu olay bir dönüm noktası olmuş ve etkili genom çalışmalarının hızlanmasına sebep olmuştur. Soyanın genomu incelenmeye devam edildikçe üretim verimliliği de doğru orantılı olarak artmıştır (Zhang ve ark., 2022b).

2010 yılında Williams 82 hattının dizilenmesiyle birlikte artan araştırmalar ve raporlar sonucunda bir veya birkaç referans genom verisinin bütün türle ilgili genetik çeşitlilik verisine ulaşılamayacağı anlaşılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu tüm genomun %80'lik bir kısmının nükleusta bulunduğu ve yüksek oranda korunduğu görülmüştür. Genomun %20'lik kısmının adaptasyonu sağlayan gen bölgelerinden oluştuğu ve genetik çeşitliliğin de bu bölgelerde meydana gelen değişimlerden kökenlendiği tespit edilmiştir (Li ve ark., 2014; Liu ve ark., 2020). Bu çalışmayla birlikte genetik çeşitliliğin korunması ve çevresel adaptasyonun iyileştirilmesi için stratejik çalışmalara başlanmıştır. Bu kapsamda ürün verimliliğinin artırılması amacıyla çevresel stres faktörlerinin incelenmesi ve genetik mekanizmalarının çözülmesi ihtiyacı doğmuştur. Çevresel stres faktörlerinin, bu faktörlerin bitki türlerine

etkilerinin ve strese karşı verilen yanıtların genetik olarak incelenmesi ve ilgili yolların tespitiyle adaptasyonu ve ürün verimliliğini artırıcı adımları atmak mümkün olmuştur (Liu ve ark., 2020).

2.2 BİTKİDE STRES FAKTÖRLERİ

İlk olarak 1936 yılında Hans Selye tarafından ortaya atılan stres kavramı, elverişsiz ve kısıtlı çevresel ortam olarak tanımlanmıştır (Lichtenthaler, 1998). Ancak yapılan araştırmalarla birlikte 60 yılda stres kavramının kapsamı ve tanımı değişiklik göstermiş ve biyolojik anlamda stres, canlı organizmanın homeostazisini tehdit eden bütün çevresel etkenlere karşı verdiği tepki olarak tanımlanmaya başlamıştır (Kültz, 2020). Bitkisel anlamda stres ise bitkinin ürün verimliliğini düşüren çevresel faktörlerin tamamı olarak tanımlanabilmektedir. Bitkiler, aynı anda bir veya birden fazla stres faktörüne maruz kalabilmekte ve aynı anda birden fazla faktöre karşı tolerans geliştirmek zorunda kalabilmektedirler (Acar ve ark., 2022).

Tanımı itibariyle stres kavramı zararlı bir etki olarak görülebilse de bitkinin strese verdiği yanıtlara göre bitkilerin daha gelişmiş özellikler kazanmasına katkı da sağlayabilmektedir. Çünkü stres sonucu organizmada meydana gelen değişimler ve stres yanıtları geçici olabileceği gibi kalıcı olarak bitki fizyolojisinde değişiklik meydana getirmiş de olabilmektedir. Bu değişiklikler strese karşı bitkiye direnç kazandıracak değişimler ise bitkinin daha gelişmiş ve adaptif bir hale gelmesine katkı sağlayacaktır. Bunlara ek olarak çevresel bir faktörün stres olarak değerlendirilmesi durumu, çalışılan bitki türüne ve diğer çevresel etmenlere göre değişiklik gösterebilmektedir. Stres, fizyolojik veya kimyasal olaylarda bazı değişimlerin veya hasarların meydana gelmesine sebep olan biyotik veya abiyotik faktörler olarak tanımlanabilmektedir (Acar ve ark., 2022).

Bitkide stres biyotik veya abiyotik etmenlerle ortaya çıkabilmektedir. Biyotik stres faktörleri; patojenler, yabancı bitkiler, böcekler, mikroorganizmalar ve hayvanlar olarak

gruplandırılmıştır. Abiyotik stres faktörleri ise; kuraklık, tuzluluk, ekstrem sıcaklık, kuvvetli ışık, ultraviyole ışık (UV), ağır metaller, yetersiz oksijen ve topraktaki iyon dengesizliği olarak gruplandırılmıştır. Stres faktörleri bitki üzerinde tahrip edici veya yıkıcı etkilere sebep olmaktadır. Bitkide morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal birçok değişime sebep olan stres faktörleri kontrol altına alınmadığı ve tolerans veya direnç mekanizmaları geliştirilmediği takdirde üretim ve hasat açısından dünya çapında bir tehdit oluşturmaktadır. Strese karşı oluşturulan yanıt, kendi kendine oluşup doğal seçim ile bitkide dirençli özellik haline gelebildiği gibi laboratuvar ortamında belirli mutagenler kullanılarak da dirençli özellik kazandırılabilen ve moleküler ıslah çalışmaları yürütülebilmektedir (Lin ve ark., 2022).

Stres faktörlerinin moleküler düzeydeki en önemli belirtisi, oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin hızlanmasıdır (Hasanuzzaman ve Fujita, 2022). Stres, bitki hücresinde hücre duvarı, hücre zarı veya hücre iskeletinde bulunan gen anlatım ürünleri ile algılanmaktadır. Stres, dış çevrede bir konsantrasyon veya basınç değişimi olarak kendini gösterebilir ve algılandığı andan itibaren bitkide oksidatif strese sebep olarak stres türüne göre değişen farklı yollar ile kendini göstermektedir. Bu yollar; ROS bağımlı sinyal yolları, salisilik asit (SA) sinyal yolağı, jasmonat (JA) sinyal yolağı, etilen sinyal yolağı, kalsiyum (Ca^{+2}) sinyal yolağı, mitojenle aktiveleşen protein kinaz (MAPK) yolağı, nitrik oksit (NO) sinyal yolağı, brassinosteroid (BR) sinyal yolağı, oksin (IAA) sinyal yolağı ve giberellin (GA) sinyal yolağı olarak gruplandırılabilir (Naz ve ark., 2024; Mullineauz ve ark., 2018). Stres, bu yollar üzerinden etki edebilmektedir ve transkripsiyon faktörlerinin ve gen anlatım ürünlerinin aktif rol aldığı bu yollar proteomik olarak anlatım miktarlarında değişimlere sebep olmaktadır (Miransari, 2016).

2.2.1 BİYOTİK STRES FAKTÖRLERİ

Bitki biyolojisinde iki alt başlıkta incelenen stres faktörlerinin başlıklarından biri biyotik stres faktörleri olarak bilinmektedir. Biyotik stres faktörleri, ana başlıklarıyla; patojenler, yabani bitkiler, böcekler, mikroorganizmalar ve hayvanlar olarak bilinmektedir. Özel olarak patojenler; bakteri, virüs, mantar, nematod vb. olarak ayrılmaktadır ve bitki sistemlerinde yüksek oranda hasarlara sebep olabilmektedirler (Tripathi ve ark., 2022). Soya bitkisinde hasara sebep olan 200'den fazla patojen olduğu bilinmektedir ve bu patojenlerin bitkide yarattığı hasarlar hastalık olarak adlandırılmaktadır (Lin ve ark., 2022). Soyada görülen hastalıklar incelendiğinde, hastalıkların 29 tanesi mantar, 6 tanesi bakteri, 18 tanesi virüs, 6 tanesi nematod ve 3 tanesi mikoplazma kaynaklı olarak rapor edilmiştir ve çoğunlukla hastalıkların bitkinin kök sisteminde başlayarak organizmaya yayıldığı görülmektedir (Akem, 1996; Roth ve ark., 2020).

Biyotik stres faktörleriyle başa çıkmak için genellikle kimyasal ve ilaç uygulamaları kullanılmaktadır. Ancak kimyasal kullanımı hem yüksek maliyetli hem de çevre kirliliğine sebebiyet veren bir yöntemdir. Kimyasal veya ilaç kullanımı yerine strese dirençli hatların veya çeşitlerin geliştirilmesi veya ıslah edilmesi maliyet ve çevre sağlığı açısından daha efektif bir yöntem olmaktadır. Bitki türlerinin ıslahı ile strese dirençli bitki türlerinin geliştirilmesi için klasik yöntemlerin yanısıra günümüzde moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Moleküler ıslah yöntemlerinin kullanılması belirli hastalık ve patojenlere karşı bitkinin dayanıklılık sağlaması açısından çok önemlidir. Kantitatif özelliklere ait lokusların (QTL) tanımlanması moleküler markörlerin kullanımına olanak tanımıştır (Tripathi ve ark., 2022). QTL nicel özellik lokusları olarak çevrilmektedir ve bir özelliğe katkıda bulunan genlerin bulunduğu çoklu bölgeleri ifade etmektedir. Hem kalıtsal hem de çevresel etkenlerle varyasyon gösteren fenotipik özelliklere odaklanmaktadır ve stres çalışmalarında önemli bir yer edinmektedir (Boopathi, 2020). Biyotik faktörler kendi başlarına bitki organizmasında strese sebep olabileceği gibi çevresel faktörlerin de etkisiyle koordine bir şekilde de strese sebebiyet verebilmektedirler (Roth ve ark., 2020).

2.2.2 ABİYOTİK STRES

Abiyotik stres faktörleri, bitkilerin büyüme ve gelişmelerini engelleyen yüksek tuzluluk, kuraklık, aşırı sıcaklık, soğuk hava, toprakta besin eksikliği ve toksik iyonlar olarak ifade edilebilmektedir ve büyük çoğunluğu iklimsel dengesizliklerle ilişkilidir (Levitt, 1980). Abiyotik stres faktörleri, bitkilerin ürün verimliliğini %50 azaltmakla birlikte bitki türlerinin farklı coğrafyalarda nasıl görüldüğüne yani çeşitliliğine de etki etmektedir. Abiyotik stres faktörleri, artan nüfusla birlikte her geçen gün daha da büyük bir tehdit haline gelmektedir. Dünyadaki tarım alanlarının ve tarım ürünlerinin büyük bir çoğunluğunun (yaklaşık %90) abiyotik stres faktörlerine duyarlı olması yıllık %70'e varan verim kayıplarına sebep olmaktadır (Erol ve ark., 2023; Zhang ve ark., 2022a). Bitkinin bulunduğu çevredeki bütün koşullar değerlendirilerek o koşullardan en az birinin elverişsiz olmasıyla bitkide stres ve strese bağlı olarak stres yanıtı meydana gelmektedir. Stres koşulları altında bitkilerin geliştirdikleri birden fazla savunma mekanizması mevcuttur ve stres koşuluna özel olarak değişebilmektedir. Bu savunma mekanizmalarına genel olarak 'stres direnci' ya da 'stres toleransı' denilmektedir (Acar ve ark., 2022).

Stres koşullarına dirençli bitkiler, o koşullara adaptasyon sağlamış türler olarak da tanımlanabilmektedir. Adaptasyon doğal yollarla geliştirilebileceği gibi moleküler ıslah mekanizmalarıyla da bir bitki türünün adaptasyon sağlamasını sağlamak mümkündür. Adaptasyon mekanizması, bitki organizmasında birden fazla farklı şekilde çalışabilmekte ve farklı adaptasyon şekillerini ortaya çıkarmaktadır. Genel anlamıyla sınıflandırıldığında; morfolojik, fizyolojik, genetik ve moleküler adaptasyonlar olarak sınıflandırılacak adaptasyon çeşitleri mevcuttur (Zandalinas ve ark., 2018).

2.2.2.1 KURAKLIK STRESİ

Kuraklık stresi; bir diğerk adıyla ‘su stresi’dir ve fiziksel veya fizyolojik kuraklık olarak iki alt grupta incelenebilmektedir. Fiziksel kuraklık, bitkinin yetiştiğı ortamda suyun kıt olması anlamına gelmektedir. Fizyolojik kuraklık ise donma, mineral eksikliği veya fazlalığı sebebiyle bitkinin yeterli su ve mineral ihtiyacını karşılayamaması olarak tanımlanmaktadır (Çırak ve Esendal, 2006). Kuraklık stresi, bitki hücrelerinin su potansiyelinin düşmesi, stomaların kapanması ve buna bağılı olarak azalan fotosentez ve ozmotik dengenin bozularak metabolik aktivitelere zarar vermesi şeklinde kendini gösterebilmektedir.

Bitki türlerine göre değışmekle birlikte doğada kuraklık stresine toleranslı olma durumu görülebilmektedir. Genellikle su biriktiren ve su koruyan bitki türlerinde, stres koşuluna maruz kalma süresi ve maruz kalınan kuraklık stresinin yoğunluğuna göre değışen bir toleranstan bahsetmek mümkün olmaktadır (Jaleel ve ark., 2007).

Kuraklık stresine tolerans ve adaptasyon gösterilmesi için geliştirilmiş bazı mekanizmalar da araştırmalara konu olmaktadır. Bitki biyolojisinde model organizmalardan biri olan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde gerçekleştirilen çalışmalarla kuraklık stresinin moleküler yanıt mekanizmaları araştırılmıştır ve ABA bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki ayrı yolak grubu içerdikleri görülmektedir (Dias ve ark., 2012). Absisik asit (ABA) bitkilerin büyüme, gelişme ve stres yanıtı mekanizmalarının düzenlenmesinde görev alan bitkisel bir hormondur ve sirkadyen ritim ile doğrudan ilişkili olarak çalışmaktadır. Özellikle kuraklık stresi ve tuz stresi üzerine yapılan çalışmalarda adaptasyon mekanizmaları üzerinde önemli bir rolü olduğu görülmektedir. Ana etki mekanizmasının, stres koşulunda anlatımının artmasıyla stomalar üzerinden çalıştığı tespit edilmiştir (Yuan ve ark., 2020).

Soyada yürütölen kuraklık çalışmalarında ise *Arabidopsis thaliana*’dan elde edilen bilgiler ile tespit edilen gen bölgeleri başlangıç noktası olmuştur. İlk olarak soyada kuraklık stresi ile ilişkili gen bölgeleri incelenmiş ve tespit edilen 354 gen bölgesinden 79 tanesinin halihazırda *Arabidopsis thaliana*’da tespit edilen kuraklık ilişkili gen

bölgelerinin ortoloğu olduğu görülmüştür. Tespit edilen 354 gen bölgesinden 79 adet ortolog gen bölgesinin 38 tanesinin belirgin bir şekilde ayrı olan metabolik yolların bir üyesi olduğu görülmüştür. Çalışma tasarısı yapılırken birbirinden farklı metabolik yollara ait 13 adet ayrı gen bölgesi seçilmiş ve qPCR validasyonu için çalışmalara başlanmıştır. Yapılan bu çalışma sonucu gen ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve *Arabidopsis thaliana* ile *Glycine max.* türlerinin her ikisinde de kuraklık stresine verilen cevapların ortolog bölgelerle korunduğu tespit edilmiştir (Dias ve ark., 2012).

Ayrıca bu konuda yapılan çalışmalarda kuraklık stresi uygulanmış soya bitkisinde yapılan proteomik çalışmalarda ABA mekanizması dışında kuraklık stresine yanıt ve direnç mekanizmasının fotosentez mekanizması ve oksidatif stres mekanizmasını üzerinden etki ettikleri tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas ve dirençli türler arasında yapılan bu çalışmada proteomik inceleme amaçlı 2D jel elektroforezi yöntemi kullanılmış ve spot analizi ile sonuç elde edilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak toplam 20 adet özgün protein spotu tespit edilmiş ve bu spotlar kütle spektrometresi yöntemiyle tespit edilerek proteomik analizler mümkün olmuştur (Yahoueian ve ark., 2021).

2.2.2.2 EKSTREM SICAKLIK (SICAK/SOĞUK) STRESİ

Soya türlerinde görülen bir diğer abiyotik stres faktörü ise ekstrem sıcaklık stresidir. Soyanın büyüme, gelişim ve üreme dengesinin oluşabilmesi için büyümeye elverişli sıcaklıklarda (22-24°C) yetiştirilmesi gerekmektedir. Sıcaklıkta meydana gelecek bir artış veya düşüş ürün verimliliğini negatif olarak etkileyebilmektedir. Küresel ısınmayla birlikte dünyayı tehdit eden sıcaklık artışları bitkilerde de stres faktörü olarak etki etmekte ve ürün verimini düşürmektedir. Son 125 yılda dünya yüzey sıcaklığında 0,8°C bir sıcaklık artışı görüldüğü tespit edilmiş ve raporlanmıştır. Önümüzdeki 75 yıl içerisinde de dünya yüzey sıcaklığının 1,4-5,8 °C artış göstereceği öngörülmektedir (Acar ve ark., 2022). Bu durum soyada sıcaklık stresini oluşturmaya

sebebiyet verebileceğinden dolayı öngörülen koşullara toleranslı hatların seleksiyonunun yapılması önem kazanmaktadır.

Ekstrem sıcaklık koşullarının stres olarak algılanması için bitkinin yüksek veya düşük sıcaklığa bir periyoda yayılacak şekilde maruz kalması gerekmektedir. Zira bitkiler kısa süreli ekstrem koşullara karşı vereceği stres yanıtı ile anlık sıcaklık değişimlerine tolerans gösterebilmektedirler (Nahar ve ark., 2016).

Yükseklik sıcaklık stresine vejetatif evredeyken maruz kalındığında bitki yapısında daha yüksek ve geri dönüştürülemeyen hasarlar görülmektedir. Vejetatif evrede strese maruz kalmış bitkilerde bitkilerin generatif evreye geçemedikleri görülmektedir. Aynı zamanda vejetatif evrede strese maruz kalan bitkilerin sıcaklık stresi dışındaki diğer biyotik ve abiyotik stres faktörlerine de hassas hale geldikleri tespit edilmiştir (Jianing ve ark., 2022).

2.2.2.3 AĞIR METAL STRESİ

Ağır metaller, biyolojik organizmalarda yüksek oranda tahribata toksik ajanlardır ve hava, su, toprak kirliliklerine sebep olmaktadır. Özgül ağırlığı 5 g cm^3 'ten ve atom numarası 20'den büyük olan metaller ağır metal olarak tanımlanmıştır ve abiyotik stres faktörü olarak bilinmektedirler. Ancak bitkinin büyüme ve gelişimi için gerekli olan iyonların bazıları (Fe, Zn, Cu, Mo, Ni) da ağır metaller kategorisinde olduğundan ağır metaller bitki biyolojisinde zorunlu ağır metaller ve zorunlu olmayan ağır metaller olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Zorunlu olmayan ağır metaller başlı başına bir stres faktörü olarak değerlendirilirken zorunlu ağır metallerin stres faktörü olarak değerlendirilmesi için yüksek konsantrasyonlarda maruziyet gerekmektedir. MTP (metal tolerance protein) olarak bilinen metal direnç proteinleri yardımıyla metal stresine karşı bitki organizmalarının direnç oluşturduğu ve mineral alımlarının arttığı gözlemlenmiştir (Acar ve ark., 2022; Turhan ve ark., 2023).

Ağır metaller aynı zamanda toprak yapısında, toprağın pH ve mineral dengesinde bozulmalara sebep olduğundan dolayı olarak da strese ve stres yanıtı oluşmasına yol açabilmektedir. Ağır metal stresi, bitkide ROS oluşumu tetiklemekte ve bitki hücrelerinde oksidatif hasar oluşmasına sebep olmaktadır. Oksidatif stres bitkilerde karbonhidrat yapısının bozulmasına ve bitkide stresin etkilerinin büyümesine sebep olmaktadır (Shaffique ve ark., 2023).

2.2.2.4 TUZ STRESİ

Dünya yüzeyinin %6'sının, ekili tarım arazilerinin %20'sinin ve sulanan arazilerin %50'sinin tuzluluktan negatif etkilendiği bilinmektedir ve yaşanan tahıl kayıplarının önlenmesi için tuz stres mekanizmasının anlaşılması ve tuz stresine dirençli bitki türlerinin ıslah edilmeleri gerekmektedir. Hızla artan dünya nüfusunun yiyecek ihtiyacının karşılanması için temel tahıl ürünleri üretiminin önümüzdeki 25 yıl içerisinde mevcut kapasitesinin üzerine %87 artırılması gerektiği öngörülmektedir. Tüketim ihtiyacının karşılanması için bitkilerde stres faktörlerinin etkilerinin azaltılması ve strese dirençli bitki türlerinin ıslah edilmeleri gerekmektedir. (Rengasamy, 2010; Acar ve ark, 2022).

Toprakta tuz birikiminin kötüleşen iklimsel koşullara bağlı olarak farklı şekillerde ortaya çıkabildiği bilinmektedir. Toprakta tuzluluk oluşmasının öne çıkan sebepleri; atmosferik birikim, deniz seviyelerinde görülen artış, temiz su kaynaklarına karışan tuzlu su kaynakları ve en önemlisi de küresel ısınmanın bir sonucu olarak artan yüzey sıcaklık ve buharlaşma değerleri olarak görülmektedir. Ayrıca jeokimyasal süreçlerin ve antropojenik aktivitelerin de topraktaki tuzluluk seviyelerinin artmasına etki gösterdikleri bilinmektedir (Balasubramaniam ve ark., 2023). Antropojenik aktiviteler genellikle tarım uygulamalarında yapılan hatalardan kaynaklanmaktadır ve hatalı sulama sistemleri, yetersiz drenajlar, gübreleme çalışmaları şeklinde listelenebilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu tuzluluk oranı en yüksek olan iklimler kurak ve yarı kurak iklimler olarak belirlenmiştir. Tuzlu topraklar, sırasıyla

yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek pH ve yüksek sodyum konsantrasyonu ile karakterize edilen tuzlu, alkali ve tuzlu-alkali toprakları içermektedir (Singh, 2021). Özellikle NaCl doğada en sık olarak karşılaşılan çözünmüş tuz türüdür ancak toksik seviyelerde tuz birikimine sebep olan başka tuz formları da bulunmaktadır. Çeşitli sülfat grupları, klorürler, bikarbonatlar, karbonatlar ve boratlar bu tuz formlarından bazılarıdır (Daliakopoulos ve ark., 2016). Toprak ve sudaki çözünmüş tuz miktarının artışı ile ekin verimliliğinde düşüş gözlemlenmektedir.

Tuz stresi; bitkinin büyüme ve gelişimini olumsuz etkileyen en önemli stres faktörlerinden biridir. Toprakta toksik seviyelerde sodyum birikimi oluşmasına sebep olmaktadır. Hücre içi ozmotik basınç dengesinin bozulmasına Ayrıca hücrenin iyon homeostazisini bozması dolayısıyla ciddi fizyolojik ve morfolojik bozulmalara sebep olmaktadır. Hücre içi ozmotik basınç dengesinin bozulması toksik seviyelerde sodyum birikimi oluşmasına ve ozmotik strese yol açmaktadır. Ozmotik stres, çözünmüş tuzların yoğunluğunun artmasıyla meydana gelmektedir. Bitki köklerinin pasif olarak suyu almakta zorlanması anlamına gelmektedir. İyonik stres ise zararlı iyonların bitki hücrelerinde birikerek önemli besinlerin alımının engellenmesi anlamına gelmektedir. Fizyolojik etkiler; azalan fotosentez, düşük turgor basıncı, hormonal değişiklikler olarak kendilerini göstermektedir (Ondrasek ve ark., 2022).

Bitki organizmalarına negatif etki eden en tahrip edici stres faktörlerinden biri tuz stresidir ve her yıl tahıl kaybı yaşanmasına sebep olmaktadır. Tuzluluğun tarıma etkisi, bölgelere göre değişiklik gösterebilir. Bu etkiler, iklim koşulları ve jeolojik yapıya bağlı olarak farklılık gösterebilir. Bu durum, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde, gıda üretimi ve toprak yönetimi açısından ciddi bir sorun teşkil etmektedir (Reddy ve ark., 2017; Rasheed ve ark., 2022).

Soya bitkisi, tuz stresine karşı karmaşık ve çok katmanlı adaptasyon mekanizmaları geliştirmiş bir bitki türüdür. Tuz stresi, ozmotik stres, iyon dengesizliği ve oksidatif stres gibi sorunlar yaratarak bitki metabolizmasını derinden etkiler; su potansiyelinin azalması, turgor kaybı, fotosentez oranının düşmesi, büyüme geriliği ve tohum çimlenmesinin baskılanması gibi olumsuz etkiler ortaya çıkar. Soyada bu stresin

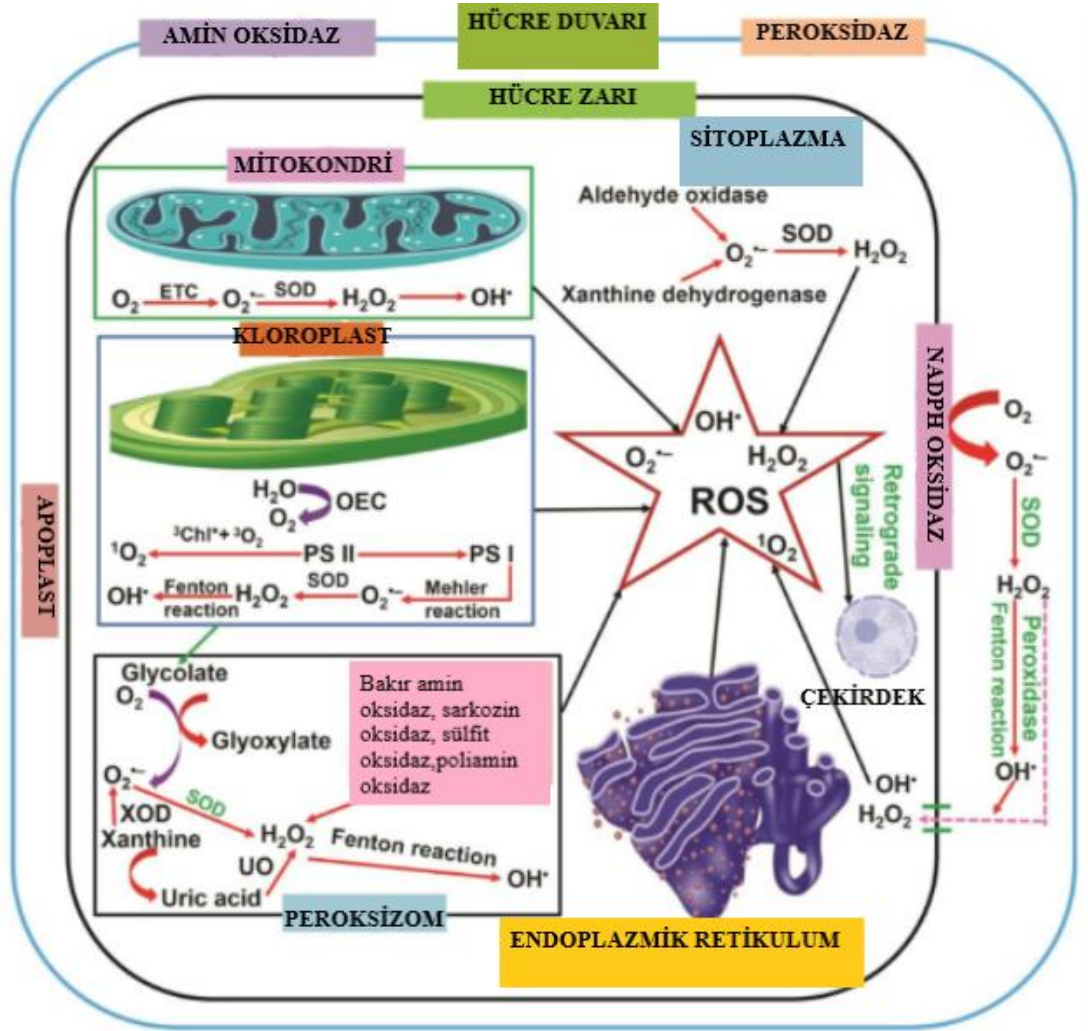
etkilerini minimize etmek için bir dizi fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yanıt devreye girer.

Bitki; prolin, glisin betain, şekerler, poliaminler ve ozmolitler gibi ozmotik düzenleyiciler biriktirerek hücre içi su dengesini korur. Prolin, bir amino asit türü olup, bitkilerde hem protein yapı taşlarından biri olarak hem de abiyotik stres koşullarında koruyucu bir molekül olarak önemli işlevlere sahiptir. Prolin, özellikle kuraklık, tuzluluk, aşırı sıcaklık ve ağır metal stresi gibi çevresel streslere karşı bitkilerin hayatta kalma stratejilerinde kritik rol oynar (Kausar ve Komatsu, 2022). Ozmolit, bir çözeltideki çözünen madde veya moleküllerdir. Bir çözeltideki toplam madde miktarı yani toplam konsantrasyon ise ozmolalite olarak ifade edilmektedir. Ozmolalite, hücre içi ve hücre dışı arasındaki su dengesini yani ozmotik basıncı kontrol eden bir faktördür ve ozmotik basınca bağlı olarak hücre sel su alımını da etkilemektedir. Ozmolalitenin fazla olması su alımının engellenmesine ve hücre sel işlevin bozulmasına sebep olabilmektedir (Kitiwan ve ark., 2021; Alhuthali ve ark., 2021).

Bitki hücrelerinde tuz stresi birçok farklı yolak üzerinden etki edebilmekte ve bu yollar çeşitli stres yanıt mekanizmalarını aktive edebilmektedir. Tuza aşırı duyarlılık (SOS) yolları bunlardan biridir ve bitkilerde iyon homeostazı sağlamak ile görevlidir. Üç temel bileşenden oluşmaktadır ve bunlar; hücre zarında Na^+/H^+ antiportörü olarak görev alan SOS1, protein kinaz ve Ca^{2+} sensörü olarak görev alan SOS2 ve SOS3 olarak bilinmektedir. SOS yolağı sayesinde hücrede strese bağlı olarak meydana gelen iyon birikiminin toksik seviyelere ulaşması engellenir (Abudureyimu ve Aksoy, 2019).

Tuz stresine bağlı olarak oluşturulan bir diğer yanıt mekanizması ise ROS yolağı üzerinden oluşmaktadır. ROS molekülleri; lipid, protein, DNA ve RNA moleküllerinde oksidatif hasar oluşmasına sebep olmaktadır. ROS molekülleri hücrede farklı yerlerde ve birçok farklı yolak üzerinden oluşabilmektedir. Şekil 2.2’de ROS moleküllerinin oluşum mekanizmaları, üretim yerleri ve türleri gösterilmektedir (Kesawat ve ark., 2023). Stresin algılanmasıyla birlikte hücre duvarından başlayarak sitoplazmaya kadar devam eden enzimatik reaksiyonlar sonucunda ROS molekülleri oluşmaktadır.

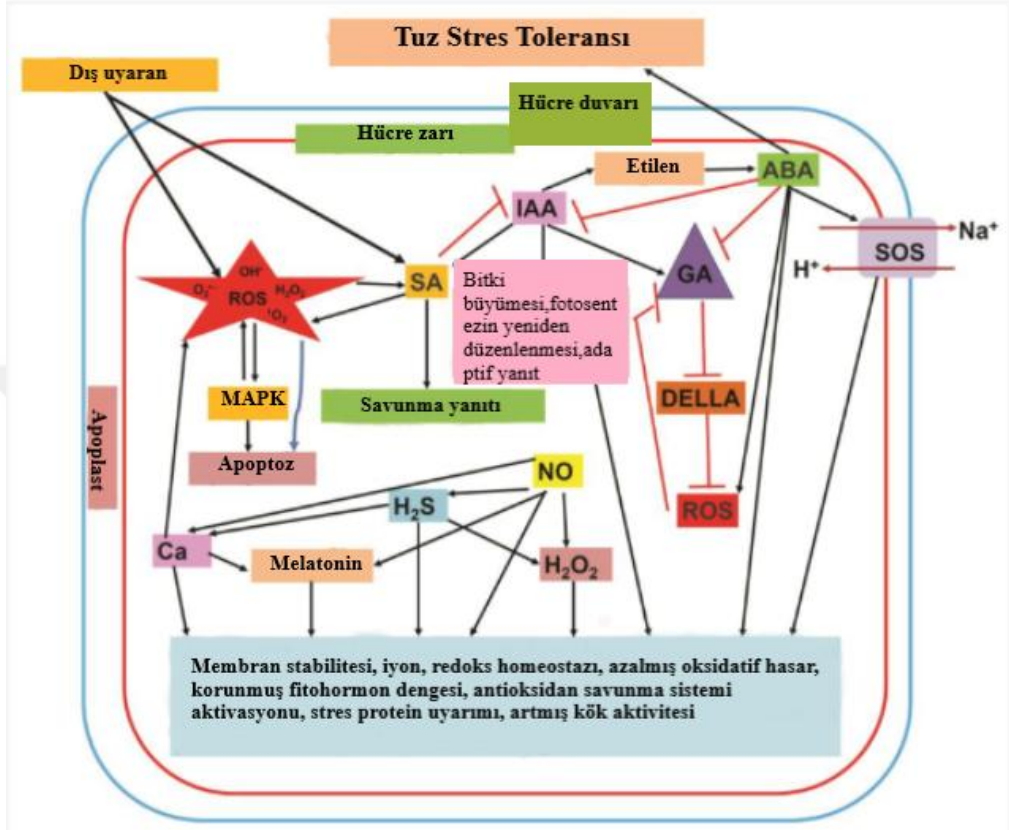
Hücrede meydana gelen ROS artışına karşı süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) gibi antioksidan enzimler ve glutatyon, askorbik asit gibi düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar devreye girmektedir. ROS moleküllerinin fazla anlatımı oksidatif strese bağlı olarak apoptoza yol açtığından, stres durumunda antioksidan mekanizmaların devreye girmesi apoptozu engellemek açısından bitkide hayati önem taşımaktadır. Kloroplastlar ROS üretiminin en fazla görüldüğü bölgedir ve elektron taşıma sistemi ile fotosistem I ve II’de ROS moleküllerinin açığa çıktığı bilinmektedir. Bu durumda stres altındaki bitkide ROS moleküllerinin artması solunum ve fotosentez mekanizmalarındaki bozulmalarla ilişkilendirilebilmektedir (Kesawat ve ark., 2023).



Şekil 2.2 Bitkilerde ROS oluşum mekanizması ve üretim yerleri (Kesawat ve ark., 2023) SOD: Süperoksit dismutaz, XOD: Ksantin oksidaz, ROS: Reaktif oksijen türleri, ETC: Elektron taşıma zinciri, PS I: Fotosistem I, PS II: Fotosistem II, NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat, O₂: Oksijen, H₂O₂: Hidrojen peroksit, -OH: Hidroksil, UO: Ürat oksidaz, O₂⁻: Süperoksit, ¹O₂: Singlet oksijen

Tuz stresinin etki ettiği temel yollardan bir diğeri de hormonal yanıt yollarıdır. Tuzluluk gibi çevresel stresler, bitkilerde önemli bir stres fitohormonu olan absisik asit (ABA) birikimine neden olur. Bitkiye özgü serin/treonin kinaz olan SNF1 ile ilişkili kinaz 2 (SnRK2). abiyotik streslere karşı bitkilerin cevaplarında rol oynarlar. SnRK2'ler bitkilerde abiyotik stres sinyali iletiminde rol oynayan enzimler olup absisik aside yanıt olarak aktive olurlar. SnRK2 yardımıyla fosforillenen transkripsiyon faktörleri stres ilişkili genlerin anlatımını başlatmaktadır. Stres ilişkili genlerin anlatımı ise strese bağlı hormon üretimini tetiklemektedir. Hormonal sinyal

yolaklarında ABA hormonu önemli bir rol oynarken etilen, oksin, brassinosteroid, sitokinin, giberellin, jasmonat ve salisilik asit gibi diğer stres hormonları da stres toleransını düzenler. Esas olarak çimlenmede görev alan ABA, bitkide tuz stresi algılanması ile de aktifleşir ve stomaların kapanmasını sağlar. Kapanan stomalar ile ABA duyarlı element (AREB) transkripsiyon faktörleri aktifleşir ve stresle ilişkili olan genlerin anlatımını düzenler. Şekil 2.3'te tuz stresine tolerans oluşturulmasında görev alan moleküller ve hormonlar arasındaki etkileşim ağı gösterilmiştir (Kesawat ve ark., 2023). Bunlara ek olarak ABA'nın ROS molekülleri üzerinde de düzenleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir. ABA diğer hormonlarla etkileşime girerek farklı stres yanıt mekanizmalarında görev alabilmektedir. Örneğin; ABA yolağı ile aktive olan transkripsiyon faktörleri brassinosteroid üretimini baskılayarak stres yanıtı oluşturmaktadır. Aynı zamanda ABA, oksin hormonu ile çalışarak bitkide strese bağlı suya yönelim görülmesine sebep olabilmektedir (Li ve ark., 2022; Waadt ve ark., 2022).

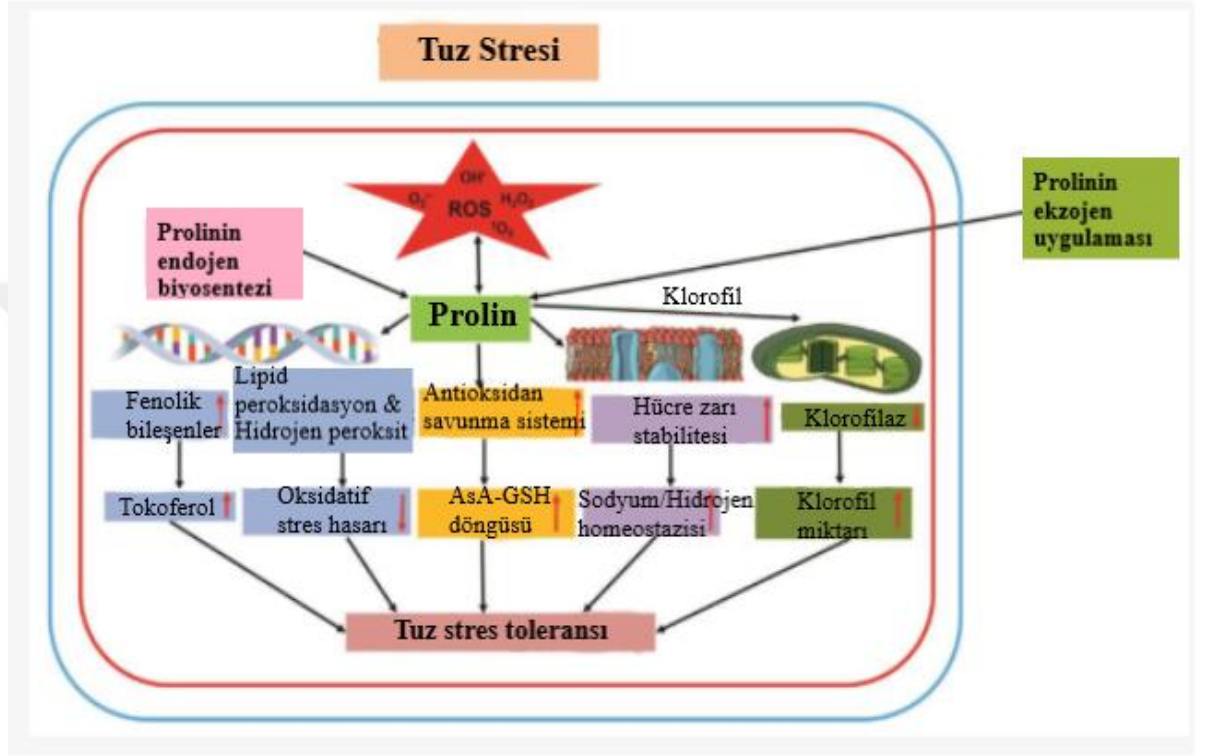


Şekil 2.3 Tuz stresine karşı oluşturulan tolerans sırasında hormonlar ve sinyal molekülleri arasındaki etkileşim ağı (Kesawat ve ark., 2023) ROS: Reaktif oksijen türleri, MAPK: Mitojenle aktif olan protein kinaz, SA: Salisilik asit, IAA: İndoleasetik asit, ABA: Absisik asit, SOS: Tuza aşırı hassas, GA: Giberellik asit, Ca: Kalsiyum, NO: Nitrik oksit, H₂O₂: Hidrojen peroksit, H₂S: Hidrojen sülfür, OH: Hidroksil, O²⁻: Süperoksit, ¹O₂: Singlet oksijen

Moleküler düzeyde, stres sinyallerine yanıt olarak DREB, MYB, bZIP ve NAC gibi transkripsiyon faktörleri aktifleşir, stresle ilişkili genlerin (örneğin, HSP, LEA) ekspresyonu artar ve mikroRNA'lar genetik düzenlemeyi hassas bir şekilde modüle eder.

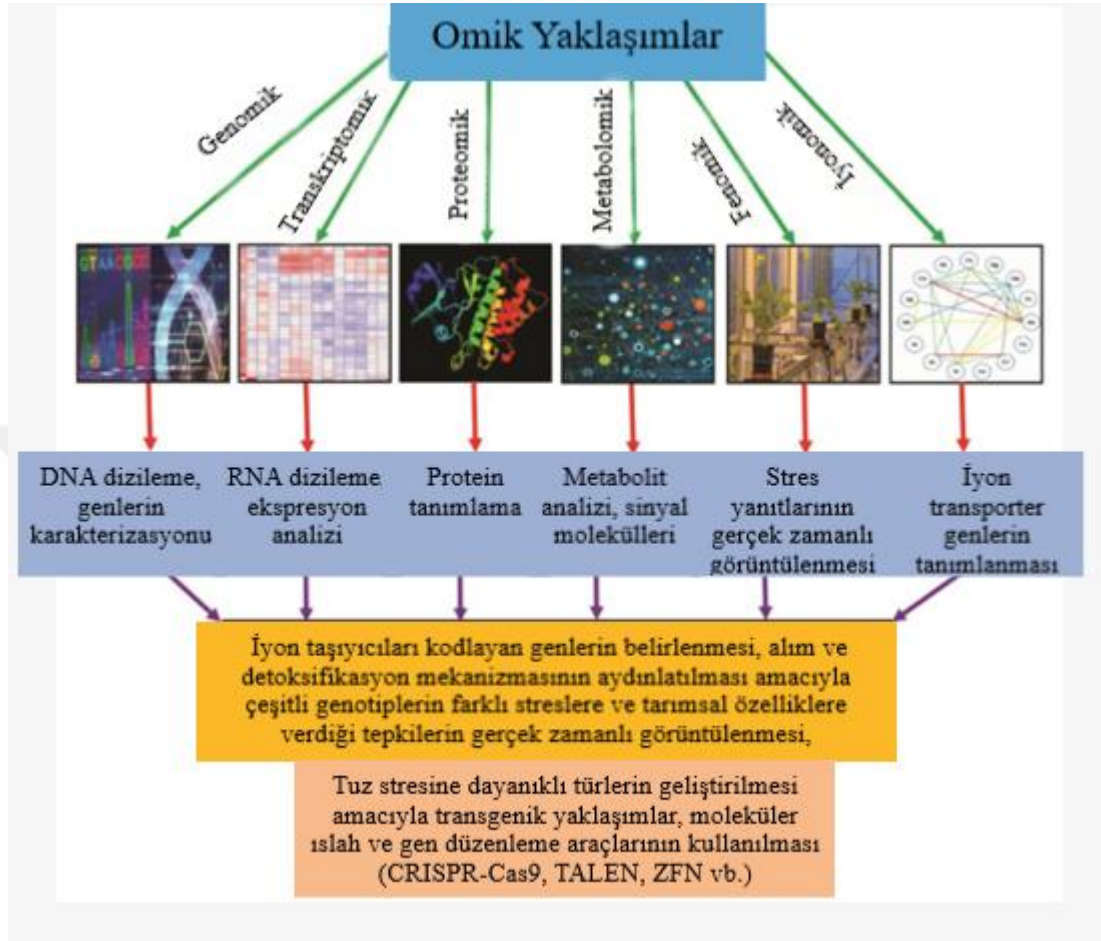
Tuz stresi toleransının artırılması için yapılan araştırmalarda, CRISPR/Cas9 gibi gen düzenleme teknolojileriyle tuza dayanıklı soya çeşitleri geliştirilmekte, rizobakteriler ve mikoriza mantarları gibi faydalı mikroorganizmalarla simbiyotik ilişkiler araştırılmakta ve ABA, silikon ya da prolin gibi dışsal uygulamalarla stres yanıtları iyileştirilmektedir. Prolin ozmotik dengeyi korumada görevlidir ve strese bağlı olarak su kaybı yaşayan hücrelerde su tutulumu sağlayarak stres toleransı oluşmasına yardımcı olur. Şekil 2.4'te prolinin dış ve iç sentez mekanizmaları ve prolin yolağı

üzerinden tuz stresine karşı tolerans oluşturma yolları gösterilmiştir (Kesawat ve ark., 2023).



Şekil 2.4 Prolinin dış ve iç sentez mekanizmaları ve stres toleransı oluşturma yolları (Kesawat ve ark., 2023)

Transkriptom, proteom ve metabolom gibi omik yaklaşımlar, stresle ilişkili moleküler yolların keşfine ve dayanıklı soya türlerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Şekil 2.5’te farklı omik yaklaşımların bitkilerde strese karşı yanıt geliştirmek amacıyla kullanıldığı yöntemler gösterilmiştir (Kesawat ve ark., 2023). Soyanın tuz stresine karşı geliştirdiği bu adaptasyon mekanizmalarının anlaşılması, tarımsal verimliliği artırmak, çevresel sürdürülebilirliği sağlamak ve küresel gıda güvenliğine katkı sunmak açısından büyük önem taşımaktadır (Munns ve Tester, 2008).



Şekil 2.5 Farklı bitki türlerinin büyümesini ve verimliliğini artırmak için tuza dayanıklı türlerin geliştirilmesinde farklı omik yaklaşımların kullanılması (Kesawat ve ark., 2023)

2.3 PROTEOMİK

Proteomik, bir organizmadaki bütün proteinlerin analiz edilmesi, tanımlanması ve fonksiyonel ilişkilerinin açığa çıkarılması ile ilgilenen araştırma alanıdır (Nenni ve ark., 2020). Proteinler hücresel yapıtaşları olduğundan dolayı stres biyolojisi çalışmalarında, transkripsiyon faktörleriyle birlikte çalışmaları ve moleküler mekanizmalarının ortaya çıkarılmaları büyük önem kazanmaktadır.

Proteomik, belirli koşullar altında bir hücre, doku, organ veya organizmada bulunan proteinlerin yapısal özelliklerini ve diğer moleküllerle olan tüm etkileşimlerini

inceleyen bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerle ilişkili tüm moleküler analizler, proteomik analiz olarak adlandırılmaktadır. DNA, genetik bilgiyi sabit bir kod dizisi şeklinde taşır, ancak hücre içinde meydana gelen dinamik değişiklikleri yansıtamamaktadır. Bu durum, transkriptomik ve genomik çalışmaların önemini artırsa da proteinlerin hücresel işlevlerin büyük bir kısmını gerçekleştirdiği göz önüne alındığında, proteomik çalışmalar daha kapsamlı ve güvenilir sonuçlar sunmaktadır.

Proteomik analizlerin diğer omik verilerle entegre edilerek sistem biyolojisi yaklaşımıyla değerlendirilmesi de gerekmektedir. Transkriptomik, metabolomik ve epigenetik verilerin proteomik analizlerle bütünleştirilmesi, stres yanıtlarının daha kapsamlı ve mekanistik düzeyde anlaşılmasına imkân tanır (Yan ve ark., 2022). Örneğin, belirli bir proteinin ifade düzeyindeki artış, sadece genetik regülasyonla değil, aynı zamanda epigenetik faktörlerle veya transkripsiyon sonrası düzenlemelerle ilişkili olabilir.

Son on yılda bitkilerde abiyotik streslere karşı verilen moleküler yanıtların anlaşılması yönünde yapılan proteomik araştırmalar hem teknolojik hem de biyolojik düzeyde büyük ilerlemeler kaydetmiştir. Kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, soğuk, ağır metal ve oksidatif stres gibi çevresel faktörler altında bitkilerin gösterdiği protein düzeyindeki değişimleri kapsamlı şekilde anlamaya yönelik proteomik çalışmalar, klasik 2D jel elektroforezi yöntemlerinden sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) gibi yüksek çözünürlüklü tekniklere evrilmiştir. Özellikle veri-bağımsız toplama (DIA), veri-bağımlı toplama (DDA), izobarik etiketleme (iTRAQ, TMT) ve fosfoproteomik gibi ileri düzey yöntemlerin yaygınlaşması, proteinlerin sadece miktar düzeylerinin değil, aynı zamanda fosforilasyon, redoks, asetilasyon, glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarının da detaylı şekilde analiz edilmesini sağlamıştır. *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Zea mays* gibi bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda, stres altındaki protein profilleri incelenmiş ve binlerce proteinin anlatım düzeylerinde değişim meydana geldiği saptanmıştır (Chen ve Komatsu, 2021). Kuraklık stresi altında fotosentetik proteinlerin (RuBisCo büyük ve küçük alt birimleri, fotosistem I ve II) anlatım seviyelerinde düşüş görülürken,

antioksidan sistemde görevli SOD, CAT, APX gibi enzimlere ait proteinlerin anlatım düzeylerinde artış görülmüştür. Kök dokusunda ise osmotik stresle ilişkili aquaporinler, LEA proteinleri (late embryogenesis abundant), ısı şok proteinleri (HSP) ve protein kinazların regülasyonu saptanmıştır. Soğuk stresinde ise özellikle membran lipid bileşenlerini değiştiren lipid transfer proteinleri (LTP'ler), antifriz proteinleri ve mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz 2 (MKK2) gibi mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolak bileşenlerinin fosforilasyon düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir. Ağır metal stresine yönelik proteomik çalışmalarda ise metal şelatlayan metallothioneinler, fitokelatin sentetazlar, ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları ve glutatyon-S-transferazların artan düzeyleri dikkat çekmektedir. Tuz stresi altında yapılan proteomik analizlerde hücre duvarı yeniden düzenleyicileri (ekspansinler, glukanaazlar), iyon taşıyıcıları (yüksek afiniteli potasyum taşıyıcısı (HKT), sodyum-hidrojen değiştirici (NHX), tuz aşırı hassas (SOS1)), sekonder metabolizma enzimleri (fenilalanin amonyum liyaz, izoflavon sentaz) ve stres yanıtı transkripsiyon faktörlerinin (temel lösin fermuarı (bZIP), WRKY, NAC) ekspresyon seviyelerinde belirgin değişimler olduğu gösterilmiştir. Soya bitkisinde yapılan iTRAQ tabanlı proteom analizinde tuz stresine bağlı olarak izoflavonoid metabolizmasında yer alan izoflavonredüktaz (IFR), şalkon izomeraz (CHI) ve dihidroflavonol-4-redüktaz (DFR) gibi proteinlerin anlatım seviyesinde artış olduğu, ayrıca flavonoid biyosentezinin GmMYB173 gibi transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu ile kontrol edildiği saptanmıştır. Sıcaklık stresine bağlı proteomik değişimlerde ise protein stabilizasyonunu sağlayan HSP70, HSP90 gibi şaperon proteinleri ön plana çıkarken, protein sentezine dair ribozomal alt birimlerin ve translasyon faktörlerinin düzenlendiği gözlenmiştir (Yan ve ark.,2022).

Bu gelişmelerin yanı sıra bitkisel proteomikte son yıllarda biyoinformatik destekli ağ analizleri, yapay zekâ algoritmaları ve gen-ontoloji sınıflandırmaları ile veriler çok daha anlamlı hale getirilmiş; protein-protein etkileşim haritaları ile stres toleransı sağlayan merkezi proteinler belirlenmiştir. İleri düzey kütle spektrometreleri sayesinde artık çok küçük miktarda örnekle yüksek derinlikli proteomik veriler elde edilebilmektedir. Ayrıca çeşitli bitki türlerinde yapılan çalışmalar, stres altında

proteinlerin yalnızca bolluğunun değil aynı zamanda lokalizasyonunun da değiştiğini, bazı proteinlerin çekirdekten sitoplazmaya ya da organellere taşındığını göstermiştir. Bu bulgular, stres yanıtının sadece bir ifade değişimi değil, aynı zamanda hücresel yeniden organizasyonu da kapsadığını ortaya koymaktadır. Proteomik veriler yalnızca bitkinin stres anındaki fizyolojik durumunu anlamaya değil, aynı zamanda tolerans belirteçlerinin tanımlanması, genetik mühendislik uygulamaları ve stres dirençli hatların geliştirilmesi açısından da büyük potansiyel taşımaktadır. Transgenik bitkilerde hedef genin proteom düzeyindeki etkilerinin değerlendirilmesi, gen susturma (VIGS, RNAi) veya CRISPR-Cas9 temelli mutasyonlar sonrası oluşan proteomik profil farklılıkları, fonksiyonel genetik ile proteomik verilerin entegrasyonunu sağlayarak stres mekanizmalarının daha net anlaşılmasına katkı sunmaktadır (Yan ve ark., 2022).

Proteomik çalışmalar sonrası mRNA seviyelerinden elde edilen bilgiler, gen ekspresyonunun yalnızca transkripsiyon sonrası düzenlemeleri hakkında bilgi verebilir. Ancak bu bilgiler, proteinin post-translasyonel modifikasyonlara uğrayıp uğramadığı, belirli uyaranlara karşı nasıl yanıt verdiği veya hangi protein-protein etkileşimlerini gerçekleştirdiği gibi detayları tam olarak açıklayamaz. Çünkü mRNA seviyelerinde meydana gelen değişimler, protein düzeyinde aynı şekilde yansımayabilir. Bunun sebebi, mRNA'nın translasyon sürecinden başlayarak farklı regülatör mekanizmalar tarafından kontrol edilmesi ve hücresel seviyede farklı sonuçlar üretmesidir. Bu nedenle, hücredeki gerçek fizyolojik süreçleri anlamak ve biyolojik sistemlerin işleyişini daha doğru bir şekilde yorumlamak için proteomik analizler kritik bir öneme sahiptir. Proteomik çalışmalar, protein düzeyinde meydana gelen değişimleri ve bu değişimlerin biyolojik sistemlere etkisini detaylı bir şekilde ortaya koyarak, biyolojinin dinamik yapısını en iyi şekilde anlamamıza olanak tanır. Bu özellikleri nedeniyle proteomik, biyolojik araştırmalarda ve özellikle hücresel mekanizmaların anlaşılmasında vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir (Horgan, 2011).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 BİTKİ MATERYALİNİN SEÇİMİ

Bu tez çalışmasında kullanılan Ataem-07 çeşidi ve S04-05 (Üstün) soya hattı ve mutant 150-43 ve 405-1 hatlarına ait tohumlar kullanılmıştır. Soya mutantları T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı'nda elde edilen mutant hatlardır. Ataem-07 ve Üstün soya çeşitlerine ait tohumlar Cs-137 gama radyasyonu kaynağında 150, 200 ve 250 Gy gama radyasyonu ile ışınlanmış ve seçilen mutantların tuz toleransları hem in vitro hem in vivo koşullarda belirlenmiştir. Bu tezde bu mutant hatlar arasından iki hattın 6. jenerasyona ait tohumlar kullanılmıştır (Atak ve ark., 2024).

3.2 SOYA ÇEŞİT ve MUTANT HATLARINDA TUZLULUK STRESİ UYGULAMASI

Tuz stresi ön denemesi: Tuz stresine toleranslı olarak seçilen mutant hatların M6 jenerasyonundaki tuz stres cevaplarının belirlenmesi için tohumlar, üç tekrarlı olacak şekilde, perlit dolgulu plastik bitki yetiştirme viollerine ekilmiştir. Ekilen bitkiler bitki büyüme odasında 10 gün boyunca 16 saat gündüz/8 saat gece ışık periyodunda 25 °C (± 2 °C)'de Hoagland besin solüsyonu kullanılarak yetiştirilmiştir (Tablo 3.1) (Hoagland, 1920). Optimum koşullarda yetiştirilen fideler 11. günden itibaren 90 mM, 100 mM, 120 mM, 150mM ve 180 mM NaCl içeren Hoagland solüsyonu ile sulanmıştır. Uygulama 10 gün boyunca devam ettirilmiş ve stres uygulamasının 10. gününde bitkiler hasat edilmiştir. Tuzluluğun etkilerinin belirlenmesi için hasat edilen bitkilerde fizyolojik (taze ağırlık, gövde uzunluğu ve kök uzunluğu) ve biyokimyasal (lipid peroksidasyon, klorofil, prolin ve ozmolit konsantrasyonu) analizler yapılarak stres değerlendirilmesi yapılmıştır.

Tuz stresi denemesi: Tuz stresine verdikleri cevapları ortaya koymak için planlanan yeni bir denemede ön denemede elde edilen sonuçlara göre Ataem-07 çeşidi ve Üstün soya hattı ile mutant hatlara ait bitkilere çimlenmenin 14. gününden itibaren 10 gün süre ile 180 mM NaCl uygulanmasına karar verilmiştir.

10. gününden itibaren 10 gün süre ile 180 mM NaCl uygulanmasından sonra bitkilerde fiziksel ve biyokimyasal analizler gerçekleştirilerek protein izolasyonu yapılmış ve bütün sonuçlar istatistik olarak analiz edilmiştir.

Hasat sırasında viyollerden alınarak köke yapışmış perlitlerden arınması amacıyla kontrol grubu için standart Hoagland solüsyonuna, tuz stresi uygulanan bitkiler için 180 mM NaCl eklenmiş Hoagland solüsyonuna batırılan fideler kurutma kâğıdı üzerinde kurutulmuştur. Fidelerin taze ağırlık ölçümleri Shitmatzu marka ATX224R analitik terazi ile gerçekleştirilmiştir. Fideler, kök başlangıç noktasından başlayarak en uçtaki büyüme noktasına kadar gövde uzunluğu için, kök başlangıç noktasından başlayarak en uçtaki saçak köke kadar kök boyu için cetvel yardımı ile ölçülmüştür.

Tablo 3.1 Hoagland besin solüsyonu içeriği ve litredeki miktarları (Hoagland, 1920)

HOAGLAND BESİN SOLÜSYONU					
MAKROBESİN(M)	M.Wt	M	M için	Final Solüsyon	Element
KNO ₃	101,1	1	101,1	6 ml/L	K, N
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,16	1	236,16	4 ml/L	Ca, N
(NH ₄)H ₂ PO ₄ ya da (KH ₂ PO ₄)/(NH ₄ NO ₃)	115,08	1	115,08	2 ml/L	N, P
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,49	1	246,49	1 ml/L	Mg, S
MİKROBESİN(mM)		mM	mM için		
KCl	74,55	50	3.72	1 ml/L	K, Cl
H ₃ BO ₃	61,84	25	1,54		B
MnSO ₄ ·H ₂ O	169,01	2	0,33		Mn, S
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	289,55	2	0,57		Zn, S
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,71	0,5	0,12		Cu, S
H ₂ MoO ₄ (%85 MoO ₃)	161,97	0,5	0,08		Mo
Fe-EDTA	346,08	20	6,92	1 ml/L	Fe

3.3 BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3.3.1 Lipid Peroksidasyon Birikimi Tayini

Oksidatif stres, antioksidan ve pro-oksidanlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmıştır. MDA(Malondialdehit) bileşiği, çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşan bir bileşiktir ve oksidatif stres sonucu ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Cordiano, ve diğerleri, 2023). Lipid peroksidasyon tayini Stewart ve Bewley (1980) metoduna göre gerçekleştirildi ve aynı metod baz alınarak konsantrasyon hesabı yapılmıştır (Stewart ve Bewley, 1980).

Hasat zamanı toplanmış olan V1 ve V2 evrelerindeki üçlü yapraklardan orta yapraklar seçilerek toplu hasat (bulk) hazırlandı. Hazırlanan bulk alınan 0,1 g yaprak örnekleri sterilizatör ile 180°C’de 120 dk bekletilerek sterilize edilmiş havan ve havan elleri ile 1 ml dH₂O eklenerek homojenize edildi. Homojenize edilmiş örneklerin üzerine eş hacimde taze hazırlanmış %0,5 (v/w) TBA (Tiobarbitürik asit) ve %20’lik TCA (trikloroasetik asit) çözeltisinden eşit hacimde (1 ml) eklenir. Alt üst edilen örnekler ısıtıcı blokta 95°C’de 30 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sırasında 10’ar dakika arayla örnekler alt üst edilir. 30 dakikanın sonunda örnekler kalorimetrik reaksiyonun sonlandırılması için buz banyosuna yerleştirilerek 5 dakika bekletilir. İnkübasyon sonrasında örneklerde yeşilden sarı-pembe tonlarına geçen bir renk değişimi görülmesi beklenmektedir. Buz banyosundan sonra örnekler 4°C’de 10.000 rcf hızda 30 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası pellet dağıtılmadan toplanan süpernatantlar yeni mikrosantrifüj tüplerine alınır. Süpernatantlar, her yaprak örneğinden 3 biyolojik ve 3 teknik tekrar ile 532 ve 600 nm dalga boylarında Implen marka NanoPhotometer NP40 spektrofotometre cihazında absorbans ölçümü yapılarak hesaplandı. Kaydedilen sonuçlar ‘MDA/g.TA’ cinsinden ifade edilir (Stewart ve Bewley, 1980; Li, ve ark., 2012; Li ve ark., 2025).

3.3.2 Prolin Konsantrasyonu Tayini

Prolin konsantrasyon tayini, Bates ve diğerleri (1973) metoduna göre uygulanmış ve aynı metoda göre konsantrasyon hesaplanması yapılmıştır (Bates ve ark., 1973; Taiz ve ark., 2015). Hasat zamanı toplanmış olan V1 ve V2 evrelerindeki üçlü yapraklardan orta yapraklar seçilerek toplu hasat hazırlandı. 0,1 g yaprak örnekleri sterilize edilmiş havan ve havan elleri ile taze hazırlanmış %3'lük (v/w) sülfosalisilik asit solüsyonundan 2 ml eklenerek homojenize edildi. Ezilen örnekler 10.000 rcf hızda 15 dakika santrifüj edilir. Bu sırada taze olarak asit ninhidrin çözeltisi hazırlandı. Toplam 50 ml asit ninhidrin çözeltisi için 1,25 g ninhidrin tartılır. Üzerine 30 ml asetik asit eklenir ve alt üst edilerek çözülmesi sağlanır. Bu çözeltinin üstüne 1/3 sulandırılmış fosforik asitten 20 ml eklenir ve çözelti alt üst edilir. Santrifüj sonrası pellet bozulmadan süpernatantlar yeni bir tüpe alınır. Alınan süpernatant ile aynı hacimde (yaklaşık 2 ml) asetik asit ve asit ninhidrin çözeltisi eklendi. Reaksiyonun başlaması için örnekler 15 dkda bir alt üst edilerek 1 saat boyunca 100°C'de inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda reaksiyonun sonlanması için buz banyosuna yerleştirilerek 5 dakika bekletildi. Elde edilen karışım tolüen ile ekstrakte edildi ve son ürün 520 nm dalga boyunda absorbans ölçümü için spektrofotometre cihazında cam küvet ile ölçüldü. Sonuçlar 'µg/µL' cinsinden ifade edildi (Bates ve ark., 1973; Yuan ve ark., 2024).

3.3.3 Fotosentetik Pigment Miktarı Tayini

Fotosentetik pigmentler, bitkilerde ve diğer fotosentetik organizmalarda ışık enerjisini yakalayan ve fotosentez sürecini gerçekleştiren moleküllerdir. Başlıca klorofiller ve karotenoidler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar (Taiz ve ark., 2015). Fotosentetik pigment miktarı tayini Arnon (1949) metoduna göre uygulanmış ve aynı metod kullanılarak konsantrasyon hesabı yapılmıştır (Arnon, 1949). Hasat zamanı toplanmış olan V2 ve V3 evrelerindeki üçlü yapraklardan orta yapraklar seçilerek bulk hazırlanmıştır. Hazırlanan bulkten alınan 0,1 g yaprak örnekleri sterilizatör ile sterilize

edilmiş ve -80°C’de soğutulmuş havan ve havan elleri ile 0,1 g yaprak dokusu sıvı azot yardımı ile toz haline getirilerek 2 ml %80(v/w)’lik aseton eklenerek homojenize edilir. Elde edilen homojenatlar whatman no.2 filtre kağıtları ile süzülerek yeni tüplere alınır. Örnekler küvete yüklenerek 470 nm, 645 nm ve 663 nm dalga boylarında spektrofotometre cihazı ile absorbans ölçümü yapılarak kaydedilir. Elde edilen örnekler ‘µg/g.TA’ cinsinden ifade edilir.

$$\text{Klorofil A (mg/g.TA)} = (A_{645}/1000 \text{ ml}) \times 2 \text{ ml}/0,1 \text{ g}$$

$$\text{Klorofil B (mg/g.TA)} = (A_{663}/1000 \text{ ml}) \times 2 \text{ ml}/0,1 \text{ g}$$

$$\text{Toplam klorofil (mg/g.TA)} = ((20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}) / 1000 \text{ ml}) \times 2 \text{ ml}/0,1 \text{ g}$$

(Arnon, 1949; Oral ve ark., 2024)

3.3.4 Ozmolit Birikimi Miktarı Tayini

Ozmolalite ölçümü ozmometre cihazı (Semi-Micro Osmometer K-7400, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hasat zamanı toplanan ve -80°C’de muhafaza edilen V2 ve V3 yapraklarının orta yapraklarından bir toplu hasat hazırlandı ve hazırlanan toplu hasattan 25 mg tartılarak 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Tüplerdeki yaprak örnekleri bir gece öncesinden -20°C’de bekletildi. -20°C’de bekletilen örnekler +4°C’ye ayarlanmış santrifüj cihazında maksimum hızda 30 dk santrifüj edilerek yaprak örneklerindeki bütün bitki özütünün çıkarılması sağlandı. Santrifüj sonrası bitki özütlerinden çıkan miktarın tamamı alınarak 10 kat dilüsyon yapıldı. Dilüe edilmiş bitki özütünden 180 µl alınarak ozmometre küvetlerine koyuldu ve cihaza yerleştirildi. Ölçüm değerleri mOsmol/kg cinsinden hesaplandı (Uçarlı ve Gürel, 2020).

3.4 PROTEİN İZOLASYONU VE KONSANTRASYON TAYİNİ

3.4.1 Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu manuel TCA-aseton metodu kullanılarak yapılmıştır (Mechin ve ark., 2007). Yöntem için lizis (T1 tamponu) ve yıkama (T2 tamponu) solüsyonları deneyden hemen önce taze olarak hazırlanmış ve soğuması için -80°C 'ye bırakılmıştır. Hasat zamanı toplanmış olan V1 ve V2 evrelerindeki üçlü yapraklardan orta yapraklar seçilerek toplu hasat hazırlanmıştır. Hazırlanan toplu hasattan alınan 0,3 g yaprak dokusu, sterilizatör ile 180°C 'de 120 dk bekletilerek sterilize edilmiş ve -80°C 'de soğutulmuş havan ve havan elleri ile sıvı azot eklenerek toz hale gelinceye kadar ezilir. Ezilerek toz haline getirilmiş yaprak örnekleri 2 ml soğutulmuş T1 tamponu (%10 TCA, %90 aseton, %0,07 beta-merkaptotanol) eklenerek homojenize edilir. Homojenize edilen örnekler 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplere alınarak alt üst edilir ve -20°C 'de 1 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresince örnekler 15 dk'lık periyotlarla alt üst edilerek tampondaki aseton yardımı ile mevcut klorofilin olabildiğince parçalanması ve beta-merkaptotanol yardımı ile parçalanmış proteinlerin TCA yardımı ile çöktürülmesi hedeflenir. 1 saatlik inkübasyon sonrası örnekler 10.000 rcf'de 15 dk santrifüj edilir ve santrifüj sonrası pellet bozulmadan süpernatant uzaklaştırılır. Pelletin üzerine 2 ml soğutulmuş T2 tamponu (%90 aseton, %0,07 betamerkaptoetanol) eklenir ve pellet kalkacak şekilde örnekler alt üst edilir. Pelletin yerinden oynadığından emin olduktan sonra örnekler -20°C 'de 1 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresince 15 dk'da bir örnekler alt üst edilir. İnkübasyon sonrası 10.000 rcf'de 15 dk santrifüj yapılır ve süpernatant uzaklaştırılır. T2 tamponu ile yıkama işlemi, mevcut klorofilin tamamı uzaklaştırılana kadar devam ettirilir. Şeffaf bir süpernatant ve pellet elde edildikten sonra son kez 10.000 rcf'te 15 dk santrifüj uygulanır ve süpernatant uzaklaştırılır. Sonrasında pelleti protein tozu haline getirmek amacıyla örnekler Eppendorf marka Concentrator Plus cihazına yerleştirilir ve D-AL ayarında 45 dakika kurumaya bırakılır. Kuruyan örnekler -80°C 'de muhafaza edildi (Mechin ve ark., 2007).

3.4.2 Protein İzolatlarının Rehidrasyonu

İzole edilen protein örneklerinin konsantrasyon tayinlerinin yapılarak 2D jel elektroforezine yüklenmeleri için rehidre edilmeleri gerekmektedir. Rehidrasyon işlemi Bio-Rad ReadyPrep™ 2-D Starter Kit kullanım kılavuzunun Bio-Rad Criterion Dodeca Cell cihazının kullanımı için verilmiş olan protokole göre yapılmıştır (Bio-Rad, ReadyPrep 2-D Starter Kit). Rehidrasyon işlemi öncesi rehidrasyon tamponu (8M üre (Thermo Scientific, Cat. No. 29700), %2 CHAPS (Thermo Scientific, Cat. No. 28300), 50 mM DTT (Dithiothreitol (Cas No. 3483-12-3)), %0,2 Biolyte 3/10 Ampholite (Biorad, Cat. No. #1631112), %0,001 Bromofenol mavisi (Cas No. 115-39-9)) taze olarak hazırlanır. Hazırlanan tampon +4°C'de ışık görmeyecek şekilde muhafaza edilmiştir.

Örnekler -80°C'den çıkarıldı ve rehidrasyon işlemi oda sıcaklığına geldiklerinde örneklerin üzerine 200 µl rehidrasyon tamponu eklendi ve örnekler hareket edecek şekilde alt-üst edilir. Tampon eklenen örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletilir ve +4°C santrifüj cihazında 10.000 rcf'de 13 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir tüpe alınarak ölçümlere hazır bir halde +4°C'de muhafaza edildi (Liu ve ark., 2008).

3.4.3 Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Tayini

Bradford yöntemi, protein konsantrasyon ölçümü için kullanılan hızlı, doğruluk oranı yüksek ve diğer yöntemlere oranla düşük maliyetli bir metottur. Coomassie blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması temeline dayanan metot, spektrofotometrik ölçüm ile sonuç vermektedir (Kruger, 2009).

Bradford yöntemi ile protein konsantrasyon tayini yapılması için bir standart eğrisi oluşturulmalı ve R^2 değeri hesaplanarak absorbans değerinden konsantrasyon verisine ulaşmamızı sağlayacak bir denklem elde edilmelidir. Standart eğrisini oluşturmak için

sığır albümin serumu (BSA) kullanılmaktadır. 1,5 µg/µl olacak şekilde tartılarak hazırlanan stok standart solüsyonu artan dozlarda uygulanarak standart eğrisi oluşturulmaktadır. Ayrıca yöntem için gerekli olan Bradford reaktifi (100 mg Coomassie G-250, 50 ml %95 EtOH, 100 ml %85 fosforik asit, 1 litreye tamamlayacak şekilde dH₂O) hazırlanarak 0,22 µm filtreden geçirilmekte ve kullanıma hazır halde +4°C’de muhafaza edilmektedir.

Bu tez çalışması için deneyler 96 kuyucuklu plaka üzerinde gerçekleştirilmiştir. Standart solüsyonu son konsantrasyonu sırasıyla 1,5 µg/µl, 3 µg/µl, 4,5 µg/µl, 6 µg/µl, 7,5 µg/µl olacak şekilde kuyucuklara dağıtılmıştır. Protein örneklerinden de 3 tekrarlı olacak şekilde 1’er µl alınarak kuyucukların tabanına dağıtılmıştır. 1 kuyucukta hiç protein örneği bulunmayacak şekilde boş bırakılmıştır ve ölçümde kör değer olarak değerlendirilecektir. Standart solüsyonu ve protein örnekleri dağıtıldıktan sonra son hacim 200 µl olacak şekilde kuyucuklara Bradford reaktifi dağıtılarak reaktifin çalışması ve renk değişiminin gerçekleşmesi için 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Ölçümler Bio-Rad iMark Microplate Reader ile 595 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Microsoft excel yardımı ile bir standart eğrisi oluşturularak µg/µl cinsinden hesaplandı (Bradford, 1976).

3.4.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Örnek Kalitesinin İncelenmesi

SDS-PAGE jel elektrofrez, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan ve proteinlerin denatüre olarak negatif yük ile yüklenmesi temeline dayanan bir elektrofrez yöntemidir. 1-100 kDa aralığındaki proteinlerin görüntülenmesi için kullanılmaktadır (Schagger, 2006).

SDS-PAGE protokolü %12’lik hizalayıcı (dH₂O, 0,5 M Tris-HCl, %10 SDS, %30, %0,8 w/v Acrylamide/bis-acrylamide, %10 APS, TEMED) ve ayırıcı (dH₂O, 1,5 M Tris-HCl, %10 SDS, %30, %0,8 w/v Acrylamide/bis-acrylamide, %10 APS, TEMED) olmak üzere iki ayrı jelin birleşimi ile hazırlandı. Ayırıcı jel kasete döküldükten sonra

tamamen polimerize olması beklenerek akabinde hizalayıcı jel döküldü. Bradford yöntemi ile konsantrasyon tayini yapılan örnekler, son konsantrasyonları 60 µg olacak şekilde 5X Laemmli boya ile 1:4 oranında karıştırılmıştır. Laemmli boya ile karıştırılan örnekler denatüre olmaları amacıyla 95°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örneklerin oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiş ve oda sıcaklığına gelen örnekler hazır boyanmış protein ladder ile jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Yükleme sonrası örnekler 100 V akımda 120 dakika boyunca yürütülmüştür. Jeller SDS-PAGE dikey elektroforez sisteminden çıkarılarak fiksasyon solüsyonu (%10 asetik asit, %30 metanol) içerisinde yerleştirilmiş ve 2 saat boyunca orbital çalkalayıcıda bırakılmıştır. 2 saatin sonunda fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılmış ve örnekler yıkama amacıyla 3 kez 20'er dakika süreyle distile su içerisinde orbital çalkalayıcıda bırakılmıştır. Yıkama işlemi sonrası distile su uzaklaştırılmış ve jelin boyanması için örnekler coomassie blue G-250 solüsyonunda 2 saat orbital çalkalayıcıda bırakılmıştır. Boyama işlemi sonrasında, coomassie blue boyası uzaklaştırılmış ve örnekler fazla boyanın uzaklaşması amacıyla açıcı (%10 asetik asit, %40 metanol) solüsyonda 2 saat orbital karıştırıcıda bırakılmıştır. Jellerin renklerinin açıldığı ve bant keskinlikleri belli olana kadar boya açma işlemi devam etmiştir. Bant keskinlikleri net bir şekilde görülür hale geldiğinde açıcı ortamdan uzaklaştırılmış ve örnekler distile su içerisine alınmıştır. Jel görüntüleri Bio-Rad ChemiDoc MP cihazında alınmış olup bant kalınlıklarının ölçümü ImageJ programı ile yapılmıştır (Rath ve ark., 2009).

3.5 İKİ BOYUTLU (2D) JEL ELEKTROFOREZİ

3.5.1 Protein Örneklerinin İzoelektrik Odaklanmaları ve 2D Jel Elektroforezi

İzoelektrik odaklama, proteinlerin bir pH gradienti içerisinde izoelektrik noktalarına göre ayrılmasını sağlayan elektroforetik bir ayrılma işlemidir. Proteinlerin N terminal ve C terminal bölgelerinde bulunan proton alıcısı bölgelerinin proton bağlama kapasitesi temeline dayanmaktadır (Friedman ve ark., 2009).

İzoelektrik odaklama işlemi Bio-Rad Protean i12 IEF Cell cihazında yapılmış olup Bio-Rad ReadyPrep 2D Starter Kit protokolü takip edilerek yürütülmüştür. Deney protokolü için dehidre olarak temin edilen 11 cm'lik Bio-Rad marka ReadyStrip IPG stripler kullanılmıştır. Yapısında akrilamid/bis-akrilamid bulunduran IPG stripler için cihazda ayrılma işleminden önce 14-16 saatlik bir rehidrasyon işlemi uygulanmaktadır.

Bradford yöntemi ile tespit ettiğimiz protein konsantrasyonları 185 µl örnekte toplam 250 µg olacak şekilde hazırlandı. Konsantrasyon hesabı yapılan örneklerden 185 µl alınarak rehidrasyon tepsisine yüklenmiştir. Yüklenen örneklerin üzerine IPG stripler jel kısmı örneklerle temas edecek ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Striplerin üzerine havayla teması kesecek miktarda (yaklaşık 2 ml) kit ile temin edilen mineral yağından eklenerek rehidrasyon tepsisinin üstü kapatılmış ve 24°C'de 14-16 saat rehidrasyon işlemi için bırakılmıştır.

Rehidrasyon işlemi sonrası forseps yardımıyla mineral yağından süzülerek alınan stripler hava kabarcığı kalmayacak şekilde izoelektrik odaklama tepsisine alınmıştır. Stripler alınmadan önce izoelektrik odaklama tepsisinde elektrotların üzerine elektrot kağıtları yerleştirilerek iletkenliği sağlamaları amacıyla nanopure su ile ıslatılmıştır. Elektrotlar dikkatli bir şekilde striplerin üzerine oturtulmuş ve izoelektrik odaklama tepsisi cihaza yerleştirilmiştir. Protokolde 11 cm'lik stripler için verilen yönergelere göre izoelektrik odaklama işlemi başlatılmış ve protein örnekleri yürütülmüştür.

Yürümenin bitmesiyle birlikte stripler forseps yardımıyla jel kısmına temas etmemeye dikkat ederek yıkama tepsisine jel kısmı yukarı bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Sonrasında stripler yıkama tepsisinin mineral yağı olmayan bir kanalına veya yeni yıkama tepsisine alınarak 4 ml dengeleme tamponu (equilibrium buffer I) eklenmiştir. Dengeleme tamponu eklendikten sonra örnekler 13 dakika orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Sonrasında örnekler boş bir kanala alınarak üzerlerine 2 ml dengeleme tamponu (equilibrium buffer II) eklenmiştir. Örnekler 13 dakika orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bu işlemin ardından stripler iki boyutlu jel elektroforez sisteminde yürütülmeye hazır hale gelmiştir.

2D jel elektroforezi SDS-PAGE ile benzer olarak proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması temeline dayanmaktadır. %12'lik SDS-PAGE ayırıcı jel hazırlanarak Bio-Rad marka jel kasetlerine dökülür ve tamamen polimerize beklenir. İzoelektrik odaklama ve dengeleme işlemleri sonrası hazır hale gelmiş olan stripler ayırıcı jel üzerine yatay bir şekilde yerleştirilir ve 2 ml Bio-Rad overlay agaroz ile üzerleri kaplanarak kasetler Bio-Rad marka PROTEAN II xi Cell cihazına yüklenir. 120 V akım ile örnekler takip edilerek kasetin en altına ulaşana kadar yürütme işlemi sürdürülür. Yürütme işlemi bitiminde kasetler forseps yardımı ile kenarlarından açılarak jelin üstünü tamamen kaplayacak kadar fiksasyon solüsyonu içerisine yerleştirilir ve orbital çalkalayıcıda 1 saat çalkalanır. Fiksasyon işlemi sonrası distile su ile 20 dakikalık periyotlarla 3 kez yıkama yapılır. Sonrasında örnekler spotların boyanması için üzerlerini kaplayacak kadar Coomassie Blue G-250 boyasının içerisine yerleştirilir ve minimum 12 saat süreyle orbital çalkalayıcıya bırakılır. Boyama işlemi sonrası fazla boyadan uzaklaşmak amacıyla örnekler üzerlerini geçecek kadar boya uzaklaştırma solüsyonu içerisine yerleştirilerek 1 saat orbital çalkalayıcıda çalkalanır. Bu işlem temiz bir jel arka planı üzerinde spotlar belirginleşinceye kadar her seferinde açıcı solüsyon yenilenerek tekrarlanır. Boya açma işlemi tamamlanan jeller analiz için hazırdır ve görüntü alınana kadar üzerlerini geçecek kadar distile su içerisinde üstü kapalı steril bir kapta +4°C'de 1 ay süreyle muhafaza edildi (Liu ve ark., 2008).

3.5.2 2D Jellerin Analizi ve Spotların Kesilmesi

2D jellerin analizleri için Bio-Rad PDQuest Advanced yazılımı kullanılmıştır. 2D jellerin analizleri için özel olarak geliştirilmiş olan bu yazılım, jel görüntüleri üzerindeki renk değişimlerini tespit ederek protein spotlarını algılamak ve spot yoğunluklarını tespit etmek prensibiyle çalışmaktadır.

Görüntüler Bio-Rad ChemiDoc MP cihazı ile Coomassie mavi boyası ayarı seçilerek alınmıştır. Alınan görüntüler analiz programına yüklenerek protein spotlarının analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında spotların yoğunluklarının artış ve azalışları her kondisyon için kontrol grubu ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda farklı soya hatları kullanıldığından dolayı da hat farkından gerçekleşen ekspresyon farklılıklarının yakalanması amacıyla aynı temele dayanan ikinci bir analiz işlemi daha yürütülmüştür.

Artış ve azalışları değerlendirilerek strese ve hat farkına bağlı olarak ekspresyon farklılığı olduğu tespit edilen spotlar steril 1 ml'lik pipet uçları ile jelden kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Tespit edilen spotların tamamı jellerden kesildikten sonra jelin içerisindeki boyanın temizlenmesi amacıyla üstlerine 1:1 oranında hazırlanmış asetonitril ve 100 mM amonyum bikarbonat solüsyonundan 100 µl eklenmiştir. Tüpler 30 dakika orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Örneklerin boya kalıntılarından tamamen arındırılması için 500 µl daha asetonitril eklenerek boya kalıntılarının uzaklaşması ve beyaz bir jel görüntüsü alınana kadar örnekler solüsyonun içerisinde bekletilir. Boya kalıntısı kalmayan jel yeni mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine spotun büyüklüğüne göre (56-70 µl) tripsin tamponu eklenir ve +4°C'de 2 saat inkübasyona bırakılır. 2 saat inkübasyonun ardından örnekler gece boyu inkübasyon için 37°C'de bırakılır. Gece boyu inkübasyon sonrası %5 formikasıit/asetonitril solüsyonu hazırlanır ve örnek hacmiyle 1:2 oranda olacak şekilde örneklerin üstüne eklenir. Örnekler 15 dakika daha 37°C'de inkübasyona bırakılır. Spot analizleri için örneklerin kurutulması gerekmektedir. Kurutma işlemi Eppendorf marka Concentrator Plus cihazında V-AL ayarı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Wisniewski ve Mann, 2012; Shevchenko ve ark., 2007).

Kurutulan örnekler spot analizi için mikrosantrifüj tüplerinde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Spot analiz işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Bölümü DEKART Proteomik Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.5.3 Zip-Tip Protein Saflaştırma

Proteinlerin saflaştırılmaları için yapılan bu işlemde Millipore marka C18 ZipTips pipet uçları kullanılmıştır. Zip-Tip pipet uçları, tek adımlı tuzdan arındırma ve yoğunlaştırma temellerine dayanmaktadır. Pipet uçları ilk olarak iki kere %100'lük asetronitril solüsyonu ile ıslatıldıktan sonra 2 kere de %70'lik asetronitril solüsyonu ile ıslatılmıştır. Sonrasında %3 asetronitril ve %0,1 trifloroasetik asit içeren dengeleme solüsyonu ile ıslatılmıştır. 10 µl protein örneği 15-20 kere pipetaj yapılarak pipet uçlarına alınmış ve %5'lik metanol ile %0,1'lik trifloroasetik asit içeren yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Alınan protein örneği temiz bir tüpe koyularak ve %60 asetronitril ve %0,1 trifloroasetik asit ile elüe edilmiştir. Saflaştırma işlemi sonrasında örnekler Eppendorf marka Concentrator Plus cihazının V-AL ayarı kullanılarak kurutulmuştur (Andre ve Karas, 2007).

3.6 LC-MS/MS ANALİZİ

LC-MS/MS yöntemi, sıvı kromatografi (LC) ve tandem kütle spektrofotometresi (MS/MS) işlemlerinin birleşiminden oluşan bir analiz tekniğidir. Bir karışımın bileşenleri ayırma prensibine dayalı olarak çalışmaktadır (Ardrey, 2003).

Tüm peptit ayrımları, Thermo Scientific Ultimate 3000 Serisi RSLCnano pompası ile Thermo Scientific Ultimate 3000 Serisi TCC-3000RS kolon bölmesi ve Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 Serisi RS otomatik numune yükleyicisine bağlanarak, Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, ABD) tarafından kontrol edilen bir

sistemde gerçekleştirilmiştir. Her analizde, örnekler bir yakalama kolonuna (Acclaim PepMap, 5 mm × 300 µm iç çap, C18, 5 µm, 100 Å; Thermo Scientific, ABD) 5 µL/dak hızında, %0,05 (v/v) triflorasetik asit ve %1 asetronitril içeren bir sulu çözelti ile yüklenmiştir. Üç dakikalık bir süreden sonra, yakalama kolonu bir analitik kolon (Acclaim PepMap RSLC, 15 cm × 75 µm iç çap, C18, 2 µm, 100 Å; Thermo Scientific, ABD) ile çevrimiçi olarak bağlanmıştır. Peptit elüsyonu, mobil faz A ve B karışımı uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz A, %0,1 (v/v) formik asit içeren HPLC derecesinde su, mobil faz B ise %0,1 (v/v) formik asit içeren HPLC derecesinde asetronitrilden oluşmaktadır. Kesilmiş örnekler, 0,30 µL/dak akış hızında 130 dakikalık bir gradyan elüsyon kullanılarak Thermo Q Exactive kütle spektrometresi ile doğrudan arayüzlenmiş şekilde ayrılmıştır. Uygulanan gradyan adımları: 0–45 dakika arasında %6'dan %20'ye lineer artış; 45–75 dakika arasında %40'a lineer artış; 75–90 dakika arasında %90'a lineer artış ve 30 dakika sabit tutulma; 120–125 dakika arasında %6'ya azalma ve 125–130 dakika arasında %94'e A şeklindedir. Kolon sıcaklığı 40 °C olarak ayarlanmış ve her örnekten 2 µl enjekte edilmiştir.

Q Exactive kullanılarak veri bağımlı toplama işlemlerinde, tarama dizisi; çözünürlük 70.000, tarama aralığı 400–2000 m/z, otomatik kazanç kontrol (AGC) hedefi 3×10^6 , maksimum enjeksiyon süresi 60 ms ve spektrum veri türü olarak merkezioid spektrumu parametreleri ile başlayan bir Orbitrap Full MS spektrumu içermektedir. MS2 analizi için ilk 10 prekürsör seçilerek yüksek enerjili çarpışma ayrışması (HCD): çözünürlük 17.500, AGC 1×10^5 , maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2 m/z, NCE 27 ve merkezioid spektrum veri türü parametreleri kullanılarak analiz edilmiştir. Her örnek serisi öncesinde, pozitif modda kalibrasyon solüsyonu (LTQ Velos ESI Pozitif İyon Kalibrasyon Solüsyonu 88323, Pierce, ABD) kullanılarak harici kalibrasyon işlemi yapılmıştır. Alt doldurma oranı $1,5 \times 10^5$ yoğunluk eşliğine karşılık gelecek şekilde %9 olarak ayarlanmıştır. Ayrıca, atanmamış ve tek yüklü türler MS2 analizinden hariç tutulmuş ve dinamik dışlama otomatik olarak ayarlanmıştır.

LC-MS/MS analizinden elde edilen ham verilerin işlenmesi, protein tanımlaması ve nicelendirme işlemleri Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific, ABD)

yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein tanımlaması için; peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0,02 Da, kütle doğruluğu 2 ppm arama parametreleri kullanılmıştır. Maksimum bir kaçırılmış bölünme izin verilerek, minimum peptit uzunluğu altı amino asit olarak belirlenmiştir. Sisteinlerin karbamidometilasyonu (+57.021464) sabit modifikasyon olarak ayarlanmış, metiyoninlerin oksidasyonu (+15.994915) ve asparajinin deamidasyonu (+0.984016) değişken modifikasyon olarak belirlenmiştir (Afshar & Hall, 2023). Prosedürün sonlanması için her protein örneğinde minimum iki benzersiz peptitin tanımlanması gerekmektedir. Giriş verileri UniProtKB-SwissProt veritabanında organizma adı ile aranmıştır. Protein gruplandırması, Proteome Discoverer 2.2'de bulunan Gene Ontology (GO) veritabanı kullanılarak moleküler fonksiyona göre gerçekleştirilmiştir.

3.7 İSTATİKSEL ANALİZLER

Soya bitkilerine ait anaç ve mutant hat bitkilerinin kontrol grubu bitkileri ve 10 gün boyunca 180 mM NaCl uygulanmış olan bitkileri eş zamanlı hasat edilerek fiziksel ve biyokimyasal ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Fiziksel ve biyokimyasal analiz sonuçları gerçekleştirilen ölçümlerin kendi birim cinsleri ile GraphPad Prism 10 (<https://www.graphpad.com/>) istatistik analiz programına kaydedilmiştir. Program üzerinden oluşturulan grafiklerde tek yönlü ANOVA testi uygulanmış ve standart sapmayla birlikte hesaplanarak istatistiksel olarak anlamlı olan değişimler harf cinsinden ifade edilmiştir (Kim, 2017)

4 SONUÇLAR

4.1 TUZ STRESİNİN BİTKİ BÜYÜMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Ataem-07 ve Üstün soya çeşitleri ile mutant 150-43 ve 405-1 hatlarına ait bitkilerin 180 mM NaCl stresine karşı verdikleri cevaplar belirlenmiştir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de sırasıyla tuz stresi uygulanmadan önce 14 günlük soya bitkileri ve tuz stresinin 10. günündeki bitkilerin gelişimi verilmiştir. Tuz stresi uygulamasında Ataem-07 ve Üstün soya çeşitlerinde mutant hatlara oranla gözle görülür şekilde klorizis ve yapraklarda morfolojik bozulmalar gözlemlenmiştir. Gözlemlenen değişimlerin aksine yapılan fizyolojik ölçümler sonucunda tuz stresi uygulanan mutant hatlarda stres toleransını işaret edecek istatistiksel olarak anlamlı bir fiziksel değişim tespit edilememiştir.



Şekil 4.1 14 günlük Ataem-07, Üstün ve mutant hatların bitki gelişimleri. A- Kontrol grubu bitkiler B- Stres grubu bitkileri

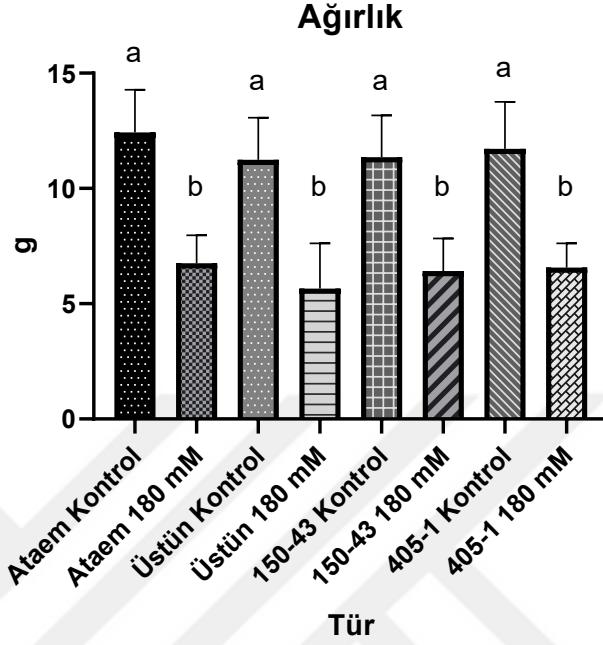


Şekil 4.2 10 günlük tuz stresi uygulanan bitkilerin tuz stresine cevapları. C- Kontrol grubu bitkileri D- Stres grubu bitkileri

Tüm bitkilerin taze ağırlık, boy ve kök uzunlukları ölçülmüştür. Tablo 4.1 ve Şekil 4.3'te Ataem-07, Üstün, 150-43 ve 405-12'e ait taze ağırlık değerleri verilmiştir. Shimadzu marka ATX224R analitik terazi ile yapılan ölçümler sonrası GraphPad Prism 10 istatistiksel analiz programına alınan ölçüm sonuçları gram (g) cinsinden kaydedilmiştir. 10 günlük NaCl uygulaması sonrasında tüm hatların taze ağırlıklarında %40'tan fazla azalma olduğu ölçülmüştür. Ataem-07 çeşidine ait taze ağırlık; tuz stresinde kontrole göre %45,62 azalırken bu oran mutant 150-43'te %43,53 olmuştur. Üstün çeşidinde taze ağırlık kontrole göre %49,74 oranında azalmışken mutant 405-1'de bu oran %43,95 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.1 180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama taze ağırlıkları ve standart sapma değerleri

Soya çeşit ve hatları	Taze ağırlık		
	Kontrol	180 Mm NaCl	
	g	g	%
Ataem-07	12,43 ± 1,85	6,76 ± 1,21	54,38
150-43	11,35 ± 1,46	6,41 ± 1,41	56,47
Üstün Kontrol	11,24 ± 1,75	5,65 ± 1,96	50,26
405-1	11,72 ± 3,90	6,57 ± 1,01	56,05

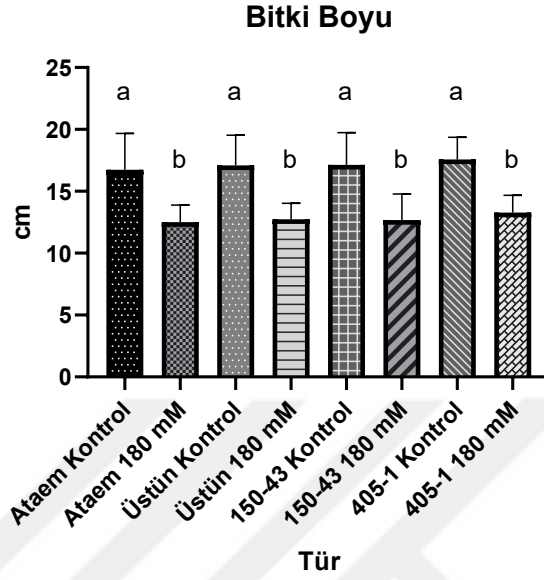


Şekil 4.38 Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların taze ağırlıkları üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır.

Tüm bitkilerin boy uzunlukları ölçülmüş Tablo 4.2' ve Şekil 4.4'te verilmiştir. 10 günlük NaCl uygulaması sonrasında Ataem çeşidine ait bitki boyu tuz stresinde kontrole göre %25,33 oranında azalırken mutant 150-43'te %25,41 olmuştur. Üstün çeşidinde bitki boyu kontrole göre %26,04' e azalmışken mutant 405-1 hattında ise bu oran %24,42 yükselmiştir. Tuz stresinde soya çeşitleri ve mutantlar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.25 180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama bitki boyları

Soya çeşit ve hatları	Bitki boyu		
	Kontrol	180 Mm NaCl	
	cm	cm	%
Ataem	16,74 ± 2,72	12,5 ± 1,39	74,67
150-43	17,13 ± 2,21	12,74 ± 1,29	74,59
Üstün Kontrol	17,08 ± 2,38	12,74 ± 1,96	73,96
405-1	17,57 ± 2,01	13,28 ± 1,38	75,58

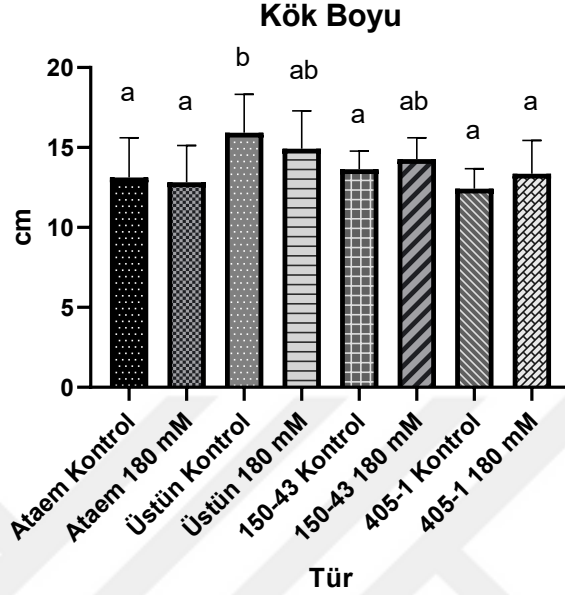


Şekil 4.49 Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların bitki boyları üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır.

Tüm bitkilerin kök boyu uzunlukları ölçülmüş Tablo 4.3' ve Şekil 4.5'te verilmiştir. 10 günlük NaCl uygulaması sonrasında Ataem-07 çeşidine ait kök boyu tuz stresinde kontrole göre %2,22 oranında azalırken mutant 150-43'te %4,61 oranında artış olmuştur. Üstün çeşidinde bitki boyu kontrole göre %6,29 oranında azalmışken mutant 405-1 hattında ise bu oran %7,48 oranında yükselmiştir. Tuz stresinde soya çeşitleri ve mutantlar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.36 180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama kök uzunlukları

Soya çeşit ve hatları	Kök Boyu		
	Kontrol	180 Mm NaCl	
	cm	cm	%
Ataem	13,11 ± 1,72	12,82 ± 2,29	97,78
150-43	13,64 ± 1,17	14,27 ± 1,34	104,61
Üstün Kontrol	15,92 ± 2,81	14,92 ± 2,37	93,71
405-1	12,42 ± 1,29	13,35 ± 2,09	107,48



Şekil 4.510Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların kök boyları üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır.

4.2 BİYOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI

4.2.1 Lipid Peroksidasyon (MDA) Tayini Analizine Ait Sonuçlar

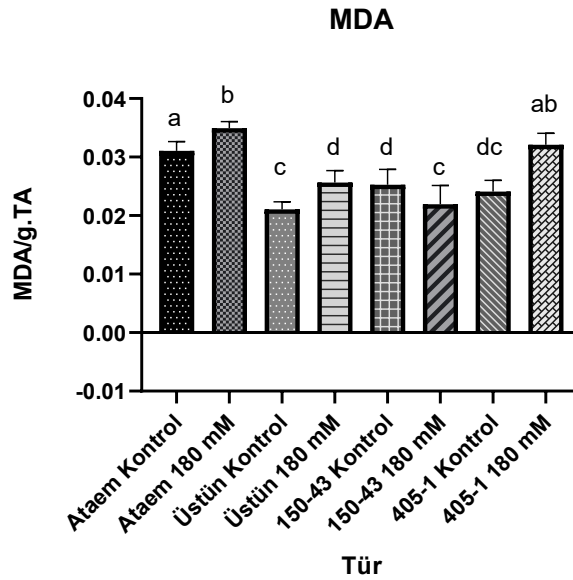
Tuz stresinin deneyde kullanılan soya hatları üzerindeki etkilerinin görülmesi amacıyla MDA ölçümü yapılarak tuz stresinin biyokimyasal etkilerinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonrası elde edilen absorbans değerleri hesaplanılarak MDA/g.TA cinsinden hesaplanarak kaydedilmiştir. Her koşul için ortalama MDA konsantrasyonları standart sapmalar da göz önüne alınarak sütun grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.6).

Tablo 4.4 ve Şekil 4.6'da kontrol ve tuz stresindeki MDA değerleri verilmiştir. 10 günlük NaCl uygulaması sonrasında Ataem çeşidine ait MDA değerleri kontrole göre %9,67 oranında artarken mutant 150-43'te kontrole göre %16 oranında düşmüştür. Üstün çeşidinde MDA kontrole göre %19,04 artış görülürken mutant 405-1 hattında

ise bu oran %33,33 olmuştur. 150-43 mutant hattının MDA konsantrasyonunda %16'lık bir azalma göstermiş ve sonuçlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Elde edilen MDA sonuçlarına göre mutant 150-43 hattının 180 mM NaCl stresine toleranslı olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.47 180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama MDA değerleri

Soya çeşit ve hatları	MDA Tayini		
	Kontrol	180 Mm NaCl	
	MDA/g.TA	MDA/g.TA	%
Ataem	0,031 ± 0,001	0,034 ± 0,001	109,67
150-43	0,025 ± 0,002	0,021 ± 0,003	84
Üstün	0,021 ± 0,001	0,025 ± 0,002	119,04
405-1	0,024 ± 0,001	0,032 ± 0,001	133,33



Şekil 4.61 Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların MDA üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır.

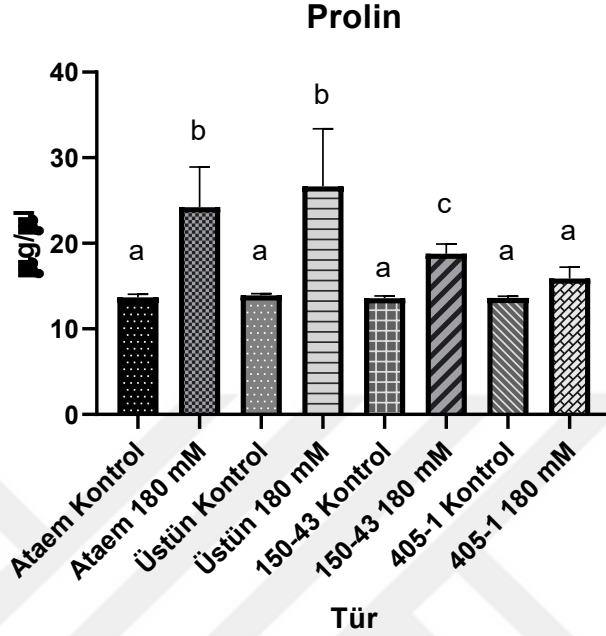
4.2.2 Prolin Konsantrasyonu Tayini Analizine Ait Sonuçlar

Tuz stresinin deneyde kullanılan soya hatları üzerindeki etkilerinin görülmesi amacıyla prolin konsantrasyonu ölçümü yapılarak tuz stresinin biyokimyasal etkilerinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonrası elde edilen absorbans değerleri hesaplanılarak $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cinsinden ifade edilmiştir. Her koşul için ortalama prolin konsantrasyonları standart sapmalar da göz önüne alınarak sütun grafiğine dönüştürülmüştür (Şekil 4.7).

Prolin ölçüm verileri incelenerek her hattın tuz stresi uygulanmamış kontrol grubunun prolin ortalamasının optimum değeri gösterdiği kabul edilerek yüzdece değişimleri hesaplanmıştır (Tablo 4.5 ve Şekil 4.7). Elde edilen sonuçlara göre tuz stresi uygulanan soya çeşit ve mutant hatların tamamında strese bağlı olarak prolin konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir. Ataem-07 çeşidinde prolin oranı kontrolüne göre artışı (%77.02) göz önüne alındığında mutant hatta bu artış daha düşüktür (%38,86). Benzer sonuçlar Üstün çeşidinde de gözlemlenmiştir ve bu çeşitte sonuçlar istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo 4.5 180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama prolin değerleri

Soya çeşit ve hatları	Prolin Tayini		
	Kontrol	180 Mm NaCl	
	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	%
Ataem	13,67 $\pm$ 0,001	24,2 $\pm$ 0,001	177,02
150-43	13,58 $\pm$ 0,002	18,79 $\pm$ 0,003	138,86
Üstün	13,91 $\pm$ 0,001	26,65 $\pm$ 0,002	191,58
405-1	13,62 $\pm$ 0,001	15,89 $\pm$ 0,001	116,66



Şekil 4.712 Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların prolin üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır.

4.2.3 Fotosentetik Pigment Miktarı Tayini Analizine Ait Sonuçlar

Tuz stresinin deneyde kullanılan soya hatları üzerindeki etkilerinin görülmesi amacıyla fotosentetik pigment (klorofil a/klorofil b) ölçümü yapılarak tuz stresinin biyokimyasal etkilerinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonrası elde edilen absorbans değerleri hesaplanılarak $\mu\text{g/g}$.TA cinsinden ifade edilmiştir. Her koşul için ortalama klorofil A, klorofil B (Şekil 4.8) ve total klorofil miktarları standart sapmalar da göz önüne alınarak sütun grafiğine dönüştürülmüştür (Şekil 4.9).

Klorofil a, klorofil b ve total klorofil ölçüm verileri incelenerek her hattın tuz stresini uygulanmamış kontrol grubunun stres grubuna oranla ortalamasının optimum değeri gösterdiği kabul edilerek yüzde değişimleri hesaplanmıştır (Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8). Elde edilen sonuçlara göre tuz stresini uygulanan soya çeşit ve mutant

hatların tamamında strese bağılı olarak total klorofil konsantrasyonlarında azalma gözlemlenmiştir.

Ataem-07 soya çeşidinde klorofil a oranı 180 mM NaCl uygulamasında kontrole göre azalmıştır (%65,94). Bu oran mutant 150-43 hattında %57,74 olarak belirlenmiştir. Bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Üstün çeşidinde klorofil a oranı 180 mM NaCl uygulamasında kontrole göre azalmıştır (%63,41). Bu oran mutant hat 405-1 için %43,37 olarak bulunmuştur. Azalma oranları Üstün çeşidi için istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken mutant hat 405-1 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Ataem-07 soya çeşidinde klorofil b oranı 180 mM NaCl uygulamasında kontrole göre azalmıştır (%20,17). Bu oran mutant 150-43 hattında %20,75 olarak belirlenmiştir. Bu azalma önemli bulunmuştur. Üstün çeşidinde ise klorofil b oranı 180 mM NaCl uygulamasında kontrole göre azalmıştır (%21,23). Mutant 405-1 hattında bu oran %5,33 olarak hesaplanmıştır. Azalma oranları üstün çeşidi için istatistiksel olarak anlamlı bulunurken mutant hat 405-1 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ataem-07 çeşidinde total klorofil oranının kontrolüne göre azalma oranı (%52,68) göz önüne alındığında mutant hat 150-43'te bu azalma daha düşüktür (%44,34). Üstün çeşidinde de total klorofil oranı kontrole göre %49,57 oranında azalırken mutant hat 405-1'de azalma oranının (%31,54) daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo 4.69180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama klorofil A değerleri

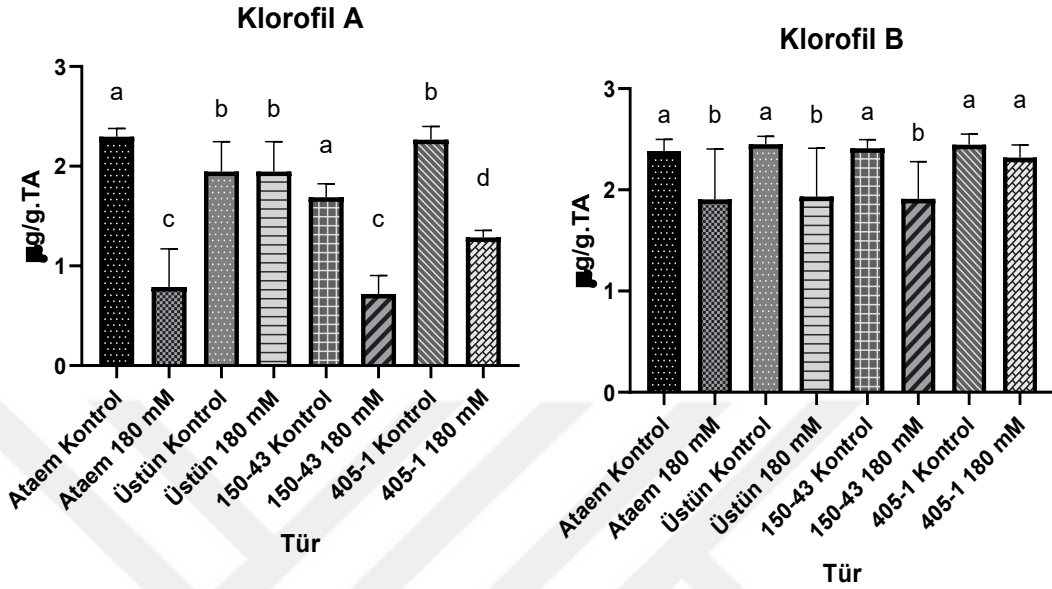
Soya çeşit ve hatları	Klorofil A		
	Kontrol	180 mM NaCl	
	µg/g.TA	µg/g.TA	%
Ataem	2,29 ± 0,08	0,78 ± 0,38	34,06
150-43	1,68 ± 0,13	0,71 ± 0,18	42,26
Üstün	1,94 ± 0,29	0,71 ± 0,25	36,59
405-1	2,26 ± 0,13	1,28 ± 0,07	56,63

Tablo 4.710180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama klorofil B değerleri

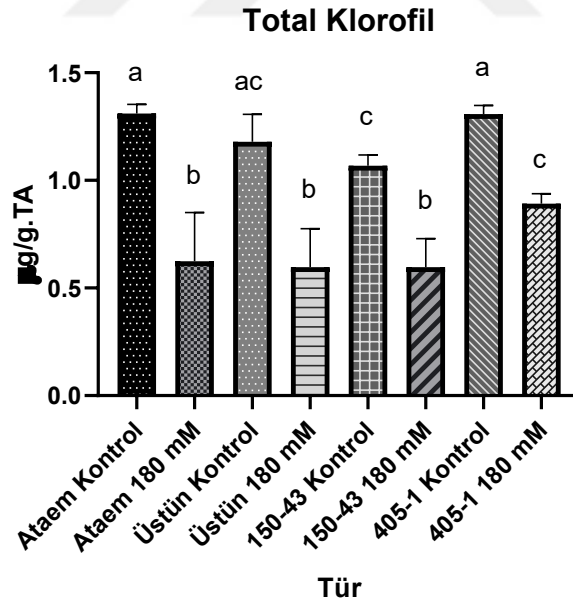
Soya çeşit ve hatları	Klorofil B		
	Kontrol	180 mM NaCl	
	µg/g.TA	µg/g.TA	%
Ataem	2,38 ± 0,11	1,9 ± 0,49	79,83
150-43	2,41 ± 0,08	1,91 ± 0,36	79,25
Üstün	2,45 ± 0,07	1,93 ± 0,47	78,77
405-1	2,44 ± 0,1	2,31 ± 0,12	94,67

Tablo 4.811180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama total klorofil değerleri

Soya çeşit ve hatları	Total klorofil		
	Kontrol	180 mM NaCl	
	µg/g.TA	µg/g.TA	%
Ataem	1,31 ± 0,001	0,62 ± 0,001	47,32
150-43	1,06 ± 0,002	0,59 ± 0,003	55,66
Üstün	1,17 ± 0,001	0,59 ± 0,002	50,42
405-1	1,3 ± 0,001	0,89 ± 0,001	68,46



Şekil 4.813 Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların klorofil A ve klorofil B üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır.



Şekil 4.914 Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların total klorofil üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır.

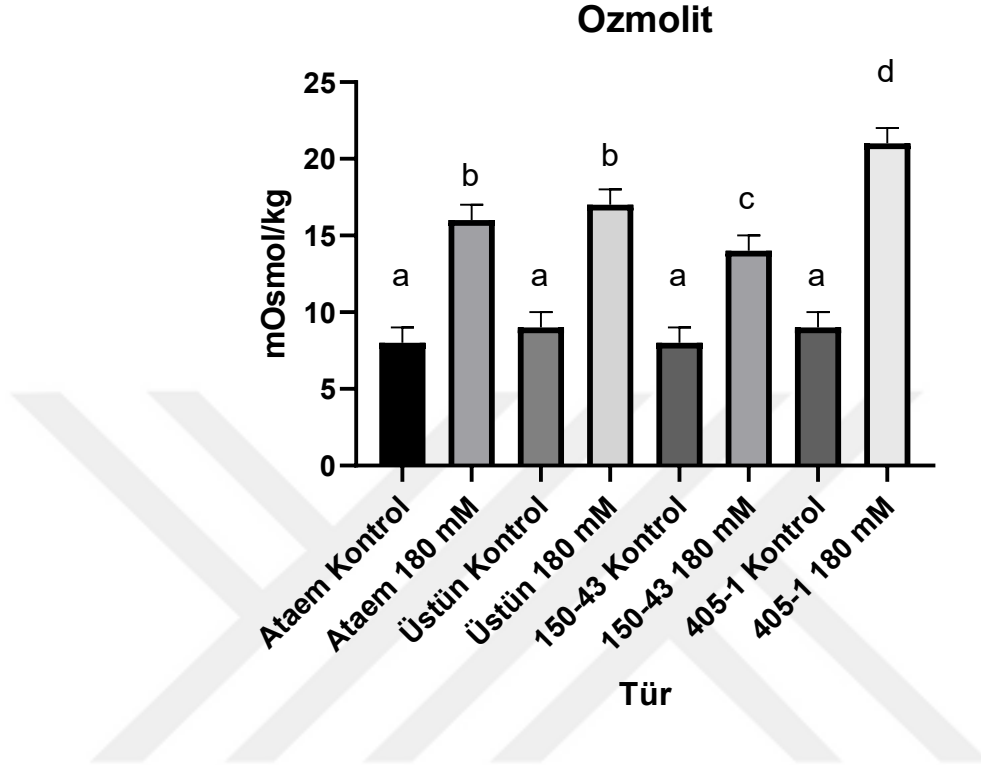
4.2.4 Ozmolit Ölçümü Analizine Ait Sonuçlar

Tuz stresinin deneyde kullanılan soya çeşit ve hatları üzerindeki etkilerinin görülmesi amacıyla ozmolit ölçümü yapılarak tuz stresinin biyokimyasal etkilerinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonrası elde edilen değerler hesaplanılarak mOsmol/kg cinsinden ifade edilmiştir. (Şekil 4.10).

Ozmolit ölçüm verileri incelenerek her hattın tuz stresi uygulanmamış kontrol grubunun total klorofil ortalamasının optimum değeri gösterdiği kabul edilerek yüzde değişimleri hesaplanmıştır (Tablo 4.9). 150-43 hattına ait bitkilerde ozmolit miktarındaki artış oranı %75 olarak tespit edilirken Ataem-07 çeşidinde artış %100 oranında olmuştur. 405-1 hattında ozmolit artışı %133,33 olarak tespit edilirken Üstün çeşidinde bu artış %88,88 oranında kalmıştır. Ozmolit miktarlarındaki artış tuz stresinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Tablo 4.9 180 mM NaCl tuz stresinde kontrol çeşitler ve mutant hatların ortalama ozmolit birikim değerleri

Soya çeşit ve hatları	Ozmolit		
	Kontrol	180 Mm NaCl	
	mOsmol/kg	mOsmol/kg	%
Ataem	8 ± 0,001	16 ± 0,001	200
150-43	8 ± 0,002	14 ± 0,003	175
Üstün	9 ± 0,001	17 ± 0,002	188,88
405-1	9 ± 0,001	21 ± 0,001	233,33



Şekil 4.10 15Tuz stresinin kontrol çeşitler ve mutant hatların ozmolit değeri üzerindeki etkileri. Aynı harfle gösterilmeyen koşullar arasında en az 0,05 birim fark bulunmaktadır.

4.3 İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZ ANALİZİNE AİT SONUÇLAR

Ataem-07, Üstün soya çeşitleri ve 150-43 ve 405-1 mutant hatlarının kontrol ve 180 mM NaCl stresi uygulanan bitkilerinden izole edilen proteinlerin ekspresyon seviyesindeki farklılıklar 2D jel elektroforez analizi ile tespit edilmiştir. Bu tez kapsamında çalışılan tüm soya hatlarında kontrol grubu ve NaCl uygulanan stres grubu örneklerindeki spot sayıları Tablo 4.10'da ve örneklerle ait iki boyutlu jel görüntüleri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

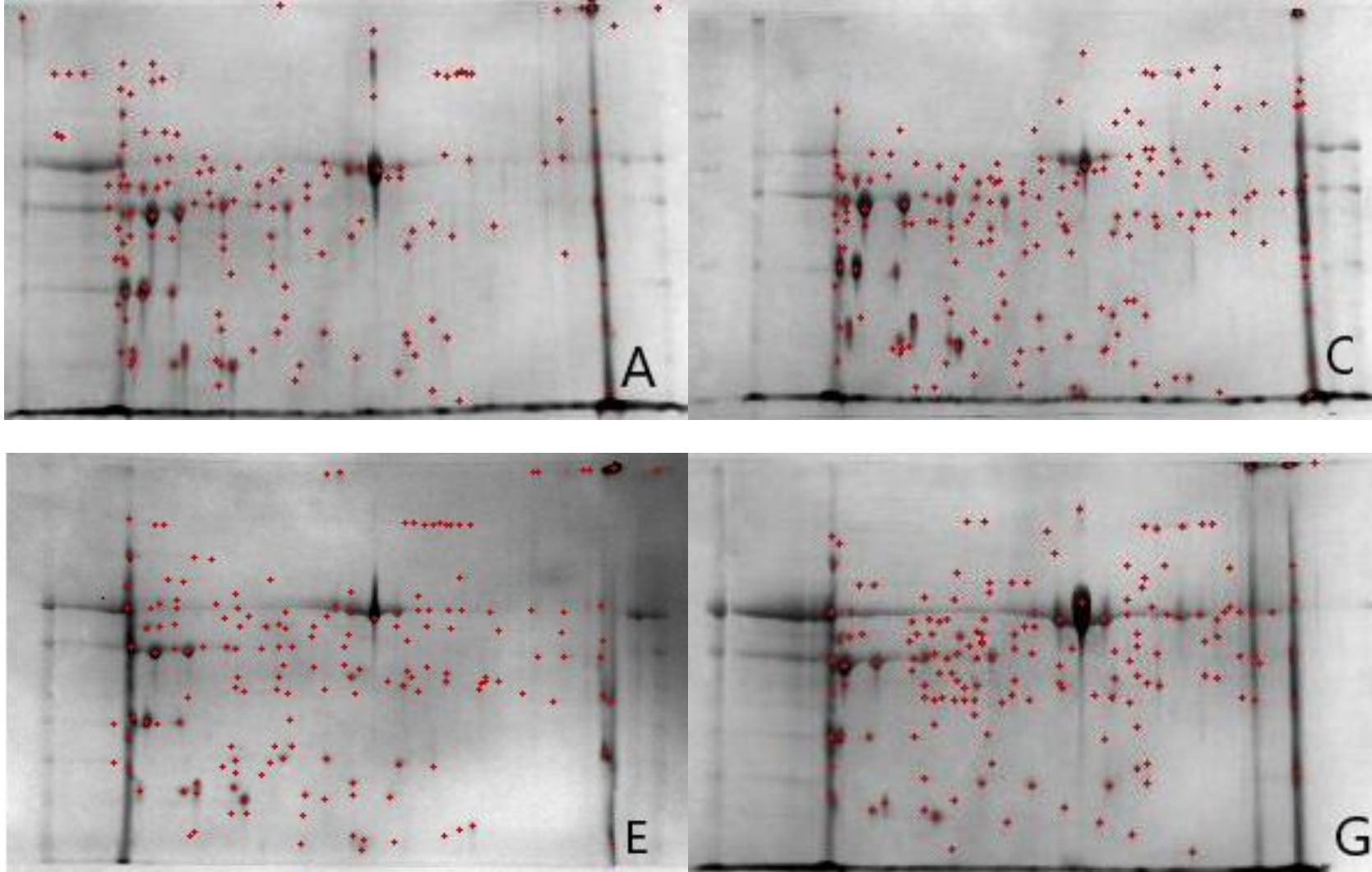
Yüklenen jel görüntülerinde spot analizlerinin yapılması için jel görüntüleri üzerinde bir normalizasyon çalışması tamamlanmıştır. Normalizasyon işlemi sonrasında Yürütülen 8 adet jelde toplam 1276 adet spot tespit edilmiştir. En fazla protein spotu

405-1 mutant hattının kontrol grubuna ait jelde tespit edilirken en düşük sayıda protein spotu Ataem-07 çeşidinin kontrol grubuna ait jelde tespit edilmiştir. Yüzdece protein spot sayısındaki 180 mM NaCl uygulaması sonrasında değişimler incelendiğinde Ataem-07 ve Üstün çeşitlerinde sırasıyla %17 ve %18'lik bir değişim görülürken 150-43 ve 405-1 mutant hatlardaki değişim sırasıyla %5 ve %7 olarak tespit edilmiştir.

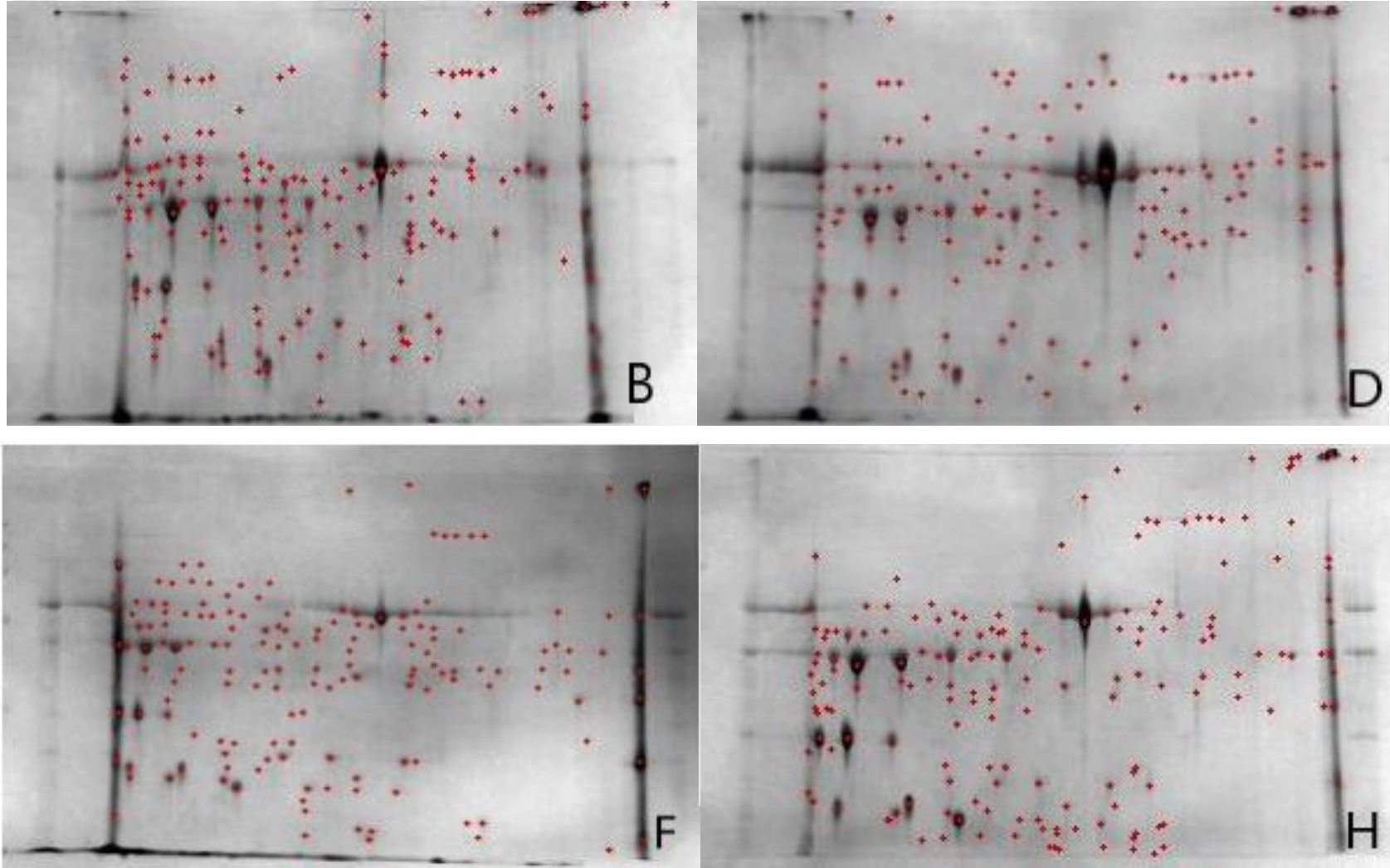
Jel görüntüleri Bio-Rad ChemiDoc cihazı kullanılarak kaydedilmiştir. Kaydedilen jel görüntüleri analiz edilmek üzere Bio-Rad PDQuest Advanced yazılımına yüklenmiştir.

Tablo 4.1013İki boyutlu jel elektroforezi ile elde edilen deney gruplarına ait protein spotlarının sayısı

Gruplar	Protein Spot Sayıları
Ataem-07 Kontrol	140
Ataem-07 180 mM NaCl	165
150-43 Kontrol	163
150-43 180 mM NaCl	156
Üstün Kontrol	176
Üstün 180 mM NaCl	145
405-1 Kontrol	171
405-1 180 mM NaCl	160

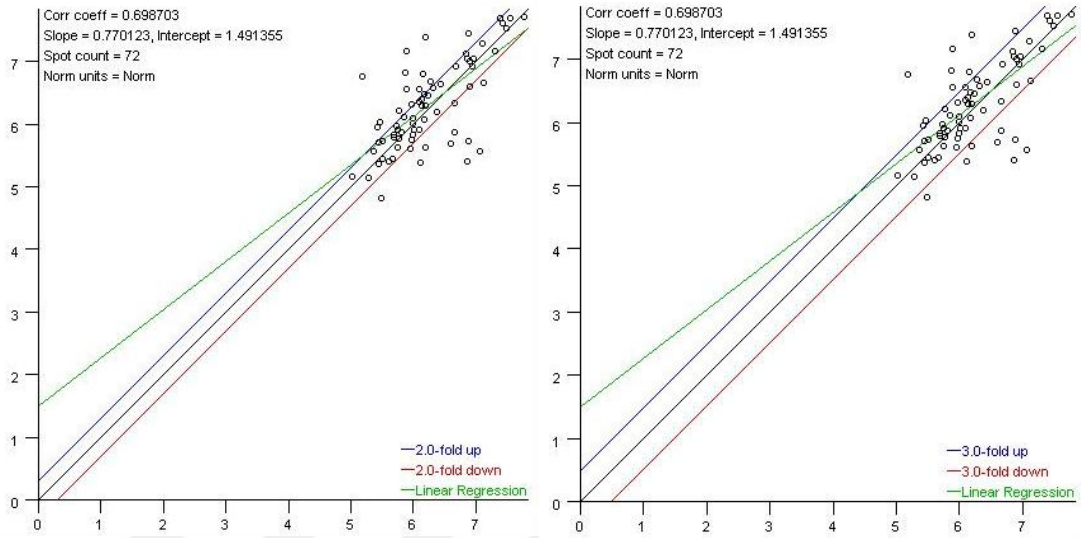


Şekil 4.116Soya hatlarının 2D jel görüntüleri A) Ataem hattı kontrol grubu C) Üstün hattı kontrol grubu E) 150-43 hattı kontrol grubu G) 405-1 hattı kontrol grubu

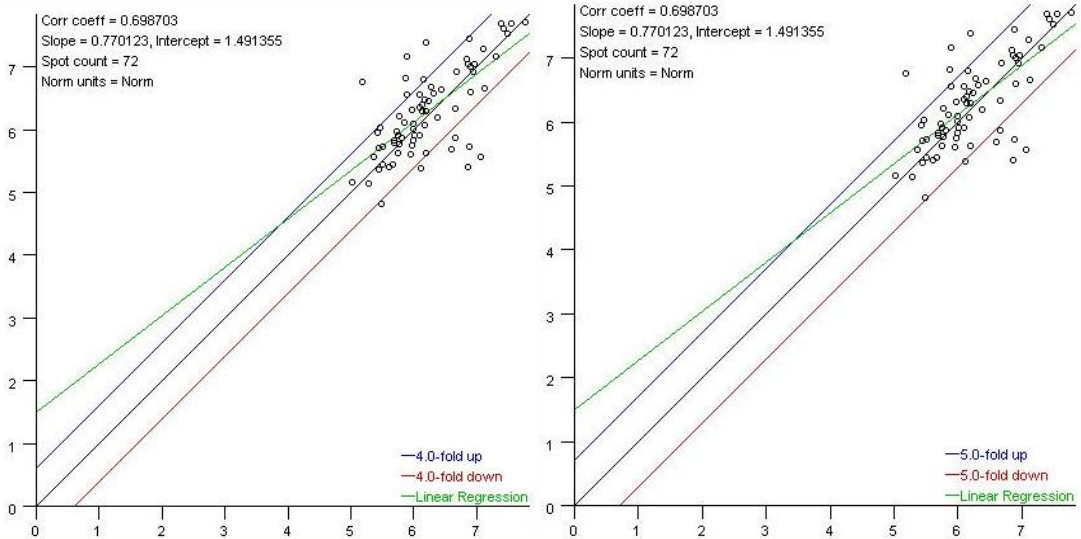


Şekil 4.17Soya hatlarının 2D jel görüntüleri B) Ataem hattı 180 mM NaCl uygulanan grup D) Üstün hattı 180 mM NaCl uygulanan grup F) 150-43 hattı 180 mM NaCl uygulanan grup H) 405-1 hattı 180 mM NaCl uygulanan grup

PDQuest 2-D analiz yazılımı kullanılarak spotların dağılım grafiği (scatter plot) analizleri yapılmıştır. Analiz, anaç ve mutant türlerin kendi kontrol grupları ve stres grupları arasında karşılaştırmalı olacak şekilde tasarlanmıştır. Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te Ataem hattının tuz stresi uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerinde protein anlatım düzeyleri arasındaki sırasıyla 2 kat, 3 kat, 4 kat ve 5 kat farklılık görünen protein spotlarının dağılım grafiği gösterilmektedir.

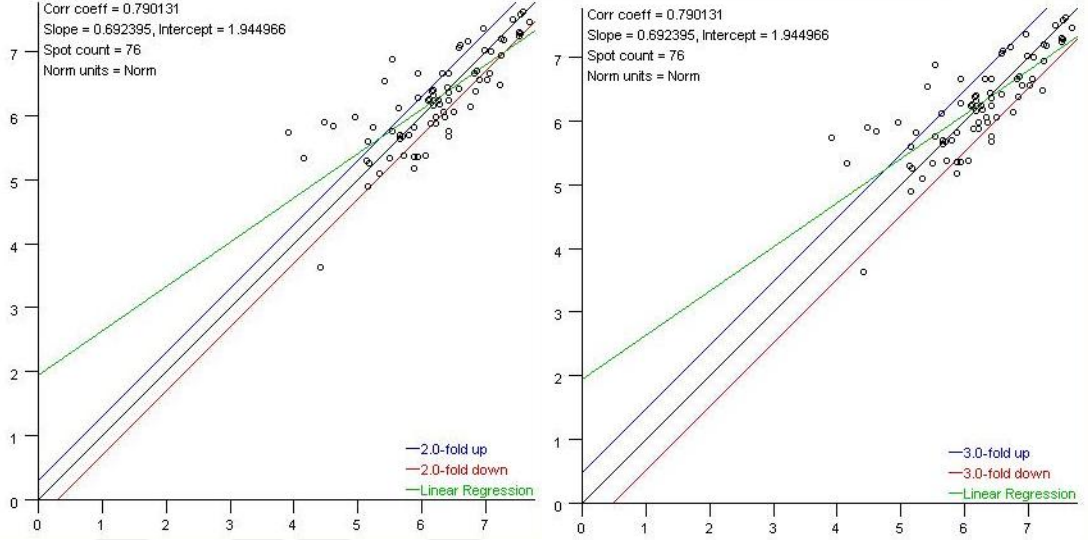


Şekil 4.18 Ataem hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve azalmış (sol) ve 3 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği

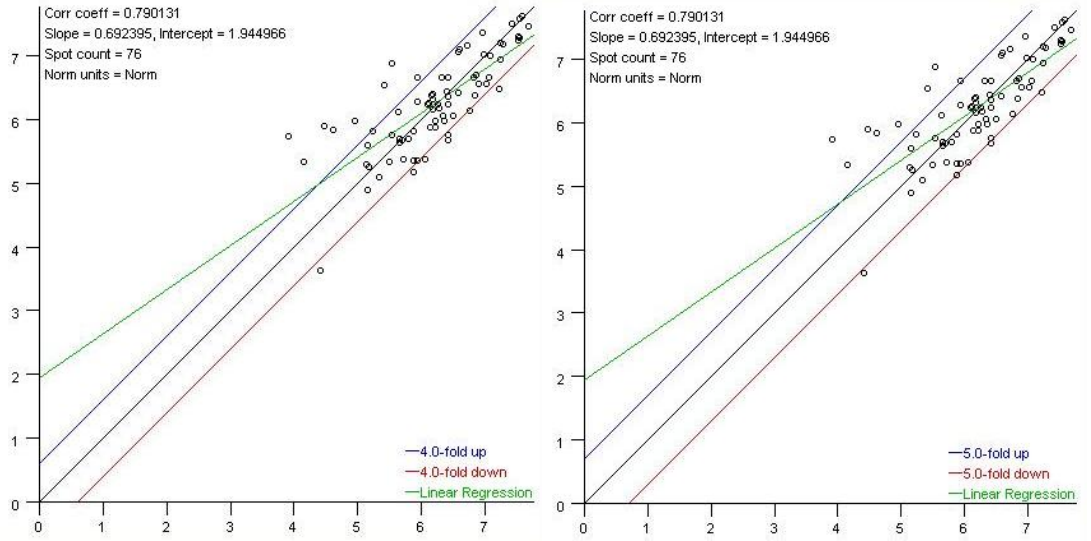


Şekil 4.19 Ataem hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve azalmış (sol) ve 5 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da Üstün hattının tuz stresi uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerinde protein anlatım düzeyleri arasındaki sırasıyla 2 kat, 3 kat, 4 kat ve 5 kat farklılık görünen protein spotlarının dağılım grafiği gösterilmektedir.

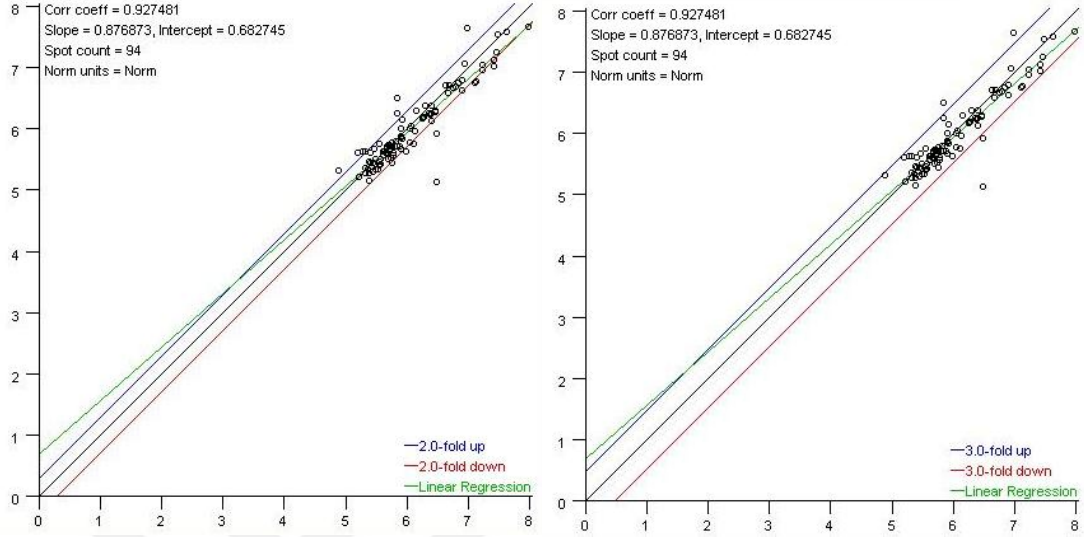


Şekil 4.152Üstün hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve azalmış (sol) ve 3 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği

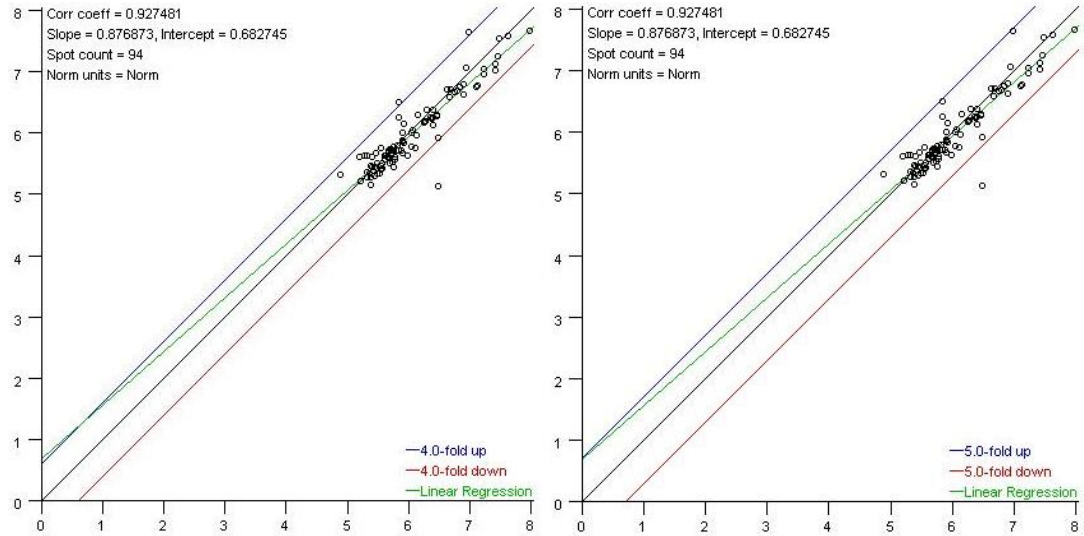


Şekil 4.1621Üstün hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve azalmış (sol) ve 5 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’te 150-43 mutant hattının tuz stresi uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerinde protein anlatım düzeyleri arasındaki sırasıyla 2 kat, 3 kat, 4 kat ve 5 kat farklılık görünen protein spotlarının dağılım grafiği gösterilmektedir.

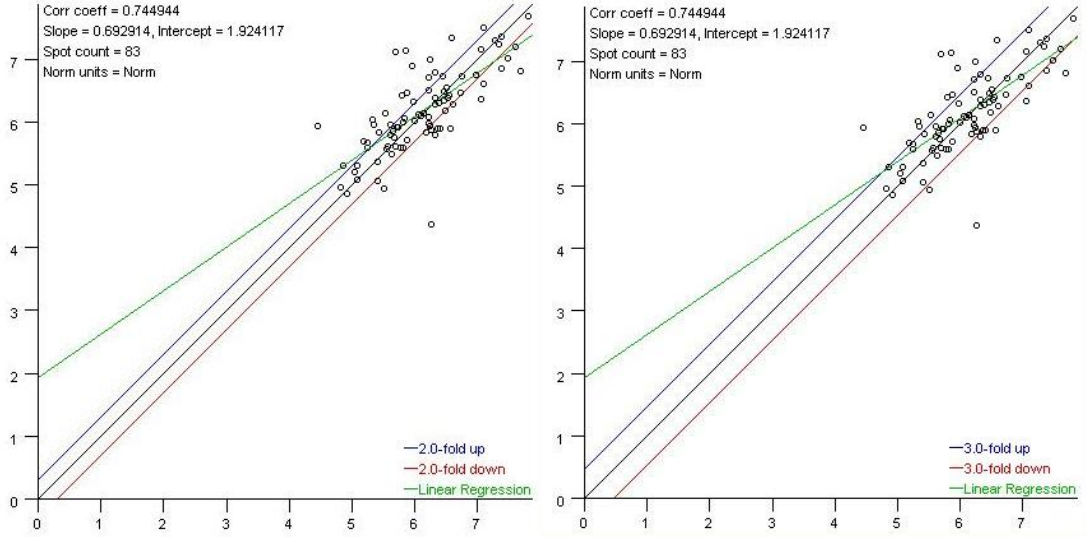


Şekil 4.17 22150-43 hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve azalmış (sol) ve 3 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği

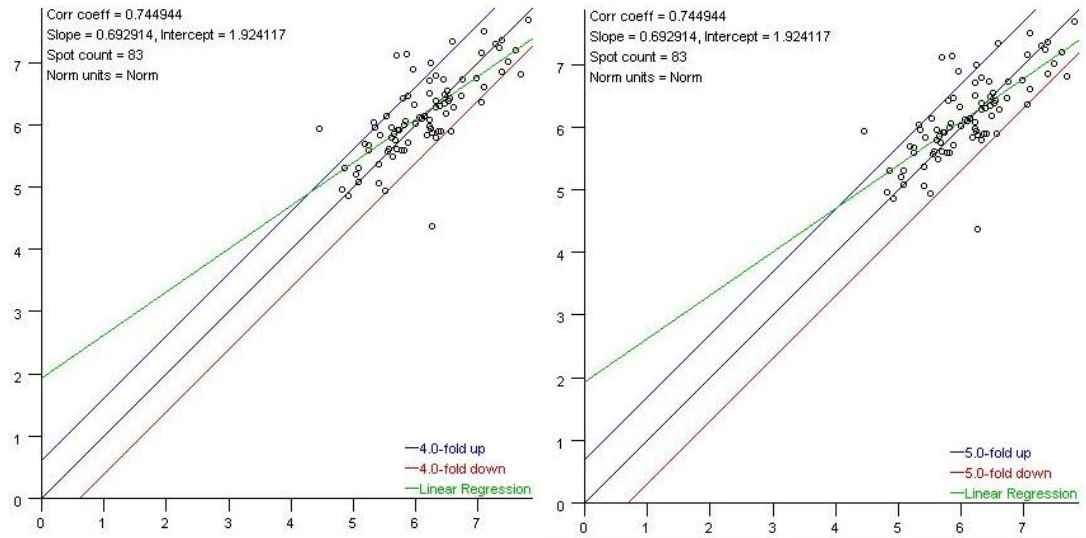


Şekil 4.18 23150-43 hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve azalmış (sol) ve 5 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği

Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de 405-1 mutant hattının tuz stresi uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerinde protein anlatım düzeyleri arasındaki sırasıyla 2 kat, 3 kat, 4 kat ve 5 kat farklılık görünen protein spotlarının dağılım grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.19 2405-1 hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve azalmış (sol) ve 3 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği



Şekil 4.20 2405-1 hattında stres uygulanmış bitkilerde kontrol grubu bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve azalmış (sol) ve 5 kat artmış ve azalmış (sağ) proteinlerin dağılım grafiği

Spotların anlatım seviyelerinin sütun grafikleri oluşturularak LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmek üzere 32 adet özgün spot seçilmiştir. Seçilen spotların PDQuest analizleri Ataem-07 çeşidi ve mutant 150-43 hattı arasında (Şekil 4.21), Üstün çeşidi ve 405-1 hattı arasında (Şekil 4.22) ve tüm çeşit ve hatlar arasında (Şekil 4.23) karşılaştırmalı şekilde üç ayrı analizde incelenmiştir. Spotlar, numaraları ve PDQuest analizlerine ait sütun grafikleriyle birlikte verilmiştir.

PDQuest analizi sonrası; A2, C4, F5, G3 spotlarında tuz stresi koşullarında anlatımlarının azaldığı, B1, B5, B6, B8, D1, D2, D3, D4, F1, F2, F3, G1, G2, H1, H2, H3, H4 spotlarında tuz stresi koşullarında anlatımlarında artış görüldüğü tespit edilmiştir.

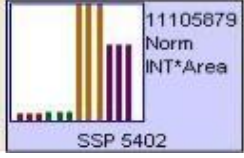
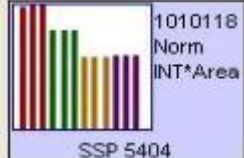
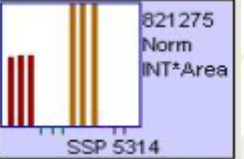
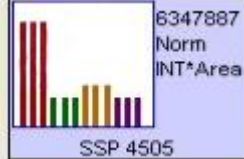
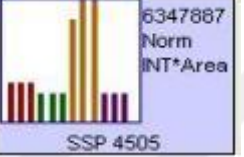
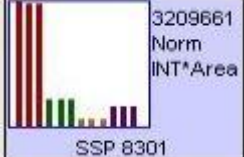
Seçilen spotların PDQuest analizleri Ataem-07 çeşidi ve mutant 150-43 hattı arasında tuz stresine karşı verdikleri cevaplara göre şu şekildedir; A1 spotunun anlatım seviyesi 150-43 hattında azalmıştır. Spot, glutamin sentetaz proteinine aittir ve hücre içi katalitik aktivitelerde rol oynamaktadır. B1 spotunun anlatım seviyesi Ataem-07 çeşidinde tuz stresi koşullarında artmıştır. Spot, İzoflavon redüktaz homolog 2 proteinine aittir ve oksidoredüktaz aktivitesinde görev almaktadır. B5 spotunun anlatım seviyesinin Ataem-07 çeşidinde tuz stresinde arttığı görülmektedir. Spot, S-adenozilmetiyonin sentaz proteinine aittir ve ATP bağlanmasında görev almaktadır. F1 spotunun anlatımı, 150-43 hattında tuz stresi koşullarında artmıştır. Spot, koproporfirojen oksidaz proteinine aittir ve uroporfirojen dekarboksilaz aktivitesinde görev almaktadır. F2 spotunun anlatım seviyesi 150-43 hattında tuz stresi koşullarında artmıştır. Spot, S-adenozilmetiyonin sentaz proteinine aittir ve ATP bağlanmasında görev almaktadır. F3 spotunun anlatım seviyesi 150-43 hattında tuz stresi uygulamasıyla artmıştır. Spot, tanımlanmayan bir proteine aittir ve gama-glutamil peptidaz aktivitesinde görev aldığı tespit edilmiştir.

Seçilen spotların PDQuest analizleri Üstün çeşidi ve 405-1 hattı arasında tuz stresine karşı verdikleri cevaplara göre C3 spotunun anlatımı 405-1 mutant hattında azalmıştır. Spot, tanımlanmamış bir proteine ait olup ATP bağlanmasında görev aldığı bilinmemektedir. C4 spotunun anlatımı, Üstün çeşidinde ve mutant 405-1 hattında tuz stresi koşullarında azalmıştır. Spot, NAD-bağımlı epimeraz/dehidrataz bölgesi

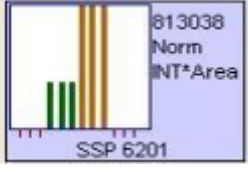
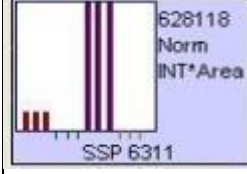
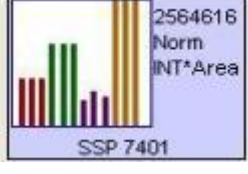
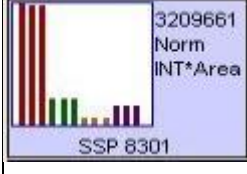
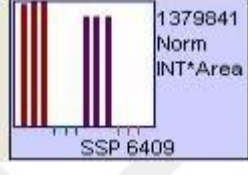
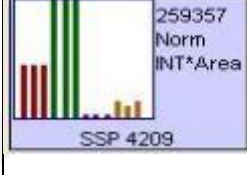
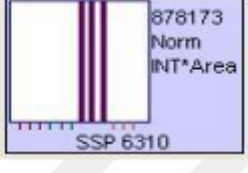
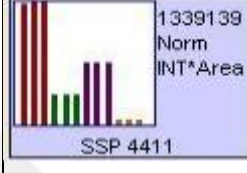
proteinine aittir ve RNA bağlanmasında görev almaktadır. D1 spotunun anlatımı Üstün çeşidi ve 405-1 mutantında tuz stresi koşullarında görülmektedir. Spot, ribulaz bifosfat karboksilaz büyük zincir proteinine aittir ve karbondioksit fiksasyonunda görev almaktadır. D2 spotunun anlatım seviyesi, Üstün çeşidinde tuzlulukta görülmüştür. Spot, NAD-bağımlı epimeraz/dehidrataz bölgesi proteinine aittir ve karbondioksit fiksasyonunda görev almaktadır. D4 spotunun anlatımı, Üstün çeşidi ve 405-1 mutant hattında tuz stresi koşullarında artmıştır. Spot, dehidrin proteinine aittir ve stres yanıtında görev almaktadır. G1 spotunun anlatımı, Üstün çeşidi ve 405-1 hattında tuz stresi uygulamasında azalmıştır. Spot, NADP bağlanma bölgesi içeren bir proteine aittir ve oksidoredüktaz aktivitesinde görev almaktadır. G3 spotunun anlatım seviyesi, Üstün çeşidi ve 405-1 mutant hattında tuz stresi koşullarında azalmıştır. Spot, PsbP-ucu bölgesi içeren bir proteine ait olup fotosistem II'nin düzenlenmesinde görev almaktadır. H1 spotunun anlatımı, 405-1 hattında tuz stresi koşullarında artmıştır. Spot, fosfoglisarat kinaza ait olup ADP-ATP bağlanmasında görev almaktadır.

Seçilen spotların PDQuest analizleri tüm çeşit ve hatlar arasında karşılaştırmalı şekilde de incelenmiştir. A2 spotunun 150-43 mutant hattında anlatımı görülmezken diğer çeşit ve hatlarda tuz stresi koşullarında anlatımının azaldığı tespit edilmiştir. Spot, tanımlanmamış bir proteine ait olup şaperon aktivitesinde görev almaktadır. B6 spotunun anlatım seviyesinin tüm çeşit ve mutant hatlarda tuz stresi durumlarda arttığı görülmektedir. Bu spot, V tipi proton ATPaz E alt ünitesine ait bir protein olarak tanımlanmıştır ve ATPaz aktivitesinde görev almaktadır. B8 spotunun anlatımı tüm çeşit ve hatlarda tuz stresi koşullarında artmıştır. Spot, fruktoz-bifosfat aldolaz proteinine aittir ve karbonhidrat degradasyonunda görev almaktadır. D3 spotunun anlatımının tüm çeşit ve hatlarda tuz stresi koşullarında arttığı görülmüştür. Spot, RuBisCo proteinlerinden birine aittir ve ATP bağımlı protein katlanmalarında görev almaktadır. F5 spotunun anlatım seviyesi 150-43 hattı hariç diğer hat ve çeşitlerde tuz stresi koşullarında azalmıştır. Spot, tanımlanmayan bir proteine aittir ve oksijen açığa çıkarma aktivitesinde (OER) görev almaktadır. G2 spotunun anlatım seviyesi, 150-43 çeşidi hariç tüm çeşit ve hatlarda tuz stresiyle artmıştır. Spot, proteazom alfa alt ünitesi proteinine aittir ve peptitlerin ayrılmasında görev almaktadır. H2 spotunun anlatımı, mutant hatlarda tuz stresi koşullarında azalırken, Ataem-07 ve Üstün çeşitlerinde tuz

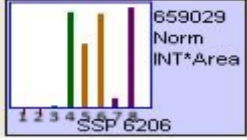
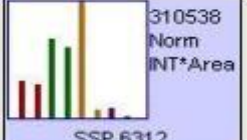
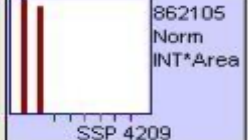
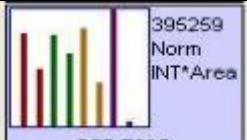
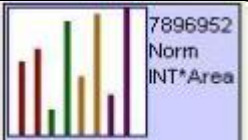
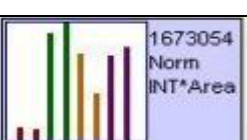
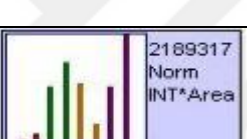
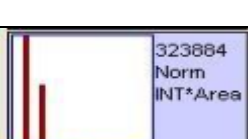
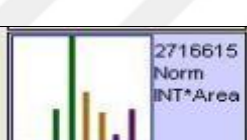
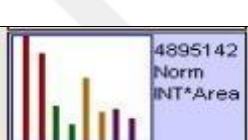
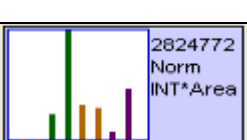
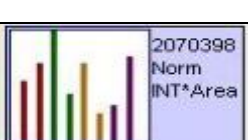
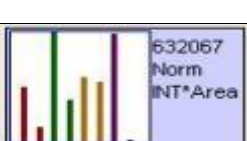
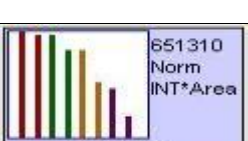
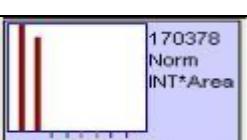
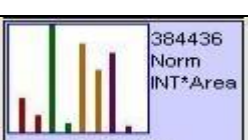
stresi koşullarında artmıştır. Spot, NAD bağımlı epimeraz/dehidrataz bölgesi içeren proteine ait olup RNA bağlanma mekanizmasında görev almaktadır. H3 ve H4 spotlarının anlatımları, tüm çeşit ve hatlarda tuz stresi koşullarında artmıştır. Spotlar, NAD bağımlı epimeraz/dehidrataz bölgesi içeren proteinlere ait olup oksidoredüktaz aktivitesinde görev almaktadırlar.

Spot Numarası	PD-Quest Analizi	Spot Numarası	PD-Quest Analizi
Spot A1		Spot F1	
Spot B1		Spot F2	
Spot B5		Spot F3	

Şekil 4.26 Ataem-07 çeşidi ve 150-43 mutant hattı ile yapılan karşılaştırmalı PD-Quest analizine ait sütun grafikleri

Spot Numarası	PD-Quest Analizi	Spot Numarası	PD-Quest Analizi
Spot C3		Spot D4	
Spot C4		Spot G1	
Spot D1		Spot G3	
Spot D2		Spot H1	

Şekil 4.27Üstün çeşidi ve 405-1 mutant hattı ile yapılan karşılaştırmalı PD-Quest analizine ait sütun grafikleri

Spot Numarası	PD-Quest Analizi	Spot Numarası	PD-Quest Analizi
Spot A2		Spot E7	
Spot B6		Spot F4	
Spot B8		Spot F5	
Spot B2		Spot F6	
Spot B3		Spot F7	
Spot C1		Spot G2	
Spot C2		Spot H2	
Spot D3		Spot H3	
Spot E1		Spot H4	

Şekil 4.28 Ataem-07 ve Üstün çeşitleri ile mutant 150-43 ve 405-1 ile yapılan karşılaştırmalı analize ait PD-Quest sütun grafikleri

Ataem-07 ve Üstün çeşit ve 150-43 ve 405-1 mutant hatlarda anlatım farklılığı görülen 9 adet protein spotu (B2, B3, C1, C2, E1, E7, F4, F6 ve F7) tespit edilmiştir. PDQuest analizi sonrası; glisin kesme sistemi P proteinlerine ait B2, B3 spotlarının 150-43 mutantında anlatımlarının azaldığı, hemperoksidaz ailesi protein bölgesi ve sistein proteinaz proteinine ait C1 ve C2 spotlarının 150-43 mutant hattında anlatımının olmadığı, NADP bağlanma bölgesi içeren protein, gama-glutamil hidrolaz ve helikaz ATP bağlayıcı bölge içeren proteinlerine ait E1, F4, F7 spotlarının sadece 150-43 hattında anlatımının olduğu, glutatyon dehidrogenaz, gama glutamil hidrolaz ve proteazom alfa alt ünitesi proteinlerine ait E7, F6 spotlarının 150-43 mutantında anlatım seviyesinin diğer hatlara kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

PDQuest analizi sonrası anlatım seviyelerinde anlamlı istatistiksel değişiklik görülen ve 2D jellerden kesilen spotlar LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir ve LC-MS/MS yöntemi sonucunda elde edilen peptid bilgileri UniProt ve String veritabanlarında aksesyon numaraları ve organizma ile aratılarak protein isimleri ve hücre içi görevleri belirlenmiştir. Seçilen spotlara karşılık gelen proteinler isimleri, görevleri ve aksesyon numaraları Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.142 boyutlu jel elektroforezlerinden seçilen ve kesilen spotların LC-MS/MS analizi sonuçları

Spot Numarası	Protein İsmi	Proteinin Görevi	Aksesyon Numarası	Çeşit/Hatlardaki Durumları
A1	Glutamin sentetaz	Katalitik aktivite	I1MFC4	150-43 hattında azalış
A2	Tanımlanmamış protein	Şaperon	K7MJZ5	150-43 hattında anlatımı yok
B1	İzoflavon redüktaz homolog 2	Oksidoredüktaz aktivitesi	Q9SDZ0	Ataem-07 çeşidinde tuzlulukta artış
B2	Glisin kesme sistemi P proteini	Glisin degradasyonu	I1MXB1	150-43 hattında azalış
B3	Glisin kesme sistemi P proteini	Glisin degradasyonu	I1M923	150-43 hattında azalış
B5	S-adenozilmetiyonin sentaz	ATP bağlanma mekanizması	I1MHR0	Ataem-07 çeşidinde tuzlulukta artış
B6	V tipi proton ATPaz E alt ünitesi	ATPaz üretimi	I1K6C1	Çeşit ve hatların tümünde tuzlulukta artış
B8	Fruktoz-bifosfat aldolaz	Karbonhidrat degradasyonu	I1LJ68	Çeşit ve hatların tümünde tuzlulukta artış
C1	Hemperoksidaz ailesi proteini	Peroksidaz aktivitesi	I1JGV6	150-43 hattında anlatımı yok

Tablo 4.15 Devamı 2 boyutlu jel elektroforezlerinden seçilen ve kesilen spotların LC-MS/MS analizi sonuçları

Spot Numarası	Protein İsmi	Proteinin Görevi	Aksesyon Numarası	Çeşit/Hatlardaki Durumları
C2	Sistein proteinaz	Peptidaz aktivitesi	A0A0R0GB30	150-43 hattında anlatımı yok
C3	Tanımlanmamış protein	ATP bağlanması	K7MJZ5	405-1 hattında azalış
C4	NAD-bağımlı epimeraz/dehidrataz bölgesi	RNA bağlanması	I1L838	Üstün ve 405-1'de tuzlulukta azalış
D1	Ribulaz bifosfat karboksilaz büyük zincir	Karbondioksit fiksasyonu	P27066	Üstün ve 405-1'de tuzlulukta var
D2	NAD-bağımlı epimeraz/dehidrataz bölgesi	Karbondioksit fiksasyonu	I1JR38	Üstün çeşidinde tuzlulukta var
D3	RuBisCO büyük alt birimini bağlayıcı proteinin beta alt birimi	ATP bağımlı protein katlanmaları	A0A0R0IU60	Çeşit ve hatların tümünde tuzlulukta artış
D4	Dehidrin	Stres yanıtı	K7LEQ5	Üstün ve 405-1'de tuzlulukta artış
E1	NADP bağlanma bölgesi içeren protein	NADP bağlanması	C6THR8	150-43 hattında anlatımı var

Tablo 4.16 Devamı 2 boyutlu jel elektroforezlerinden seçilen ve kesilen spotların LC-MS/MS analizi sonuçları

Spot Numarası	Protein İsmi	Proteinin Görevi	Aksesyon Numarası	Çeşit/Hatlardaki Durumları
E7	Glutasyon dehidrogenaz	Glutasyon dehidrogenaz ve glutasyon transferaz aktivitesi	I1NJ59	150-43 hattında artış
F1	Koproporfirojen oksidaz	Uroporfirojen dekarboksilaz aktivitesi	A0A0R0G797	150-43 hattında tuzlulukta artış
F2	S-adenozilmetionin sentaz	ATP bağlanması	I1MHR0	150-43 hattında tuzlulukta artış
F3	Tanımlanmamış protein	Gama-glutamil peptidaz aktivitesi	A0A0R0GUI6	150-43 hattında tuzlulukta artış
F4	Gama-glutamil hidrolaz	Gama-glutamil peptidaz aktivitesi	P93164	150-43 hattında var
F5	Tanımlanmamış protein	OER aktivitesi	I1MNK0	150-43 hariç tüm çeşit ve hatlarda tuzlulukta azalış
F6	Proteazom alfa alt ünitesi	Peptit ayrılması	A0A0R4J3L5	150-43 hattında artış
F7	Helikaz ATP-bağlayıcı bölge içeren protein	DNA helicaz aktivitesi	A0A0R0GTX9	150-43 hattında var

Tablo 4.17 Devamı 2 boyutlu jel elektroforezlerinden seçilen ve kesilen spotların LC-MS/MS analizi sonuçları

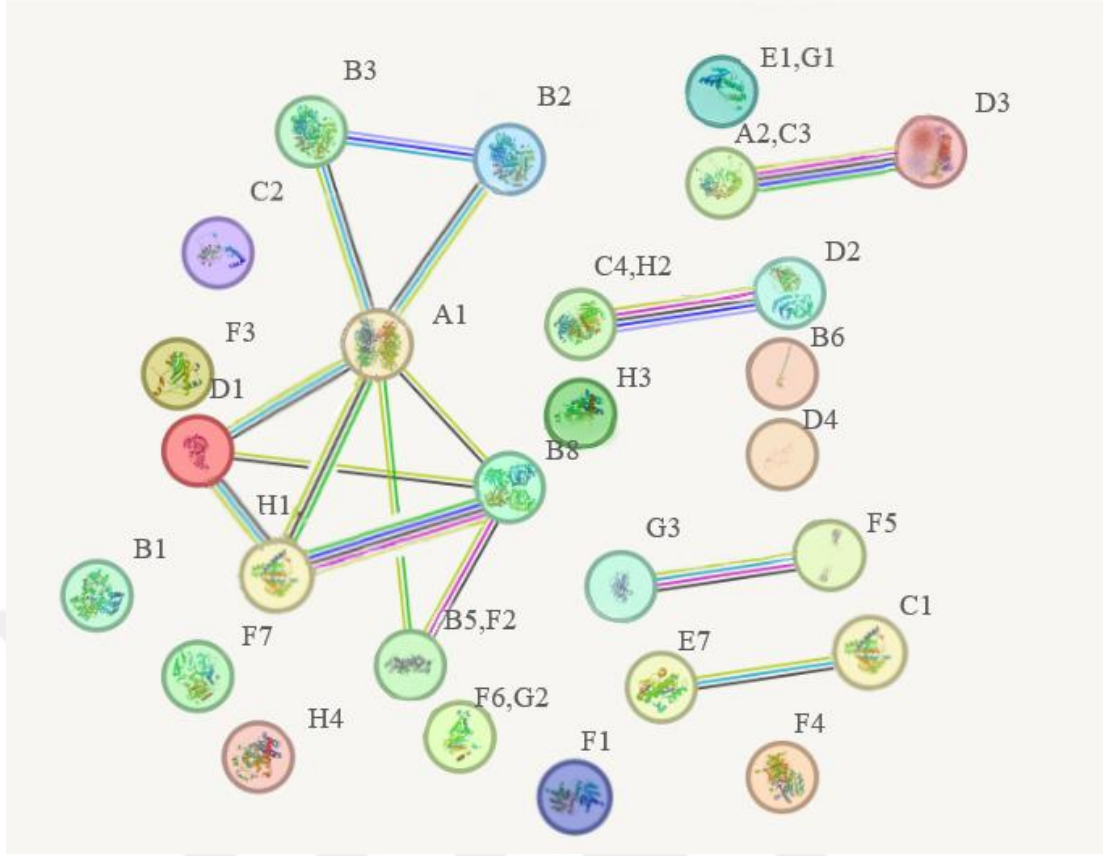
Spot Numarası	Protein İsmi	Proteinin Görevi	Aksesyon Numarası	Çeşit/Hatlardaki Durumları
G1	NADP bağlanma bölgesi içeren protein	Oksidoredüktaz aktivitesi	C6THR8	Üstün ve 405-1’de tuzlulukta azalış
G2	Proteazom alfa alt ünitesi	Peptit ayrılması	A0A0R4J3L5	150-43 hariç tüm çeşit ve hatlarda tuzlulukta artış
G3	PsbP C-ucu bölgesi içeren protein	Fotosistem II’nin düzenlenmesi	I1N123	Üstün ve 405-1’de tuzlulukta azalış
H1	Fosfoglisarat kinaz	ADP-ATP bağlanması	A0A0R0GFW6	405-1 hattında tuzlulukta artış
H2	NAD epimeraz/dehidrataz içeren protein	bağımlı RNA bağlanması bölgesi	I1JR38	Mutant hatlarda tuzlulukta azalış
H3	NAD epimeraz/dehidrataz içeren protein	bağımlı Oksidoredüktaz aktivitesi bölgesi	A0A0R0F859	Çeşit ve hatların tümünde tuzlulukta artış
H4	NAD epimeraz/dehidrataz içeren protein	bağımlı Oksidoredüktaz aktivitesi bölgesi	A0A0R4J4L1	Çeşit ve hatların tümünde tuzlulukta artış

Aksesyon numaraları ile tespit edilen peptidlerin ilgili proteinleri bulunarak String veritabanında araştırılmıştır. String veritabanı incelemesi sonrasında elde edilen protein spotlarının birbirleri ile etkileşimlerini veren şema Şekil 4.24'te verilmiştir. String veritabanı kullanılarak elde edilen bu ağda, stres koşullarında regülasyonu değişen proteinlerin birbirleriyle olan potansiyel etkileşimleri görselleştirilmiştir. Görselde her bir düğüm bir proteini, kenarlar ise bu proteinler arasındaki bilinen veya tahmin edilen etkileşimleri temsil etmektedir.

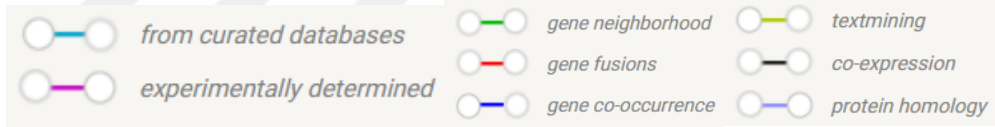
UniProt sonuçlarına göre hücre içi katalitik aktivitelerde görev alan protein spotlarının arasında, hücre içi fotosentez ve oksijenli solunum mekanizmalarında rol oynayan proteinler arasında, glutatyon ve peroksidaz aktivitelerini düzenleyen proteinler arasında, şaperon proteinleri arasında, karbondioksit fiksasyon proteinleri arasında, ATP bağlanma mekanizması ve karbonhidrat degradasyonunda görevli proteinler arasında ortak gen anlatım mekanizmalarının etkili olduğu görülmektedir. Deneysel olarak görev tanımı belirlenmiş proteinlerin geniş bir veri tabanında aratılması sonucu elde edilen sonuçlar biyokimyasal analiz sonuçlarıyla uyumlu ve tuz stres yanıt mekanizmasını açıklayıcı niteliktedir.

Aynı zamanda String analizi sonrası stres durumunda anlatım seviyesinde değişim görülen ancak diğer spotlarla etkileşimi olmayan spotların da var olduğu tespit edilmiştir. Bu spotlar (B1, B6 C2, D4, F1, F3, F4, F7, H3 ve H4 spotları) solunum, stres yanıtı, DNA eşlenmesi gibi birbirinden uzak ancak hücrel olarak hayati öneme sahip süreçlerde görev almaktadır.

Aynı zamanda homoloji gösteren protein türleri de Şekil 4.24'te belirtilmiştir. Protein spotları arasındaki etkileşimler renk kodlu olacak çizgilerle ifade edilmiştir ve renk kodlarının ifade ettiği etkileşim türleri Şekil 4.25'te verilmektedir.

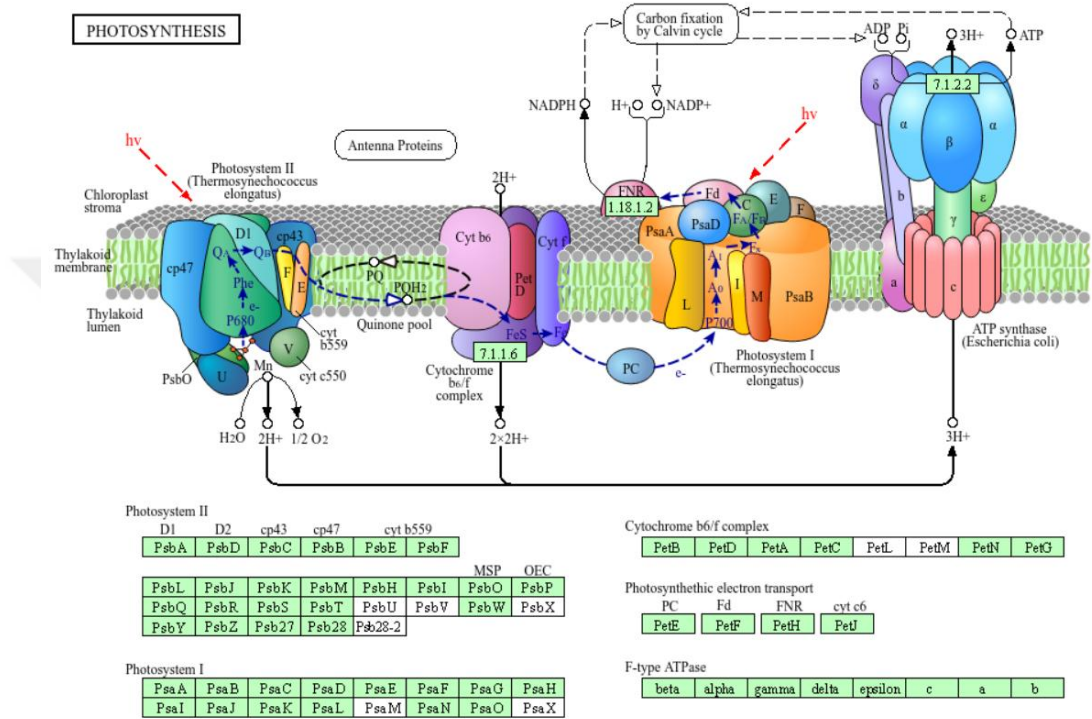


Şekil 4.29 Elde edilen protein spotlarının String analizi



Şekil 4.230String analizindeki çizgi ifadeleri

Yapılan spot analizleri sonucunda tespit edilen değişimlerin üç ana metabolik yolak üzerinden stres yanıtında rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu yolaklar; fotosentez, enerji metabolizması, antioksidan savunma yolaklarıdır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan proteinlerin metabolik yolak bilgileri KEGG veritabanı üzerinden elde edilmiştir. Şekil 4.26’da fotosentez yolağı şematik olarak gösterilmiştir. Tuz stresine tolerans ile ilişkili görülen genler yeşil işaretli olarak gösterilmiştir. Üstün ve 405-1’de fotosisten II’de PsbP proteinini tuzlulukta azalmıştır.



Şekil 4.26 KEGG yolak analiziyle belirlenen fotosentez yolağı şeması. Yeşil renkle vurgulanan protein erişim numaraları tuzluluk ve kuraklık toleransı ile ilişkilendirilmiştir.

5 TARTIŞMA

Küresel iklim değışikliğı, su kaynaklarının kısıtlanması ve toprak tuzluluğundaki artış gibi çevresel problemler, tarımsal üretimi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu bağlamda, soya (*Glycine max*) gibi tarımsal açıdan önemli bitki türlerinin abiyotik streslere karşı gösterdiği fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yanıtların araştırılması büyük önem arz etmektedir. Artan dünya nüfusu, iklim değışikliğı ve sınırlı tarım arazileri düşünüldüğünde tuza dayanıklı bitki türlerinin geliştirilmesi kritik hale gelmiştir. Bu bağlamda, tuza dayanıklı soya türlerinin geliştirilmesi, tarımsal üretimi artırmakla kalmayacak, aynı zamanda ekonomik olarak sürdürülebilir bir çözüm sunarak çiftçilerin gelirini artıracaktır. Tuz stresi, bitkilerde ozmotik dengesizlik, iyon toksisitesi ve oksidatif stres gibi mekanizmaları tetikleyerek büyüme ve gelişimi olumsuz etkilemektedir (Ondrasek ve ark., 2022).

Gama ışınlarıyla mutasyona uğratılmış soya çeşit (Ataem-07 ve Üstün) ve mutant hatlarının (150-43 ve 405-1) tuz stresine tolerans mekanizmalarını anlamaya yönelik yürütülen bu çalışma, tarımsal sürdürülebilirlik hedefleri açısından önemlidir (Atak ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında, Ataem-07 ve Üstün çeşitleri ile 150-43 ve 405-1 mutant hatlarının tuz stresine karşı gösterdikleri adaptif tepkiler ayrıntılı şekilde değerlendirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında, Ataem-07, Üstün soya çeşitleri ve 150-43 ve 405-1 mutant hatlarının kontrol ve 180 mM NaCl stresi uygulanan bitkilerinden izole edilen proteinlerin ekspresyon seviyesindeki farklılıkları göstermek amacıyla 8 adet 2D jel yürütülmüştür ve toplamda 1276 adet protein spotu tespit edilmiştir. En fazla spot görülen jel Üstün ve 405-1 hattının tuz uygulanmamış grubuna aittir. En az sayıda spotun olduğu jel Ataem-07 çeşidinin kontrol grubuna aittir. 180 mM NaCl uygulamasından sonra Ataem-07 çeşitlerine ait jellerdeki spot sayılarında bir artış varken 150-43 hattında spot sayısı azalmıştır. Üstün ve mutant 405-1 hatında ise tuz stresinde bir azalma tespit edilmiştir.

Fizyolojik düzeyde incelenen büyüme parametreleri, bitkinin tuz stresi altındaki adaptasyon kapasitesini yansıtan önemli göstergeler sunmaktadır. Yürütülen fizyolojik analizlerde, tuz stresine maruz kalan mutant hatların bitki ve kök boyu ile taze ağırlık değerlerinde çeşitlere göre mutant hatlarda kontrole göre daha az oranda düşüş

gözlenmiştir. Gelişim parametrelerinde gözlenen bu farklılıklar, mutant hatların tuz stresine karşı gösterdiği cevapları göstermektedir. Kök uzunluğu, bitkinin topraktan su ve besin alımını artırarak stres koşullarında hayatta kalmasını kolaylaştırır. Kuraklığa toleranslı bir hat olarak seçilen 150-43 hattının kontrol grubuna göre daha uzun kök geliştirdiği tespit edilmiştir.

Kurt ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Araştırma sonucunda; artan tuz konsantrasyonları ile incelenen karakterlerden soya bitki boyu, kök uzunluğu ve taze ağırlıklarında bir azalış olduğunu göstermiştir. Ayrıca en uzun köklerin de kontrole göre 150 mM tuz uygulamalarında bulmuştur (Kurt ve ark., 2023).

Biyokimyasal düzeyde yapılan analizler, bitkilerin tuz stresine karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarını anlamada kilit öneme sahiptir. Çalışmada, prolin birikimi, lipid peroksidasyonu, fotosentetik pigment ve ozmolit birikim miktarları incelenmiştir. Prolin, hücrel osmotik dengeyi koruma ve serbest radikalleri temizleme işlevi görerek stres toleransını artıran bir moleküldür. Soya çeşitlerin ve mutant hatların tuz stresi altında kontrollerine göre prolin birikim miktarları artmıştır. Ancak görülen artış oranının mutant hatlarda daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayan ve ark. tarafından yürütülen çalışmada yapılan biyokimyasal incelemelere bakıldığında da tuz stresi koşullarında mutant soya hatlarında prolin konsantrasyonunda artış tespit edilmiştir (Ayan ve ark., 2025).

Lipid peroksidasyonu ise hücrel membran hasarını yansıtan bir gösterge olup stres belirteci olarak bilinmektedir. Bu çalışmada 150-43 mutant hattı hariç tüm çeşit ve hatlarda tuz stresi altında lipid peroksidasyon oranının artış gösterdiği tespit edilmiştir. Zhang ve ark. tarafından yürütülen çalışmada da tuz stresi koşullarında ROS molekülleri ile MDA konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2022c). İstatistikler tuz stresi koşullarında MDA konsantrasyonlarında artış görüldüğünü göstermektedir. Buna karşın 150-43 hattında tuz stresi altında MDA konsantrasyonunda istatistiksel olarak artış olmaması bu hattın tuz stresine karşı MDA yolağı üzerinden tolerans geliştirmiş olabileceğini işaret etmektedir. ROS detoksifikasyon enzimlerinin ve membranla ilişkili taşıyıcı proteinlerin anlatımlarında ciddi değişimler saptanmıştır. Tuz stresi, endositoz ve vesikül taşıma süreçlerinde görev alan proteinlerin düzeylerini de etkileyerek hücre içi madde taşınımını etkilemiştir. Bu sonuç, dışsal kimyasalların stres koşulları altında

hücrel metabolizmayı olumlu şekilde modüle edebileceğini göstermektedir (Komatsu ve Nishiuchi, 2024).

Fotosentetik pigment miktarlarındaki değişimler de bitkilerde stresin bir göstergesi olduğu ve bitkilerde görülen klorosis durumunun besin eksikliği ve stresi ifade ettiği bilinmektedir. Bu çalışmada fotosentetik pigmentler klorofil a, klorofil b ve total klorofil olarak ele alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tüm bitkilerde tuz stresi koşullarında kontrolüne göre klorofil pigment oranlarında azalma saptanmıştır. Ayan ve ark. tarafından yürütülen çalışmada da görülen klorofil a, klorofil b ve total klorofil ölçüm sonuçları sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir (Ayan ve ark., 2024).

Bir çözeltideki çözünen madde veya moleküller ozmolitler olarak tanımlanmaktadır ve bitkilerde ozmotik birikimi görülmesi bitkinin stres altında olduğunu ifade etmektedir. Bu tez çalışmasında yapılan ozmolit ölçümleri tüm çeşit ve hatlarda ozmolit konsantrasyonlarında artış olduğunu göstermiştir ancak 150-43 hattına ait bitkilerdeki ozmolit artışının oransal olarak diğer bitkilerden az olması strese karşı ozmolit yolağı üzerinden bir yanıt oluşturulduğunu ifade etmektedir. İki mutant hattın ozmolit artışları arasında yaklaşık iki kat artış farkı görülmüştür. Uçarlı ve Gürel tarafından yürütülen çalışma tuz stresi altındaki bitkilerde ozmolit miktarlarında artış görüldüğünü göstermektedir (Uçarlı ve Gürel, 2020).

Bu çalışma kapsamında fizyolojik ve biyokimyasal analizlerin yanısıra proteomik analizler de yürütülmüştür. 2D jel elektroforezi sonuçlarında, mutant hatlarda stres koşullarında çeşitli protein spotlarının yoğunluğunda farklılıklar gözlenmiştir. Ataem-07, Üstün soya çeşitleri ve 150-43 ve 405-1 mutant hatlarının kontrol ve 180 mM NaCl stresi uygulanan bitkilerinden izole edilen proteinlerin ekspresyon seviyesindeki farklılıkları göstermek amacıyla 8 adet 2D jel yürütülmüştür ve toplamda 1276 adet protein spotu tespit edilmiştir. En fazla spot görülen jel Üstün ve 405-1 hattının tuz uygulanmamış grubuna aittir. En az sayıda spotun olduğu jel Ataem-07 çeşidinin kontrol grubuna aittir. 180 mM NaCl uygulamasından sonra Ataem-07 çeşitlerine ait jellerdeki spot sayılarında bir artış varken 150-43 hattında spot sayısı azalmıştır. Üstün ve mutant 405-1 hatında ise tuz stresinde bir azalma tespit edilmiştir. Aynı zamanda çeşit ve türler arasında da temel proteinler arasında anlatım farklılıkları görülmüştür. Tuz stresine maruz bırakılan soya bitkisinin çeşit ve mutant hatları arasındaki protein profil farklılıkları LC-MS/MS yöntemiyle incelenmiştir. Anlatım seviyesinde değişim

görülen proteinlerin genetik düzeydeki karşılıkları STRING ve UniProt veri tabanları üzerinden doğrulanmıştır (Ayan ve ark., 2024). Tanımlanan proteinlerin önemli bir kısmının enerji metabolizması, antioksidan savunma, osmotik denge ve stres sinyalleme yollarında görev aldığı belirlenmiştir. Söz konusu proteinler arasında izoflavon redüktaz (IFR), glutamin sentetaz, dehidrin, S-adenozil metiyonin sentaz, fruktoz-bifosfat aldolaz, fosfoglisarat kinaz, V tipi proton ATPaz ve RuBisCo alt birimleri gibi stres ilişkili proteinler yer almaktadır.

Tespit edilen spotların %15'inin NAD bağımlı epimeraz/dehidrataz bölgesi içeren proteinlere ait olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinin hücrede karotenoid ve steroid biyosentez yollarında görev aldığı bilinmektedir (Fu ve ark., 2024). NAD bağımlı epimeraz/dehidrataz bölgesi içeren proteinlerde protein katlanma sisteminde görev aldığı tespit edilen bir spot hariç tüm proteinlerde stres koşulları altındaki bitkilerde anlatım seviyesinde artış olduğu görülmüştür. Fu ve ark. tarafından yürütülen çalışmada yapılan protein-protein etkileşimleri de sonuçları destekler niteliktedir.

Bu çalışma kapsamında sadece tuz stresine bağlı olarak anlatım seviyesinde azalma görülen tanımlanmamış gama-glutamil peptidaz aktivitesinde görev alan bir proteinin PR-10 (patojen ilişkili protein 10) protein ailesine ait olduğu tespit edilmiştir. PR-10 protein ailesine ait proteinlerin 150-43 hattında anlatım seviyesinde değişim görülmezken diğer çeşit ve hatlarda tuz stresi koşullarında anlatımının azaldığı tespit edilmiştir.

Xu ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada PR-10 ailesi proteinlerinin biyotik strese maruz kalan bitkilerde stres yanıtı olarak anlatımının arttığı görülmektedir (Xu ve ark., 2014). Athar ve arkadaşları, tuza dayanıklı bir buğday çeşidinde tuza duyarlı olan çeşitten daha az toplam çözünür proteine sahip olduğunu göstermiştir (Athar ve ark. 2022).

Tuz stresine bağlı olarak izoflavon redüktaz homolog 2 proteinin Üstün çeşidi ve 405-1 mutant hattında anlatımında azalma olduğu tespit edilmiştir. Pi ve arkadaşları tarafından yapılan proteomik ve fosfoproteomik bir çalışmada izoflavon redüktaz homolog 2 proteinlerinin stres altındaki bitkilerde anlatımının hem artabileceği hem azalabileceği gösterilmiştir (Pi ve ark., 2016).

Bu tez kapsamında bulunan spotların %18,75'inin ADP-ATP bağlanma mekanizmasında görev aldıkları ve ilgili proteinlerin stres altındaki bitkilerde anlatımlarının arttığı tespit edilmiştir. Bu proteinler; fosfoglisarat kinaz, S-adenozilmetiyonin sentaz, RuBisCo proteinleri ve V tipi proton ATPaz E alt ünitesi proteinleridir. Stres durumunda ATP üretiminde rol oynayan proteinlerin anlatımında artış olması stres yanıtının ROS yolağı üzerinden etki ettiğini destekleyici bir bulgudur. Stres altındaki bitkide artan ROS moleküllerine karşı oluşturulan antioksidan yanıtların bitkide enerji açığı oluşturmaktadır (Zhao ve ark., 2025).

Yahoueian ve ark. (2021) kuraklığa dayanıklı ve hassas iki soya çeşidi üzerinde bir araştırma yürütmüşlerdir (Yahoueian ve ark., 2021). Bu çalışmada, dayanıklı genotipin antioksidan savunma sisteminde görev alan proteinleri (örneğin, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, glutatyon S-transferaz) daha yüksek düzeyde ifade ettiği gösterilmiştir. Bu tez kapsamında antioksidan savunma sistemine işaret eden dolaylı bulgular (düşük MDA, yüksek prolin) bu savunma stratejileriyle paralellik göstermektedir. Antioksidan sistemin aktivasyonu, zar proteinlerinin yeniden düzenlenmesi ve enerji metabolizmasındaki değişimler tüm çalışmalarda ortak olarak gözlemlenmektedir. Özellikle ROS yakalama sistemleri tüm çalışmalarda ortak olarak vurgulanmıştır. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon S-transferaz ve askorbat peroksidaz gibi enzimlerin stres altındaki ifadelerinin stres koşullarında arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca enerji metabolizmasındaki proteinlerin (ATP sentaz, NADPH dehidrogenaz gibi) strese yanıt olarak artış göstermesi, hücrenin enerji ihtiyacının karşılanmasında bu sistemlerin önemini açıkça ortaya koymaktadır. Sinyal iletim yollarında görev alan reseptör benzeri kinazlar (RLK), kalsiyum bağlayıcı proteinler ve MAPK kaskadına ait proteinler, stresin algılanması ve hücresel düzeyde uygun yanıtların başlatılması açısından belirleyici rol oynamaktadır (Pi ve ark., 2016).

Gelecekteki çalışmalar, gen düzenleme teknolojileri kullanarak mutant hatların dayanıklılık mekanizmalarını daha ileri düzeyde geliştirebilir. CRISPR/Cas9 gibi teknolojiler, tuza dayanıklılığı sağlayan genlerin hedeflenmesine olanak tanıyabilir. Örneğin, DREB, NAC ve MYB gibi transkripsiyon faktörlerinin etkinliğini artırarak bitkilerin stres koşullarına adaptasyonu optimize edilebilir. Ayrıca, omik yaklaşımların entegrasyonu, dayanıklılık mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılmasını sağlayabilir. Bu yöntemler, stres altında aktif olan genler, proteinler ve

metabolitler hakkında daha fazla bilgi sunarak dayanıklı türlerin geliştirilmesine ışık tutacaktır (Horgan, 2011). Ayrıca, dijital teknolojiler ve hassas tarım uygulamaları, tuza dayanıklı bitki türlerinin geliştirilmesi ve performanslarının izlenmesi için etkili araçlar sunmaktadır. Sensör tabanlı sistemler, drone görüntüleme ve yapay zekâ destekli veri analitiği, bu türlerin büyüme performansını optimize etmek için kullanılabilir. Bu teknolojilerin entegrasyonu, araştırma sürecini hızlandıracak ve tarımsal verimliliği artıracaktır. Sonuç olarak, bu çalışma, mutant soya türlerinin tuz stresine karşı geliştirdiği adaptasyon mekanizmalarını kapsamlı bir şekilde ortaya koymaktadır. Çalışmanın bulguları, küresel gıda güvenliği ve çevresel sürdürülebilirlik hedeflerine ulaşmak için önemli bir temel sunmaktadır. Tuza dayanıklı bitki türlerinin geliştirilmesi, yalnızca tarımsal verimliliği artırmakla kalmayacak, aynı zamanda değişen iklim koşullarına uyum sağlayarak daha sürdürülebilir bir geleceğe katkıda bulunacaktır (Liakos, 2018). LC-MS/MS ile tanımlanan proteinler hem genetik dayanıklılığın hem de stres koşullarındaki fenotipik değişimin doğrudan göstergeleri olarak moleküler belirteç geliştirme sürecinde kullanılabilir.

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

- 1- Tuz stresi ile bitkilerde boy, kök uzunluğu ve taze ağırlık miktarlarında azalma, yapraklarda klorisiz ve kıvrılmalar gözlemlenmiştir.
- 2- Tuz stresi altındaki bitkilerde MDA, prolin ve ozmolit miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı miktarda artış görülmüştür. 150-43 mutant hattına ait bitkilerde MDA miktarının anlamlı oranda azaldığı tespit edilmiştir. Total klorofil miktarlarının ise istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı gözlemlenmiştir.
- 3- Kontrol grubu ve tuz stresi uygulanmış bitkilere ait proteinler, proteomik analiz için 2D jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. 2D jel elektroforez incelemesinde toplam 1276 adet spot tespit edilmiştir. Spotların %2,5'unda anlamlı değişimler tespit edilmiş ve LC/MS-MS yöntemiyle analiz edilmiştir.
- 4- Tuz stres yanıtında rol oynayan proteinler Ataem-07, Üstün, 150-43 ve 405-1 bitkilerinde bulunmuştur.

- 5- 150-43 mutant hattının Ataem-07 çeşidine ve 405-1 mutant hattına kıyasla tuz stresine MDA, prolin ve ozmolit birikimleri yolları üzerinden daha toleranslı olduğu ve tolerans mekanizmasıyla ilgili proteinler tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

- Abudureyimu, B., & Aksoy, E. (2019). Comparison of the sensitivity of Arabidopsis SOS pathway mutants under salt stress. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, s. 1982-1989.
- Acar, O., Öztürk, E., Seçkin Dinler, B., Gül, V., Demirbaş, S., Sefaoğlu, F., . . . Koç, F. N. (2022). *Bitkilerde Abiyotik ve Biyotik Stres Yönetimi*. Ankara: İksad Yayınevi.
- Afshar, M., & Hall, G. (2023). LC-MS/MS method for quantitative profiling of ketone bodies, α -keto acids, lactate, pyruvate and their stable isotopically labelled tracers in human plasma: An analytical panel for clinical metabolic kinetics and interactions. *Journal of Chromatography*.
- Akem, C. N. (1996). Management of Soybean Diseases. *IITA Research Guide*.
- Akmalovna, A. C. (2022). Biological Properties of Soybean. *E Conference Zone*, s. 90-94.
- Alhuthali, S., Kotidis, P., & Kontoravdi, C. (2021). Osmolality Effects on CHO Cell Growth, Cell Volume, Antibody Productivity and Glycosylation. *International Journal of Molecular Science*, s. 1-19.
- Alsajri, F. A., Wijewardana, C., Irby, T. J., Bellaloui, N., Krutz, J. L., Golden, B., . . . Reddy, R. (2022). Developing Functional Relationship Between Temperature and Soybean Yield and Seed Quality. *Agronomy Journal*, s. 194-204.
- Anderson, E. J., Ali, M. L., Beavis, W. D., Chen, P., Clemente, T. E., Diers, B. W., . . . Tilmon, K. J. (2019). Soybean [Glycine max (L.) Merr.] Breeding: History, Improvement, Production and Future Opportunities. J. M. Al-Khayri, S. M. Jain, & D. V. Johnson içinde, *Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes* (s. 431-516). Springer Nature.
- Andre, M., & Karas, M. (2007). Investigation of Sample-Purification Procedures for MALDI-Based Proteomic Studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, s. 1047-1053.
- Ardrey, R. E. (2003). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction. D. J. Ando içinde, *Analytical Techniques in the Sciences (AnTS)*. Wiley.
- Arnon, D. I. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiology*, s. 1-15.
- Atak, Ç., Çelik, Ö., Ayan, A., Meriç, S., & Erdoğan, M. (2020). *Mutasyon ıslahı ile soyada (Glycine max. L.) tuzluluğa ve kuraklığa toleranslı bitkilerin geliştirilmesi*. İstanbul: Tarım ve Orman Bakanlığı.
- Ateş, M. A. (2020). Molecular Phylogenetic Relationships of Some Fabaceae Species That Used as Forage Crops in Turkey. *Bahçe*, s. 119-123.
- Athar, H. R., Zulfikar, F., Moosa, A., Ashraf, M., Zafar, Z. U., Zhang, L., . . . Siddique, K. H. (2022). Salt stress proteins in plants: An overview. *Frontiers Plant Science*, s. 1-23.

- Ayan, A., Meriç, S., Gümüş, T., Çelik, Ö., & Atak, Ç. (2025). Two dimensional proteomic analyses revealed salinity and drought tolerance related protein alterations in two gamma-induced soybean mutant. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, s. 29-40.
- Balasubramaniam, T., Shen, G., Esmaili, N., & Zhang, H. (2023). Plants Response Mechanism to Salinity Stress. *Plants*, s. 1-22.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, s. 205-207.
- Bio-Rad. (tarih yok). PDQuest 2D Analysis Software.
- Bio-Rad. (tarih yok). *ReadyPrep 2-D Starter Kit*. Bio-Rad: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110009A.pdf> adresinden alındı
- Boerma, H. R., Specht, J. E., Carter, T. E., Nelson, R. L., Sneller, C. H., & Cui, Z. (2004). Genetic Diversity in Soybean. *Agronomy Monographs*, s. 303-416.
- Boopathi, M. N. (2020). QTL Analysis. M. N. Boopathi içinde, *Genetic Mapping and Marker Assisted Selection* (s. 978-981). Springer.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochemistry*, s. 248-254.
- Carneiro, F. M., Angeli Furlani, C. E., Zerbato, C., de Menezes, P. C., da Silva Girio, L. A., & de Oliveira, M. F. (2019). Comparison between vegetation indices for detecting spatial and temporal variabilities in soybean crop using canopy sensors. *Precision Agriculture*, s. 979-1007.
- Chen, S., & Komatsu, S. (2021). Plant proteomic research 4.0: Frontiers in stress resilience. *International Journal of Molecular Science*, s. 22-24.
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological Sciences*, s. 557-572.
- Cordiano, R., Gioacchino, M. D., Mangifesta, R., Panzera, C., Gangemi, S., & Minciullo, P. L. (2023). Malondialdehyde as a Potential Oxidative Stress Marker for Allergy-Oriented Diseases: An Update. *Molecules*, s. 1-22.
- Çırak, C., & Esendal, E. (2005). Soyada Bitki Gelişim Dönemleri. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, s. 57-65.
- Çırak, C., & Esendal, E. (2006). Soyada Kuraklık Stresi. *On Dokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, s. 231-237.
- Daliakopoulos, I. N., Tsanis, I. K., Koutroulis, A., Kourgialas, N. N., Varouchakis, A. E., Karatzas, G. P., & Ritsema, C. J. (2016). The Threat of Soil Salinity: A European Scale Review. *Elsevier*, s. 727-739.
- Desta, K. T., Hur, O. S., Lee, S., Yoon, H., Shin, M.-J., Yi, J., . . . Choi, Y.-M. (2022). Origin and Seed Coat Color Differently Affect the Concentration of Metabolites and Antioxidans Activities in Soybean(*Glycine max* (L.) Merrill) Seeds. *Food Chemistry*, s. 1-11.

- Dias, F. G., Neves-Borges, A. C., Barbosa Viana, A. A., Mesquita, R. O., Romano, E., Grossi-de-Sa, M. d., . . . Alves-Ferreira, M. (2012). Expression Analysis in Response to Drought Stress in Soybean: Shedding Light on the Regulation of Metabolic Pathway Genes. *Genetics and Molecular Biology*, s. 222-232.
- Endres, G., & Kandel, H. (2015). Soybean Growth and Management. *NDSU Extension Service*, s. 1-8.
- Erol, S. A., Arslanoğlu, Ş. F., Bayram, C., & Kaymak Bayram, G. (2023). Soya (Glycine max (L.) Merrill) ve Kuraklık Stresi. C. Demir, & M. F. Baran içinde, *Tarımda Yaşamak* (s. 173-223). Ankara: İksad Yayınevi.
- Friedman, D. B., Hoving, S., & Westermeier, R. (2009). Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. R. R. Burgess, & M. P. Deutscher içinde, *Methods in Enzymology* (s. 515-540). Academic Press.
- Fu, S., Wang, L., Li, C., Zhao, Y., Zhang, N., Yan, L., . . . Niu, Y. (2024). Integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic analyses revealed molecular mechanism for salt resistance in soybean (Glycine max L.) seedlings. s. 1-31.
- Gill, S. S. (2010). Antioxidant mechanisms in plant under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, s. 909-930.
- Goyal, A., Beenu, T., Modgil, R., & Kumar, V. (2021). Soybean (Glycine max.). B. Tanwar, & A. Goyal içinde, *Oilseeds: Health Attributes and Food Applications* (s. 1-46). Singapore: Springer.
- Grassini, P., La Menza, N. C., Rattalino Edreira, J. I., Monzon, J. P., Tenorio, F. A., & Specht, J. E. (2021). Soybean. V. O. Sadras, & D. F. Calderini içinde, *Crop Physiology Case Histories for Major Crops* (s. 282-319). Academic Press.
- Greenway, H., & Munns, R. (1980). Mechanism of Salt Tolerance in Nonhallophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, s. 149-190.
- Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2022). Plant Oxidative Stress: Biology, Physiology and Mitigation. *Plants*, s. 1-4.
- Herman, J. C. (1992). *How a soybean plant develops?* Iowa: Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service.
- Hoagland, D. R. (1920). Optimum Nutrient Solutions for Plants. *Science*, s. 562-564.
- Horgan, R. P. (2011). Omic technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Wiley*, s. 1-7.
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D. A. (2017). Agriculture in 2050: Recalibrating Targets for Sustainable Intensification. *BioScience*, s. 386-391.
- Jaleel, A. C., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sankar, B., Gopi, R., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2007). Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids Surf B*, s. 150-157.
- Jianing, G., Yuhong, G., Yijun, G., Rasheed, A., Qian, Z., Zhiming, X., . . . Jian, W. (2022). Improvement of Heat Stress Tolerance in Soybean (Glycine max L.)

- by Using Conventional and Molecular Tools. *Frontiers in Plant Science*, s. 1-17.
- Kausar, R., & Komatsu, S. (2022). Proteomic approaches to uncover salt stress response mechanisms in crops. *International Journal of Molecular Sciences*, s. 1-21.
- Kesawat, M. S., Satheesh, N., Kherawat, B. S., Kumar, A., Kim, H.-U., Chung, S.-M., & Kumar, M. (2023). Regulation of reactive oxygen species during salt stress in plants and their crosstalk with other signaling molecules-Current perspectives and future directions. s. 1-37.
- Kim, S.-H., Subramanian, P., Hahn, B.-S., & Ha, B.-K. (2022). High-Throughput Phenotypic Characterization and Diversity Analysis of Soybean Roots(*Glycine max* L.). *Plants (Basel)*, s. 1-15.
- Kim, T. K. (2017). Understanding One-Way ANOVA Using Conceptual Figures. *Korean Journal of Anesthesiology*, s. 22-26.
- Kitiwan, B. K., Vasunilashown, S. M., Baer, H. J., Mukamal, K., & Juraschek, S. P. (2021). The Association of Urine Osmolality with Decreased Kidney Function and/or Albuminuria in the United States. *BMC Nephrol*, s. 1-11.
- Komatsu, S., & Nishiuchi, T. (2024). Proteomic analysis to understand the promotive effect of ethanol on soybean growth under salt stress. *Biology*, s. 1-14.
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford Method for Protein Quantitation. N. J. Kruger içinde, *The Protein Protocols Handbook* (s. 17-24). Totowa: Humana Press.
- Kurt, C. H., Tunçtürk, M., & Tunçtürk, R. (2023). Tuzluluk stresi koşullarında yetiştirilen soya (*Glycine max* L.) bitkisinde bazı fizyolojik ve biyokimyasal değişimler üzerine salisilik asit uygulamalarının etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, s. 91-101.
- Kültz, D. (2020). Definin Biological Stress and Stress Responses Based on Principles of Physics. *Jez-A Ecological and Integrative Physiology*, s. 350-358.
- Levitt, J. (1980). Responses of Plant to Environmental Stress: Water, Radiation, Salt and Other Stresses. *Academic Press*, s. 365.
- Li, M., Liu, R., Li, D., Dong, S., Liu, H., & Ning, Z. (2025). Experimental translocation of *Primulina* species provides insights into the conservation of threatened karst cave plants. *Global Ecology and Conservation*, s. 1-16.
- Li, S., Liu, S., Zhang, Q., Cui, M., Zhao, M., Li, N., . . . Wang, L. (2022). The interaction of ABA and ROS in plant growth and stress resistances. *Frontiers in Plant Science*, s. 1-16.
- Li, X., Zhang, L., Li, Y., Ma, L., Bu, N., & Ma, C. (2012). Changes in Photosynthesis, Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Soybean Seedlings Exposed to UV-B Radiation and/or Cd. *Plant Soil*, s. 377-387.
- Li, Y.-H., Zhou, G., Ma, J., Jiang, W., Jin, L.-G., Zhang, Z., . . . Qiu, L.-j. (2014). De-novo Assembly of Soybean Wild Relatives for Pan-genome Analysis of Diversity and Agronomic Traits. *Nature Biotechnology*, s. 1-10.
- Liakos, K. G. (2018). Machine learning in agriculture: A review. *Sensors*.

- Lichtenthaler, H. K. (1998). The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, s. 187-198.
- Lin, F., Chhapekar, S. S., Vieira, C. C., Da Silva, M. P., Rojas, A., Lee, D., . . . Nguyen, H. T. (2022). Breeding for Disease Resistance in Soybean: A Global Perspective. *Springer Nature*, s. 3773-3872.
- Lin, F., Chhapekar, S. S., Vieira, C. C., Da Silva, M. P., Rojas, A., Lee, D., . . . Nguyen, H. T. (2022). Breeding for Disease Resistance in Soybean: A Global Perspective. *Theoretical and Applied Genetics*, s. 3773-3872.
- Liu, C., Wang, X., Ma, H., Zhang, Z., Gao, W., & Xiao, L. (2008). Functional properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. *Food Chemistry*, s. 29-37.
- Liu, Y., Du, H., Li, P., Shen, Y., Peng, H., Liu, S., . . . Tian, Z. (2020). Pan-Genome of Wild and Cultivated Soybeans. *Cell*, s. 1-15.
- Lorenzen, L. L., Boutin, S., Young, N., Specht, J. E., & Shoemaker, R. C. (1995). Soybean Pedigree Analysis Using Map-Based Molecular Markers: I. Tracking RFLP Markers in Cultivars. *Crop Science*, s. 1326-1336.
- Lugano, G. (2013). *Bio Render*.
<https://app.biorender.com/illustrations/6731029a734b000e4b1a19d7>
 adresinden alındı
- Ma, Y., Wei, Z., Liu, J., Liu, X., & Liu, F. (2021). Growth and physiological responses of cotton plants to salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, s. 565-576.
- McWilliams, D. A., Berglund, D. R., & Endres, G. J. (1999, Haziran). Soybean Growth and Management. *NDSU Extension Service*. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı.
 adresinden alındı
- Mechin, V., Damerval, C., & Zivy, M. (2007). Total Protein Extraction with TCA-Acetone. H. Thiellement, M. Zivy, C. Damerval, & V. Mechin içinde, *Plant Proteomics* (s. 1-8). Humana Press.
- Miransari, M. (2016). *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production*. London: Elsevier.
- Modgil, R., Tanwar, B., Goyal, A., & Kumar, V. (2020). Soybean (*Glycine max.*). *Springer*, s. 1-46.
- Mullineaux, P. M., Exposito-Rodriguez, M., Laissue, P. P., & Smirnoff, N. (2018). ROS-dependent signalling pathways in plants and algae exposed to high light: Comparisons with other eukaryotes. *Free Radical Biology and Medicine*, s. 52-64.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, s. 651-681.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *The Annual Review of Plant Biology*, s. 651-681.

- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2016). Heat Stress Responses and Thermotolerance in Soybean. M. Miransari içinde, *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production* (s. 261-284). Academic Press.
- Naz, M., Afzal, M. R., Raza, M. A., Pandey, S., Qi, S., Dai, Z., & Du, D. (2024). Calcium signaling in plants: A plant stress perspective. *South African Journal of Botany*, s. 464-485.
- Nenni, M., Çelebier, M., & Süslü, İ. (2020). Proteomik Çalışmalara Genel Bakış. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, s. 48-58.
- Ondrasek, G., Rathod, S., Manohara, K. K., Gireesh, C., Anantha, M. S., Sakhare, A. S., . . . Horvatinec, J. (2022). Salt Stress in Plants and Mitigation Approaches. *Plants*, s. 1-21.
- Oral, E., Tunçtürk, R., Tunçtürk, M., Nohutçu, L., & Şelem, E. (2024). Tuz Stresi Koşullarında Yetiştirilen Soya Fasülyesi (*Glycine max*. L.)'nde Mikoriza Uygulamalarının Bazı Biyokimyasal Özellikler Üzerine Etkisi. *ISPEC Tarım Bilimleri Dergisi*, s. 551-559.
- Pagano, M. C., & Miransari, M. (2016). The importance of soybean production worldwide. *Abiotic and Biotic Stresses in in Soybean Production*, s. 1-26.
- Pi, E., Qu, L., Hu, J., Tsai, S.-N., Du, L., Huang, Y., . . . Ngai, S. (2015). Mechanisms of soybean roots tolerances to salinity revealed by proteomic and phosphoproteomic comparison between two cultivars. *Molecular and Cellular Proteomics*, s. 266-288.
- Rasheed, A., Raza, A., Jie, H., Mahmood, A., Ma, Y., Zhao, L., . . . Jie, Y. (2022). Molecular Tools and Their Applications in Developing Salt-Tolerant Soybean (*Glycine max* L.) Cultivars. *Bioengineering*, s. 1-22.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent Binding Explains Anomalous SDS-PAGE Migration of Membrane Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, s. 1760-1765.
- Reddy, I. C., Kim, B. K., Yoon, I. S., Kim, K. H., & Kwon, T. R. (2017). Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches. *Focus on Mechanism and Approaches-Rice Science*, s. 123-144.
- Rengasamy, P. (2010). Soil Processes Affecting Cropn Production in Salt-Affected Soils. *Functional Plant Biology*, s. 613-620.
- Roth, M. G., Webster, R. W., Mueller, D. S., Chilvers, M. I., Faske, T. R., Mathew, F. M., . . . Smith, D. L. (2020). Integrated Management of Important Soybean Pathogens of the United States in Changing Climate. *Journal of Integrated Pest Management*, s. 1-28.
- Roulin, A., Auer, P. L., Libault, M., Schlueter, J., Farmer, A., May, G., . . . Jackson, S. A. (2012). The Fate of Duplicated Genes in a Polyploid Plant Genome. *The Plant Journal*, s. 143-153.
- Sapolsky, R. M. (1994). Measures of Life. *The Sciences*, s. 10-13.
- Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-Page. *Nature Protocols*, s. 16-22.

- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., . . . Jackson, S. A. (2010). Genome Sequencing of the Palaeopolyploid Soybean. *Nature*, s. 178-183.
- Shaffique, S., Hussain, S., Kang, S.-M., Imran, M., Kwon, E.-H., Khan, M. A., & Lee, I.-J. (2023). Recent Progress on the Microbial Mitigation of Heavy Metal Stress in Soybean: Overview and Implications. *Frontiers Plant Science*, s. 1-11.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2007). In-Gel Digestion for Mass Spectrometric Characterization of Proteins and Proteomes. *Nature Protocols*, s. 2856-2860.
- Singh, A. (2021). Soil salinity: A global threat to sustainable development. *Soil Use and Management*, s. 39-67.
- Singh, A. (2021). Soil Salinization Management for Sustainable Development: A review. *Science Direct*, s. 1-15.
- Song, Q., Jenkins, J., Jia, G., Hyten, D. L., Pantalone, V., Jackson, S. A., . . . Cregan, P. B. (2016). Construction of high resolution genetic linkage maps to improve the soybean genome sequence assembly Glyma1.01. *Springer Link*, s. 1-11.
- Stewart, R. R., & Bewley, D. J. (1980, 2). Lipid Peroxidation Associated with Accelerated Aging of Soybean Axes. *Plant Physiology*, s. 245-248.
- Szabados, L., & Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Cell Press*, s. 89-97.
- Taiz, L., Zeiger, E., Maller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development*. Sinauer Associates.
- Tripathi, N., Tripathi, M. K., Tiwari, S., & Payasi, D. K. (2022). Molecular Breeding to Overcome Biotic Stresses in Soybean: Update. *Plants*, s. 1-24.
- Turhan, Ş., Turfan, N., & Kurnaz, A. (2023). Heavy Metal Contamination and Health Risk Evaluation of Chestnut(*Castanes sativa* Miller) Consumed in Turkey. *International Journal of Environmental Health Research*, s. 1091-1101.
- Uçarlı, C., & Gürel, F. (2020). Differential Physiological and Molecular Responses of Three-Leaf Stage Barley(*Hordeum Vulgare* L.) Under Salt Stress Within Hours. *Plant Biotechnology Reports*, s. 89-97.
- United States Department of Agriculture. (2021). *United States Department of Agriculture*. Foreign Agricultural Service: <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/2222000> adresinden alındı
- United States Department of Agriculture. (2024). *Foreign Agricultural Service*. <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/2222000> adresinden alındı
- Voora, V., Bermudez, S., Le, H., Larrea, C., & Luna, E. (2024). *Soybean Prices and Sustainability*. International Institute for Sustainable Development.
- Waadt, R., Seller, C. A., Hsu, P.-K., Takahashi, Y., Munemasa, S., & Schroeder, J. I. (2022). Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, s. 680-694.

- Wisniewski, J. R., & Mann, M. (2012). Consecutive Proteolytic Digestion in an Enzyme Reactor Increases Depth of Proteomic and Phosphoproteomic Analysis. *Analytical Chemistry*, s. 2631-2637.
- Xu, P., Jiang, L., Wu, J., Li, W., Fan, S., & Zhang, S. (2014). Isolation and characterization of a pathogenesis-related protein 10 gene (GmPR10) with induced expression in soybean (*Glycine max.*) during infection with *Phytophthora sojae*. *Molecular Biology Reports*, s. 4899-4909.
- Yahouei, S. H., Bihanta, M. R., Babaei, H. R., & Bazargani, M. M. (2021). Proteomic analysis of drought stress response mechanism in soybean leaves. *Food Science and Nutrition*, s. 2010-2020.
- Yan, S., Bhawal, R., Yin, Z., Thannhauser, T. W., & Zhang, S. (2022). Recent advances in proteomics and metabolomics in plants. *Molecular Horticulture*, s. 1-38.
- Yuan, H., Wang, Q., Tan, J., Wu, J., Liang, C., Wang, Y., . . . Wan, Y. (2024). Ionic titanium is expected to improve the nutritional quality of Tartary buckwheat sprouts through flavonoids and amino acid metabolism. *Food Chemistry*, s. 1-10.
- Yuan, L., Xie, G. Z., Zhang, S., Li, B., Wang, X., Li, Y., . . . Xu, X. (2020). GmLCLs Negatively Regulate ABA Perception and Signalling Genes in Soybean Leaf Dehydration Response. *Plant, Cell and Environment*, s. 412-424.
- Zandalinas, S. I., Mittler, R., Balfagon, D., Arbona, V., & Gomez-Cadenas, A. (2018). Plant Adaptations to the Combination of Drought and High Temperatures. *Physiologia Plantarum*, s. 2-12.
- Zhang, M., Liu, S., Wang, Z., Yuan, Y., Zhang, Z., Liang, Q., . . . Tian, Z. (2022a). Progress in Soybean Functional Genomics Over the Past Decade. *Plant Biotechnology Journal*, s. 256-282.
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J.-K. (2022b). Abiotic Stress Responses in Plants. *Nature*, s. 105.
- Zhang, D., Wang, X., Zhang, Z., Li, C., Xing, Y., Luo, Y., . . . Cai, H. (2022c). Symbiotic system establishment between *Piriformospora indica* and *Glycine max.* and its effects on the antioxidant activity and ion transporter related gene expression in soybean under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, s. 1-16.
- Zhao, Y., Gong, J., Shi, R., Wu, Z., Liu, S., Chen, S., . . . Tian, J. (2025). Application of proteomics in investigating the responses of plant to abiotic stresses. s. 1-24.