

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KURAKLIK STRESİ UYGULANAN BAZI KÜLTÜR (*Hordeum vulgare* L.) VE
YABANI (*Hordeum spontaneum*) ARPA GENOTİPLERİNDE STRESİN GEN
İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

Elif YETİLMEZER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

KURAKLIK STRESİ UYGULANAN BAZI KÜLTÜR (*Hordeum vulgare* L.) VE YABANI (*Hordeum spontaneum*) ARPA GENOTİPLERİNDE STRESİN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

Elif YETİLMEZER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Kuraklık, tarımsal üretimde verim ve kaliteyi doğrudan etkileyen abiyotik stres etmenlerinin başında gelmektedir. Bitkiler, stres koşullarına en az zarar görecektir şekilde bazı değişikliklerle dayanıklılık göstermektedir. Bu çalışmada, kuraklık stresine karşı farklı tolerans kabiliyetine sahip arpa genotiplerinin kuraklık stresi altında gen ifade profilleri ile bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri incelenmiştir. Materyal olarak Tarm92, Avcı2002, Misket, Sayım40 ve *Hordeum spontaneum* genotipleri kullanılmıştır. Kuraklık stresinin farklı günlerinde alınan örneklerle morfolojik (fide boyu, taze ve kuru ağırlık), fizyolojik (yaprak turgor ağırlığı ve yaprak klorofil içeriği) ve biyokimyasal (prolin içeriği) analizler gerçekleştirilmiş; *HVA1*, *Dhn3*, *HvSNAC1*, *HvCBF4*, ve *HSP17.8* genlerinin ifadeleri karşılaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, kuraklığın süresine, incelenen özelliğe ve genotiplere göre değişiklik göstermiştir. Artan kuraklık stresiyle beraber, özellikle toprak su kapasitesinin %20 ve %10 olarak ölçüldüğü zamanda morfolojik ve fizyolojik sonuçlarda belirgin düşüşler gözlenirken, prolin miktarı ve belirlenen genlerin ifadelerinde artış gözlenmiştir. Tarm92 çeşidi kuraklığa toleranslı olarak ve Avcı2002 çeşidi ise hassas olarak belirlenmiştir. Yine kuraklık stresine olan cevapları bakımından, Misket ve Sayım40 çeşitleri Tarm92 çeşidine yakın sonuçlar verirken, *Hordeum spontaneum* genotipi Avcı2002 çeşidine benzer sonuçlar vermiştir. Bitkinin, kuraklık stresine yanıtının karmaşıklığından dolayı, morfolojik ve fizyolojik analiz sonuçlarının tek başına değerlendirilmesindeki zorluk, transkriptomik çalışmalarla birlikte verimli bitki seçiminde kolaylık ve doğruluk sağlamasının yanında, bitki ıslahında kullanılabilecek aday genlerin tanımlanmasına yardımcı olacaktır.

Eylül 2023, 136 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Arpa (*Hordeum vulgare* L.), kuraklık stresi, Real-time PCR, Transkriptom analizleri, gen ifadesi

ABSTRACT

Ph.D Thesis

INVESTIGATION OF STRESS AT THE LEVEL OF GENE EXPRESSION IN SOME CULTURE (*Hordeum vulgare* L.) AND WILD (*Hordeum spontaneum*) BARLEY GENOTYPES UNDER DROUGHT STRESS CONDITIONS

Elif YETİLMEZER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Drought is one of the abiotic stress factors that directly affect yield and quality in agricultural production. Plants show resistance to stress conditions with some changes in a way to minimize damage. In this study, gene expression profiles and some morphological, physiological and biochemical changes of barley genotypes with different tolerance to drought stress were investigated under drought stress. Tarm92, Avc12002, Misket, Sayım40 and *Hordeum spontaneum* genotypes were used as material. Morphological (seedling height, fresh and dry weight), physiological (leaf turgor weight and leaf chlorophyll content) and biochemical (proline content) analyses were performed on samples taken on different days of drought stress and the expression of *HVA1*, *Dhn3*, *HvSNAC1*, *HvCBF4*, and *HSP17.8* genes were compared.

The results obtained varied according to the duration of drought, traits and genotypes. With increasing drought stress, especially when the soil water capacity was measured at 20% and 10%, significant decreases were observed in morphological and physiological results, while the amount of proline and the expression of the determined genes increased. Tarm92 variety was determined as drought tolerant and Avc12002 variety was determined as sensitive. Again, in terms of their response to drought stress, Misket and Sayım40 varieties gave similar results to Tarm92 variety, while *Hordeum spontaneum* genotype gave similar results to Avc12002 variety. Due to the complexity of the plant's response to drought stress, the difficulty in evaluating the results of morphological and physiological analysis alone, together with transcriptomic studies, will help to identify candidate genes that can be used in plant breeding, as well as providing ease and accuracy in the selection of productive plants.

September 2023, 136 Pages

Key Words: Barley (*Hordeum vulgare* L.), drought stress, qRT-PCR, Transcriptomes analysis, gene expression

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle desteğini sunan, duruşu ve nezaketi ile saygı duyup örnek aldığım çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD),

Hoşgörüsü, sabrı, bilgi ve deneyimleriyle tezin her aşamasında desteğini esirgemeyen çok kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD),

Tez izleme komitemde yer alan Sayın Prof. Dr. Münevver PINAR'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD) ve Sayın Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Projenin hazırlanmasından yazımına kadar desteğini esirgemeyen, bilgi ve nezaketi ile yanımda olan Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Arpa Islah Birimi'nden Dr. Namuk ERGÜN'e; Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nden başta Ülkü Selcen HAYDAROĞLU, Yavuz DELEN ve aynı bölümde ailem gibi olan, bilgi, destek ve hoşgörülerini her zaman hissettiren çok değerli mesai arkadaşlarıma,

Güler yüzleri ve deneyimleriyle, deneylerimde yardımcı olan başta Aybüke OKAY olmak üzere Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü değerli lisansüstü öğrencilerine,

Her konuda gösterdikleri karşılıksız özveri ve destekle beni bugünlere getiren aileme ve son olarak masum sevgisi ve sabrıyla yanımda olan oğlum Eymen KOÇAK'a en derin duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma, TAGEM/TBAD/A/20/A7/P1/1577 numaralı TAGEM projesi ile desteklenerek, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü alt yapısı kullanılarak yürütülmüştür.

Elif YETİLMEZER
Ankara, Eylül 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1 Arpa (<i>Hordeum</i> L.).....	6
2.2 Arpanın Kökeni ve Dağılımı	8
2.3 Arpanın Ekonomik Önemi	9
2.3.1 Dünya’da arpa üretimi ve durumu	10
2.3.2 Türkiye’de arpa üretimi ve durumu	11
2.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Arpa Çeşitlerinin Özellikleri	12
2.5 Bitkilerde Stres	13
2.6 Kuraklık Stresi	18
2.7 Bitkilerin Kuraklık Stresine Uyum Mekanizmaları	20
2.7.1 Morfolojik mekanizmalar	20
2.7.2 Fizyolojik mekanizmalar	21
2.7.3 Biyokimyasal mekanizmalar	22
2.7.4 Moleküler mekanizmalar ve stresten sorumlu bazı önemli genlere bakış	27
2.8 Tez Çalışmasında Kullanılan Stres Genleri.....	30
2.9 Kaynak Özetleri	30
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	47
3.1 Materyal	47
3.1.1 Bitki materyali.....	47
3.2 Yöntem	47
3.2.1 Bitkilerin tarla ve iklim odalarında yetiştirilmesi.....	47
3.2.2 Kuraklık stresi koşullarının oluşturulması.....	48
3.2.3 Bitkilere kuraklık stresi uygulaması	50
3.2.4 Morfolojik ölçümler	51
3.2.5 Fizyolojik ölçümler.....	52
3.2.6 Biyokimyasal ölçüm	52
3.2.7 Gen ifade profillerinin incelenmesi.....	54
4. BULGULAR	60
4.1 Arpa Genotiplerinin Kuraklık Stresine Morfolojik ve Fizyolojik Tepkileri	60
4.1.1 Fide uzunlukları	62
4.1.2 Taze ve kuru ağırlıkları	63

4.1.3 Yaprak bağıl su içeriği.....	68
4.1.4 Yaprak klorofil içeriği	70
4.2 Arpa Genotiplerinin Kuraklık Stresi Altında Prolin İçeriği	72
4.3 Belirlenen Genlerin qRT-PCR Yöntemi İle İfade Profillerinin İncelenmesi	77
4.3.1 Total RNA izolasyonu	77
4.3.2 Gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri ve erime eğrisi (Melting Curve).....	79
4.3.3 Gen ifadesi çalışmalarına ait bulgular	85
5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇ.....	105
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ.....	130



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik asit
ABF	: ABRE bağlayıcı faktör
ABRE	: ABA yanıt elementleri
ADOR	: Askorbit bağlı oksidoredüktaz
ALDH	: Aldehit dehidrogenaz
APX	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbik asit
bp	: Baz çifti
CAT	: Katalaz
CCI	: Klorofil konsantrasyon indeksi
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CSMO	: C-4 sterol metil oksidaz
DHN	: Dehidrin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DRE	: Kuraklığa duyarlı element
DREB	: Kuraklığa duyarlı bağlanma
Fru	: Fruktoz
GADPH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Glc	: Glikoz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSA	: Glutamat semialdehide
GSH	: Glutasyon
HSP	: Isı şok proteinleri
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KATI	: Kuru ağırlık toleransı
LEA	: Geç Embriyogenez Proteinleri
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz yolağı
MDA	: Malondialdehit
MYB	: Myeloblastosis
MYBR	: Myeloblastosis tanıma bölgesi
MYCR	: Myelocytomatosis tanıma bölgesi

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Poliethilenglikol
POD	: Peroksidaz
POX	: Peroksidaz
P5CS	: Pirolin-5-karboksilat sentaz
P5CDH	: P5C dehidrojenaz
P5CR	: Pirolin-5-karboksilat redüktaz
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakika devir sayısı
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RWC	: Yaprak bağıl su içeriği
SA	: Salisilik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
Suc	: Sukroz
TATI	: Taze ağırlık toleransı
TFs	: Transkripsiyon faktörleri
OAT	: Ornitin-delta-aminotransferaz
O_2^-	: Süperoksit
OH^-	: Hidroksil radikal
WUE	: Su kullanım verimliliği
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kuraklık stresinin bitkideki etkileri	3
Şekil 2.1 Dünya arpa ekim alanı, üretim ve verimi.....	10
Şekil 2.2 Türkiye arpa ekim alanı, üretim ve verimi	11
Şekil 2.3 Çevresel stres faktörleri	15
Şekil 2.4 Abiyotik strese karşı bitki cevaplarının genel dinamikleri	16
Şekil 2.5 Prolinin kuraklığa dayanıklılıktaki rolü	25
Şekil 2.6 Arpada abiyotik stres cevabında rol oynayan temel genler	27
Şekil 2.7 Kurak ve tuz stresi koşullarında ABA bağımlı ve ABA bağımsız yolaklarda gen ifadesinin düzenlenmesi	29
Şekil 3.1 Hasat dönemi tarla fotoğrafları	47
Şekil 3.2 Sera ve iklim odasında yetiştirilen arpa genotipleri.....	48
Şekil 3.3 Stres uygulamasından önce bitkilerin yetiştirilmesi	50
Şekil 3.4 Stres ve kontrol grubu, morfolojik ve fizyolojik çalışmaları.....	53
Şekil 3.5 Prolin ölçüm işlemleri.....	54
Şekil 3.6 RNA izolasyonu.....	55
Şekil 3.7 RNA kalite ve miktar tayini	56
Şekil 3.8 qRT-PCR işlemleri.....	59
Şekil 4.1 Stres ve kontrol grubu fide uzunlukları	62
Şekil 4.2 Stres grubu taze ve kuru ağırlıkları	64
Şekil 4.3 Kontrol grubu taze ve kuru ağırlıkları	64
Şekil 4.4 Stres ve kontrol grubu TATI ve KATI oranları	66
Şekil 4.5 Stres ve kontrol grubu yaprak bağıl su içeriği (BSİ)	69
Şekil 4.6 Stres ve kontrol grubu yaprak klorofil içeriği.....	71
Şekil 4.7 Kuraklık stresi koşullarında <i>H. spontaneum</i> genotipi prolin seviyeleri.....	73
Şekil 4.8 Kuraklık stresi koşullarında Avcı2002 çeşidi prolin seviyeleri.....	74
Şekil 4.9 Kuraklık stresi koşullarında Tarm92 çeşidi prolin seviyeleri	75
Şekil 4.10 Kuraklık stresi koşullarında Sayım40 çeşidi prolin seviyeleri	76
Şekil 4.11 Kuraklık stresi koşullarında Misket çeşidi prolin seviyeleri.....	77
Şekil 4.12 <i>HVA1</i> primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri	80
Şekil 4.13 <i>HVA1</i> primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği	80

Şekil 4.14 <i>Dhn3</i> primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri	81
Şekil 4.15 <i>Dhn3</i> primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği	81
Şekil 4.16 <i>HvSNAC1</i> primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri.....	82
Şekil 4.17 <i>HvSNAC1</i> primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği	82
Şekil 4.18 <i>HvCBF4</i> primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri.....	83
Şekil 4.19 <i>HvCBF4</i> primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği.....	83
Şekil 4.20 <i>HSP17.8</i> primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri.....	84
Şekil 4.21 <i>HSP17.8</i> primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği.....	84
Şekil 4.22 <i>HVA1</i> genine ait bulgular.....	86
Şekil 4.23 <i>Dhn3</i> genine ait bulgular.....	87
Şekil 4.24 <i>HvSNAC1</i> genine ait bulgular	88
Şekil 4.25 <i>HvCBF4</i> genine ait bulgular	89
Şekil 4.26 <i>HSP17.8</i> genine ait bulgular	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Hordeum cinsine ait türler	6
Çizelge 2.2 Dünya arpa ekim alanı, üretimi ve verimi	10
Çizelge 2.3 Türkiye arpa ekim alanı, üretim ve verimi.....	11
Çizelge 2.4 Tez çalışmasında kullanılan çeşitlerin özellikleri	12
Çizelge 2.5 Tez çalışmasında kullanılan stres genleri ve hücredeki bilinen rolleri	30
Çizelge 2.6 Abiyotik stres altındaki bitkilerde prolinin eksojen uygulaması ve koruyucu rolü.....	35
Çizelge 2.7 Arpada tanımlanan stres ile ilgili bazı transkripsiyon faktörleri.....	42
Çizelge 3.1 Toprak su kapasitesinin hesaplanması	49
Çizelge 3.2 cDNA PCR döngü basamakları	57
Çizelge 3.3 İfade profilleri incelenen genler ve primer dizileri	57
Çizelge 3.4 qRT-PCR reaksiyon bileşimi	58
Çizelge 3.5 qRT-PCR aşamaları	58
Çizelge 4.1 Stres grubu morfolojik ve fizyolojik ölçümler.....	61
Çizelge 4.2 Fide uzunlukları kontrol/stres grubu karşılaştırılması	63
Çizelge 4.3 Taze ağırlık kontrol/stres grubu karşılaştırılması	67
Çizelge 4.4 Kuru ağırlık kontrol/stres grubu karşılaştırılması	68
Çizelge 4.5 Yaprak bağıl su içeriğinin kontrol/stres grubu karşılaştırılması	70
Çizelge 4.6 Yaprak klorofil içeriğinin kontrol/stres grubu karşılaştırılması.....	72
Çizelge 4.7 Kit protokolü ile elde edilen RNA miktar ve kaliteleri.....	78
Çizelge 4.8 cDNA miktar ve kaliteleri.....	79

1. GİRİŞ

Tarla bitkileri içinde üretim miktarı ve ekiliş alanı bakımından ikinci sırada yer alan arpa (*Hordeum vulgare* L.), yüksek protein içeriğine sahip, buğday, mısır ve pirinç gibi dünyanın en önemli tahıl bitkilerinden biridir. Diğer tahıl ürünlerine kıyasla arpa, kuru koşullara daha uygundur ve genellikle yarı kurak ve kurak bölgelerde yetiştirilir. Ayrıca arpa, tuza en dayanıklı tahıl bitkisidir ve orta derecede tuza dayanıklı bir ürün olarak kabul edilir (Akinwale vd. 2016, Alkharabsheh vd. 2021).

Türkiye'nin tüm bölgelerinde üretimi yapılabilmektedir. TUİK 2022 raporuna göre, arpa üretimi 2021 yılında 5 milyon 750 bin ton, 2022 yılında %47,8'lik bir artışla 8,5 milyon tona yükselmiştir. 2021-2022 piyasa dönemi için toplam tahıl ürünlerinin üretiminde, yurt içi üretimin yine yurt içindeki talebi karşılama derecesi %80,3 olarak gerçekleşmiştir. Tarla bitkilerinde üretim açısından yüksek paya sahip buğdayın yeterlilik derecesi; durum buğdayında %151,8, diğer buğdayda %79,9 olacak şekilde, genel buğday talep karşılama derecesi %87,3 olarak belirtilmiştir. Yem sanayisi için önemli olan arpanın yeterlilik derecesi ise %66,8 olarak kaydedilmiştir (TUİK 2023).

Bitkiler yaşam ortamlarıyla sürekli ilişki halindedir ve bu yaşam ortamının olumsuz yönde değişmesi, bu değişime karşı bitkinin adaptasyon eksikliği, bitkide stres oluşturmaktadır. Bitkiler stres olarak algıladıkları tüm çevresel etmenlere karşı çok sayıda ve farklı cevaplar geliştirerek yaşamlarını sürdürmeye çalışmaktadır. Geliştirdikleri bu cevap hücresel açıdan karmaşık bir takım biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları içermektedir. Bu cevaplar, stresin çeşidine ve derecesine, bitkinin fizyolojik ve genetiksel özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Böylece bitkiler bu cevaplar ile ortama adaptasyon sağlayarak hayatta kalmaktadır (Kuromori vd. 2022).

Stres faktörleri ile bitkiler yaşamları boyunca çok kez karşılaşmaktadır. Bu faktörler biyotik ve abiyotik (fizikokimyasal) olarak gruplandırılabilir (Levitt 1980). Biyotik faktörler, bazı bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizma kaynaklı oluşurken; abiyotik faktörler ise sıcaklık, su, radyasyon ve mekanik etkilerle oluşan çevre faktörleridir (Kaur vd. 2022).

Bitkilerin biyokütlesinin yaklaşık %80-95'i sudan oluşmaktadır. Su, bitki büyümesi/gelişimi ve bitki metabolizmasının birçok yönü dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde hayati bir rol oynamaktadır (Brodersen vd. 2019). Kuraklık, yağışın düzensiz dağılımı, evapotranspirasyon ve rizosfer çevresindeki su tutma kapasitesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır ve bitki verimliliğini etkileyen en ciddi çevresel streslerden biridir. Su kaynaklarının tükenmesi ve dünya nüfusunundaki hızlı artışla birlikte artan gıda talebi, tarım faaliyetlerini de etkilemektedir (Passioura ve Angus 2010, DeVincentis vd. 2021).

Kuraklık stresi koşulları altında bitkilerin moleküler, biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik ve ekolojik özellikleri ve süreçleri bozulmaktadır. Su eksikliği olan ortamlarda bitki verimi ve kalitesi olumsuz etkilenmektedir. Büyüme evreleri, yaş, bitki türleri, kuraklık şiddeti ve süresi bitkilerin kuraklığa karşı tepkilerini etkileyen temel faktörlerdir. Kuraklığa karşı direnç mekanizması da bitki türleri arasında farklılık göstermektedir. Dahası, kuraklığa karşı bitkinin tepkisi, diğer kuraklık stresi olaylarının önceki oluşumuna ve yoğunluğuna ayrıca diğer streslerin varlığına bağlıdır (Thomason ve Battaglia 2020). Bu nedenle bitkiler, kaynak kullanımlarını azaltmak ve kuraklık gibi olumsuz çevresel koşullarla başa çıkmak için metabolizmalarını ayarlama yeteneğine sahiptir (Gupta vd. 2020).

Su kıtlığı meydana geldiğinde, yapraklardan terleme yoluyla su kaybı oranı, kuru ortamlarda kökler yoluyla su alım oranını aşmaktadır. Kökler genişleyerek daha fazla su almaya çalışır ve bu da sonuçta bitkileri su açığı olduğunda stomatal su kaybını en aza indirecek şekilde adapte eder ve stomalar kapanır (Goche vd. 2020). Bitkilerdeki tipik kuraklık stresi belirtileri arasında yaprakların kıvrılması, sararması, kuruması ve kalıcı solgunluk yer almaktadır (Corso vd. 2020). İyon taşınımı, transkripsiyon faktörü aktiviteleri ve absisik asit (ABA) sinyali yoluyla bitkilerin stoma regülasyonu da bitkilerin kuraklık stresine verdiği tepkilerin içinde yer almaktadır (Kumar vd. 2019, Prakash vd. 2019, Muhammad Aslam vd. 2022).

Bitki büyümesi ve su mevcudiyeti arasında güçlü bir korelasyon vardır çünkü hücre büyümesi, hücre bölünmesine kıyasla su eksikliğinden daha fazla etkilenmektedir. Bu

koşullar altında, hücre duvarı genişleyebilirliğinin ve turgorun azalmasının bir sonucu olarak bitkilerin büyümesi engellenir (Seleiman vd. 2021). Kuraklık koşulları şiddetli olduğunda solunum da azalabilir, ancak hafif stres altında solunumda artışlar gözlenmiştir. Su açığıyla başa çıkmak için, stres altındaki bitkilerin ozmotik ayarı, kök ve yaprakların şeker içeriğindeki artışla korunur ve geçmişte kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde sürgünlere kıyasla köklerde nispeten daha fazla büyüme gözlenmiştir (Miranda vd. 2021).

Şekil 1.1’de kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal etkileri gösterilmiştir. Sinyal iletiminde yer alanlar gibi moleküler düzeyde çeşitli ağlar da kuraklık stresine karşı bu tepkilerin geliştirilmesinden sorumludur (Zandalinas vd. 2020).



Şekil 1.1 Kuraklık stresinin bitkideki etkileri (Seleiman vd. 2019)

Bitkiler kuraklık stresi altında hücrelerinde ozmolit denen ve hücrede turgor dengesinin korunmasını sağlayan çözünür maddeler sentezlemektedir (Serraj ve Sinclair 2002). Bunlar asparajin, prolin ve glisin gibi serbest amino asitler, betain, organik asitler ve karbonhidratlar gibi farklı gruplardan oluşabilmektedir. Bu metabolitler su potansiyelini, hücre turgorunun korunmasını, ozmotik ayarlamayı, hayatta kalmayı korur, kuraklık altında proteinleri ve membran lipid çift katmanlı yapılarını stabilize ederek normal fizyolojik süreçlerin korunmasına yardımcı olmaktadır (Krasensky ve Jonak 2012, M. Aslam vd. 2022).

Kurak koşullar başladığında ilk biriken serbest amino asit prolindir. Bu yüzden bitkinin su stresine girdiğini gösteren bir referanstır. Prolin, hücrede lipid oksidasyonunu engellemek, protein yapılarını korumak, sinyal iletimi ve mitokondri fonksiyonlarını düzenlemek, hücre bölünmesi veya ölümü, gen anlatım seviyelerinin düzenlenmesi gibi temel birçok göreve sahiptir (Liang vd. 2013, Kaur ve Asthir 2015).

Bitkinin kuraklık stresi altında oluşturduğu hücresel cevap, birçok biyokimyasal ve moleküler mekanizmayı içermektedir. Kurak stresi toleransı ile ilgili moleküler kontrol mekanizmalarının aydınlatılması stres ile ilişkili spesifik genlerin ifadesine dayanmaktadır (Wang vd. 2003, Bhargava ve Sawant 2013). Stres yolaklarında rol alan bu genler temel olarak;

1. Sinyal kaskadlarında ve transkripsiyonel kontrolde rol alan genler; *MYC*, *MAP kinaz*, *SOS kinaz* (Zhu 2001), fosfolipazlar (Frank vd. 2000) ve *HSF*, *CBF/DREB*, *ABF/ABAE* (Choi vd. 2000, Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 2007).
2. Membranların ve proteinlerin korunmasında doğrudan fonksiyonu olan genler; Isı şok proteinleri ve şaperonlar, LEA proteinleri (Bray 2000), osmoprotektanlar ve serbest radikal uzaklaştırıcılar.
3. Su ve iyon alımı ve taşınmasında rol alan proteinler; akuaporin ve iyon taşıyıcıları (Blumwald 2000) olmak üzere gruplandırılmaktadır.

Strese toleransta etkili aday genlerin tanımlanması, stres yollarında bulunan genlerin strese cevap ifadeleri ve stres adaptasyonundaki rolleri araştırılarak, strese toleranslı biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesi için araştırmalar sürdürülmektedir. Aynı zamanda bu çalışmalarla birlikte bitki türlerinin yayılış alanları ve bu sınırların nasıl oluştuğu anlaşılmakta, bitkilerin verimliliğini arttıracak çalışmalara hız kazandırılmakta ve bitki metabolizması hakkında bilgilere ulaşılmaktadır (Büyük vd. 2012).

Kuraklığa tolerans bakımından tarımsal üretimde kullanılan bitkilerin doğal genotiplerinin de dahil edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır. Başlangıçta gen, protein, metabolit düzeyindeki incelemeler, şuan yerini hücre toleransını belirlemede toplu yaklaşımlar sunan transkriptom, proteom ve metabolom gibi fonksiyonel genom bilimine bırakmıştır. Yapılan çalışmalar, yabani genotipler ile ıslah edilmiş akrabaları arasında genomik DNA seviyesinde farklılıklar oluştuğunu ortaya koymaktadır. Bu farklılıkların anlaşılabilmesi ve yabani genotiplerin kuraklığa dayanıklılığını sağlayan faktörlerin ortaya konulabilmesi için karşılaştırmalı genomik veya karşılaştırmalı transkriptomik yaklaşımlarının kullanılması gerekmektedir. Kuraklık toleransının temellerini anlamak için transkriptomik, proteomik, metabolomik ve biyoinformatik gibi “omik” yaklaşımların kullanıldığı daha fazla karşılaştırmalı analizlerin yapılmasına ihtiyaç vardır (Dolferus 2014, Öztürk 2015).

Bu proje ile, ıslah programı ve tarla gözlemlerine göre belirlenen 5 arpa genotipinin kuraklık stresi etkisinde bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizlerle elde edilen verileri ve bazı kuraklık stres genlerine ait ifade düzeyleri karşılaştırılarak, ıslah programları için veri oluşturma ve yine bu programlara multidisipliner yaklaşımlarla moleküler tekniklerin dahil edilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Arpa (*Hordeum* L.)

İlk kültüre alınan bitkilerinden biri olan *Hordeum vulgare*, Kapalı Tohumlular (Magnoliophyta) bölümünün, Tek Çenekliler (Liliopsida) sınıfının, Buğdaygiller (Poaceae) familyasının, *Hordeum* cinsine aittir (USDA 2022). POWO (2023)'e göre *Hordeum* cinsine ait kabul edilen tür isimleri çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Alem	:Plantae
Şube	:Magnoliophyta
Sınıf	:Liliopsida
Takım	:Poales
Familya	:Poaceae
Cins	: <i>Hordeum</i>

Çizelge 2.1 *Hordeum* cinsine ait türler

<i>Hordeum aegiceras</i>	<i>Hordeum distichon</i> L.	<i>Hordeum patagonicum</i>
<i>Hordeum arizonicum</i>	<i>Hordeum erectifolium</i>	<i>Hordeum procerum</i>
<i>Hordeum bogdanii</i>	<i>Hordeum euclaston</i>	<i>Hordeum pubiflorum</i>
<i>Hordeum brachyantherum</i>	<i>Hordeum flexuosum</i>	<i>Hordeum pusillum</i>
<i>Hordeum brachyatherum</i>	<i>Hordeum fuegianum</i>	<i>Hordeum roshevitzii</i>
<i>Hordeum brevisubulatum</i>	<i>Hordeum guatemalense</i>	<i>Hordeum secalinum</i>
<i>Hordeum bulbosum</i> L.	<i>Hordeum halophilum</i>	<i>Hordeum stenostachys</i>
<i>Hordeum californicum</i>	<i>Hordeum jubatum</i>	<i>Hordeum tetraploidum</i>
<i>Hordeum capense</i>	<i>Hordeum lechleri</i>	<i>Hordeum spontaneum</i>
<i>Hordeum chilense</i>	<i>Hordeum marinum</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
<i>Hordeum comosum</i>	<i>Hordeum murinum</i> L.	<i>Hordeum</i> × <i>jungblutii</i>
<i>Hordeum cordobense</i>	<i>Hordeum muticum</i>	<i>Hordeum</i> × <i>lagunculciforme</i>
<i>Hordeum depressum</i>	<i>Hordeum parodii</i>	<i>Hordeum</i> × <i>pavisii</i>

Yedi çift kromozomlu tek yıllık bir tahıl olan arpanın, diploid türleri iki ve altı sıralı başak morfolojisine sahiptir. Diploid ($2n = 2x = 14$) arpa genomu, çoğu birden fazla kopya halinde bulunan 39.000'den fazla protein kodlayan gen (Mascher vd. 2017) ile 5,1 Gb (gigabaz) büyüklüğüne sahiptir. Genomunun yaklaşık %84'ünün mobil elementlerden ve tekrarlanan dizilerden oluşması ise bir diğer özelliğidir (Gozukirmizi ve Karlık 2017). Bitki patolojisi, bitki genetiği, bitki biyokimyası, bitki fizyolojisi ve bitki biyoteknolojisinde deneysel bir model oluşturması diploid özelliğinden kaynaklanmaktadır. *Hordeum bulbosum*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum* ve *Hordeum secalinum* türleri tetraploit (tetraploid, $2n = 4x = 28$) ve *Hordeum nodosum* türü hekzaploid ($2n = 6x = 42$ hekzaploit) olarak raporlandırılmıştır (Saisho ve Takeda 2011, Harwood 2016).

Kısa yaşam döngüsü, kendine tozlaşması, tek yıllık bir bitki olması ve genomunun yedi çift kromozomdan oluşması, arpayı moleküler çalışmalar için önemli bir model bitki yapmaktadır. Fizyolojik, morfolojik ve genetik açıdan büyük çeşitlilik göstermesi, geniş ölçüde genetik stokların ve haritaların bulunması ve kendi kendine döllenebilmesi sayesinde çok yönlü testlerin uygulanabilmesi, arpanın fizyolojik ve moleküler çalışmalar için önemini daha da arttırmaktadır. Bunun yanı sıra, yabancı arpanın aşırı iklim koşullarına uyum sağlayabilme yeteneği ve henüz açığa çıkmamış olası uyum yeteneği göz önüne alındığında, gelecekte arpanın germplazm kaynaklarına başvurularak bu potansiyellerin kullanılabileceği düşünülmektedir (Forster vd. 2000).

Arpa insan beslenmesi için kullanılsa da buğday ve pirinç tüketiminin artmasıyla yem, malt ve bira hammaddesi olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Arpanın dünyada kullanım alanları yaklaşık %68'i hayvan yemi, %21'i sanayide ve %5'i de gıda üretiminde, ülkemizde ise %86'sı yemlik, %14 maltlık olarak kullanılmaktadır (Konur ve Akgün 2022). Gıda endüstrisinde ekmek, bisküvi, kraker, çay, bebek maması yapımında kullanılmaktadır. Arpada sindirilebilir lif oranının yüksek olması ve yüksek β -glukan içerdiğinden dolayı bazı ülkelerde arpa unu şeklinde kullanımı artmış ve insan beslenmesinde de önem kazanmıştır (Baik ve Ullrich 2008, Ergun vd. 2012). Arpa bileşiminde kuru maddede yaklaşık olarak %52-72 nişasta, %9-14 protein ve nişasta

olmayan polisakkarit olmak üzere sırasıyla %4-6 selüloz/lignin, %3-6 β -glukan ve %4-7 arabinoksilan mevcuttur (Köten vd. 2013).

2.2 Arpanın Kökeni ve Dağılımı

Buğday, mısır, pirinç ve arpa antik çağlardan beri hatta günümüze kadar uzanan en önemli tahıllardır. M.Ö. 8000 yıl öncesine kadar uzanan arkeobotanik kanıtlar, Bereketli Hilal boyunca farklı yerlerde arpa tohumlarının olduğunu ortaya çıkarmıştır (Dawson vd. 2015, Wang vd. 2016). Yabani bir ata olan *Hordeum spontaneum* MÖ 4500-3500 yılları arasında İsrail'den güneybatı İran'a kadar uzanan bölgelerde bulunmuştur (Badr vd. 2000). Ancak, diğer raporlar arpanın merkezinin Fas, Etiyopya ve Himalayalar olduğunu göstermiştir (Molina-Cano vd. 1999). Arpa ayrıca Etiyopya'dan Mısır'a, oradan da Yunanistan'dan Özbekistan'a, Orta Asya'ya ve Hindistan'ın bir kısmına kadar uzandığı bildirilmiştir (Pankin vd. 2018, Britannica 2020).

Morfolojik özellikleri açısından arpa üçe ayrılabilir Birincisi, altı sıralı bir tür olan *H. vulgare*'dir, bu türün başakları her iki tarafta çentikli ve her çentikte üç başakçıklıdır. İkincisi *H. distichum* iki sıralı bir türdür ve bu, verimli taneler üreten merkezi çiçeklere sahiptir, yan çiçekleri ise kısır. Son olarak en az yetiştirilen arpa türü olan *H. irregulare* aynı zamanda verimli merkezi çiçeklere sahip olup bazı varyetelerinde kısır ve verimli yan çiçekleri bulunmaktadır (Zhou 2009). Altı sıralı arpalar, Tibet'in (günümüzdeki Çin) güneyinden Pakistan'ın kuzeyine kadar oradan Hindistan ve Nepal'e kadar yayılmıştır (Zeng vd. 2018). Arpanın kökeni ve kültüre alınmasını araştıran çok sayıda çalışma olmasına rağmen, en yaygın ve kabul edilebilir yöntem genetik ve kromozomal araştırmalara dayanmaktadır. Genetik ve kromozomal araştırmalar sonucunda, araştırmacılar arpanın olası kökeninin Orta Doğu'da Bereketli Hilal civarında olduğunu vurgulamışlardır (Zeng vd. 2018, Britannica 2020).

2.3 Arpanın Ekonomik Önemi

Çevre şartlarına adapte olma yeteneğiyle geniş bir coğrafyada üretilen arpa, genel olarak hayvan beslenmesi ve malt yapımında tüketilmektedir. USDA (2022) verilerine göre dünya üzerinde 2020/21 sezonunda yaklaşık 51 milyon hektar (ha) alanda 159 milyon ton arpa üretimi gerçekleşmiştir. AB, 2020/21’de dünya arpa ekim alanları ve üretiminde ilk sırayı almıştır. TÜİK (2022) verilerine göre; arpa, Türkiye’de 2021 yılı itibarıyla yaklaşık 3,2 milyon ha alanda 5,75 milyon ton üretime ve ortalama 181 kg/da verime sahiptir. Türkiye’nin arpa üretimine bakıldığında, üretimin yaklaşık %70-80’lik kısmı kurak ve yarı kurak alanlarda gerçekleşmektedir. Bu durum tane verimi ve ürün kalitesi üzerinde olumsuz etki yaratmaktadır. Ancak; arpa diğer tahıllara nazaran sınırlı su koşullarına karşı dayanıklılık göstermektedir. Türkiye’de arpa üretiminin yağışa dayalı koşullarda gerçekleşmesi, değişik çevresel ve iklimsel koşullara uyum sağlayan çeşitlerin kullanılmasını gerektirmektedir (Aktaş 2017, Eğilmez 2022).

Arpa üretimimiz, tüketimimizi karşılamakla beraber bazı yıllar yaşanan kuraklık ve kalite sorunları nedeniyle ithalat yapılmaktadır (Eğilmez 2022). Farklı tüketim alanları olan arpadan beklenen tane kalitesi kavramı da farklılıklar gösterebilmektedir. Özellikle hayvan yemi teminindeki yetersizlikler ve kaliteli ürüne olan ihtiyaç, arpa tarımının önemini daha da artırmaktadır. Türkiye’de genel olarak arazilerin parçalı oluşu, kültürel uygulama eksiklikleri, bilinçsiz gübreleme ile uygun olmayan çeşit seçimi gibi etkenler nedeniyle arpa verimi düşmektedir. Bunlara ek olarak agroekolojik bölgelerin varlığı, kuraklık, yatma problemi, diğer biyotik ve abiyotik stres faktörleri arpa üzerinde ıslah çalışmalarının devam etmesini zorunlu kılmaktadır. Üretim artışını sağlayabilmek için yüksek verimli, yetiştirme şartlarına uygun, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Dirik vd. 2022). Yine ülkemizde her bölgeye önerilen yeni çeşitlerin belirlenmesi çalışmaları arpa üretiminde ve kalitesinde önemli bir artış sağlanabileceği gibi, ithalatın azaltılması ile ekonomiye de katkı sağlanacaktır (Konur ve Akgün 2022).

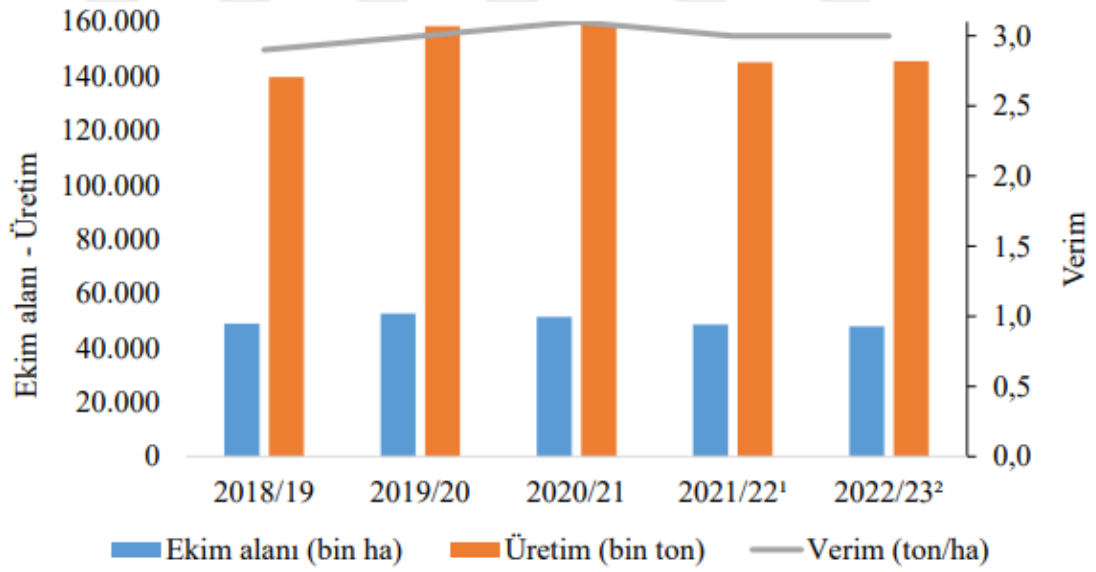
2.3.1 Dünya’da arpa üretimi ve durumu

Dünya arpa ekim alanları 2020/21’de yaklaşık 51,4 milyon ha olarak gerçekleşmiştir. Ekim alanlarının 2021/22 sezonunda ise yaklaşık 48,6 milyon hektar ile bir önceki döneme göre %5,4 daraldığı tahmin edilmektedir (Çizelge 2.2). Bu durumun; Avustralya, AB, Kazakistan, Rusya ve Türkiye’deki ekim alanlarının azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ekim alanlarının 2022/23 üretim sezonunda ise yaklaşık 47,9 milyon ha olacağı öngörülmektedir (USDA 2022).

Çizelge 2.2 Dünya arpa ekim alanı, üretimi ve verimi

Yıllar	Ekim alanı (bin ha)	Üretim (bin ton)	Verim (ton/ha)
2018/19	48.858	139.623	2,9
2019/20	52.614	158.376	3,0
2020/21	51.374	159.408	3,1
2021/22 ¹	48.589	145.079	3,0
2022/23 ²	47.863	145.526	3,0

¹/Tahmin, ²/Öngörü



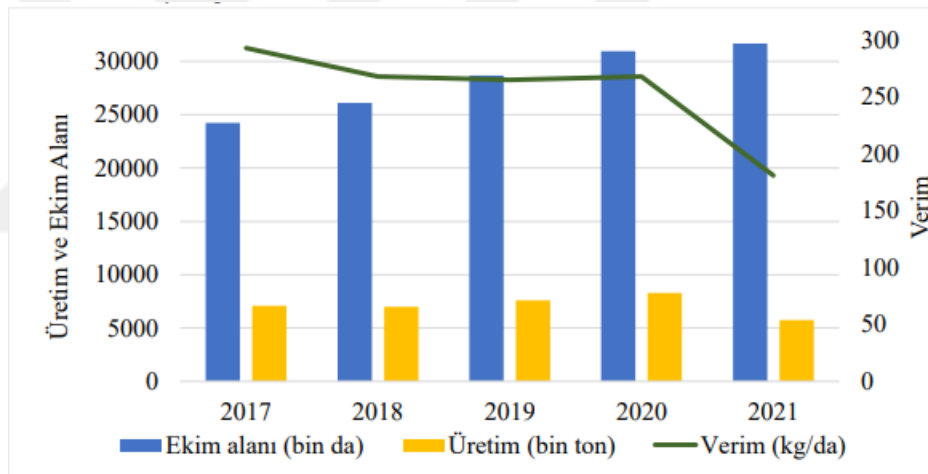
Şekil 2.1 Dünya arpa ekim alanı, üretim ve verimi

2.3.2 Türkiye’de arpa üretimi ve durumu

Türkiye’nin arpa ekim alanları 2021 yılında 2020 yılına göre yaklaşık %2,3 artış göstermektedir. Türkiye’nin toplam 2021 yılı arpa üretimi ise bir önceki yıla göre %30,7 azalarak yaklaşık 5,8 milyon ton olmuştur. Verime bakıldığında, 2021’de verim bir önceki yıla göre yaklaşık %32,5 düşerek 181 kg/da olmuştur (Çizelge 2.3) (TÜİK 2022).

Çizelge 2.3 Türkiye arpa ekim alanı, üretim ve verimi

Yıllar	Ekim alanı (bin da)	Üretim (bin ton)	Verim (kg/da)
2017	24.247	7.100	293
2018	26.119	7.000	268
2019	28.690	7.600	265
2020	30.972	8.300	268
2021	31.691	5.750	181



Şekil 2.2 Türkiye arpa ekim alanı, üretim ve verimi

Türkiye’nin 2021 yılı arpa üretiminin %95,7’lik kısmını diğer arpa üretimi, geriye kalan %4,3’lük kısmını ise biralık arpa üretimi karşılamaktadır. Türkiye’nin 2021 yılı biralık arpa üretimi bir önceki yıla göre %58,3 oranında azalmışken, diğer arpa üretimi ise %28,6 oranında azalmıştır. Ayrıca hem biralık arpa hem de diğer arpa üretiminin son 5 yılda en düşük olduğu yılın 2021 yılı olduğu görülmektedir. Türkiye’de 2021 yılının kurak geçmesi ve arpa ekim alanlarının daralması biralık arpa ve diğer arpa üretiminin azalmasına yol açmıştır (Eğilmez 2022).

2.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Arpa Çeşitlerinin Özellikleri

Tez kapsamında Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından tescillenen 4 çeşit, Tarm92, Avcı-2002, Misket ve Sayım; yabani olarak seçilen *Hordeum spontaneum* genotipi kullanılmıştır. Tescilli çeşitlerin özellikleri aşağıda belirtildiği gibidir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4 Tez çalışmasında kullanılan çeşitlerin özellikleri

	TARM92	AVCI2002	MİSKET	SAYIM40
	İki Sıralı- Yemlik Arpa	Altı Sıralı- Yemlik Arpa	İki Sıralı- Yemlik Arpa	İki Sıralı- Yemlik Arpa
Tescil Yılı	1992	2002	2020	2021
Çeşit Sahibi Kuruluş	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
Morfolojik Özellikleri	2 sıralı, kılçıklı, uzun başaklı, kavuzlu-beyaz daneli, ince uzun yapraklı, bitki boyu 90-100 cm'dir.	6 sıralı, kılçıklı, orta ve uzun başaklı, beyaz homojen daneli, geniş koyu yapraklı, 95-105 cm bitki boyundadır.	2 sıralı, kılçıklı, uzun başaklı, beyaz taneli, geniş uzun yapraklı ve orta boylu bir çeşittir.	2 sıralı, kılçıklı, orta-uzun başaklı, beyaz taneli ve orta boylu bir çeşittir.
Tarımsal Özellikleri	Alternatif gelişme tabiatında, yatmaya dayanıklı, kurak ve mikro element (Çinko ve Bor) toksisitesine toleranslı, kardeşlenme kapasitesi yüksek, ekim nöbetinde en istikrarlı, orta-erkenci, başak kırılıcılığı yok ve kolay harmanlanabilir bir çeşittir.	Kışlık, yatmaya dayanıklı, suya ve azota tepkisi çok iyi, yüksek kardeşlenme ve biyolojik verime sahip, orta-geççi, başak kırılıcılığı olmayan ve kolay harmanlanabilir bir çeşittir.	Kışlık gelişme tabiatında, sağlam saplı ve yatmaya dayanıklı, kardeşlenme kapasitesi yüksek, suya ve azota tepkisi iyi, eş zamanlı olgunlaşmaya sahip, başaklanma zamanı orta, başak kırılıcılığı olmayan ve kolay harmanlanabilen, yüksek verimli ve geniş adaptasyon kabiliyetine sahip bir çeşittir.	Kışlık gelişme tabiatında, sağlam saplı ve yatmaya dayanıklı, çok yüksek kardeşlenme kapasitesine sahip, suya ve azota tepkisi iyi, eş zamanlı olgunlaşmaya sahip, başaklanma zamanı orta, başak kırılıcılığı olmayan ve kolay harmanlanabilen, çok yüksek verimli ve geniş adaptasyon kabiliyetine sahip bir çeşittir.
Verim Özellikleri	Kuru koşullarda 350-450 kg/da	Destek sulu koşullarda 450-600 kg/da	Kuru koşullarda 410-540 kg/da	Kuru koşullarda 488-741 kg/da

Çizelge 2.4 Tez çalışmasında kullanılan çeşitlerin özellikleri (devam)

	TARM92	AVCI2002	MİSKET	SAYIM40
Teknolojik Özellikleri	1000 dane ağırlığı 40-45 g; Protein oranı %10-12; Elek üstü (2,5 mm <) % 85 ve biyolojik değeri orta (% 74,9)	1000 dane ağırlığı 38-40 g; Protein oranı %9-11; Elek üstü (2,5 mm <) % 80-85 (sulu şartlarda)	1000 tane ağırlığı 33.8-42.7 g, protein oranı %11.4-16.2, hektolitre ağırlığı 61.0-62.5 kg/hl, 2.8-2.5 mm elek üstü değeri %49.5-72.1 arasında değişmektedir.	1000 tane ağırlığı 39.0-42.3 g, protein oranı %13.4-14.2, hektolitre ağırlığı 63.4-70.8 kg/hl, 2.8-2.5 mm elek üstü değeri %48.2-69.0 arasında değişmektedir.
Hastalık Durumu	Arpa yaprak lekesi ve arpa çizgili yaprak lekesi hastalıklarına orta dayanıklıdır.	Arpa yaprak lekesi, arpa çizgili yaprak lekesi ve kar küfü hastalıklarına dayanıklıdır.	Arpa yaprak lekesi ve arpa çizgili yaprak lekesi hastalıklarına karşı orta dayanıklıdır.	Arpa yaprak lekesi ve arpa çizgili yaprak lekesi hastalıklarına karşı orta dayanıklıdır.
Tavsiye Edilen Bölgeler	İç Anadolu ve Geçit Bölgelerinin yarı taban ve kıraç alanlarına tavsiye edilir	İç Anadolu, Geçit ve Doğu Anadolu Bölgesinin yüksek alanlarının taban/yarı taban ve destek sulama yapılan alanlarına yalın ve fiğ ile karışımlarda tavsiye edilir.	İç Anadolu ve Geçit Bölgelerinin yarı taban ve kıraç alanlarına tavsiye edilir.	İç Anadolu ve Geçit Bölgelerinin yarı taban ve kıraç alanlarına tavsiye edilir.
Çeşidin yetiştirilmesi ile ilgili bazı öneriler:	Tohumluk miktarı: 20-22 kg/da sertifikalı tohum Ekim zamanı: 1-15 Ekim tarihleri arası Ekim derinliği: 4-5 cm Gübreleme: Toprak analizine göre tavsiye edilen miktar kullanılmalıdır.	Tohumluk miktarı: 20-22 kg/da sertifikalı tohum Ekim zamanı: 1-15 Ekim tarihleri arası Ekim derinliği: 4-5 cm Gübreleme: Toprak analizine göre tavsiye edilen miktar kullanılmalıdır.	Tohumluk miktarı: 20-22 kg/da sertifikalı tohum Ekim zamanı: 1-15 Ekim tarihleri arası Ekim derinliği: 4-5 cm Gübreleme: Toprak analizine göre tavsiye edilen miktar kullanılmalıdır.	Tohumluk miktarı: 20-22 kg/da sertifikalı tohum Ekim zamanı: 1-15 Ekim tarihleri arası Ekim derinliği: 4-5 cm Gübreleme: Toprak analizine göre tavsiye edilen miktar kullanılmalıdır.

2.5 Bitkilerde Stres

Canlı varlıkların, hayatlarını sürdürebilmeleri ve ihtiyaçlarını giderebilmeleri için dünyada olup biten her şeye karşı vermiş oldukları tepkiler stres olarak tanımlanmaktadır. Hayatın kaçınılmaz bir parçası olan stres kelimesi Latince “estricia” fiilinden türemiştir. Stresi fiziksel ve biyolojik stres olarak ele alacak olursak; fiziksel stres, herhangi bir nesneye uygulanan kuvvete karşı nesnenin boyutunda meydana gelen değişim olarak

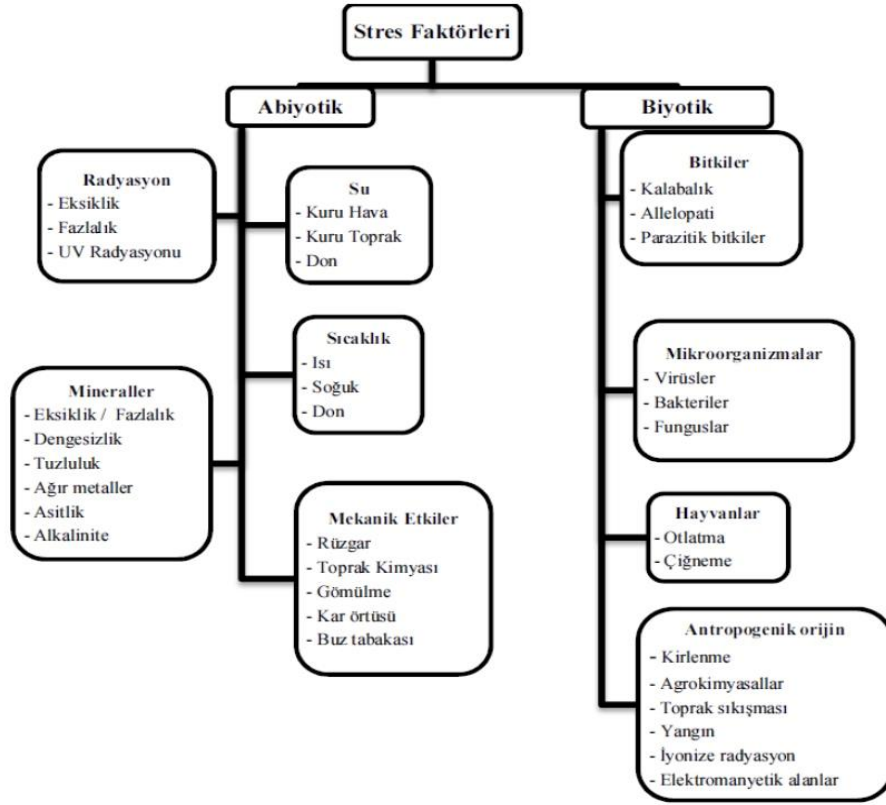
ifade edilmektedir. Biyolojik stres ise bitkilerin yaşam alanlarına çevre koşullarına bağlı olarak meydana gelen değişimlerden dolayı bitkinin gelişim ve büyümesinin olumsuz yönde etkilenmesi olarak ifade edilmektedir (Levitt 1980). Strese karşı meydana gelen tepkiler ve buna bağlı olarak oluşan değişimler geçici olabileceği gibi geri döndürülemez etkilere de neden olabilmektedir. Stres kelimesi her ne kadar olumsuz ve zararlı bir etki olarak karşımıza çıksa da kontrol edilebilir durumlarda olumlu ve iyileştirici özelliği daha da iyi seviyelere çıkarabilme özelliği bulunmaktadır (Gül 2022).

Bitkiler büyüyüp gelişebilmek için bir takım içsel ve dışsal olayların etkisi altındadırlar. Bir bitkinin büyüebilmesi için uygun çevre şartlarına ihtiyaç vardır. Dünyadaki yaşam döngüsünün devamlılığı için doğal yaşamın canlı hayatında önemli bir yere sahip olan bitkiler uygun yetişme ortamlarına rağmen bulundukları çevrenin birtakım olumsuz etkilerine maruz kalabilmektedir. Bitkilerin büyüme, gelişim, meyve oluşumu gibi yaşamsal faaliyetlerini yerine getirebilmesini sağlayan çevre şartlarında meydana gelen değişimler bitkinin yaşamsal döngüsünü zayıflatmakta ve bitkilerde stres olayını meydana getirmektedir (Gürel ve Avcıoğlu 2001). Bitkilerin maruz kaldığı strese karşı vermiş olduğu morfolojik, fenolojik anatomik ve metabolik tepkiler dünyanın varoluşundan bugüne doğal seleksiyonun ortaya çıkması ile çevresel stres faktörleri önemli hale gelmiştir (Gaspar vd. 2002).

Bitkiler üzerinde büyük bir etkisi olan stresin süresi ve şiddeti diğer etkenler gibi oldukça önemlidir. Bitki üzerinde meydana gelen stresin şiddeti ve süresi arttıkça bitkinin dayanım gücü azalmaktadır. Stres, bitkinin dayanabileceği sınırın üstüne çıktığında fiziki olarak görülmeyen zararlar artık gözle görülebilir hale gelir ve dönüşü olmayan zararlar ortaya çıkar. Bitkiler üzerinde meydana gelen strese bağlı zararlar bitkinin türüne, tolere edebilme ve adaptasyon yeteneğine bağlı olarak değiştiği göz önüne alındığında bitkilerde stres olayının aydınlatılması ve bitkilerin bulunduğu ortamdaki stresi bertaraf edebilecek tür ve çeşitlerinin geliştirilmesi oldukça önemli bir hale gelmektedir (Gül 2022).

Stres faktörleri ile bitkiler yaşamları boyunca çok kez karşılaşılırlar. Bu faktörler biyotik ve abiyotik (fizikokimyasal) olarak gruplandırılabilir (Levitt 1980). Şekil 2.3’de

gösterildiği gibi, biyotik faktörler, bazı bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizma kaynaklı oluşurken; abiyotik faktörler ise sıcaklık, su, radyasyon ve mekanik etkilerle oluşan çevre faktörleridir (Büyük 2014).



Şekil 2.3 Çevresel stres faktörleri (Larcher 1995)

Bitkiler doğada birçok stres etmenine maruz kaldığı için stres mekanizmalarının bilinmesi, dayanıklı tür ve çeşitlerin geliştirilmesi için çok önemlidir.

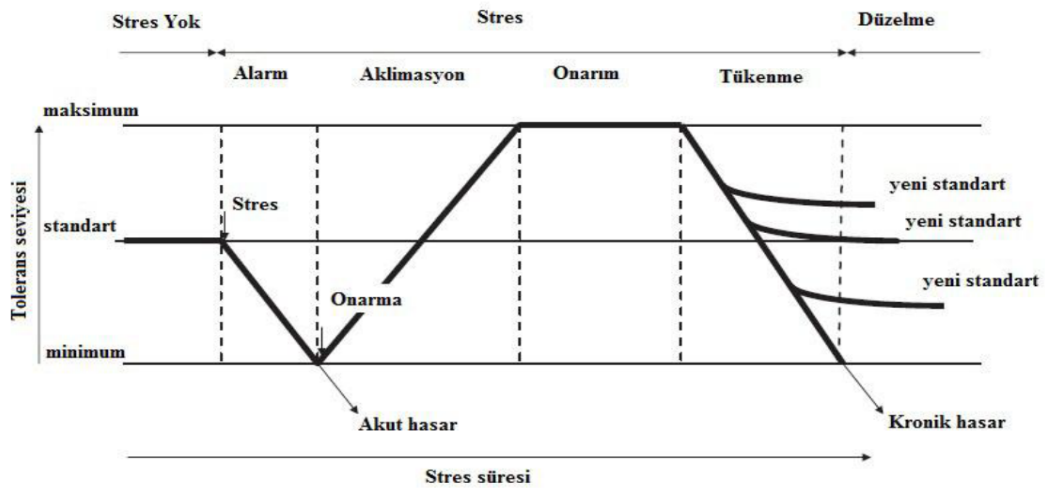
Bitkiler abiyotik strese karşı, genel açıdan dört aşamalı bir cevap oluştururlar (Kosová vd. 2011). Bu aşamalar,

- 1- Başlangıç alarm evresi
- 2- Aklimasyon evresi
- 3- Onarım evresi
- 4- Tükenme evresi

Bitkilerin çevresel şartlarda göstermiş olduğu yaşam döngüsü Şekil 2.4’de gösterilmiştir. Buna göre, bitkilerin yaşayabileceği ortamlarda stressiz bir durum (standart) söz konusuysen stresin olduğu ilk evrede bitkide alarm durumu devreye girerek yaşamsal döngüsünde ani bir düşüş yaşanarak yapısal ve fonksiyonel durumlarında bozulmalar oluşmakta ve bu durum ileri boyutlara ulaştığında hücre yapısında ani hasarlar meydana gelmektedir (Kacar vd. 2002).

Stres yoğunluğu bitkinin canlılığını devam ettirebilecek seviyelerde sabit bir şekilde kalırsa protein sentezi ve koruyucu maddeler yeniden sentezlenerek ortamda oluşan değişikliğe (yükseklik, sıcaklık, nem gibi) uyum sağlayarak performansını korumasına izin veren ve aklimasyon olarak tanımlanan normal seviye için onarım evresine geçmektedir (Suzuki ve Mittler 2006).

Bu süreçte bitki çevrenin olumsuz şartlarına alışarak dayanıklılık kazanmaktadır. Uzun süreli aklimasyonda, bitkiler bazı organlarını kaybetse de normalleşme sürecinde fazladan enerji harcayarak bitki kaybettiği organının yerine yenisini oluşturur. Adaptasyon ve aklimasyon kelimesi aynı etkiyi gösterse de adaptasyon kelimesi aklimasyon kelimesinden farklı bir terim olup bitkilerin ortamdaki olumsuz değişikliklere karşı dayanıklılığını genetiksel özelliklerinden aldığını ifade etmektedir.



Şekil 2.4 Abiyotik strese karşı bitki cevaplarının genel dinamikleri (Korkmaz ve Durmaz 2017)

Onarım evresi boyunca stresin süresinin uzaması veya şiddetinin artması durumunda bitki tükenme sendromu durumuna girdiğinden aşamalı olarak yeni standartlar oluşturarak süreci bertaraf etmeye çalışır. Tolerans sınırları aşıldığı takdirde kalıcı hasarlar oluşmaya başlar. Bitki bu süreci tolere edemeyecek duruma geldiğinde kronik hasarlara bağlı olarak yaşamsal fonksiyonları son bularak ölüm olayı gerçekleşir (Kosová vd. 2011). Stres anında bitkilerin göstermiş olduğu tepki sıralaması teorik olarak benimsenmiş bir yaklaşım sıralaması olup her stres anında böyle bir durum söz konusu olmayabilir.

Bütün bu evrelerden çıkarılacak sonuç, bitkilerin stres anında göstermiş oldukları direncin stresin türü, süresi ve dozu ile doğrudan ilişkili olduğudur. Bu nedenle stres süreçleri sürekli değişim gösterdiğinden bu kuralların her zaman geçerli olduğu söylenemez. Çünkü bu stres olayları belirgin bir tanı vermeden bitkilerde etkisini gösterebilir. Örneğin; stres koşullarının yüksek olduğu sıcak çöller, tuzlu topraklar, aşırı yüksek dağlar ve soğuk yerlerde yetişen bitkilerin ortama iyi adapte olduğu ve bu ortamlarda herhangi bir zarar görmeden normal yetiştirme şartlarında büyüyebildikleri halde, çoğu bitkinin yaşayabildiği stressiz şartlarda yaşayamadığı bilinen bir gerçektir. O halde bu tarz bitkilerin streste olduğunu söylememiz doğru bir yaklaşım tarzı olmayacaktır. Çünkü bitkiler her stres koşullarına karşı aynı tepkiyi vermediklerinden dolayı stres şartlarına adapte olmuş bir bitkinin streste olduğunu söylemek doğru olmaz (Kacar vd. 2002).

Bitkiler bulundukları ortamda meydana gelen ve yaşamlarını zora sokan stres durumlarında hayatta kalabilmek için bir takım savunma mekanizmaları devreye sokmaktadırlar. Bitkiler bu şartlar altında yaşamlarını sürdürebilmek için geliştirdikleri savunma mekanizmasına “stres direnci” ya da “strese dayanıklılık” olarak ifade edilmektedir. Bitkilerin strese karşı göstermiş olduğu tepkiler tümüyle olabileceği gibi bazı organları tarafından da gerçekleşebilir (Kadioğlu 2004). Örneğin çölde yetişen bitkiler aşırı sıcaklardan dolayı su kaybını en aza indire bilmek için kütin tabakaları kalın ve yüzey hacimleri küçük, yaprak yüzeyleri tüylü ve stomaları daha derinde, kökleri derinlerdeki suya ulaşabilecek kadar uzun olacak şekilde ortama karşı dayanıklı olmaktadır.

2.6 Kuraklık Stresi

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında kuraklık stresi %26'lık pay ile en büyük dilimi içermektedir. Bunu %20 ile mineral stresi ve %15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan diğer tüm stresler %29'luk bir pay alırken, yalnızca %10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Öztürk ve Sefaoğlu 2022).

En önemli ve şiddetli abiyotik streslerden kuraklık, mahsulün fizyolojik büyümesini azaltmanın yanı sıra verimi de düşürmektedir. Ayrıca, dünyadaki tarım arazilerinin %45'i kuraklık stresi tehlikesi altındadır, dünya nüfusunun %38'i de kuraklıktan etkilenen bu bölgelerde yaşamaktadır (Guo vd. 2018).

Bitki büyüme sürecinde ana kısıtlayıcı faktörlerden biri olan kuraklık; bitki solunumunu, fotosentezi ve stoma hareketini engelleyebilir. Böylece, bitki büyümesi ve fizyolojik metabolizması etkilenebilir. Kuraklık stresine yanıt olarak bitkiler, kuraklık stresini hafifletmek için morfolojik ve yapısal değişiklikler, kuraklığa dayanıklı genlerin ekspresyonu, hormonların sentezi ve ozmotik düzenleyici maddeler gibi kuraklık tepki mekanizmalarını etkinleştirirler (Yang vd. 2021). Su stresinde kök gelişiminin devamlılığını sağlayan mekanizmalar, osmotik basıncın ayarlanması ve hücre çeperinin esneme kapasitesindeki artıştır. Hücresel veya tüm bitki düzeyinde meydana gelebilecek birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler süreç, su eksikliğine bağlı olarak değişebilir (Jeyasri vd. 2021, Chaudhry ve Sidhu 2022).

Su eksikliğine karşılık olarak bitki direnci, kuraklıktan kaçış (örneğin, daha kuru ortamlarda erken çiçeklenme zamanı), kaçınma (örneğin, stoma tarafından terleme düzenleyici ve yoğun kök sistemlerinin geliştirilmesi), dokularda su yönetiminin korunması, antioksidan temizleyici sistem, bitki büyüme düzenleyicileri ve ozmotik düzenleme yoluyla gerçekleştirilebilir (Turyagyenda vd. 2013, Nguyen vd. 2017).

Kuraklık stresleri hücre şişkinliğini, fotosentetik aktiviteyi, değişen oksidatif metabolizmayı ve membran kararsızlığını belirgin bir şekilde etkilemekte (Fahad vd. 2017), bitkilerde yaprak boyutunu, gövde uzamasını ve su kullanım etkinliğini azaltmaktadır (Alghabari vd. 2015, 2016). Kuraklığa maruz kaldıklarında bitkiler, kök sisteminde veya yaprak seviyesinde fitohormon absisik asit (ABA) üretimini hızlandırmakta, bu da stomaların kapanmasına neden olmakta ve terleme kayıplarını azaltmaktadır (Bashir vd. 2021). Bitkiler, ozmotik potansiyeli düşürmek ve su stresinin neden olduğu olumsuzlukların üstesinden gelmek için ozmotik düzenlemeyi kullanmaktadır (Bijalwan vd. 2022).

Su kaybı ile birlikte iyon miktarında artış gözlenir ve böylece membran ve protein yapısında denatürasyon meydana gelir. Hücrede büyümenin durması ile yaprak boyutu küçülür, fotosentez ve solunum yavaşlar. Yeterli suyun olmaması ksilem ve floemdeki iletimi etkiler. Meyve ve tohum olgunlaşmasını, ürün kalitesini düşürür. Stresi ile birlikte hücrelerde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) birikimiyle oksidatif stres görülür (Büyük 2014).

Biyotik strese direnç genellikle tek bir gen tarafından kontrol edilirken, kuraklık stresi gibi abiyotik streslere verilen yanıtlar birçok gen tarafından kontrol edilir (Vinocur ve Altman 2005, Anjum vd. 2011a). Bu süreçler özellikle ifade analizleri ve genomik yaklaşımlar için uygundur (Sreenivasulu vd. 2007). Erken gelişim aşamalarında bile, kuraklık stresi ve kuraklık stresinin neden olduğu morfolojik etkiler, verim oluşumu üzerinde önemli etkilere sahiptir. Bu nedenle, kuraklık stresi (Cattivelli vd. 2008) ve düzenleyici süreçlerini anlamak çok önemlidir. Bitkilerde kuraklık stresi, su eksikliği ile başlar, ozmotik ve oksidatif stres ve hücresel hasarla sonuçlanır. Bu, osmoprotektif moleküllerden çözünür şekerlerin (Wehner vd. 2015) artmasıyla turgor sürdürülür, kuraklık stresine tepkiler başlar. Ayrıca kontrol grubuna kıyasla stresli bitkilerde ölçülebilir daha düşük su içeriğine ve azalan büyümeye yol açar (Honsdorf vd. 2014). Stres algısı, absisik asit (ABA) reseptörleri, heksokinazlar veya iyon kanalına bağlı reseptörler gibi özel reseptörler tarafından algılanır. Stres sinyali daha sonra örneğin serin-treonin kinazlar, serin-treonin fosfatazlar, kalsiyum bağımlı protein kinazlar veya fosfolipazlar yoluyla iletilir. Son olarak, gen ekspresyonu geç embriyoda bol miktarda

bulunan (LEA) proteinleri, dehidrin veya reaktif oksijen türlerini (ROS) ve *MYB*, *WRKY*, *NAC*, *AP2/ERF*, *DREB2* veya *bZIP* gibi transkripsiyon faktörlerini kodlayan efektör genler tarafından düzenlenir. Strese yanıt veren mekanizmaları aktive eder, homeostazı yeniden kurar ve hasarlı proteinleri ve zarları korur, onarır (Bhardwaj vd. 2023).

Yukarıda bahsedilen genlerin yanı sıra, stres etkilerini dengelemek için bitkiler, ısı şoku proteinlerini, osmoprotektanları ve ikincil metabolitleri biriktirebilen mekanizmalar geliştirmiştir (Raza 2020, Bhardwaj vd. 2023). Bu tepkiler arasında proteinojenik bir amino asit olan prolin stres altında bitkinin hayatta kalmasını etkiler (Rodríguez-Ruiz vd. 2019). Prolin, stres koşullarında hücre turgorunun korunması, karbon ve azot kaynağı olarak, metallerin şelasyonu ve sinyal molekülü olarak çeşitli rollere sahiptir (Aghdam vd. 2019).

Kuraklık stresi tepkisindeki düzenleyici süreçlerin bozulması, hücresel homeostazın geri döndürülemez değişikliklerine ve fonksiyonel ve yapısal proteinlerin ve zarların yıkımına yol açarak hücre ölümüne ve verim oluşumunun azalmasına yol açar (Farooq vd. 2017). Örneğin arpa (Guo vd. 2009) ve buğdayda (Aprile vd. 2013) kuraklık stresiyle ilişkili genler için transkriptom analizi tamamlanmıştır ve bu kuraklık stresi toleransında yer alan genlerin tepkilerini anlamamız için önemlidir.

2.7 Bitkilerin Kuraklık Stresine Uyum Mekanizmaları

Bitkinin doku ve organları kuraklığın etkisini gözlemlemek için kullanılmaktadır (Bitterlich vd. 2019). Kuraklığın süresi ve şiddeti, strese verilen cevapta etkili olmaktadır (Farooq vd. 2017, González-Villagra vd. 2017). Bu cevaplar, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak verilmektedir.

2.7.1 Morfolojik mekanizmalar

Bitkiler yaşamlarının devamı için stresten kaçarak ve tolerans göstererek tepki verirler. Stresten kaçan bitkiler çok şiddetli olmayan kuraklıkta yaşamlarını sürdürebilirken, strese

tolerans gösterebilenler savunma sistemlerini devreye sokarak daha fazla strese uyum sağlayabilirler.

Adaptasyonun bu kaçış mekanizması, tohum vermek için ekimden bitki olgunluğuna kadar olan kısa yağışlı dönemde sınırlı bir döngü gerektirir (Kooyers 2015, Berger vd. 2016). Erken olgunlaşan çeşitlerin, kuraklık stresinden kaçınmak ve kuraklıkla ilişkili verim kaybını, riskini azaltmak için daha başarılı olduğu gösterilmiştir (Akinwale vd. 2016). Ancak, bu kısa sürede su alımını verimli bir şekilde en üst düzeye çıkarmak için bitkilerin kök biyokütlesini hızla artırması gerekir. Bitki köklerinin mevcut koşullar veya durumlar karşısında büyüme, kontrol etme ve optimize etme yeteneği çok önemlidir (Kano vd. 2011, Thangthong vd. 2018). Biyokütle, uzunluk, yoğunluk ve derinlik gibi kök karakterleri, kuraklık ortamlarında verime katkıda bulunan önemli kuraklıktan kaçınma özellikleridir (He vd. 2017).

Ayrıca, stomaların küçülmesi ve derine gömülmesi, yaprakların kıvrılması, tüy sayısındaki değişimler, gövdenin küçülmesi veya fotosentez için değişime uğraması, kutikula ve mum tabakasının kalınlaşması, kuraklık stresi koşullarında terleme nedeniyle su kaybını en aza indirmek için gerekli diğer kuraklıktan kaçınma nitelikleridir (Aroca 2012, Güler ve Terzi 2020).

2.7.2 Fizyolojik mekanizmalar

Stres koşulları sırasında, stresle mücadele etmek için bitkiler tarafından kullanılan fizyolojik mekanizmalardan bazıları bitki düzenleyici, önemli solütlerin aşırı üretimi ve suyun korunmasını içerir. Suyun korunması durumunda, ozmotik basıncın düzenlenmesi kuraklığa toleransın tetiklenmesinde rol oynayabilir ve daha sonra hem organik hem de inorganik solütlerin birikmesine yardımcı olarak fazla su tedarikine neden olabilir (Khoyerdi vd. 2016). Çözünen madde birikimindeki bu artış hücrenin su kullanılabilirliğini azaltır ve hücrelerin turgor basıncını korumasına yardımcı olur.

Oksin, sitokinin, gibberellin etilen, prolin ve absisik asit (ABA) gibi fitohormonlar, kuraklık stresi sırasında bitki büyümesi ve gelişiminin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Vishwakarma vd. 2017). ABA, kuraklık koşulları altında bitkilerin adaptasyonunda anahtar bir düzenleyici olarak gösterilmiştir. Artan ABA sentezi ile, bitki fizyolojisi, büyümesi ve gelişiminde düzenleme ve ayarlamalar yapılmaktadır. Ayrıca, ABA üretimi diğer bitki organlarının yanı sıra sürgün ve kök kuru maddesini, yaprak gelişimini ve kök uzunluğunu da değiştirir. Ayrıca bu durum tohum çimlenmesi, uyku hali ve hatta stoma açılması ve kök büyümesi gibi geçici fizyolojik adaptasyonlara da yol açabilir (Anjum vd. 2012, Vishwakarma vd. 2017).

Nem eksikliği sırasında bitkinin fizyolojik aktivitesi değişmekte ve bu da bitkinin toplam su içeriğinde ve bağıl su içeriğinde önemli bir değişikliğe neden olmaktadır (Egert ve Tevini 2002). Yaprak bağıl su içeriği miktarı, strese toleranslı genotipler için belirleyici bir özelliktir. Yüksek klorofil içeriğine sahip bitkiler kuraklık stresiyle daha kolay başa çıkabilmektedir. Bunun nedeni klorofil içeriğinin arpada ve buğdayda kuraklığa toleranslı genotiplerin taranmasında kullanılan güvenilir bir gösterge olmasıdır (Li vd. 2006, Arjenaki vd. 2012).

Stoma iletkenliği stomaların açılma derecesi olarak ölçülmekte ve bir yaprağın ozmotik düzeniyle doğrudan ilişkili olduğu için yapraktaki su durumunun bir göstergesi olarak da kullanılabilir. Kuraklık koşulları altında yetişen bitkiler suyu korumak için daha düşük stoma iletkenliğine sahiptir ve stoma kapanması kuraklık stresine verilen en erken tepkilerden biridir (Lv vd. 2023).

2.7.3 Biyokimyasal mekanizmalar

Kuraklık stresinin, hücre içinde su ile ilişkili metabolik süreçlere ciddi etkileri olmaktadır. Bu olumsuz etkileri dengelemek için bitkiler, ısı şoku proteinlerini, ozmoprotektanları ve ikincil metabolitleri biriktirebilen mekanizmalar geliştirmiştir (Raza vd. 2023, Bhardwaj vd. 2023).

Biyokimyasal modifikasyonlardan olan hücredeki ROS (reaktif oksijen türleri) aktivitesini azaltmak, bitkiler için en yaygın ve ideal savunma mekanizmasıdır (Sharma vd. 2012). Kuraklık stresi altında, ROS birikimine karşı bitkiler genellikle enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarla veya yağda/suda çözünür moleküllerle temizleme yaparlar (Gill ve Tuteja 2010, Keunen vd. 2013). Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi bileşikler içerirken, askorbik asit (AsA), salisilik asit, glutatyon (GSH), tokoferoller, sistein vb. bileşikler enzimatik olmayan antioksidanlar olarak kabul edilir (Ejaz vd. 2012, Khazaei vd. 2020).

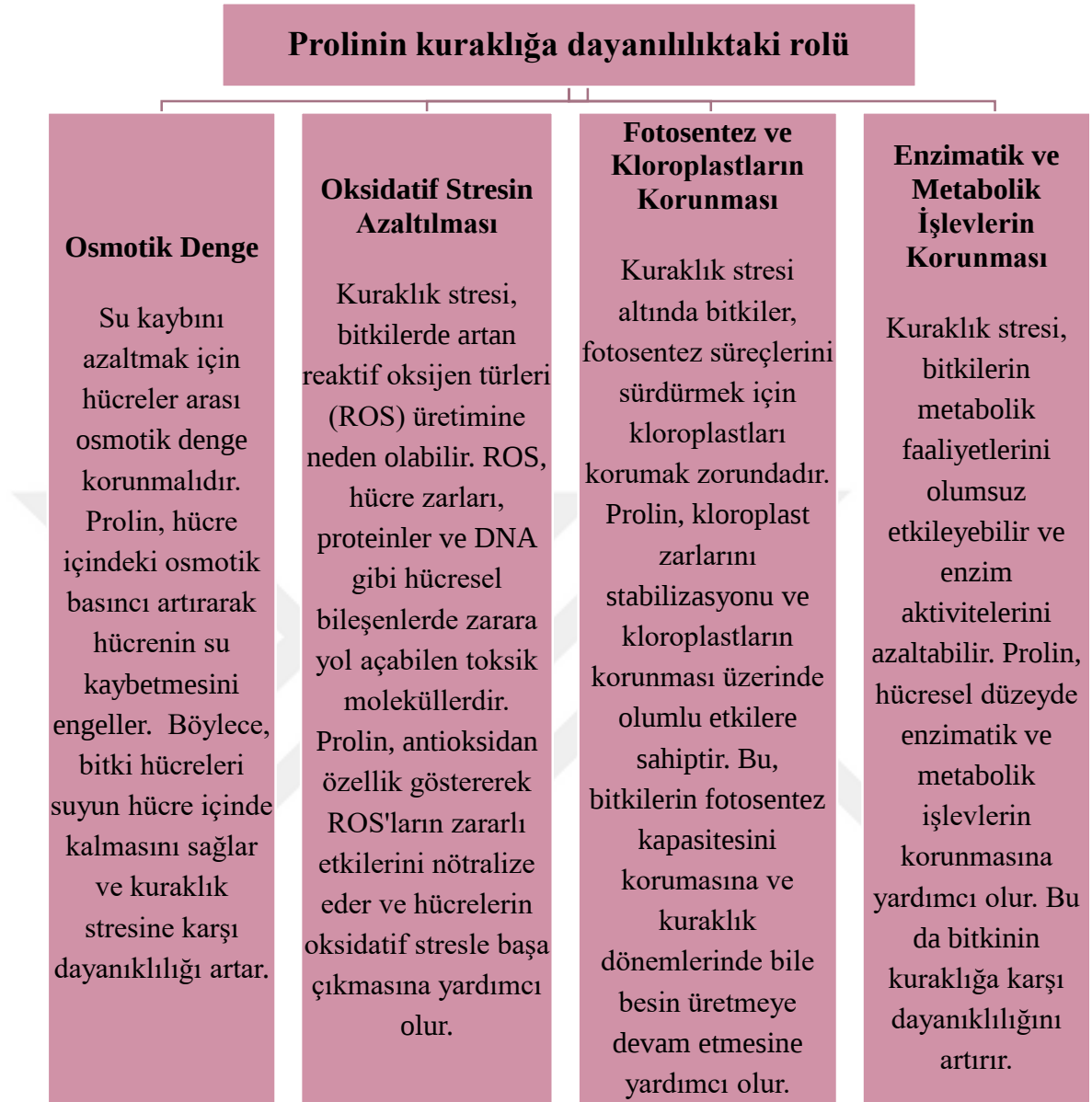
Hücre içindeki prolinin arttırılması, fotosentetik aktiviteyi ve stoma açıklığını azaltan ROS'ları detoksifiye ederek hücreyi hasardan korumak için kullanılır. Ayrıca, şekerler (örneğin glikoz, fruktoz, fruktanlar ve trehaloz) ve nişasta gibi karbonhidratlar kuraklık stresi şartlarında hücrede birikerek; osmoprotektan, karbon depolama ve ROS temizlenmesini sağlayarak stresi azaltmaya yardımcı olmaktadır (Singh vd. 2015). Glikoz (Glc), sukroz (Suc) ve fruktoz (Fru) gibi çözünebilir şekerlerin konsantrasyonundaki artış, kuraklık da dahil olmak üzere çeşitli abiyotik streslere karşı bitki toleransını artırır (Sami vd. 2016).

Bitkilerdeki en yaygın stres tolerans stratejilerinden biri, yüksek sitozolik konsantrasyonlarda bile genellikle toksik olmayan, düşük moleküler ağırlıklı, yüksek oranda çözünür bileşiklerle ve çözünen maddelerle uyumlu organik çözünenlerin farklı tiplerinin aşırı üretimidir. Bu şekilde, ozmotik düzenleme, ROS detoksifikasyonu, membranların stabilizasyonu ve enzimlerin ve proteinlerin doğal yapıları gibi farklı yollarla bitkileri stresten korurlar (Chen vd. 2007). Osmotik ayarlama, ozmotik stres altında suyun korunmasını sağlayarak; çözünür şekerler, şeker alkoller, prolin, organik asitler, kalsiyum, potasyum, klorür iyonları dahil bir dizi ozmotik olarak aktif iyonların birikimini içerir. Su eksikliği ve çözünmüş madde birikimi sonucunda, hücrenin ozmotik potansiyeli azalır, bu da suyu hücreye çeker ve turgorun korunmasına yardımcı olur (Masoudi-Sadaghiani vd. 2011).

Prolinin bitki stres toleransındaki rolü

Prolin, tuzluluk, kuraklık, ağır metaller, UV radyasyonu, mineral eksikliği gibi abiyotik streslerin tetiklenmesi sonucu eubakteriler, protozoa, deniz omurgasızları ve bitkiler gibi çok çeşitli canlılarda biriken bir aminoasittir. Özellikle kuraklık stresi gibi çevresel zorluklar altında, su kaybını önlemek, hücresel yapılarını korumak için bitkilerde prolin miktarı artar. Bu, bitkilerin kuraklığa karşı dayanıklılığını artırmak için benzersiz bir savunma mekanizması olarak kabul edilir (Shabnam vd. 2016, Aghdam vd. 2019). Şekil 2.5’de bitkilerde kuraklık toleransını arttırmak için prolinin hücredeki rolü özetlenmiştir (Ashraf ve Foolad 2007, Anjum vd. 2011a, Dar vd. 2016, Raza vd. 2023).

Prolin aynı zamanda, stres bitkileri için biyokimyasal bir belirteç olarak kullanılabilir ve ikincil bir metabolit olarak da düşünülebilir (Shahid vd. 2017). Diğer taraftan stressiz ortamlarda da sentezlenerek floral geçişi, erkek gametofit hücre ve tohumların gelişimini modüle eder. Çalışmalar, prolinin pentoz fosfat, trikarboksilik asit, üre döngüsü ve fenilpropanoid yolları gibi temel mekanizmalara da dahil olduğunu bildirmiştir (Mattioli vd. 2018, Priya vd. 2019, Mattioli vd. 2022). Ayrıca patojenik saldırı gibi biyotik stres faktörleri için önemli bir öneme sahiptir (Choudhary vd. 2005).



Şekil 2.5 Prolinin kuraklığa dayanıklılıktaki rolü

Bitkilerdeki prolin konsantrasyonu türden türe değişmektedir (Zegaoui vd. 2017). Kloroplast, sitozol gibi hücresel bölmelerde ve ayrıca ozmotik stresle ilişkili dehidrasyon ve yaralanmaya karşı hücre faaliyetlerini düzenlemek için sitoplazmada bulunabilir (Muzammil vd. 2018).

Bitkilerde prolin sentezi kloroplast ve sitozolde meydana gelir, glutamat ve ornitin yolları olarak iki şekilde gerçekleşir. Glutamat yolunda, glutamat P5CS (pirolin-5-karboksilat sentetaz) enzimi tarafından GSA (glutamat-semialdehit)'e indirgenir ve kendiliğinden P5C (pirolin-5-karboksilat)'a dönüştürülür. P5CR (P5C redüktaz) enzimi ayrıca P5C ara ürününü proline indirger. Benzer şekilde, ornitin yolunda, arginin ilk olarak arginaz enziminin etkisiyle ornitine indirgenir. Ornitin daha sonra OAT (ornitin-delta-aminotransferaz) enzimi tarafından transaminasyona uğratılarak GSA ve P5C oluşturulur ve bu da proline dönüştürülür. Prolin degradasyonu mitokondride PDH (prolin dehidrojenaz) veya POX (prolin oksidaz) enziminin ardışık etkisiyle gerçekleşir ve prolinden P5C elde edilir, P5CDH (P5C dehidrojenaz) enzimi daha sonra P5C'yi glutamata dönüştürür (Raza vd. 2023). Glutamat yolu ozmotik stres sırasında ana yoldur (Majumdar vd. 2016).

Prolin, kuraklık toleransında belirgin bir öneme sahip olduğundan dolayı en çok çalışılan ozmolittir. Prolin birikimi, hücrelerdeki hasarı azaltmak için kuraklık stresine maruz kalan bitkilerin ilk oluşturdukları cevaptır. İlerleyen kuraklık stresi, arpa bitkisinde kayda değer bir prolin birikimine neden olmuştur. Protein içeriği, kuraklık stresi süresi ilerledikçe artar ve on günlük stres sonrası kaydedilmiş en üst seviyesine ulaşır ve daha sonra on beş günlük stres sonrasında devam eden şiddetli kuraklık stresi altında azalır (Anjum vd. 2011a). Prolin, protein solvatasyonunu etkiler ve kompleks dördüncül yapının korunmasını sağlar, dehidratasyon stresi altında membran bütünlüğünü korur ve lipid membranların oksidasyonunu veya foto-inhibisyonu azaltır. Ayrıca, hücre içi yapıların stabilize edilmesine, serbest radikallerin atılmasına ve stres koşullarında hücrel redoks potansiyelinin tamponlanmasına da katkıda bulunur (Ashraf ve Foolad 2007).

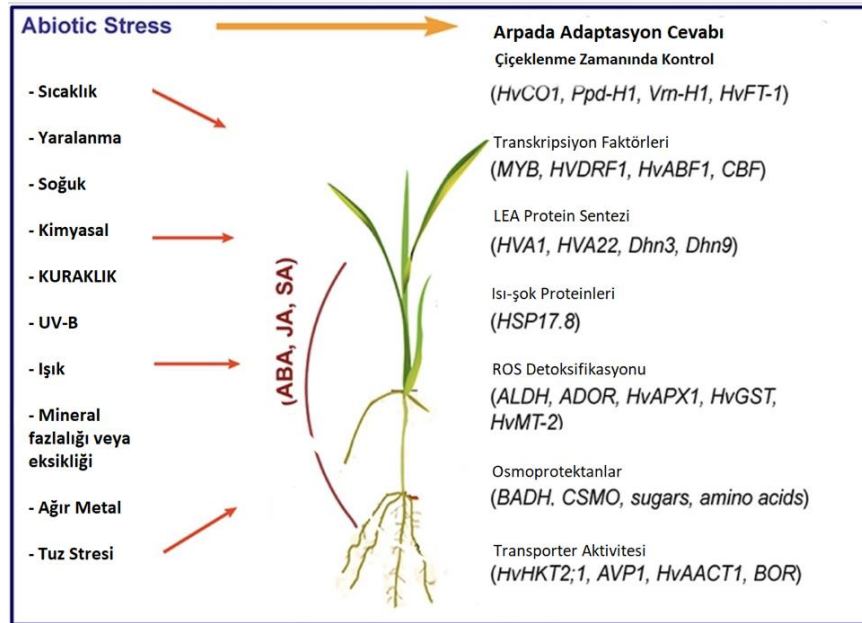
Prolin, mitokondriyal fonksiyonları modüle etmek, hücre proliferasyonunu veya hücre ölümünü etkilemek ve stresten kurtulmak için gerekli olabilecek spesifik gen ekspresyonunu tetiklemeye bir sinyal molekülü olarak görev yapabilir (Szabados ve Savoure 2010). Pek çok bitki türünde stres altında prolin birikimi, stres toleransı ile ilişkilidir ve konsantrasyonunun strese duyarlı bitkilerde strese toleranslı bitkilere oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Prolin sentezi ile ilgili bir gen olan *P5CS* geni, pirinç (Hien vd. 2003), arpa (Deng vd. 2013) ve jatropha (Yang vd. 2015) bitkisinde yapılan çalışmalarda bu genin ifadesinin arttığı bulunmuştur. ABA, prolin birikimi ve poliamin biyosentetik yolunun koordineli düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Pál vd. 2018). Bu nedenle bitkiler kuraklık stresine, uyum sağlamak ve su dengesini düzenlemek için fizyolojik faaliyetlerini değiştirerek yanıt verirler. Bu da strese daha iyi adapte olmalarını ve aktif organik çözünen maddelerin aşırı üretimini sağlamaktadır (Serraj ve Sinclair 2002).

2.7.4 Moleküler mekanizmalar ve stresten sorumlu bazı önemli genlere bakış

Bitkinin kuraklık stresi altında oluşturduğu cevap, birçok hücrel mekanizmayı içermektedir. Kurak stresi toleransı ile ilgili moleküler kontrol mekanizmalarının aydınlatılması stres ile ilişkili spesifik genlerin ifadesine dayanmaktadır (Wang vd. 2003).

Arpanın tek ya da aynı anda birçok stres faktörüyle adaptasyonunda, tanımlanmış birçok gen bulunmuştur (Gürel vd. 2016). Şekil 2.6'da arpa bitkisinin abiyotik stres faktörlerinin etkisiyle hangi genlerle strese cevap oluşturduğu özetlenmiştir.



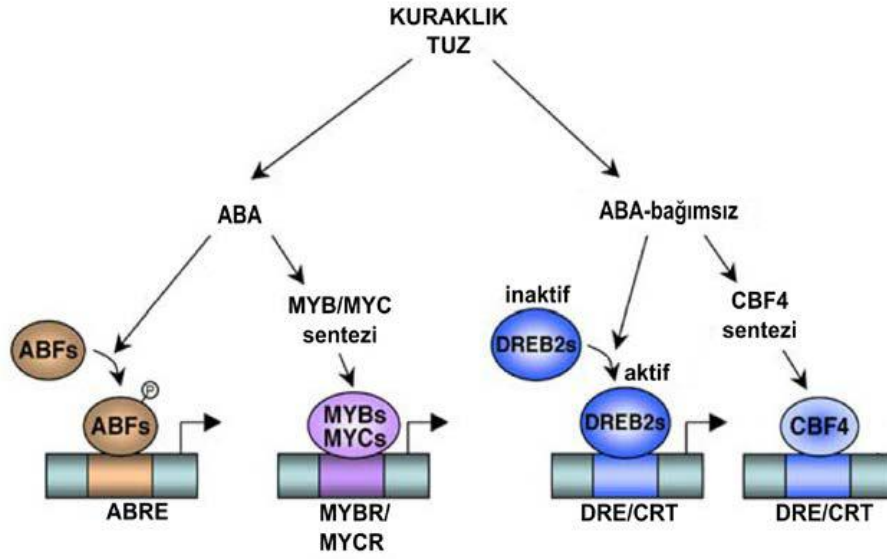
Şekil 2.6 Arpada abiyotik stres cevabında rol oynayan temel genler

Stres ile ilgili genler, erken ve geç cevap oluşturmasına (indüklenmesine) göre ayrılabilir. Erken cevap genleri; stres algılanır algılanmaz uyarılır ve kısa zamanda ifade edilirler. Örnek olarak transkripsiyon faktörlerinin çoğunluğu verilebilir. Gen indüklenince yeni protein sentezlenmesine gerek yoktur, her daim sinyal bileşikleri hazırdir. Geç cevap genleri ise, stres karşısında yavaş aktive olurlar ve ifadeleri çoğunlukla sürekli (Mahajan ve Tuteja 2005). Örnek olarak; Su kanal proteinleri, LEA benzeri proteinler, moleküler şaperonlar, antioksidanlar, ozmolit biyosentezi ve hücre bütünlüğünün sağlanması görevli genlerdir (Zhu 2002, Cramer vd. 2007). Ayrıca bu genler kuraklık stresinde sinyal iletim genlerinin düzenlenmesinde de görevlidir (Yüksel ve Aksoy 2017).

Ayrıca stresle ilgili genler, bitki hormonu olan ABA bağımlı ve ABA bağımsız olarak da sınıflandırılabilir. ABA; tohum dormansisinin teşviki, meyve gelişimi, çimlenmenin durdurulması, büyümenin regülasyonu ve stomaların kapanmasında görevlidir. Ayrıca abiyotik strese cevaptan iç mesajcıdır, bu nedenle stres hormonu da denir (Kang vd. 2010). Abiyotik stresle ilgili yapılan çalışmalarda sinyal iletimi ABA bağımlı ve bağımsız olarak, her iki şekilde de ve birbirleriyle etkileşerek kontrol edildiğini göstermiştir. Stres altında bu yollardaki proteinler, transkripsiyon faktörlerine ait gen ifadelerini aktiflemektedir. Bu transkripsiyon faktörleri her bir strese cevap olarak ayrı transkript düzenlenmesi oluşturur ve stresle ilgili birçok gen direk veya dolaylı olarak devreye girer (Agarwal ve Jha 2010). Stres ile artış gösteren ABA, transkripsiyon faktörlerini aktifler ve gen anlatımını promotör bölgede yer alan ABRE'lere bağlanarak düzenler. Genelde bZIP grubunda bulunmaktadırlar (Yüksel ve Aksoy 2017).

ABA'ya bağlı strese cevap veren proteinler, AREB/ABF, MYC/MYB, bZIP, ABRE, MYCR, MYBR

ABA'ya bağlı olmadan strese cevap veren proteinler; DREB proteinleri, DRE vasıtasıyla stres yolağını aktive ederler (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Kurak ve tuz stresi koşullarında ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollarda gen ifadesinin düzenlenmesi (Boudsocq ve Laurière 2005)

Kuraklığa karşı cevap mekanizmalarında, LEA genleri ve bu sınıfta yer alan Dehidrin (DHN) genlerinde artış saptanmıştır. MAPK (Mitogen- Activated Protein Kinase Pathway) kaskadları, hiperozmotik stres ile aktifleşir, ozmolit üretimi ve bunların birikmesinde artış gerçekleşir. Ozmolitlerin artmasıyla LEA/dehidrin protein sentezi de artarak onarım mekanizması başlar ve stres temelli oluşan hasarlardan hücreyi korur, ozmotik dengenin düzenlenmesini sağlar (Mahajan ve Tuteja 2005, Yüksel ve Aksoy 2017).

bZIP ailesi daha çok ABA birikimi ile aktive olan transkripsiyon faktörlerini içermektedir ve promotor bölgesinde bulunan ABRE'lere (ABA responsive element) bağlanarak gen ifadesini düzenlemektedir. AP2/ERF ailesinde bulunan transkripsiyon faktörleri ise promotör bölgesinde bulunan DRE'lere (drought responsive element) bağlanmaktadır. HD-ZIP transkripsiyon faktörleri ise bitkilere özel tepki vermektedir (Bhargava ve Sawant 2013).

Strese toleransta etkili aday genlerin tanımlanması, stres yollarında bulunan genlerin strese cevap ifadeleri ve stres adaptasyonundaki rolleri araştırılarak, strese toleranslı biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesi için araştırmalar sürdürülmektedir. Aynı zamanda

bu çalışmalarla birlikte bitki türlerinin yayılış alanları ve bu sınırların nasıl oluştuğu anlaşılmakta, bitkilerin verimliliğini arttıracak çalışmalara hız kazandırılmakta ve bitki metabolizması hakkında bilgilere ulaşılmaktadır (Büyük vd. 2012).

2.8 Tez Çalışmasında Kullanılan Stres Genleri

Çizelge 2.5 Tez çalışmasında kullanılan stres genleri ve hücredeki bilinen rolleri

Gen Adı	GenBank ID	Rolü	Kaynak
<i>HVA1</i>	X78205.1	LEA grup 3 üyesi bir gen olup su stresi ile ilişkili olduğu bulunmuştur.	Babu vd. 2004, Checker vd. 2012
<i>Dhn3</i>	AF181453	LEA grup 2 üyesi bir gen olup kuraklık stresi ile ilişkili olduğu bulunmuştur.	Guo vd. 2009
<i>HvSNAC1</i>	JF796130	Abiyotik ve biyotik stres cevabında rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür.	McGrann vd. 2015
<i>HvCBF4</i>	AY785851	CBF/DREBs transkripsiyon faktörü ailesine mensup olan bu genin buğdayda kuraklık toleransını arttırdığı düşünülmektedir.	Oh vd. 2007
<i>HSP17.8</i>	AK368988	Isı şoku proteinleri stres koşullarına karşı bitki toleransında önemli rol oynamaktadır.	Guo vd. 2009
<i>GADPH</i>	XM_045099798.1	Enerji ve karbonhidrat metabolizmasında yer alan enzimi kodlayan gendir. Referans gen olarak kullanılır.	Zhu vd. 2020

2.9 Kaynak Özetleri

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), kuraklığa, tuzluluğa ve fungal hastalıklara karşı sahip olduğu doğal tolerans mekanizmasıyla, stres biyolojisi çalışmalarında model organizma olarak kabul edilmektedir. Stresle ilgili olduğu düşünülen genlerin omik ve karşılaştırmalı genom çalışmaları ile tanımlaması yapılmaktadır. Ayrıca bu genlerin transformasyon çalışmaları ile de ifadeleri tanımlanmaktadır (Gürel vd. 2016).

Kuraklık stresine karşı bitkilerin morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik tepkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda, stresin ürün verimliliğini, kuru maddeyi ve büyümeyi sınırlandığı, ayrıca stomaların su noksanlığıyla kapanmasına ek olarak su alımında ve fotosentezde düşme olduğu gösterilmiştir (Anjum vd. 2011b). Curran ve arkadaşları (1990) klorofil içeriğinin belirlenmesi, bitkilerin gelişim, stres, fotosentez kapasitesi ve verim gibi özelliklerinin belirlenmesinde belirteç olabileceğini söylemişlerdir. Kuraklık stresi altında soya fasulyeleri incelendiğinde kök, gövde ve yapraklarında anatomik değişiklikler kaydedilerek, kontrol grubuna kıyasla stres grubunda kök gövde oranı artarken, klorofil içeriği ve stoma iletkenliğinin azaldığı belirtilmiştir (Makbul vd. 2011). Allahverdiyev ve arkadaşlarının (2015) buğday genotiplerinde kuraklık stresinin fizyolojik parametrelerini inceledikleri çalışmada, stresin fotosentez ve solunum oranı, stoma ve mezofil iletkenliği, pigment içerik alanı, kuru ağırlık, verim ve bayrak yapraktaki suyu düşürdüğünü gözlemlemişlerdir.

ICARDA'nın 2000 yılında yayınladığı Germplasm Programı'nda (ICARDA 2000), bitkilerin kuraklığa dayanıklılığının fide morfolojisindeki değişimlerle değerlendirildiği bir çalışmada, ICARDA'dan seçilen bazı arpa hatları (Athenais, Alanda-1, H. Spontaneum 41, Sara) kullanılmıştır. PVC tüplere ekimi yapılan arpa tohumlarının erken fide dönemindeki bitki boyu, kardeşlenme, kök uzunluğu, kök kuru ağırlığı ve fide kuru ağırlıklarının ölçümleri yapılmıştır. Bitki boyunda önemli bir farklılık bulunmazken, kardeşlenme sayısında, maksimum kök uzunluğu ve fide kuru ağırlığında önemli farklılıklar bulunmuştur. Araştırmada en fazla kök uzunluğu ile fide kuru ağırlığı arasında (0.74), kök uzunluğu ile kök kuru ağırlığı arasında (0.93) ve fide ve kök kuru ağırlıkları arasında (0.81) önemli ve olumlu ilişki tespit edilmiştir.

Dencic ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan 2 yıllık denemede, farklı ülkelerden 30 buğday çeşidi ve 21 yerel çeşit normal ve kurak koşullar altında test edilmiştir. Araştırmada; bitki boyu, başakta başakçık sayısı, başakta tane sayısı, başakta tane ağırlığı ve tane verimini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda başakta tane sayısının, başakta tane ağırlığının ve tane veriminin kuraklığa bitki boyu ve başaktaki başakçık sayısına göre daha hassas olduğu belirtilmiştir. Ayrıca stoma hacmi ve sayısı, bitki kuru ağırlığı, su

kullanımı ve nispi su kapsamı gibi özellikler kuraklıkta değerlendirilmesi gereken önemli özellikler olduğunu açıklamışlardır.

Wehner ve arkadaşlarının (2016b), 156 arpa (*H.vulgare* L.) genotipinin kuraklık stresi ve yaprak yaşlanmasında yer alan genlerin ekspresyon profilini inceledikleri çalışmada, kuraklık uygulamasından 20 gün sonra yapraklardan SPAD ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yaprak yaşlanmasının bir göstergesi olarak BBCH 25'te (Stauss 1994) ölçülen yaprak rengi, klorofil miktarı ve analiz edilen genlerin ekspresyon seviyesi için genotip ve uygulamanın önemli etkilerini tespit etmişlerdir. Ayrıca, kuraklık stresine dahil olan gen grubu (*A1*, *Dhn1*, *GAD3*, *NADP_ME*, *P5CS2*) ($r=0.84$) ile yaprak yaşlanmasında etkili olanlar ($r=0.64$) ve yaprak yaşlanması genleri (*Contig7437*, *GSII*, *hV_36467*, *LHC1b20*, *pHvNF-Y5*) ile yaprak rengi ($r=0.34$) arasında önemli korelasyonlar tespit edilmiştir. Ekimden 27 gün sonra önemli ölçüde azalan SPAD değerleriyle, kuraklık stresinin arpada yaprak yaşlanmasını hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Su stresi (Demirel vd. 2010) ve tuz stresi (Acar vd. 2011) çalışmalarında klorofil içeriğinin düştüğü belirtilmiştir. Fotosentezin engellenmesi veya azaltılması, kuraklığa bağlı ana değişikliklerden birisi olarak belirtilmiştir. Klorofil içeriğinin ekstarksiyon ile elde edilmesi ve SPAD ile ölçülmesinin karşılaştırıldığı çalışmalarda (Limantara vd. 2015, Shibaeva vd. 2020), iki metota ait değerlerin yakın olduğu belirtilmiştir. Sah ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmada, kuraklığın yaprak klorofilinde azalmaya neden olduğu, yaprak su içeriğinin ve stoma miktarının da düştüğü gözlemlenmiştir. Yeşil bitkilerde klorofil miktarının tayini için kullanılan ekstraksiyona dayalı metotların kullanımı pahalı ve uzun zaman aldığı için tahribata neden olmayan SPAD gibi portatif optik klorofil ölçerlerin kullanıldığı Atar ve Güney (2021) tarafından vurgulanmıştır.

Atar ve Bayraktar (2022) ekstraksiyon yöntemi ve klorofilmetre (SPAD) kullanarak 4 ağaç türünün klorofil içeriğini tespit ettikleri çalışmada, bir yaprağın üç farklı noktasından (sapa yakın kısım, ortası ve ucu) ölçüm yaparak ortalama Klorofil Konsantrasyon İndeksi (CCI) değeri şeklinde kaydetmişlerdir. SPAD değerlerinin gerçek klorofil içeriği ile pozitif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Fotosentez, yaşlanma ve stres

etkilerinin belirlenmesi için, toplam klorofil içeriğinin yine aynı yapraklar üzerinde ölçülmesi için, tahribatsız portatif ölçer kullanımının önemini vurgulamışlardır.

Kuraklıkla ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla belirlenen ve tezde ölçümü yapılan prolinin, su stresi altında ozmotik dengeyi sağladığı ve ayrıca plazma mebranın bütünlüğünü de koruduğu saptanmıştır (Mansour 1998). Bununla birlikte, stres koşullarındaki prolin işlevine rağmen, çiçek sentezi, makromolekül stabilizasyonu, hücre uzaması gibi diğer fizyolojik aktiviteler serbest prolin ile ilişkilendirilmiştir (Mattioli vd. 2009, Yang vd. 2011). Prolin gibi farklı osmo-düzenleyicilerin rolü, stres veya normal koşullar altında canlı tohum verimine yol açan optimal büyüme ve gelişme için önemli olduğu tespit edilmiştir (Yan 2015). Diğer taraftan stressiz ortamlarda da sentezlenerek floral geçişi, erkek gametofit hücre ve tohumların gelişimini modüle eder. Çalışmalar, prolinin pentoz fosfat, trikarboksilik asit, üre döngüsü ve fenilpropanoid yolları gibi temel mekanizmalara da dahil olduğunu bildirmiştir (Mattioli vd. 2018, Priya vd. 2019, Mattioli vd. 2022). Ayrıca patojenik saldırı gibi biyotik stres faktörleri için önemli bir öneme sahiptir (Choudhary vd. 2005). P5CS geni prolin sentezinde ilgili gendir ve pirinç (Hien vd. 2003), arpa (Deng vd. 2013) ve jatropha (Yang vd. 2015) bitkisinde yapılan çalışmalarda bu genin ifadesinin arttığı bulunmuştur.

Son yıllarda, çeşitli çalışmalar yapraktan püskürtme yoluyla prolinin dışsal olarak uygulanmasının bitkilerde abiyotik stres toleransını artırmada önemli bir rol oynayabileceğini öne sürmüştür (Orsini vd. 2018, El Moukhtari vd. 2020, Godoy vd. 2021, Zhang vd. 2021). Ayrıca, birçok rapor farklı bitki türlerinin kuraklık stresine karşı farklı tepkiler verdiğini ve bunların genellikle stresin yoğunluğuna ve bitki türüne bağlı olduğunu ortaya koymaktadır (Kaur ve Asthir 2017, Bukhari vd. 2019).

Bezelyede yapılan çalışmada kuraklık stresi altında prolin içeriğinin arttığı gözlenmiştir (Sánchez vd. 1998). Kuraklık stresi altında çeltik yapraklarında prolin seviyesinde artış saptanmıştır (Hsu vd. 2003). Cramer ve arkadaşlarının (2007), kuraklık ve tuz stresi altında Cabernet Sauvignon üzüm çeşidinin prolin miktarını değerlendirdiği çalışmada prolin miktarlarındaki artış, kuraklık stresinde tuz stresine göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Fougere ve arkadaşlarının (1991) tuz stresi altında yoncada yaptıkları

çalışmada, tuza dayanıklı çeşitlerin köklerindeki prolin seviyesinin hassas çeşitlere göre yaklaşık iki katı kadar arttığı görülmüştür. Kuraklığa toleranslı bazı soya fasulyesi çeşitlerinde, kuraklık stresi altında ozmoprotektan olarak görev yapan ve kuraklığa toleransı indükleyebilen ve etkileyebilen serbest prolin birikimi görülmüştür (Ghane vd. 2012).

Abiyotik stres altında çeşitli bitkilerde eksojen prolin uygulamasının yapıldığı bir çalışmada, temel olarak prolinin antioksidatif enzimlerin etkisini arttırdığı bulunmuştur. Çizelge 2.6 da prolin dozları ve etkileri gösterilmiştir (Kaur ve Asthir 2015, Kaur ve Asthir 2017).

İki farklı arpa genotipine (Maresi, Syron) kuraklık stresi uygulanan bir çalışmada, prolin biyosentezi ve dengesi araştırılmıştır. Stres koşullarında her iki genotipte de kök ve yapraklarda ABA ve prolin artışı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, prolin sentezinin kuraklık ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Bandurska vd. 2017). Tuz stresi altında Bayraktar-2000 buğday çeşidinde prolin seviyesinin tuz uygulamasına bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Ayrıca element analiz sonuçları ve büyüme parametrelerinin de bu sonucu doğruladığı belirtilmiştir (Can 2015).

Kuraklık stresi ve prolin arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, aspir çeşitlerine ve kuraklığa dayanıklı olduğu bilinen türe stres uygulanarak verdiği cevaplar incelenmiştir. Stres altında genotipler prolin seviyelerini arttırarak su içeriklerini sabit tutmaya çalışmışlardır. Çalışmanın devamında stres kesilerek sulama yapılmış ve prolin düzeyinde düşüş saptanmıştır. Ek olarak strese dayanıklı olan çeşitte en fazla azalış gerçekleşmiştir. Hasar tamir mekanizmasında istenilen prolin seviyesindeki değişiklikler genotipler arasında belirtilmiştir. Ayrıca yabancı türün prolin, H₂O₂ ve antosiyanin miktarı ile antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, POD, GR ve APX) diğer genotiplere göre fazla olması, stres durumunda yabancı türün dayanıklı olduğunu belirtmiştir (Çulha Erdal 2017, Toksoy ve Doğru 2021).

Szabados ve Savoure (2010), K. Kishor ve Sreenivasulu (2014) Delta 1-pirolin-5-karboksilat sentaz 2 geni (P5CS2)'nin prolin sentezinde ilgili olduğunu belirtmiştir. Prolinin, kuraklık toleransının bir göstergesi olduğunu, stresle arttığını ifade etmişlerdir.

Çizelge 2.6 Abiyotik stres altındaki bitkilerde prolinin eksojen uygulaması ve koruyucu rolü

Bitki Adı	Prolin	Etkileri	Referans
Nohut (<i>Cicer arietinum</i>)	10 µM	Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları yükselterek oksidatif hasarı azaltır	Kaushal vd. 2011
Maş Fasulyesi (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	50 µM	Askorbat-glutasyon döngüsünün bileşenlerini uyarır, antioksidan enzimlerin aktivitesini artırır, lipid peroksidasyonunu ve H ₂ O ₂ içeriğini azaltır	Aggarwal vd. 2011
Kavun (<i>Cucumis melo</i>)	200 µM	Taze ve kuru ağırlıkları, net fotosentez hızını (P _N), klorofil-2 içeriğini artırır. O ₂ ⁻ ve H ₂ O ₂ içeriğini düşürür. Antioksidan enzimlerin aktivitesini artırır	Yan vd. 2011
Deniz Nergisi (<i>Pancratium maritimum</i>)	5 mM	Stres hasarına karşı protein mekanizmalarını korur ve stresle ilgili proteinleri regüle eder	Khedr vd. 2003
Mercimek (<i>Lens culinaris</i>)	15 mM	Glutasyon transferaz ve glioksalaz enzimlerini uyarır	Molla vd. 2014
Buğday (<i>Triticum aestivum</i>)	20 mM	Sürgün ve köklerdeki taze/kuru kütleyi, sürgün uzunluklarını ve tahıl verimini geliştirir	Kamran vd. 2009
Tütün (<i>Nicotiana tabacum</i>)	20 mM	Taze kütleyi artırır, antioksidan enzimlerin aktivitelerini uyarır	Kamran vd. 2009
Şeker Kamışı (<i>Saccharum officinarum</i>)	20 mM	Guaikol peroksidaz aktivitesini geliştirerek tuzun neden olduğu oksidatif stresi hafifletir	Patade vd. 2014
Zeytin (<i>Olea europaea</i>)	50 mM	Antioksidan savunma sistemini modüle eder, fotosentetik aktiviteyi ve bitki büyümesini artırır, bitki su içeriğini sabit tutar	Ahmed vd. 2010

Tez çalışmasında, gen ifade profilleri incelenen genlere ve ait olduğu ailelere ait çalışmalar aşağıda listelenmiştir.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH): Gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması için bu gen çalışmamızda referans (Housekeeping) gen olarak seçilmiştir. *GADPH*, bitkilerde hücrel metabolizmanın temel bir bileşeni olarak sitoplazmada bulunur ve glikoliz yolu adı verilen metabolik yolda yer alır. Glikoliz, karbonhidratların parçalanarak enerji üretildiği bir dizi kimyasal reaksiyondan oluşan ana metabolik yollardan biridir (Zhu vd. 2020, Li ve Wang 2023).

GADPH'in kuraklıkta, türden türe ve bitkinin genel stres tepkisine bağlı olarak değişebilir. Ancak genel olarak, *GADPH*'in enerji üretimi, metabolik denge, oksidatif stres azaltma ve hücrel stres toleransını artırma gibi işlevleri, bitkilerin kuraklık stresi altında sağlıklarını ve hayatta kalma yeteneklerini desteklemektedir.

Gen ifadelerinin değerlendirilmesinde genellikle gerçek zamanlı RT-PCR (qRT-PCR) kullanılmaktadır. Normalizasyon amaçlı referans gen(ler) seçimi bu teknikte dikkat gerektirmektedir. Janská ve arkadaşlarının (2013) çalışmasında, kuraklık stresi altında arpa fidelerinin yaprakları kullanılarak gen ekspresyonu çalışmaları için 13 referans genin karşılaştırmasını yapmıştır. 3 farklı yazılım (GeNorm, NormFinder ve BestKeeper) kullanılarak referans gen setleri tanımlanmıştır. Soğuk uygulamasında en iyi performansı *HSP70* (0.149), *ADP-RF* (0.169) ve *ACT* (0.215) genleri, kuraklık stresi altında *ADP-RF* (0.128), *EF1a* (0.162) ve *GADPH* (0.222) genlerinin gösterdiğini raporlamışlardır. *SIGPRP* (1.181) ve *IF5A* (0.717) genlerinin her iki stres için de ifadesinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. *GADPH* geninin arpada kuraklık ile ilgili olduğunu ve bu sonucun her üç yazılım için de kararlı olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak, arpada gen ifadesi çalışmalarında qRT-PCR'ın yaygın olarak kullanıldığını fakat farklı stres koşullarında farklı referans genlerin olduğunu göz önünde bulundurulmasını belirtmişlerdir.

Kowalik ve Groszyk (2023), arpa (*Hordeum vulgare* L.), buğday (*Triticum aestivum* L.) ve çavdarın (*Secale graine* L.) çimlenme sırasında belirledikleri genlerin ifade

seviyelerine baktıkları çalışmada, kontrol olarak arpa ADP-ribosilasyon faktör ve *GADPH* referans genlerini kullanmışlardır.

❖ LEA ailesinden kuraklıkla ilgili olduğu bilinen 2 gen tezde kullanılmıştır. Bunlar LEA grup 3 üyesi ***HVA1*** ve LEA grup 2 üyesi ***Dhn3***.

LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteinini kodlayan genlerin yüksek düzeyde ifade olmasıyla birçok bitki türünde ağır metaller, sıcak, soğuk ve tuzluluk gibi diğer streslerin yanı sıra dehidrasyona karşı direncin artmasına yol açtığı bildirilmiştir (Xiao vd. 2007, Abdul vd. 2021, Mikołajczak vd. 2023). İlk Dure ve arkadaşları (1989) tarafından, aminoasit dizilimi ve korunmuş motiflere göre 6 farklı grupta değerlendirilmiştir. Bunlar; LEA1, 2, 3, 4, 5 ve atipik LEA proteinleridir (Büyük 2014).

Pirinçte yapılan bir çalışmada kuraklıkla birlikte ABA duyarlılığının arttığı, kuraklığa toleransı arttırmak için de geç embriyogenezde bol miktarda bulunan (LEA) genlerin ekspresyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Yu vd. 2016). LEA proteini kodlayan bir limon geninin (*CuCOR19*) ifadesinin artmasıyla transgenik tütünde soğuk toleransı arttığı bulunmuştur (Hara vd. 2003).

Buğday *WCS19* ve *Arabidopsis thaliana* *COR15A* genlerinin ifadesiyle *Arabidopsis thaliana*'da donmaya karşı dayanıklılığın arttığı gözlenmiştir (Ndong vd. 2002, Puhakainen vd. 2004). Ayrıca buğday *PMA80* ve *PMA1959* genlerinin ifadesinin transgenik pirinçte dehidrasyon toleransını arttırdığı belirlenmiştir (Sivamani vd. 2000).

LEA genlerinden *HVA1* ve *Dhn6*'nın kuraklığa karşı yanıt oluşturduğu, vejetatif büyümeyi geciktirdiği, *H. vulgare ssp. vulgare*'nin toplam taze biyokütlesini sınırladığı gösterilmiştir (Liang vd. 2012).

LEA proteinlerinden, *HVA1*, *HVA22*, *Dhn3* ve *Dhn9* genlerinin membran fosfolipitlerini kodlayarak su ve iyon stresine karşı hücreyi koruduğu bildirilmiştir (Gürel vd. 2016).

HVA1 (Highly ABA-Induced 1) geni bitkilerin kuraklık ve tuz stresine karşı yanıt vermesinde önemli rol oynayan, arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinde LEA-3 protein grubu bir gen olarak bilinmektedir (Kader vd. 2012). Bu genin ifadesinin, arpa, çeltik ve buğdayda kuraklığa dayanıklılığı arttırdığı gözlenmiştir (Chandra Babu vd. 2004). Aynı genin ifadesinin, *H. vulgare ssp. vulgare*'nin stres altındayken su kaybını azalttığına, hücrel hasarı önlemelerine ve stomalarını (gözeneklerini) kapatmalarına yardımcı olduğu belirtilmiştir (Liang vd. 2012).

Arpadan aktarılan *HVA1* genini bulunduran doubled haploid buğdayların kuraklık ve sıcaklık stresine karşı tolerans gösterdikleri bildirilmiştir. Bu çalışmada, sıcaklık stresi altındaki bitkilerin daha düşük oranda oksidatif yüke sahip oldukları ve verimlerinde artış olduğu gözlenmiştir (Samtani vd. 2022).

Arpadan aktarılan *HVA1* geninin çeltik bitkilerinde stres koşullarına karşı kontrol grubu olan transgenetik olmayan bitkilere oranla daha dayanıklı olduklarını; özellikle su eksikliği ve tuzluluk koşullarında *HVA1* geninin aktarıldığı ikinci generasyon çeltik bitkilerinin daha yüksek oranda tolerans gösterdikleri bildirilmiştir (Xu vd. 1996).

Sera koşullarında buğdayda yapılan bir çalışmada, arpadan aktarılan *HVA1* geninin bazı transgenetik buğday hatlarında (T₃) daha verimli su kullanımını sağladığı bulunmuştur (Sivamani vd. 2000). *HVA1* geninin yüksek oranda ekspresyon edildiği altı transgenetik buğday hatlarını su eksikliği koşullarında test ettikleri çalışmada, *HVA1* ekspresyonunun kurak koşullarda verim artışına yol açtığı sonucuna varılmıştır. Bu verim artışı normal koşullarda yetiştirilen transgenetik buğday hatlarında gözlenmemiştir (Bahieldin vd. 2005).

Oraby ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada, arpadan aktarılan *HVA1* genine sahip üçüncü generasyon transgenetik yulaf (*Avena sativa* L.) bitkilerinin kontrol grubu bitkilere göre daha iyi büyüme ve gelişme ile beraber tuzluluğa (200 mM) tolerans gösterdiği rapor edilmiştir.

HVA1 promotörlerinin transkripsiyon kontrolü altında bulunan *HsDREB1A* geni yabancı arpadan (*H. spontaneum*) parlak yalancı darıya (*Paspalum notatum Flugge*) aktarılarak yapılan bir çalışmada, transgenik bitkilerin, transgenik olmayan bitkilerle karşılaştırıldığında şiddetli tuz stresini ve tekrarlanan ciddi dehidrasyon stresini tolere ettiklerini rapor etmişlerdir (James vd. 2008).

Kuraklığa dayanıklı 48 Kavuzsuz Tibet arpası (*Hordeum vulgare ssp. vulgare*) kullanılarak yapılan bir çalışmada, *HVA1* geni susturulduğunda bitkilerde önemli oranda su kaybı olduğunu bildirilmiştir (Liang vd. 2012).

Arpada bulunan *HVA1* geninin buğdaya aktarılarak yapılan bir çalışmada, transgenetik buğday bitkilerinin kuraklık stresi altında daha iyi çimlenme ve gelişme gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, transgenik bitkilerin transgenik olmayan bitkilere göre fizyolojik özellik değerlerinin daha yüksek bulunduğunu belirtilmiştir (Habib vd. 2022).

Dhn3 geni, dehidrin ailesinde, LEA-2 grubunun alt üyesi bir gen olup, embriyo olgunlaşması, strese maruz kalma ve eksojen absisik asit (ABA) uygulamaları sırasında düzenlenerek ve kuraklık stresi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Buna göre yapılan araştırmalarda strese maruz kalan bitkilerde ABA içeriğinin yükseldiği görülmüştür. Bazı olası tahmin edilen fonksiyonları ise su bağlama ve suyun yer değiştirmesi, iyonların ayrılması, proteinlerin ve membran yapılarının tamiri, moleküler şaperonlar, membran sabitlemesi ve özel moleküllerin nükleusdan taşınması olarak sıralanabilmektedir. Bazı bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda ABA seviyesinin arttığı bitkilerde strese karşı tolerans sağlanırken, ABA seviyesinin düşük seviyede olduğu bitkilerin strese karşı koymadığı bildirilmektedir (Graether ve Boddington 2014, Güler ve Terzi 2020)

Arpa genomunda Dhn1'den Dhn13'e kadar 13 dehidrin geni tanımlanmıştır (Tommasini vd. 2008). İsrail ve Ürdün'deki iki bölgede örneklenen yabancı arpa (*H. vulgare ssp. spontaneum*) aksesyonlarında, diferansiyel kuraklık toleransı ile ilgili kantitatif farklılıkları ortaya çıkaran birkaç Dhn transkriptinin (*Dhn1, 3, 5, 6, 9*) gelişmiş bir ifadesi bulunmuştur (Suprunova vd. 2004, Kosova vd. 2014).

Park ve arkadaşlarının (2006) kuraklığa dayanıklı ve dayanıksız olmak üzere iki arpa çeşidi üzerine yürüttüğü çalışmada, kuraklığa dayanıklı genotiplerin erken gelişme döneminde dehidrasyona tepki olarak *Dhn3* ifadesini arttırdığı gözlenmiştir. Bu durum kuraklığa hassas genotiplerde görülmemiştir. Transgenik bitkilerde *DHN* genlerinin yüksek seviyede ifade olması, çeşitli abiyotik stres faktörlerine karşı toleransı arttırdığı belirtilmiştir (J. Singh vd. 2015).

Kuraklığa karşı farklı toleransa sahip iki arpa çeşidinde, Çek bahar çeşidi Amulet ve Suriye landrace türevi Tadmor'da, bitkiler azalmış tarla su kapasitesine maruz bırakıldığında düşük moleküler dehidrin proteinlerinde hem niceliksel hem de niteliksel farklılıklar bulunmuştur (Skodacek ve Prasil 2011).

İki kuraklığa dayanıklı arpa genotiplerini içeren bir çalışmada, susuz koşullarda *Dhn3* proteinini kodlayan genin ifadesinin arttığı belirtilmiştir (Guo vd. 2009). Ganguly ve arkadaşlarının (2012), yaptığı araştırmada transgenik çeltikte *OsRab16A* (*DHN* ailesine ait bir gen) geninin yüksek seviyede ifade olmasıyla don stresine karşı kontrol bitkisine göre daha iyi performans gösterdiğini rapor etmiştir.

Karami ve arkadaşları (2013), kuraklık altında arpa bayrak yaprağında çeşitli *YnSKm* dehidrinlerinin (*Dhn1*, *Dhn3*, *Dhn5*, *Dhn7* ve *Dhn9*) indüklendiğini bildirmiştir. *Dhn3* ve *Dhn9*'un göreceli ifade düzeyleri; klorofil a ve b içerikleri, ozmotik uyum, bitki biyokütlesi ve tane verimi ile pozitif, malondialdehit (MDA) ve elektrolit sızıntısı düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdiğini belirtmiştir. Yine aynı çalışmada, *Dhn3* (*Dehidrin3*) geninin, kuraklık, düşük sıcaklık ile ilgili olduğunu, ABA ve fotoperiyodik değişikliklerle strese cevap verdiğini raporlandırmıştır. *Dhn3* geninin bitkilerde kuraklık koşullarına dayanım sağlamasının yanısıra, birçok stres koşullarına karşı da tolerans sağladığı bilinmektedir.

Çilek yapraklarındaki donma dayanıklılığının buğday dehidringeninin (*WCOR410*) ifadesinin artmasıyla beraber geliştiği gözlenmiştir (Houde vd. 2004). Çeltik üzerine yapılan bir çalışmada, *Dhn3* geninin tuz stresine karşı bitkilerde ifadesinin arttığı belirtilmiştir (Al-anany vd. 2023).

Wehner ve arkadaşlarının (2016b), arpa (*Hordeum vulgare* L.) genotiplerine kuraklık stresi uyguladığı çalışmada, kuraklıkla ilgili bazı genlerin ifade profilleri incelenmiştir. *Dhn1*'in arpada kuraklık stresi altında yukarı regüle edildiği açıklanmıştır.

Üç farklı arpa genotipinin (Golden promise, Steptoe, Morex) kuraklık stresi altındaki gen ifadesinin araştırıldığı çalışmada, önceden kuraklıkla ilgisi olduğu bilinen 16 aday gen seçilerek, geçici indüklenmiş gen susturma (TIGS) hedeflenmiştir. Test edilen dört genin TIGS'si, su stresi altındaki yapraklarda DsRed floresansında önemli ölçüde daha güçlü bir düşüşle sonuçlanırken, tamamen şişen kontrol yapraklarında hiçbir etkisinin olmadığı kaydedilmiştir. Bu genler, arpa kuraklığına duyarlı faktör *HvDRF1* (DREB2 benzeri), dehidrin 6, LEA 3 grup üyesi *HVA1* ve sodyum/proton antiporter *HvHNX1* genidir. Hedeflenen dört transkriptin ayrıca dehidrasyon stresli arpa yaprağı segmentlerinde biriktiği bulunmuştur (Marzin vd. 2008).

❖ Transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerden kuraklıkla ilgili olduğu bilinen 2 gen tezde kullanılmıştır. Bunlar, NAC transkripsiyon faktör ailesinden olan ***HvSNAC1*** ve CBF/DREB transkripsiyon ailesinden ***HvCBF4***.

HvSNAC1 geni, arpa bitkisinde bulunan, SNAC (Stress-Responsive NAC) ailesine ait bir genidir. Bir transkript faktörü olarak işlev görür ve bu diğer genlerin ifadesini düzenleme yeteneği anlamına gelir. Stres koşullarında aktive olduğunda, çeşitli stres yanıtı genlerinin ifadesini artırabilir veya düzenleyebilir.

Kuraklık stresi sırasında, transkripsiyon faktörleri, bitki gelişim programlarının düzenlenmesinde ve çeşitli streslere verilen tepkilerde rol oynayan moleküler anahtarlar olarak işlev görmektedir. Bu aileye ait başlıca *NAC*, *AP2/ERF*, *MYB*, *MYC*, *bZIP*, *HID-ZIP*, *EAR*, *WRKY*, *HvDRF1*, *HvDREB*, *HvABF1* genleri arpanın strese cevabında çok karşılaşılmaktadır (Stockinger vd. 2007, Bhargava ve Sawant 2013, Dolferus 2014). Çizelge 2.7'de arpada tanımlanan bazı transkripsiyon faktörleri ve tolerans gösterdiği stres çeşitleri, referans çalışmaları ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 2.7 Arpada tanımlanan stres ile ilgili bazı transkripsiyon faktörleri

Arpa Transkripsiyon Faktörü	Tolerans Gösterdiği Stres Çeşidi	Referans
<i>HvDRF1</i>	Kuraklık, tuzluluk	Xue ve Loveridge, 2004
<i>HvCBF4</i>	Kuraklık, tuzluluk, soğuk	Xu vd. 2009
<i>HvDREB1</i>	Tuzluluk	Oh vd. 2007
<i>HvDREB1A</i>	Kuraklık, tuzluluk	James vd. 2008
<i>HvRAF</i>	Tuzluluk	Jung vd. 2007
<i>HvSNAC1</i>	Kuraklık	Al Abdallat vd. 2014
<i>HvWRKY38</i>	Dehidrasyon	Xiong vd. 2010

Model bitki *Arabidopsis thaliana*'da yaşlanmayı geciktiren NAC gen mutantları aynı zamanda abiyotik streslere karşı gelişmiş tolerans göstererek yaşlanma ve stres arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. NAC transkripsiyon faktörleri, ROS ve hormon yollarının manipülasyonu da dahil olmak üzere farklı süreçler yoluyla yaşlanmayı düzenlemektedir (Lee vd. 2012, Wu vd. 2012).

Bitkiye özgü en büyük transkripsiyon faktör ailesinden olan NAC [NAM (no apical meristem)], *Arabidopsis thaliana* transkripsiyon aktivasyon faktörü (*ATAF1/2*) ve *CUC2* gibi transkripsiyon faktörlerini içermektedir.

Puramık ve arkadaşlarının (2012), NAC transkripsiyon faktörleri ile yaptığı çalışmada, ikincil hücre duvarı biyosentezi, yaşlanma ve biyotik ve abiyotik stres toleransı dahil olmak üzere birçok gelişimsel sürecin düzenlenmesinde rol oynadığını belirtmiştir. Ayrıca tahıllarda ROS metabolizması homeostazısının teşvik edilmesinde ve düzenlenmesinde (Lee vd. 2012, Wu vd. 2012, You vd. 2013), kuraklık, soğuk ve tuzluluk streslerine karşı tepkilerin düzenlenmesinde, patojenlere karşı etki gösterilmesinde (Chen vd. 2013, Sun vd. 2013), çoklu streslerin düzenlenmesinde (Nuruzzaman vd. 2010) rol oynadığı gösterilmektedir.

SNAC genleri, bitkilerin abiyotik streslere (kuraklık, tuzluluk, soğuk stresi) yanıt verme mekanizmalarında önemli bir rol oynayan bir protein ailesidir. *HvSNAC1* geni, abiyotik streslere karşı arpa bitkisinin yanıtını düzenler. Özellikle kuraklık, tuz stresi ve soğuk

stresi gibi koşullarda bu genin ifadesi artabilir. Stomaların regölasyonunda rol oynayabilir. Stoma kontrolöl, bitkilerin su kaybını ve gaz alışverişini düzenlemelerine yardımcı olur. Bu, özellikle kuraklık stresi altında önemlidir. Yine bu genin tuzluluk stresine yanıt verme mekanizmalarını düzenlediğı bilinmektedir. Bu, arpa bitkisinin tuzlu topraklarda büyüme yeteneğini artırabilir (McGrann vd. 2015, Röhrig ve Dussart 2022).

Strese duyarlı NAC1 (SNAC1) ile yapılan diğerk çalışmalarında, Hu ve arkadaşları (2006), ilk olarak transgenik pirinçte (*OsSNAC1*) karakterize edilen ve bu transkripsiyon faktörünün kuraklık ve tuz toleransında olumlu bir rol oynadığı gösterilen *OsSNAC1*'in strese duyarlı genlerin ekspresyonunu artırarak abiyotik ve oksidatif stres toleransını düzenlediğini göstermiştir. Yine aynı transkripsiyon faktörünün stoma kapanması ve ROS homeostazını kontrol eden genleri hedeflediğı belirtilmiştir (You vd. 2013).

NAC transkripsiyon faktörü ailesinden *OsSNAC1*'in ortolog arpa geni *HvSNAC1*'in aşırı ekspresyonunun da arpa bitkilerinde kuraklığa toleransı arttırdığı gözlemlenmiştir (Al Abdallat vd. 2014). *HvSNAC1* transkripsiyon faktörünün yapılan bir başka çalışmada aşırı ekspresyonu sonucu, arpada kuraklığa dayanıklılığı artırması yanında *Ramularia collo-cygni* mantar kolonizasyonu sonucu oluşan *Ramularia* yaprak lekesi semptomlarının şiddetini azalttığı belirtilmiştir (McGrann vd. 2015).

Gürel ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada, *HvSNAC1*'in aşırı ekspresyonunun, transgenik arpa bitkilerinin farklı gelişim aşamalarında yabancı tip ve hatta ekili arpa ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir kuraklık toleransı ortaya koyduğunu göstermiştir. Bunun nedeninin, *HvSNAC1*'in bitkinin su durumunu iyileştirmesi, fotosentetik aktiviteleri artırması, biyolojik verimi teşvik ederek su kaybını azaltması olarak bildirilmiştir.

HvCBF4 geni, soğuk stresine karşı yanıt veren bir gen olarak bilinse de, kuraklık stresi ile de ilişkilendirilmiştir. Bu genin kuraklık stresine karşı arpa bitkisinin yanıtını etkilediğı ve kuraklık dayanıklılığını artırdığı belirtilmiştir. Buna ek olarak, ABA adı verilen bir fitohormonun yanıtını düzenleyebilir. ABA, kuraklık stresi koşullarında üretilir ve bitkilerin suyu daha verimli kullanmalarına yardımcı olur. *HvCBF4* geni, ABA

yanıtını etkileyerek bitkinin kuraklık stresine daha iyi adapte olmasına katkıda bulunabilir. *HvCBF4* ve benzeri genler, stomaların regülasyonunda rol oynayabilir. Stomalar, bitkilerin su kaybını kontrol etmelerine yardımcı olur. *HvCBF4* geninin etkisiyle, stomaların kapanması ve su kaybının azaltılması sağlanabilir. *HvCBF4* geninin içinde olduğu, transkripsiyon faktörleri içerisinde olan CBF/DREB ailesinin hücredeki görevi, genlerin ekspresyonunu düzenlemek, sinyal yollarında işlev görmek, bitkilerde düşük sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk toleransı ile ilgili sinyal iletim yollarında rol oynamak olarak tanımlanmıştır (Morran vd. 2011, Wu vd. 2011).

HvCBF4 geni ile kuraklık arasındaki ilişki, genellikle bitkilerin su stresine ve abiyotik streslere karşı yanıt verme mekanizmalarını anlamak ve bitkilerin daha dayanıklı hale getirilmesine yönelik çalışmalarda araştırılmıştır. Bu genin ifadesinin artırılması, bitkilerin kuraklık koşullarına karşı daha iyi adapte olmalarına ve daha yüksek kuraklık dayanıklılığına sahip olmalarına katkıda bulunabilir (Cai vd. 2022).

Özgün nükleotid dizisine (5'-TACCGACAT-3') sahip DRE ilk defa kuraklıktan sorumlu *rd29A* geninin promotöründe tanımlanmıştır (Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki 1994). DRE elementi kuraklık ve yüksek tuzluluk koşullarında *rd29A* geninin hızlı bir şekilde anlatımını sağlamaktadır. DRE'ye bağlanan proteinlerden DREB1 ve DREB2 transkripsiyon faktörleri, DRE elementini taşıyan haberci (reporter) genin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Kizis vd. 2001).

Birçok bitki çeşidinde de CBF3 ve CBF4'ün ekspresyonunun kuraklık ve tuzluluk stresine arttığı belirtilmiştir (Haake vd. 2002). Skinner ve arkadaşları tarafından (2005), arpada *HvCBF1*, *HvCBF3* ve *HvCBF4* alt grubu olarak sınıflandırılan en az 20 CBF geni tespit edilmiştir. Örneğin arpa *HvCBF4* geni, *Arabidopsis*, *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da CBF/DREB1'e yakın homolog bir proteini kodladığı belirtilmiştir (Xiao vd. 2008).

Arabidopsis thaliana'da bulunan DRE bağımlı CBF/DREB1 transkripsiyon faktörünü kodlayan gen ile arpada bulunan *HvCbf3*'ü kodlayan genin benzer olduğu bildirilmiştir (Choi vd. 2002).

Bir arpa geni olan *HvCBF4*'ün izole edilerek yapılan çalışmada, transgenetik çeltik bitkilerinde *HvCBF4*'ün aşırı ekspresyonu sonucu herhangi bir gelişme geriliği olmadan kuraklığa, yüksek tuzluluk ve düşük sıcaklık stresine karşı tolerans artışına neden olduğu bildirilmiştir (Oh vd. 2007).

Transgenik çeltikte yapılan bir çalışmada, *HvCBF4*'ü ifade eden transgenetik çeltik bitkilerinin kuraklık stresine karşı kontrol grubu olan transgenetik olmayan bitkilere kıyasla daha dayanıklı olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, bu bitkilerin kontrol grubuna göre fotosentez kapasitelerinin daha yüksek olduğunu ve stres koşullarına yanıt veren genlerin (>400) regülasyonunun arttığını vurgulamışlardır (Lourenço vd. 2011).

HvCBF4 genlerinin arpada abiyotik stres koşullarına karşı önemli rol oynadığı yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir *HvCBF4* geninin Tibet yabani arpasında tuzluluk toleransı ile önemli oranda ilişkili olduğu, tuzlulukla ifadesinin arttığı bulunmuştur (Wu vd. 2011). Arpada *HvCBF4*'ün kopya sayısının arttığı genotiplerde dona dayanıklılığın da doğru orantılı olarak arttığı bulunmuştur (Francia vd. 2016).

Arabidopsis thaliana'da bulunan DRE bağımlı CBF/DREB1 transkripsiyon faktörünü kodlayan gen ile arpada bulunan *HvCbf3*'ü kodlayan genin benzer olduğu Choi ve arkadaşları (2002) tarafından bildirilmiştir.

❖ Strese toleransta ifadesi değişen bir başka gen grubu, ısı şok proteinleridir (Hsp). Bu gruptan ***HSP17.8*** geni tezde kullanılmıştır.

HSP17.8 geni, abiyotik streslere karşı bitkilerin yanıt verme mekanizmalarının bir parçası olarak ifade edilen bir sıcaklık şok proteinidir (heat shock protein, HSP). Ayrıca "small heat shock protein (sHSP)" olarak da adlandırılır. *HSP17.8* bitkilerin stres koşullarına karşı dayanıklılığını artırmada önemli bir rol oynarlar. Bu proteinler, proteinin yanlış katlanmasını veya toplanmasını önledikleri için kontrol ve stres koşulları altında protein işlevselliğini sağlar. Ayrıca normal büyüme, gelişme ve çeşitli streslere yanıt için çok önemlidir (Wu vd. 2022, Ghouili vd. 2023).

Bitkilerin birçoğunda HSP'lerin kuraklık stresi ile indüklendiği görülmüştür. Buğdayda yapılan kuraklık çalışmasında, stresin 7. günü taze ağırlık, kuru ağırlık ve su içeriğinde düşme, kuraklık stresi ile ilgili olan *APX1*, *SAMS1* ve *HSP17.8* genlerinin ifadesinde artma olduğunu gözlemlenmiştir (Kasim vd. 2012). Transgenik Arabidopsis bitkisinde kuraklık ve tuzluluk stresi etkilerini çalıştıkları araştırmada *AtHSP17.7* geninin ifadesinin arttığını ve bitkiyi kuraklık ve tuzluluk stresine karşı tolere ettiği saptanmıştır (Sun vd. 2001).

Guo ve arkadaşları (2009) arpanın (*Hordeum vulgare* L.) kuraklık stresine adaptasyonundaki genetiksel cevabını tanımlamak için, mikroarray yöntemi kullanarak stres altındaki yaprakların transkripsiyonel değişimlerini belirlemiştir. Bunun için kuraklığa toleranslı Martin ve *Hordeum spontaneum* 41-1 (HS41-1), kuraklığa hassas Moroc9-75 genotiplerini kullanmışlardır. Kuraklık stresi altında sadece 17 gen, toleranslı bu iki çeşit tarafından ifade edilmiştir ve bu genlerin kodladığı proteinlerin kuraklık stresine toleransı arttırdığı bulunmuştur. Bu artışı gerçekleştirdiği mekanizmalar; 1. Karbon metabolizmasıyla stomaların kapanmasının kontrolü (NADP malik enzim, NAD-ME ve piruvat dehidrogenaz, PDH), 2. Osmoprotektan glisin betain sentezi (C-4 sterol metil oksidaz, CSMO), 3. Reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı koruyucu sentezi (aldehit dehidrogenaz, ALDH, askorbit bağlı oksidoredüktaz, ADOR), 4. Membranların ve proteinlerin stabilizasyonu (ısı-şok proteinlerinden 17.8, *HSP17.8* ve dehidrin 3, *DHN3*) olarak ifade edilmiştir. Ayrıca kuraklık stresi altında bu 17 genin Moroc9-75 genotipine göre Martin ve HS41-1 genotiplerinde daha fazla ifade olduğu saptanmış ve kuraklıkla ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Cocetta ve arkadaşlarının (2022) yaptığı çalışmada, bazı HSP'lerin bitki gelişimi sırasında rol oynadıklarını öne sürerken, *HSP 70* ve küçük ısı şoku proteini (sHSP) gibi diğer HSP'lerin ısı stresi altında yukarı regüle edildiğini, bu da bunların ısı stresi dahil abiyotik strese karşı koruyucu bir işlev sergilediklerini öne sürdüğünü belirtmişlerdir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Projede stres tolerans farklılıklarını genom düzeyinde yakalamak amacıyla, Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü (TARM) Arpa Islah Birimi'nden Tarm92, Avcı2002, Misket ve Sayım40 çeşitleri; yine Arpa Islah Birimi koleksiyonundan *Hordeum spontaneum* yabani formu (HSPON (NE)-5) temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

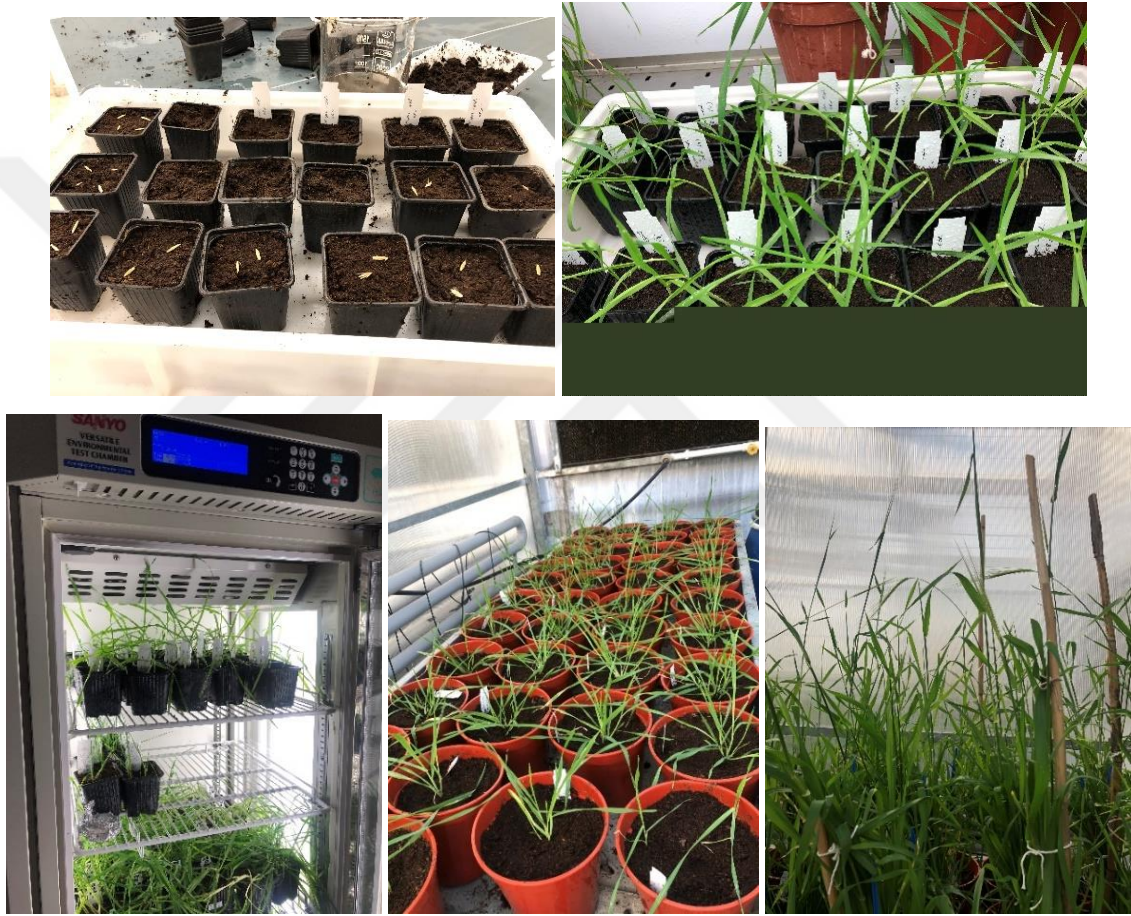
3.2.1 Bitkilerin tarla ve iklim odalarında yetiştirilmesi

TARM Gölbaşı/İkizce arazilerinde çeşitlerin ekimi yapılmış, genotipler arası farklılıklar ve özellikler gözlenmiştir. Hasat sonunda tek başaklardan elde edilen tohumlar uygun koşullarda saklanarak stres uygulaması için kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Hasat dönemi tarla fotoğrafları

Yine TARM arpa ıslah biriminden elde edilen tohumlar saksılara ekimi yapılarak, 20-22°C’de 16 saat gündüz ve 17-19°C’de 8 saat geceden oluşacak şekilde iklim odalarına yerleştirilmiştir. Soğuklanma istekleri iklim kabinlerinde 4°C de 1 ay tutularak sağlanmış, sonrasında saksıların yarısı iklim odasına yarısı seraya aktarılmıştır. Bakımları yapılan ve olgunlaşan bitkilerin başakları hasat edilmiştir. Daha sonra hasat edilen başaklar harmanlanarak, 5 genotipe ait tohumlar stres uygulamasına kadar uygun koşullarda muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Sera ve iklim odasında yetiştirilen arpa genotipleri

3.2.2 Kuraklık stresi koşullarının oluşturulması

Araştırmada kullanılacak çeşit ve hatlara ait tohumların, gen ifadesini etkileyecek olumsuz çevre koşullarını ortadan kaldırabilmek ve her genotip için aynı şartları sağlayabilmek için iklim odasında yetiştirilerek, stres uygulanmasına karar verilmiştir.

Saksılara koyulacak toprak miktarının belirlenmesi, toprak içerisindeki bağıl suyun ve stres uygulaması sırasında toprağın içerisinde kalan suyun ölçülebilmesi çalışmanın diğer basamaklarının doğru verilerle ilerleyebilmesi için önem arz etmektedir. Bunun için literatür araştırmaları yapılmış ve Peach ve Simonis (1952)'in yaklaşımı modifiye edilerek farklı denemeler kurulmuştur.

Bu kapsamda,

- Saksılar her paketten karışık olacak şekilde seçilmiş, tartılmış ve daraları alınmıştır (2 numaralı, ısıya dayanıklı plastik saksı)
- Toprak farklı gramlarda ve tekerrürlü olacak şekilde tartılarak saksılara eklenmiştir (Tüm saksılara aynı paketteki torf kullanılmıştır)
- Toprak suya doyurulmuş ve 6 saat bekledikten sonra saturasyon ağırlığı ölçülmüştür.
- Toprağın kuruması için 100°C'ye ayarlanmış etüvde 48 saat bekletilmiştir. 2 günün sonunda kuru ağırlık ölçülmüştür.
- %100'lük su kapasitesinin eldesi için saksı saturasyon ağırlığından saksı kuru ağırlığı çıkartılmıştır.
- Farklı gramda topraklarla deneme kurularak hata payı en aza indirilmiştir. Her gram toprak için %100, %70, %50, %20 su içerikleri hesaplanmış, çalışmanın devamında her bir saksı için su içeriklerinin ayarlanmasında bu hesaplamalardan faydalanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Toprak su kapasitesinin hesaplanması

Toprak	Saksı	Su oranı	Sulama	Toplam (Saksı+Toprak)
60 gr	27 gr	%100	161 ml	248 gr
		%70	113 ml	200 gr
		%50	80,5 ml	167,5 gr
		%20	50 ml	137 gr
		%10	25 ml	112 gr
		%5	13 ml	100 gr
80 gr	27 gr	%100	214 ml	321 gr
		%70	150 ml	257 gr
		%50	107 ml	214 gr
		%20	43 ml	150 gr
		%10	21 ml	128 gr

Bu metodoloji arpa kuraklık çalışmalarında izlenen standardize edilmiş bir metodolojidir (Guo vd. 2009, Wehner vd. 2016a). Çalışma sonuçlarının yurt dışındaki çalışmalarla sağlıklı şekilde mukayese edilebilmesi açısından önem arz etmektedir.

3.2.3 Bitkilere kuraklık stresi uygulaması

Toprak su kapasitesinin optimizasyonu sağlanıp, değişkenlere göre hesaplamalar yapıldıktan sonra stres uygulaması için deney seti hazırlanmıştır. Her bir saksının darası alınmış ve toprak miktarı ayarlanarak numaralandırılmıştır. Fiziksel şartların farklı zamanlarda değişkenlik gösterebilmesinden dolayı 5 genotip aynı anda denemeye alınmıştır. Saksılara 1'er tohum olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. İklim odasındaki yetiştirme koşulları 20-22°C'de 16 saat gündüz ve 17-19°C'de 8 saat geceden oluşacak uzun gün periyodu şeklinde ayarlanmıştır. Tüm bitkiler 15 gün (proje için belirlenen süre) %70 toprak su içeriği oluşacak şekilde uygun hacimde sulanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Stres uygulamasından önce bitkilerin yetiştirilmesi

15. günden sonra (erken fide dönemi) 5 genotipe ait saksılar kuraklık stresi uygulaması için kontrol ve stres grubu olarak iki bölüme ayrılmıştır. Stres grubuna sulama yapılmazken, kontrol grubundaki bitkiler iki günde bir tartılarak, su kapasitesi %70 olacak şekilde sulanmıştır. Analizler üç tekrarlı ve kontrol grubu ile paralel ilerlemiştir. Bu analizlerin zamanı toprak su kapasitesine göre belirlenmiştir.

Örnek alım zamanları;

- ✓ Stres grubunda sulamanın kesildiği gün (15 günlük bitki)
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %50'ye düştüğü gün
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %30'a düştüğü gün
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %20'ye düştüğü gün
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %10'a düştüğü gün

Büyüme konisinin ve yaprakların kurumasıyla analizler durdurulmuştur. Her grup için kuraklık indikatörü olan bazı analizler gerçekleştirilmiştir. Bunlar, morfolojik (fide boyu, taze ve kuru ağırlık), fizyolojik (yaprak turgur ağırlığı ve yaprak klorofil içeriği), biyokimyasal (prolin içeriği) ve moleküler (*HVA1*, *Dhn3*, *HvSNAC1*, *HvCBF4*, *HSP17.8*) bazı ölçümleri içermektedir.

3.2.4 Morfolojik ölçümler

Fide uzunlukları: Kontrol ve kuraklık uygulaması yapılan gruplardan fide uzunlukları ölçülmüştür (cm).

Taze ve kuru ağırlıkları: Bitkilerin toprak üstünde kalan kısımları hassas terazide tartılarak yaş ağırlıkları alınmış ve 70°C'de 48 saat etüvde kurutularak kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Taze ağırlık toleransı (TATI) ve kuru ağırlık tolerans indeksi (KATI) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$TATI (\%) = (\text{Strese maruz kalan bitkilerin taze ağırlığı} / \text{Kontrol bitkilerinin taze ağırlığı}) \times 100$$

$$KATI (\%) = (\text{Strese maruz kalan bitkilerin kuru ağırlığı} / \text{Kontrol bitkilerinin kuru ağırlığı}) \times 100$$

3.2.5 Fizyolojik ölçümler

Yaprak bağıl su içeriği: Bitkilerin tam olarak gelişmiş 2. yaprakları alınarak tartılmış, taze (yaş) ağırlık (mg) olarak kaydedilmiştir (Y.A). Yaprakların turgor haline gelmesi için, distile suyla ıslatılmış filtre kâğıtlarının arasında 1 gün bekletilmiştir. Tartımdan önce su damlacıkları kurularak turgor ağırlıkları ölçülmüştür (T.A). Sonra yapraklar 70°C etüvde 48 saat bekletilerek kuru ağırlıkları belirlenmiştir (Y.K.A). Aşağıdaki formüle göre ‘yaprak bağıl su içeriği’ hesaplanmıştır (Cseuz vd. 2002). Ölçümler 0.001 g hassasiyetle analitik terazi kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{B.S.İ. (\%)}: [\text{Y.A} - \text{Y.K.A}] / [\text{T.A} - \text{Y.K.A}] \times 100$$

Yaprak klorofil içeriği: Her bitkinin, farklı yapraklarından toplamda 3 değer olacak şekilde Konika Minolta Spot Meter cihazı ile ölçümleri yapılmıştır, ölçüm değerinin ortalaması SPAD cinsinden o tekerrürün değeri olarak verilmiştir (Öncel ve Keleş 2003) (Şekil 3.4).

3.2.6 Biyokimyasal ölçüm

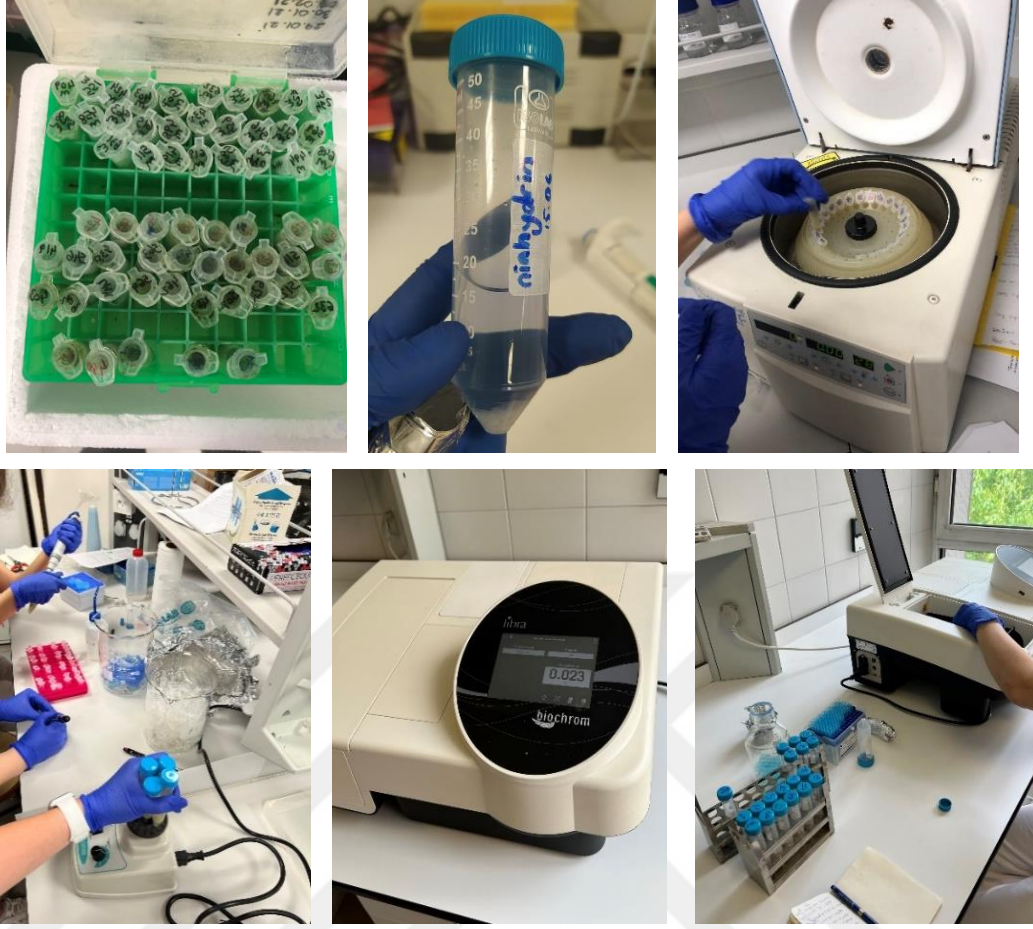
Prolin miktar tayini: Prolin miktar tayini için öncelikle çalışılacak örnek sayısına göre çözelti hazırlığı planlanmıştır. 25 örnek için 6M ortofosforik asit ve %3'lük sülfosalisilik asit hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin kullanılacağı ninhidrin asit çözeltisi için, 0,8438 gr ninhidrin alınarak 20,25 ml glisyal asetik asit ile seyreltilmiş, 60°C su banyosunda ninhidrinin erimesi sağlanmıştır. Üzerine daha önce hazırlanan 13,5 ml 6M'lık ortofosforik asit ilave edilerek karıştırılmıştır. Prolin standartların hazırlanması için; 0, 5, 12.5, 25, 37.5, 50, 75, 200 µmol/prolin içeren standartlar sülfosalisilik asit kullanılarak hazırlanmıştır.



Şekil 3.4 Stres ve kontrol grubu, morfolojik ve fizyolojik çalışmaları

Sıvı azot ile parçalanmış arpa yaprakları 0.2 gr olacak şekilde ölçülmüş, üzerine %3'lük sülfosalilik asitten 4 ml eklenerek ezilmiş ve 25°C 13.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüplerden 1 ml çekilerek üzerine 1 ml ninhidrin çözeltisi, 1 ml glasiyal asetik asit eklenmiştir. Daha önce hazırlanan standartlara da 1 ml glasiyal asetik ve 1 ml ninhidrin eklenmiştir. Tüm örnekler 100°C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. 1 saat sonunda reaksiyonu durdurmak için tüpler buzda tutulmuştur. Soğuyan tüpler 2 ml tolüen ile ekstrakte edilmiştir. Önce standartların sonra örneklerin UV Spektrofotometre cihazında, 520 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur (Bates vd. 1973) (Şekil 3.5).

Elde edilen verilerin, istatistik analizi Graphpad Prism 9.0.0.121 yazılımı ile Multiple t-testi uygulanarak grafikler oluşturulmuştur.



Şekil 3.5 Prolin ölçüm işlemleri

3.2.7 Gen ifade profillerinin incelenmesi

RNA izolasyonu

Stres ve kontrol gruplarına ait arpa yaprakları sıvı azot ile parçalanarak, RNA izolasyon aşamasına kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. İzolasyon için, Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit kullanılmıştır. İzolasyon, kitin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Sıvı azot ile toz haline getirilen örnekler 100 mg olacak şekilde ependorflara aktarılmıştır. Protokole göre örnek sayısı kadar hesaplama yapılarak, Liziz Buffer'a %1'lik 2-mercapto eklenmiştir. Hazırlanan liziz bufferdan, her bir örneğe 600 μL koyulmuş ve pipet yardımıyla ezilmiştir. 12.000 x g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüplere

aktarılmıştır. Aktarılan miktarın 1.5 katı kadar %70'lik etanol eklenerek vortekslenmiştir. Yeni toplama tüpleri alınarak içlerine filtre kolonu yerleştirilmiş, 700 μ L karışım filtre kolonuna eklenmiştir. 12.000 x g'de 15 saniye santrifüj yapılarak, kalan miktarlar için işlem tekrarlanmıştır. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılmış, filtre tekrar tüpe yerleştirilmiştir. Üzerine 700 μ L Wash Buffer I koyularak, santrifüj edilmiştir. Sıvı, koleksiyon tüpü ile atılarak, yeni koleksiyon tüplerine filtreler yerleştirilmiştir. Daha önceden içerisine etanol koyularak karıştırılan Wash Buffer II, yeni koleksiyon tüplerine yerleştirilen filtrelerin üzerine 500 μ L olacak şekilde eklenmiştir. 12.000 x g'de 15 sn santrifüjün ardından, Wash Buffer II ile yıkama işlemi birkaç kez tekrar edilmiştir. Yeni ependorf tüplerine yerleştirilen filtre kolonlarının üzerine 50 μ L RNaz içermeyen ddH₂O eklenmiştir. 1 dk oda sıcaklığında bekledikten sonra 12.000 x g'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Filtreler atılarak RNA'lar kalite ve miktar ölçümleri için hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 RNA izolasyonu

RNA kalite ve miktar tayini

RNA'ların kalite ve miktar tayinleri NanoDrop™ Lite Spectrophotometer cihazı kullanılmıştır. Ölçüm sonrası RNA'lar %1.5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek ölçüm sonuçları doğrulanmıştır. Jel için; Tris-asetik asit EDTA (TAE) tamponuna, 4 μ L EtBr jel boyası eklenerek elektroforez tankına dökülmüştür. 4 μ L RNA, 2 μ L DNA jel yükleme boyası (DNA loading dye) ile karıştırılarak jele yüklenmiş ve 120 voltta 40 dakika yürütülmüştür. UV-jel görüntüsü sistemi ile görüntüler elde edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 RNA kalite ve miktar tayini

cDNA sentezi

Gen ifadesini ölçmek için tek iplikli RNA örnekleri cDNA'ya dönüştürülerek çift iplikli hale getirilmiş ve qRT-PCR analizlerinde kullanılmıştır. RNA örneklerinden cDNA oluşturmak için Bio-Rad iScript™ cDNA Sentez kiti kullanılmıştır. Öncelikle RNA miktarları, 1000 ng/μl RNA konsantrasyonuna denk gelecek şekilde hesaplanmış, tüm örnekler aynı oranda RNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Steril PCR tüplerine, 5x iScript reaksiyon karışımından 4 μl, iScript reverse transcriptase enziminden 1 μl eklenerek son hacim 20 μl'ye tamamlanacak şekilde RNA örnek miktarları RNase içermeyen su ile tamamlanmıştır. Thermalcycler PCR cihazına yerleştirilen RNA'lara çizelge 3.2'de verilen döngü basamakları uygulanmıştır.

Çizelge 3.2 cDNA PCR döngü basamakları

İşlem	PCR basamakları
Primer bağlanması	25°C / 5 dakika
Ters transkripsiyon	46°C / 20 dakika
RT inaktivasyonu	95°C / 1 dakika
Soğutma (Opsiyonel)	4°C / sınırsız

İfade profilleri incelenen genler ve primer tasarımı

Literatür çalışmaları sonucunda kuraklık stresi ile ilgili *HVA1*, *Dhn3*, *HvSNAC1*, *HvCBF4*, *HSP17.8* genleri belirlenmiştir (Babu vd. 2004, Checker vd. 2012, Guo vd. 2009, McGrann vd. 2015, Oh vd. 2007). Gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması için Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GADPH*) geni, referans gen (Housekeeping gen) olarak seçilmiştir (Ghani vd. 2013, Zhu vd. 2020). Belirlenen bu 5 gen ve referans gene ait primer dizilimleri çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 İfade profilleri incelenen genler ve primer dizileri

Gen Adı	GenBank ID	Primer Dizilimi	Baz Sayısı
<i>HVA1</i>	X78205.1	F: 5'-GTG TAA GTT TGC CTC CGA TTT G-3'	22
		R: 5'-CGA GTG TCC TCG TTA TCC ATT TA-3'	23
<i>Dhn3</i>	AF181453	F: 5'-CCA GCT CGG TGC GTA TAT TT-3'	20
		R: 5'-CAG TCG TTG ATG CTT TCT CAT TC-3'	23
<i>HvSNAC1</i>	JF796130	F: 5'-GGT TGA TTT GGT GCT GAT TCT G-3'	22
		R: 5'-CTC CCA CTC GTT CTT CTT GTT-3'	21
<i>HvCBF4</i>	AY785851	F: 5'-GTC GAG ACA CCA ATA CCA CTA TG-3'	23
		R: 5'-AGA GGA ACA CAA CAC AAC TAT GTA-3'	24
<i>HSP17.8</i>	AK368988	F: 5'-GCC AAG AAA CCC GAG ATC AA-3'	20
		R: 5'-CCC ATA TCC ACA CCA GCT AAA G-3'	22
<i>GADPH</i>	XM045099798	F: 5'-GTT GGC AAG GTG CTC CCA GA-3'	20
		R: 5'-GCT CAT AGG TGG CTG GCT TG-3'	20

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda (qRT-PCR) kullanılmak üzere seçilen genlere ait spesifik primerler tasarlanmıştır. Çalışmada internal kontrol olarak *GADPH* geni (GenBank ID: XM045099798.1) kullanılmıştır. Genlerin, NCBI veri tabanı aracılığıyla (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) transkriptom (CDS) verilerinden

elde edilen dizileri kullanılarak Integrated DNA Technologies (IDT), PrimerQuest Tool (<https://www.idtdna.com>) aracılığıyla primer tasarımı yapılmıştır.

qRT-PCR (Real-Time PCR) gen ifade analizi

qRT-PCR reaksiyonları için iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad) kullanılmıştır. Reaksiyon parametreleri Büyük vd. (2019) tarafından optimize edildiği şekilde uygulanmıştır (Çizelge 3.4). Hacimler her bir örnek için hazırlanmıştır. Kurulan her reaksiyon için 2 negatif kontrol tüpe eklenmiş, cDNA miktarı kadar saf su konulmuştur.

Çizelge 3.4 qRT-PCR reaksiyon bileşimi

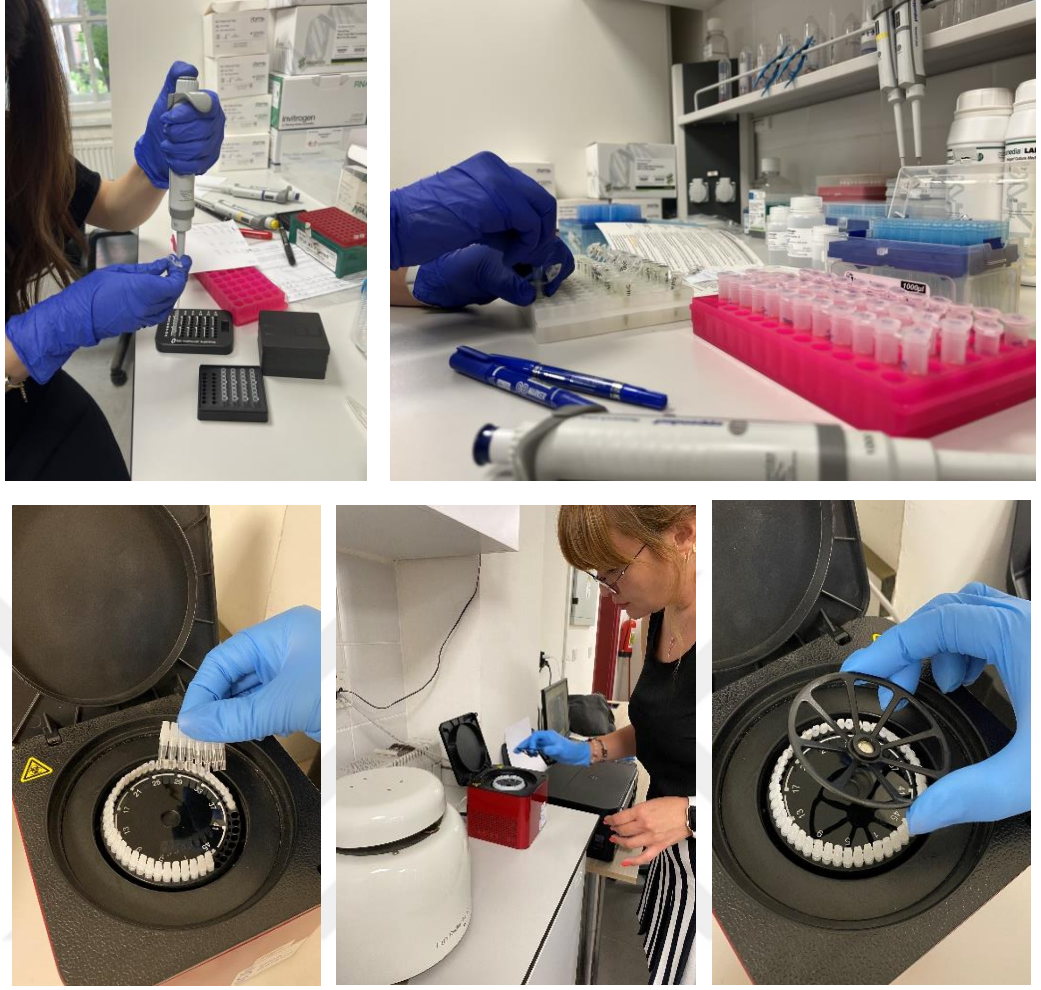
Reaktif	Hacim
2x SYBR Green Mix	5 µl
10 µM Forward Primer (İleri)	0,5 µl
10 µM Revers Primer (Geri)	0,5 µl
cDNA	1 µl
H ₂ O	3 µl

Reaksiyonlar Mic (Magnetic Induction Cycler) qRT-PCR (Biomolecular Systems) kullanılarak çizelge 3.5’de belirtilen döngü basamaklarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5 qRT-PCR aşamaları

İşlem	Sıcaklık	Döngü
Ön denatürasyon	95°C	30
Denatürasyon	95°C	15
Primer uzama/bağlama	60°C	30
Erime eğrisi analizi	60°C - 95°C	

SYBR Green reaksiyonlarının ardından istenen olası bir primer dimerinin varlığını ve reaksiyon kalitesini test etmek amacıyla Erime Eğrisi Analizi gerçekleştirilmiştir. Protokole göre 40 döngü ile reaksiyon tamamlanmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 qRT-PCR işlemleri

qRT – PCR verilerin analizi

Elde edilen qRT-PCR verilerinin analizi için, göreceli bir kantifikasyon stratejisi olarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen 2001). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GADPH*) geni referans gen olarak seçilmiş ve bağıl gen ekspresyonları belirlenmiştir. Reaksiyonda her örneğe ait floresan değerinin artışa geçtiği yani PCR ürününün artmaya başladığı eşik döngüsü olarak adlandırılan C_t (Cycle threshold/döngü eşiği) değerleri normalize edilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri, *GADPH* referans genine oranlanarak kontrol ile stres zaman periyodlarının birbiriyle karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerde ANOVA testi uygulanmış, p değerleri belirlenmiştir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

4. BULGULAR

4.1 Arpa Genotiplerinin Kuraklık Stresine Morfolojik ve Fizyolojik Tepkileri

Tarm92, Avcı2002, Misket, Sayım40 ve *Hordeum spontaneum* (HSPON (NE)-5) genotiplerine ait tohumlar saksılara ekilmiş, toprak su kapasitesi (TSK) %70 olacak şekilde iklim odasında yetiştirilmiştir. 15 günlük erken fide dönemindeki bitkilerde sulama kesilmiş ve strese tepkileri takip edilmiştir. Analizlerin zamanı toprak su kapasitesine göre belirlenmiştir. Örnek alım zamanları;

- ✓ Stres grubunda sulamanın kesildiği gün (15 günlük bitki)
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %50'ye düştüğü gün
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %30'a düştüğü gün
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %20'ye düştüğü gün
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %10'a düştüğü gün

Her grup için kuraklık indikatörü olan bazı analizler, üç tekerrürle, kontrol grubuna paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Bunlar, morfolojik ölçümlerden, fide boyu ve taze/kuru ağırlık; fizyolojik ölçümlerden yaprak bağıl su içeriği ve yaprak klorofil içeriğidir.

Fide uzunlukları cm cinsinden belirlenmiş, değerler ortalama olarak verilmiştir.

Bitkinin toprak üstünde kalan kısımlarından taze ağırlıkları hem gr olarak hem de taze ağırlık tolerans indeksi (TATI) olarak hesaplanmış, ortalamaları alınarak % cinsinden kaydedilmiştir. Bitkinin toprak üstünde kalan kısımlarından kuru ağırlıkları hem gr olarak hem de kuru ağırlık tolerans indeksi (KATI) olarak hesaplanmış, ortalamaları alınarak % cinsinden kaydedilmiştir.

Yaprak bağıl su içeriği analizi (Leaf Relative Water Content, LRWC) için, gelişmiş 2. yaprak kullanılmış, ölçümler gr cinsinden kaydedilmiştir. Sonuçlar formülüze edilerek ortalamaları alınmış % cinsinden kaydedilmiştir (BSİ).

Yaprak klorofil içeriği, yaprağın 3 farklı noktasından klorofilmetre (SPAD) kullanılarak ölçülmüş, ortalaması alınmıştır. Sonuçlar çizelge 4.1. de gösterilmiştir.

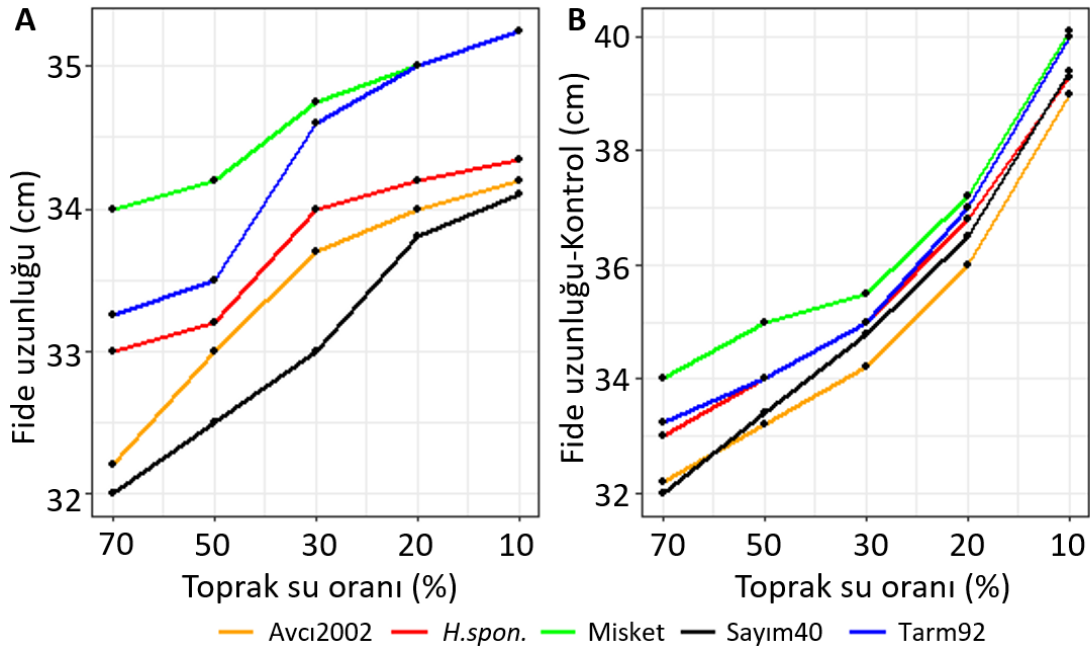
Çizelge 4.1 Stres grubu morfolojik ve fizyolojik ölçümler

Adı	TSK	Fide Uzunluğu	Taze Ağırlık	TATI (%)	Kuru Ağırlık	KATI (%)	BSİ (%)	SPAD
<i>H.spontaneum</i>	%70	33 cm	0,52 gr	100	0,065 gr	100	%86,69	41,85
Avcı2002		32,2 cm	0,532 gr	100	0,074 gr	100	%82,78	36,14
Tarm92		33,25 cm	0,604 gr	100	0,081 gr	100	%90,10	44,89
Misket		32 cm	0,702 gr	100	0,105 gr	100	%91,12	46,55
Sayım40		34 cm	0,653 gr	100	0,087 gr	100	%90,75	43,17
<i>H.spontaneum</i>	%50	33,2 cm	0,537 gr	95,81	0,071 gr	92,20	%87,40	40,17
Avcı2002		33 cm	0,54 gr	93,10	0,076 gr	95	%83,65	36,57
Tarm92		33,5 cm	0,69 gr	100,4	0,088 gr	97,77	%89,01	44,78
Misket		32,5 cm	0,725 gr	101,1	0,109 gr	110,1	%91,04	45,96
Sayım40		34,2 cm	0,697 gr	99,42	0,089 gr	97,80	%87,21	43,13
<i>H.spontaneum</i>	%30	34 cm	0,604 gr	94,15	0,084 gr	96,55	%62,63	39,75
Avcı2002		33,7 cm	0,61 gr	80,15	0,098 gr	96,07	%50,76	32,14
Tarm92		34,6 cm	0,876 gr	97,98	0,138 gr	96,50	%60,37	39,98
Misket		33 cm	0,801 gr	94,23	0,133 gr	97,08	%57,16	40,12
Sayım40		34,75 cm	0,763 gr	94,37	0,129 gr	96,26	%56,00	38,98
<i>H.spontaneum</i>	%20	34,2 cm	0,301 gr	38,39	0,044 gr	32,83	%20,15	35,89
Avcı2002		34 cm	0,238 gr	28,29	0,048 gr	34,78	%14,81	20,85
Tarm92		35 cm	0,358 gr	39,73	0,091 gr	49,72	%18,91	32,12
Misket		33,8 cm	0,31 gr	33,95	0,085 gr	44,27	%18,79	31,11
Sayım40		35 cm	0,293 gr	33,52	0,08 gr	42,32	%18,65	30,54
<i>H.spontaneum</i>	%10	34,35 cm	0,154 gr	17,99	0,022 gr	15,49	%15,63	23,453
Avcı2002		34,2 cm	0,148 gr	16,55	0,018 gr	12,32	%8,648	11,721
Tarm92		35,25 cm	0,2595 gr	27,51	0,047 gr	24,73	%12,31	17,451
Misket		34,1 cm	0,1745 gr	18,62	0,04 gr	20,51	%11,45	16,861
Sayım40		35,25 cm	0,2035 gr	21,90	0,043 gr	22,16	%11,50	15,957

Morfolojik ve fizyolojik ölçümlerin grafikleri R (version 4.2.3) (R Core Team, 2021) ve RStudio (version 2023.06.1+524) (RStudio Team, 2020) programları kullanılarak yapılmıştır. 5 genotip farklı örneklem zamanlarıyla aynı grafikte değerlendirilmiş, yine aynı grafik ile kontrol gruplarıyla kıyaslanmıştır. Şekillerde gösterilmiştir. Ayrıca morfolojik ve fizyolojik ölçümlerin, kontrol ve stres uygulanan arpa genotiplerindeki farklılığın anlamlı olup olmadığını bulmak amacıyla R istatistik programı kullanılarak t-test yapılmıştır, çizelgelerde gösterilmiştir.

4.1.1 Fide uzunlukları

Kuraklık stresinin etkili olduğu, toprak su kapasitesinin %20 olduğu zamandaki bitki boyları kontrol grubuyla değerlendirildiğinde, Sayım40 çeşidinin fide boyunun 34,1 cm, kontrol grubunun 39.4 cm; Avcı2002 çeşidinin fide boyunun 34.2 cm, kontrol grubunun 39 cm; yabani form olan *H. spontaneum* genotipinin fide boyunun 34,35 cm, kontrol grubunun 39,3 m; Tarm92 ve Misket çeşitlerinin fide boyunun 35.25 cm, kontrol gruplarının 40 ve 40.1 cm olduğu kaydedilmiştir. Kontrol ve stres gruplarının fide boyları değerlendirildiğinde, stres grubunda büyümenin azaldığı, kuraklıktan etkilendiği kaydedilmiştir. (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Stres (A) ve kontrol (B) grubu fide uzunlukları

Toprak su kapasitesi %50 ve %30'a düştüğü zaman kontrol ve stres gruplarındaki bitki boyu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bir fark bulunmazken; toprak su kapasitesi %20 ve %10'a düştüğünde farklılığın anlamlı olduğu ($p < 0.05$) bulunmuştur. Fide uzunluklarının, stres altındaki genotiplerle kontrol gruplarının karşılaştırılması çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Fide uzunlukları kontrol/stres grubu karşılaştırılması

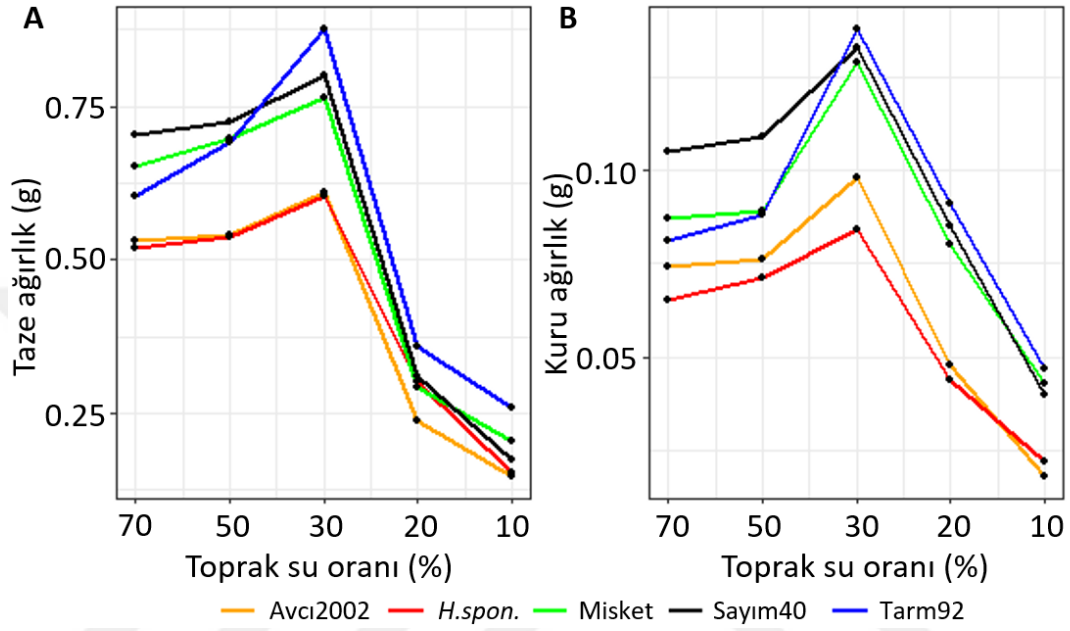
Adı	TSK	Grup1	Grup2	İstatistik (t-değeri)	Sd	p değeri	Anlamlılık derecesi
<i>H.spontaneum</i>	%50	Stres	Kontrol	-2.57307	2.624025	0.471	ns
	%30			-2.44949	4	0.3525	ns
	%20			-15.92168	4	0.000455	***
	%10			-18.59886	3.908575	0.0002915	***
Avcı2002	%50	Stres	Kontrol	-0.6432675	2.624025	1	ns
	%30			-3.0618622	4	0.188	ns
	%20			-4.8989795	4	0.04025	*
	%10			-15.438421	2.624025	0.006	**
Tarm92	%50	Stres	Kontrol	-1.2247449	4	1	ns
	%30			-1.0820036	3.816118	1	ns
	%20			-6.1967734	2.941176	0.04485	*
	%10			-14.717337	2.941176	0.00378	**
Misket	%50	Stres	Kontrol	-2.167724	3.310657	0.55	ns
	%30			-2.32379	2.941176	0.52	ns
	%20			-5.82716	3.740933	0.02655	*
	%10			-14.406647	3.274788	0.002245	**
Sayım40	%50	Stres	Kontrol	-2.434508	3.816118	0.3735	ns
	%30			-5.346797	3.274788	0.051	ns
	%20			-8.684112	2.624025	0.02645	*
	%10			-14.336547	3.816118	0.000925	***

*p< 0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir
TSK: Toprak su kapasitesi, sd: Serbestlik derecesi

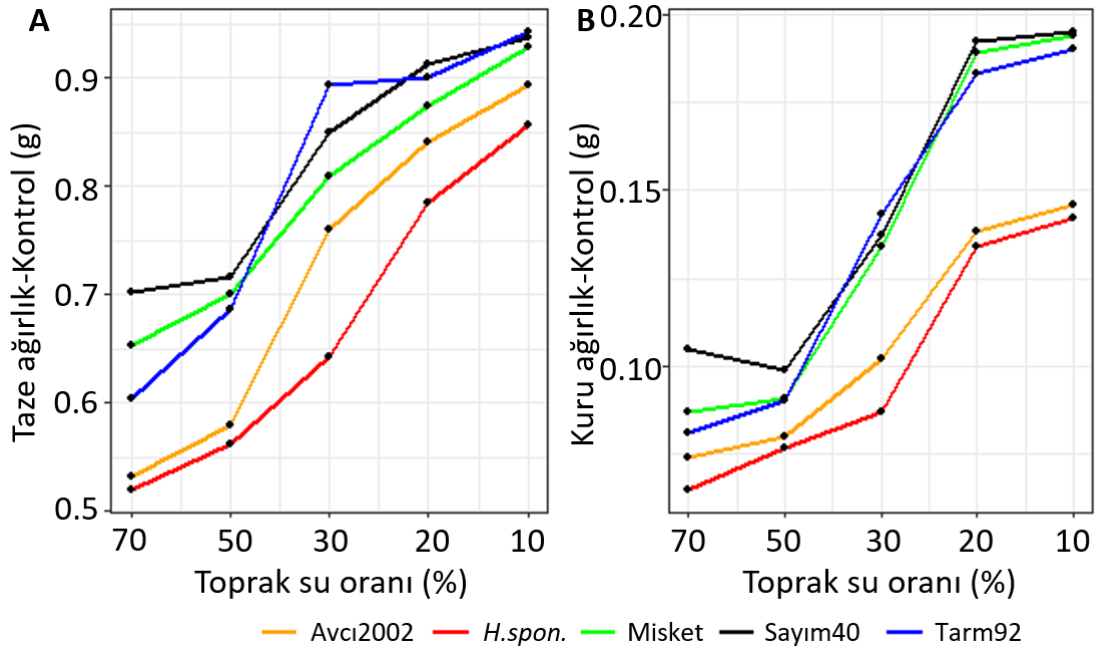
4.1.2 Taze ve kuru ağırlıkları

Taze ve kuru ağırlık ölçümleri gr ve % cinsinden grafikleri oluşturulmuş, Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4. de belirtilmiştir. Kuraklık stresinin etkili olduğu, toprak su kapasitesinin %20 olduğu zamandaki taze ağırlıkları değerlendirildiğinde, stres grubunda en yüksek oran Tarm92 çeşidinde 0,358 gr, aynı dönem kontrol grubundaki ölçümlerde ise Tarm92 çeşidinde 901 gr, Sayım40 çeşidinde 0,913 gr olarak ölçülmüştür. Avcı2002 çeşidi stres grubunda 0.238 gr ile en düşük oranı verirken, kontrol grubunda 0.784 gr ile *H. spontaneum* genotipi en düşük değeri; 0,841 gr ile de Avcı2002 çeşidi ikinci en düşük değeri vermiştir. Toprak su kapasitesi %10 olduğu stres gruplarında Tarm92 çeşidi 0,259 gr ile diğer genotipler arasında en yüksek taze ağırlık oranını verirken, kontrol grubunda

da 0,943 gr ile en yüksek oranı vermiştir. En düşük taze ağırlık 0,148 gr ile Avcı2002 çeşidinde, 2. en düşük oran 0,154 gr ile *H. spontaneum* genotipinde kaydedilmiştir. Stres grubunda birbirlerine yakın değer veren bu iki genotip kontrol grubunda da birbirlerine yakın değerler vermiştir (*H. spontaneum*: 0,856 gr; Avcı: 0,894 gr) (Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4.2 Stres grubu taze (A) ve kuru (B) ağırlıkları



Şekil 4.3 Kontrol grubu taze (A) ve kuru (B) ağırlıkları

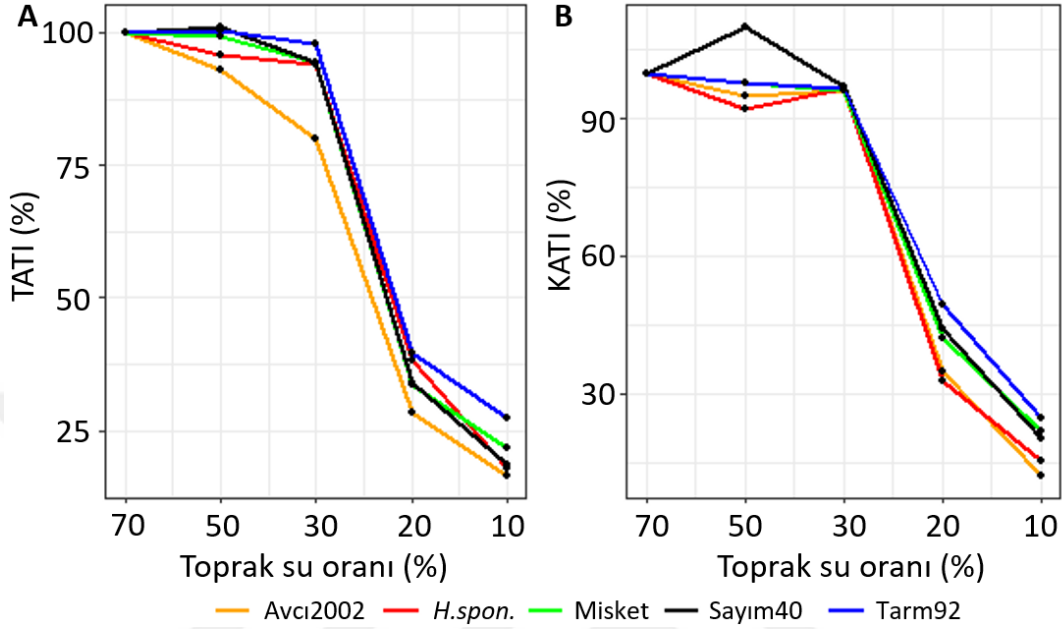
Kuraklık stresinin etkili olduğu, toprak su kapasitesinin %20 olduğu zamandaki kuru ağırlıkları değ erlendirildiğinde, stres grubunda en yüksek oran Tarm92 çeş idinde 0,091 gr, aynı dönem kontrol grubundaki ölçümlerde ise Tarm92 çeş idi 0,183 gr olarak ölçülmüştür. *H. spontaneum* genotipi stres grubunda 0.044 gr ile en düşük oranı verirken, 0,048 gr ile Avcı2002 çeş idi, *H. spontaneum* genotipine yakın bir değ er vermiştir. Kontrol gruplarında da *H. spontaneum* genotipi 0,134 gr ile en düşük, Avcı2002 çeş idi 0,138 gr ile ikinci en düşük değ eri vermiştir. Toprak su kapasitesi %10 olduğu stres gruplarında Tarm92 çeş idi 0,047 gr ile diğ er genotipler arasında en yüksek kuru ağırlık oranını verirken, kontrol grubunda 0,195 gr ile Sayım40 çeş idi en yüksek değ eri, Misket çeş idi 0,194 gr ile ikinci en yüksek değ eri vermiştir. Yine kontrol gruplarında Tarm92 çeş idi 0,190 gr ile Misket çeş idinden sonra en yüksek değ er olarak kaydedilmiştir. Stres grubunda en düşük değ eri 0,018 gr ile Avcı2002 çeş idi, 0.022 gr ile *H. spontaneum* genotipi vermiştir. Kontrol gruplarında Avcı2002 çeş idi 0,146 gr, *H. spontaneum* genotipi 0,142 gr olarak ölçülmüştür (Ş ekil 4.2, Ş ekil 4.3).

Taze ağırlık toleransı (TATI) ve kuru ağırlık tolerans indeksi (KATI) formüle göre hesaplanmıştır.

Kuraklık stresinin etkili olduğu, toprak su kapasitesinin %20 olduğu zamandaki yüzdelere baktığımızda, TATI Tarm92 çeş idinin %39,73 ile en yüksek, Avcı2002 çeş idinin %28,29 ile en düşük değ eri verdiğ i hesaplanmıştır. *H. spontaneum* genotipinin %38,39 ile Tarm92 çeş idinden sonra 2. en yüksek yüzdeyi verdiğ i bulunmuştur. Sayım40 ve Misket çeş itleri için sırasıyla %33,95 ve %33,52 ile birbirlerine yakın değ erler kaydedilmiştir. Kuraklığın etkili olduğu %10 toprak su kapasitesindeki değ erlerde, Tarm92 çeş idi yine %27,51 ile en yüksek değ eri verirken; Avcı2002 çeş idi %16,55 ile en düşük değ eri vermiştir. *H. spontaneum* genotipinin kuraklıkla beraber taze ağırlık toleransı düş erek %17,99 ile Avcı2002 çeş idinden sonra en düşük değ eri verdiğ i gözlenmiştir (Ş ekil 4.4).

KATI oranlarına baktığımızda Tarm92 çeş idinin %20 ve %10 toprak su kapasitesinde sırasıyla %49,72 ve %24,73 ile en yüksek değ eri verdiğ i, Sayım40 ve Misket çeş itlerinin, Tarm92 çeş idine yakın olduğu ölçülmüştür. En düşük yüzdeyi ise, toprak su kapasitesinin

%20 olduğu zamanda %32,83 ile *H. spontaneum* genotipi, %10 olduğu zamanda ise %12,32 ile Avcı2002 çeşidinin verdiği bulunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Stres ve kontrol grubu TATI (A) ve KATI (B) oranları

Toprak su kapasitesi %50 ve %30'a düştüğü zaman kontrol ve stres gruplarındaki taze ağırlık ve kuru ağırlık ölçümleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bir fark bulunmazken; %20 ve %10'a düştüğünde farklılığın anlamlı olduğu ($p < 0.05$) bulunmuştur. Taze ağırlıkların, stres altındaki genotiplerle kontrol gruplarının karşılaştırılması çizelge 4.3'de; kuru ağırlıkların, stres altındaki genotiplerle kontrol gruplarının karşılaştırılması çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Taze ağırlık kontrol/stres grubu karşılaştırılması

Adı	TSK	Grup1	Grup2	İstatistik (t-değeri)	Sd	p değeri	Anlamlılık derecesi
<i>H.spontanum</i>	%50	Stres	Kontrol	-2.57307	2.624025	0.471	ns
	%30			-2.44949	4	0.3525	ns
	%20			-15.92168	4	0.000455	***
	%10			-18.59886	3.908575	0.0002915	***
Avcı2002	%50	Stres	Kontrol	-0.6432675	2.624025	1	ns
	%30			-3.0618622	4	0.188	ns
	%20			-4.8989795	4	0.04025	*
	%10			-15.438421	2.624025	0.006	**
Tarm92	%50	Stres	Kontrol	-1.2247449	4	1	ns
	%30			-1.0820036	3.816118	1	ns
	%20			-6.1967734	2.941176	0.04485	*
	%10			-14.717337	2.941176	0.00378	**
Misket	%50	Stres	Kontrol	-2.167724	3.310657	0.55	ns
	%30			-2.32379	2.941176	0.52	ns
	%20			-5.82716	3.740933	0.02655	*
	%10			-14.406647	3.274788	0.002245	**
Sayım40	%50	Stres	Kontrol	-2.434508	3.816118	0.3735	ns
	%30			-5.346797	3.274788	0.051	ns
	%20			-8.684112	2.624025	0.02645	*
	%10			-14.336547	3.816118	0.000925	***

*p< 0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir
TSK: Toprak su kapasitesi, sd: Serbestlik derecesi

Çizelge 4.4 Kuru ağırlık kontrol/stres grubu karşılaştırılması

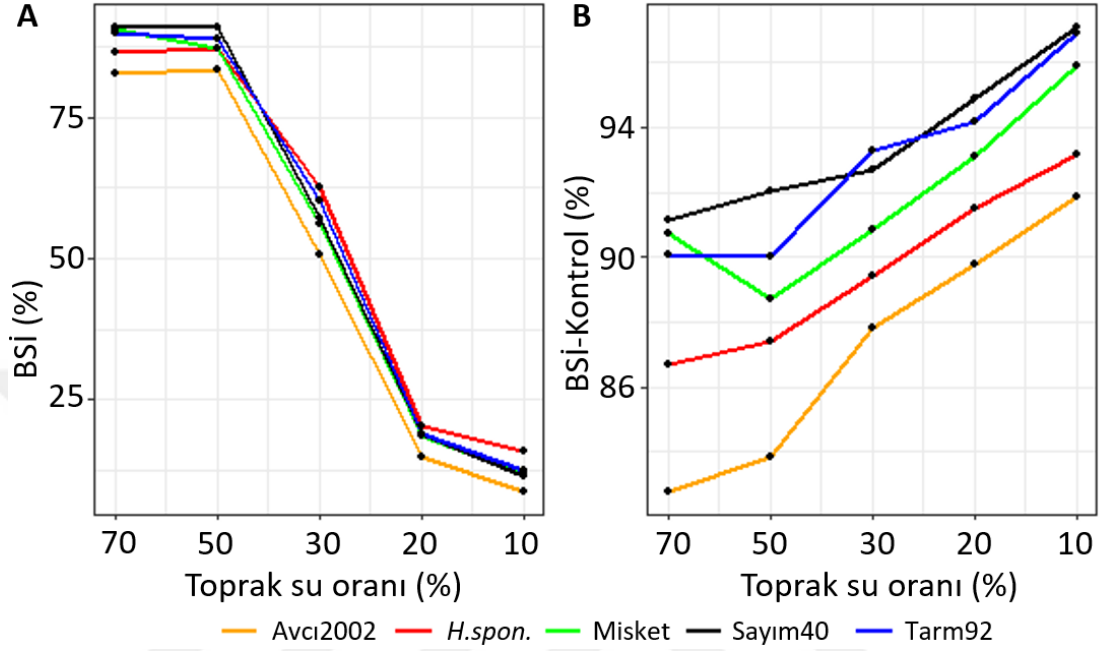
Adı	TSK	Grup1	Grup2	İstatistik (t-değeri)	Sd	p değeri	Anlamlılık derecesi
<i>H.spontaneum</i>	%50	Stres	Kontrol	-2.57307	2.624025	0.471	ns
	%30			-2.44949	4	0.3525	ns
	%20			-15.92168	4	0.000455	***
	%10			-18.59886	3.908575	0.0002915	***
Avcı2002	%50	Stres	Kontrol	-0.6432675	2.624025	1	ns
	%30			-3.0618622	4	0.188	ns
	%20			-4.8989795	4	0.04025	*
	%10			-15.438421	2.624025	0.006	**
Tarm92	%50	Stres	Kontrol	-1.2247449	4	1	ns
	%30			-1.0820036	3.816118	1	ns
	%20			-6.1967734	2.941176	0.04485	*
	%10			-14.717337	2.941176	0.00378	**
Misket	%50	Stres	Kontrol	-2.167724	3.310657	0.55	ns
	%30			-2.32379	2.941176	0.52	ns
	%20			-5.82716	3.740933	0.02655	*
	%10			-14.406647	3.274788	0.002245	**
Sayım40	%50	Stres	Kontrol	-2.434508	3.816118	0.3735	ns
	%30			-5.346797	3.274788	0.051	ns
	%20			-8.684112	2.624025	0.02645	*
	%10			-14.336547	3.816118	0.000925	***

*p< 0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir
TSK: Toprak su kapasitesi, sd: Serbestlik derecesi

4.1.3 Yaprak bağıl su içeriği

Kuraklık stresinin etkili olduğu, toprak su kapasitesinin %20 olduğu zamandaki yaprak bağıl su oranı (LRWC), formüle göre hesaplanmış ve % olarak değerler kaydedilmiştir. Buna göre, en yüksek oran *H. spontaneum* %20,15, kontrol grubu %91,49 olarak ölçülmüşken; Avcı2002 çeşidi %14,81, kontrol grubu %89,78 olarak en düşük oran olarak kaydedilmiştir. Stres grupları Tarm92 çeşidi %18,91, Sayım40 çeşidi %18,79 ve Misket çeşidi %18,65 olarak birbirine yakın değerler vermiştir. Kontrol grupları ise sırasıyla %94,18, %94,89 ve %93,12 olarak ölçülmüştür. Kuraklığa hassas olarak teze alınan Avcı2002 çeşidi, kontrol ve stres gruplarının her birinde en düşük değeri vermiştir. Tarm92 çeşidi kontrol gruplarında diğer genotiplere göre en yüksek oranı verirken, toprak

su kapasitesi %30, %20 ve %10'a düştüğünde *H. spontaneum* sırasıyla %62,63, %20,15 ve %15,63 değerleri ile stres grubunda diğer genotiplerden daha yüksek değer vermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Stres (A) ve kontrol (B) grubu yaprak bağıl su içeriği (BSİ)

Toprak su kapasitesi %50 ve %30'a düştüğü zaman kontrol ve stres gruplarındaki yaprak bağıl su içeriği ölçümleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bir fark bulunmazken; %20 ve %10'a düştüğünde farklılığın anlamlı olduğu ($p < 0.05$) bulunmuştur. Yaprak bağıl su içeriğinin stres altındaki genotiplerle kontrol gruplarının karşılaştırılması çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Yaprak bağıl su içeriğinin kontrol/stres grubu karşılaştırılması

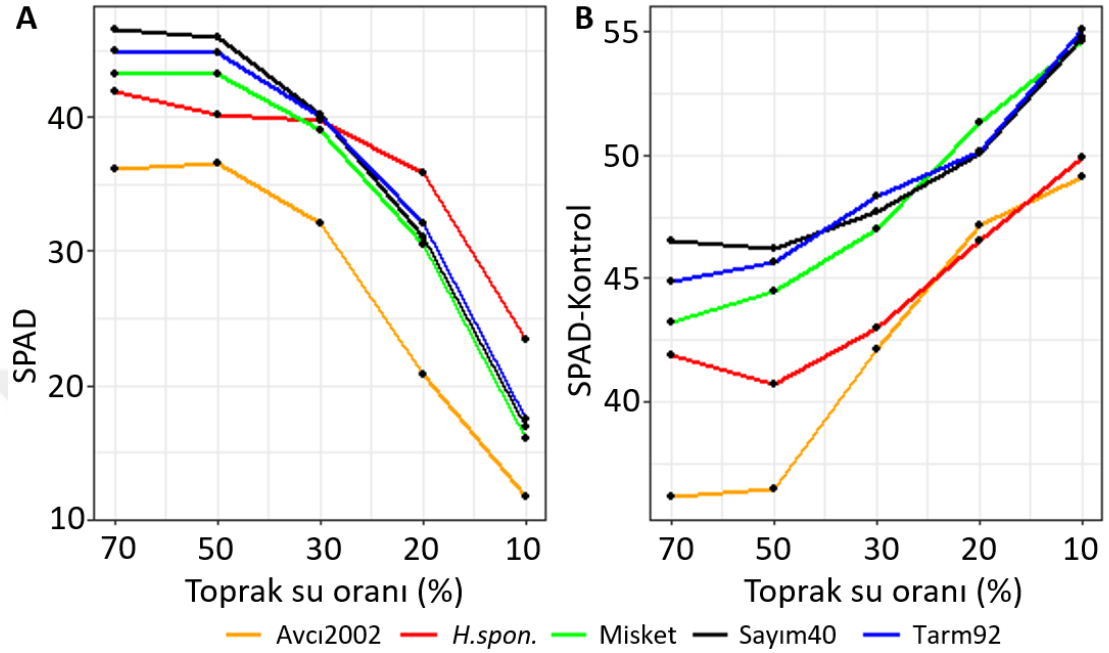
Adı	TSK	Grup1	Grup2	İstatistik (t-değeri)	Sd	p değeri	Anlamlılık derecesi
<i>H.spontaneum</i>	%50	Stres	Kontrol	-2.57307	2.624025	0.471	ns
	%30			-2.44949	4	0.3525	ns
	%20			-15.92168	4	0.000455	***
	%10			-18.59886	3.908575	0.0002915	***
Avcı2002	%50	Stres	Kontrol	-0.6432675	2.624025	1	ns
	%30			-3.0618622	4	0.188	ns
	%20			-4.8989795	4	0.04025	*
	%10			-15.438421	2.624025	0.006	**
Tarm92	%50	Stres	Kontrol	-1.2247449	4	1	ns
	%30			-1.0820036	3.816118	1	ns
	%20			-6.1967734	2.941176	0.04485	*
	%10			-14.717337	2.941176	0.00378	**
Misket	%50	Stres	Kontrol	-2.167724	3.310657	0.55	ns
	%30			-2.32379	2.941176	0.52	ns
	%20			-5.82716	3.740933	0.02655	*
	%10			-14.406647	3.274788	0.002245	**
Sayım40	%50	Stres	Kontrol	-2.434508	3.816118	0.3735	ns
	%30			-5.346797	3.274788	0.051	ns
	%20			-8.684112	2.624025	0.02645	*
	%10			-14.336547	3.816118	0.000925	***

*p< 0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir
TSK: Toprak su kapasitesi, sd: Serbestlik derecesi

4.1.4 Yaprak klorofil içeriği

Kuraklık stresinin etkili olduğu, toprak su kapasitesinin %20 olduğu zamandaki yaprak klorofil içeriği değerlendirildiğinde, stres grubunda en yüksek oran *H. spontaneum* 35,89, kontrol grubunun 46,54 olarak ölçülmüşken; stres grubunda en düşük oran Avcı2002 çeşidi 20,85, kontrol grubu 47,12 olarak kaydedilmiştir. Stres grupları Tarm92 çeşidi 32,12, Sayım40 çeşidi 31,11 ve Misket çeşidi 30,54 olarak birbirine yakın değerler vermiştir. Kontrol grupları ise sırasıyla 50,12, 50,03 ve 51,30 olarak ölçülmüştür. Toprak su kapasitesinin %10 olduğu zamandaki yaprak klorofil içeriği %20 toprak su içeriğinde ölçüldüğü gibi en yüksek *H. spontaneum* genotipi 23,45; en düşük Avcı2002 çeşidi 11,72 olarak ölçülmüştür. Kuraklığa hassas olarak teze alınan Avcı2002 çeşidi, yaprak klorofil

içeriği ölçümlerinde stres gruplarında en düşük değeri vermiştir. *H. spontaneum* genotipi ise, stres grubunda diğer genotiplerden daha yüksek yaprak klorofil içeriği ile kaydedilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Stres (A) ve kontrol (B) grubu yaprak klorofil içeriği

Toprak su kapasitesi %50 ve %30'a düştüğü zaman kontrol ve stres gruplarındaki yaprak klorofil içeriği ölçümleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bir fark bulunmazken; %20 ve %10'a düştüğünde farklılığın anlamlı olduğu ($p < 0.05$) bulunmuştur. Yaprak klorofil içeriğinin stres altındaki genotiplerle kontrol gruplarının karşılaştırılması çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 Yaprak klorofil içeriğinin kontrol/stres grubu karşılaştırılması

Adı	TSK	Grup1	Grup2	İstatistik (t-değeri)	Sd	p değeri	Anlamlılık derecesi
<i>H.spontaneum</i>	%50	Stres	Kontrol	-2.57307	2.624025	0.471	ns
	%30			-2.44949	4	0.3525	ns
	%20			-15.92168	4	0.000455	***
	%10			-18.59886	3.908575	0.0002915	***
Avcı2002	%50	Stres	Kontrol	-0.6432675	2.624025	1	ns
	%30			-3.0618622	4	0.188	
	%20			-4.8989795	4	0.04025	
	%10			-15.438421	2.624025	0.006	**
Tarm92	%50	Stres	Kontrol	-1.2247449	4	1	ns
	%30			-1.0820036	3.816118	1	ns
	%20			-6.1967734	2.941176	0.04485	*
	%10			-14.717337	2.941176	0.00378	**
Misket	%50	Stres	Kontrol	-2.167724	3.310657	0.55	ns
	%30			-2.32379	2.941176	0.52	ns
	%20			-5.82716	3.740933	0.02655	*
	%10			-14.406647	3.274788	0.002245	**
Sayım40	%50	Stres	Kontrol	-2.434508	3.816118	0.3735	ns
	%30			-5.346797	3.274788	0.051	ns
	%20			-8.684112	2.624025	0.02645	*
	%10			-14.336547	3.816118	0.000925	***

*p< 0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir
TSK: Toprak su kapasitesi, sd: Serbestlik derecesi

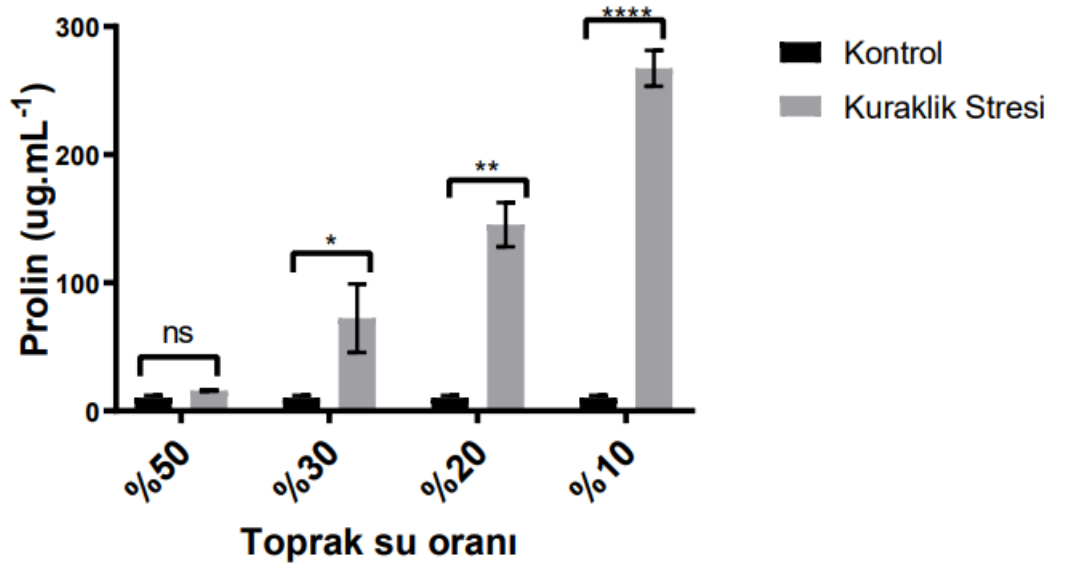
4.2 Arpa Genotiplerinin Kuraklık Stresi Altında Prolin İçeriği

Kuraklık stresi uygulanan 5 farklı arpa genotipinde serbest prolin içeriği ölçülmüştür. Elde edilen verilerin, istatistik analizi Graphpad Prism 9.0.0.121 yazılımı ile Multiple t-testi uygulanarak grafikler oluşturulmuştur. İstatistiksel analizlerde ANOVA testi uygulanmış, p değerleri belirlenmiştir (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

Analizlerin zamanı toprak su kapasitesine göre belirlenmiştir. Örnek alım zamanları;

- ✓ Stres grubunda sulamanın kesildiği gün (15 günlük bitki)
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %50'ye düştüğü gün
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %30'a düştüğü gün
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %20'ye düştüğü gün
- ✓ Stres grubunda toprak su kapasitesinin %10'a düştüğü gün

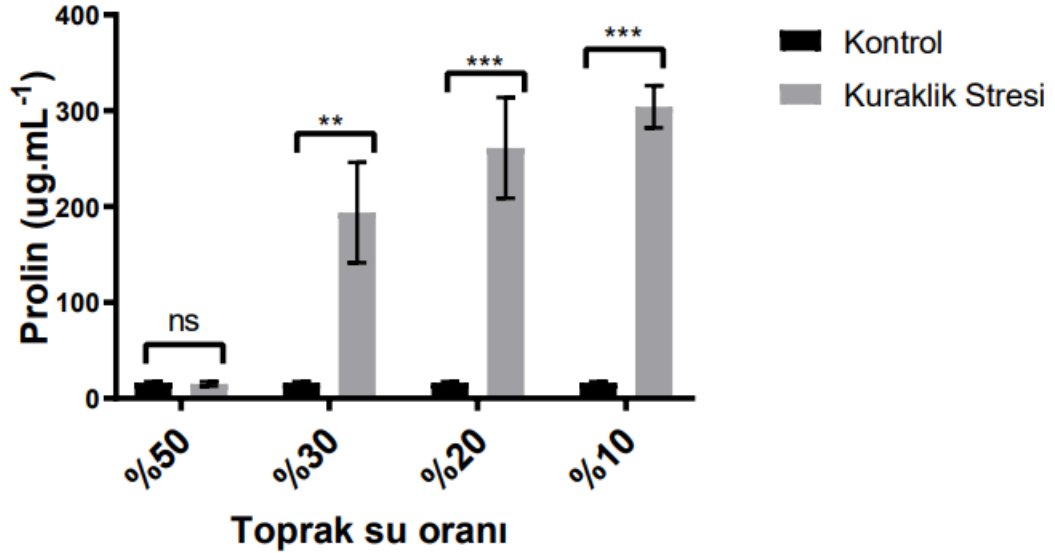
Hordeum spontaneum yabani formunun, kuraklığın farklı günlerinde ölçülmüş prolin seviyeleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Kontrol grupları ile kıyaslandığında, kuraklık stresiyle beraber değerlerde kademeli bir artış gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %20 altına düştüğünde 145,28 değeri ($p<0.01$); toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zamanda ise 267,35 ile en yüksek değerini ($p<0.0001$) vermiştir.



Şekil 4.7 Kuraklık stresi koşullarında *H. spontaneum* genotipi prolin seviyeleri

(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

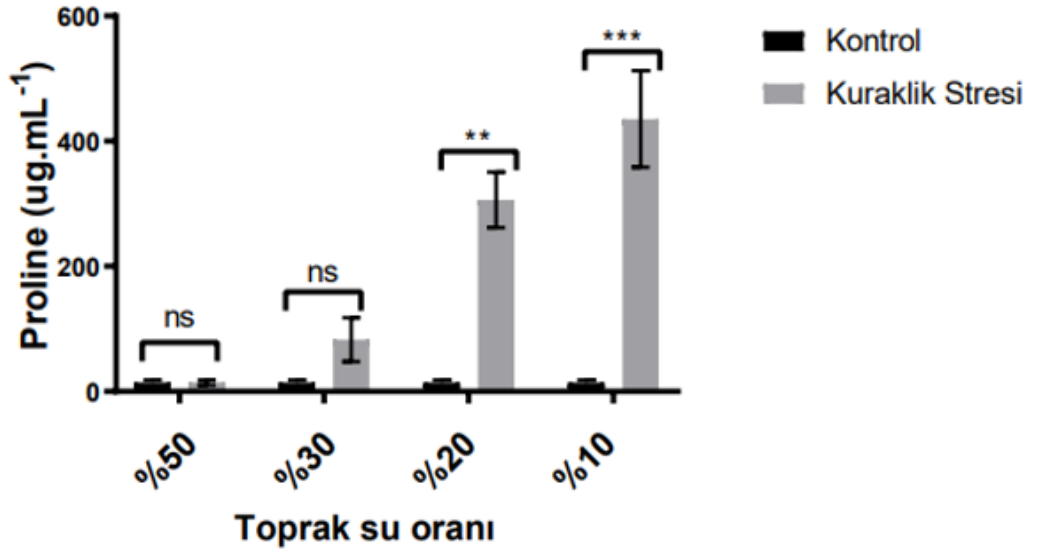
Avcı2002 çeşidinin, kuraklığın farklı günlerinde ölçülmüş prolin seviyeleri Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Kontrol grupları ile kıyaslandığında, kuraklık stresiyle beraber değerlerde kademeli bir artış gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %20 altına düştüğünde 227,55 değeri ($p<0.001$); toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zamanda ise 304,14 ile en yüksek değerini ($p<0.001$) vermiştir.



Şekil 4.8 Kuraklık stresi koşullarında Avcı2002 çeşidi prolin seviyeleri

(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

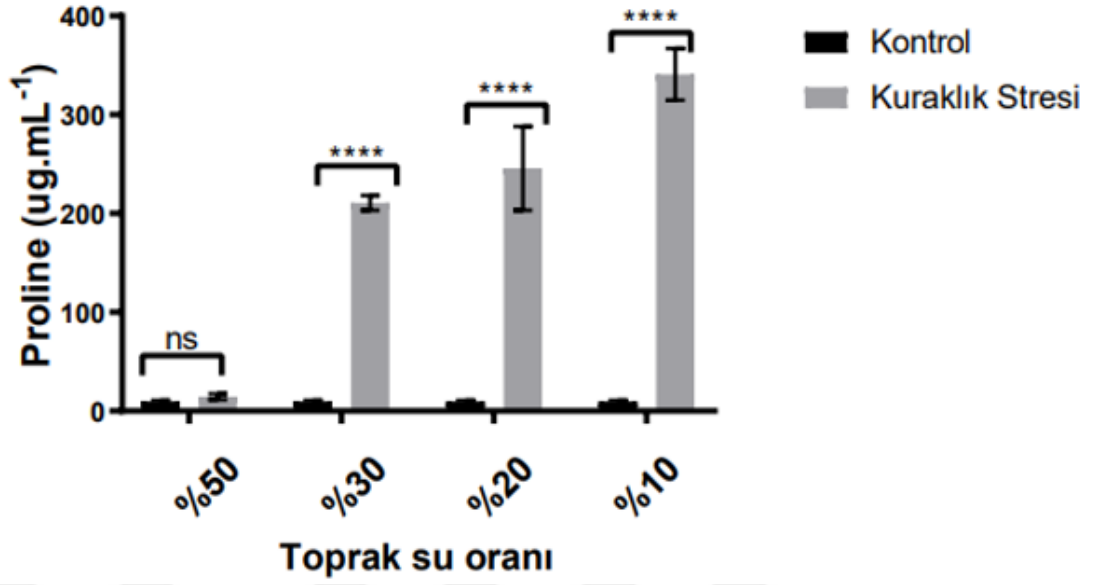
Tarm92 çeşidinin, kuraklığın farklı günlerinde ölçülmüş prolin seviyeleri Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Kontrol grupları ile kıyaslandığında, kuraklık stresiyle beraber değerlerde kademeli bir artış gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %20 altına düştüğünde 306,43 değeri ($p<0.01$); toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zamanda ise 435,36 ile en yüksek değerini ($p<0.001$) vermiştir.



Şekil 4.9 Kuraklık stresi koşullarında Tarm92 çeşidi prolin seviyeleri

(*p< 0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

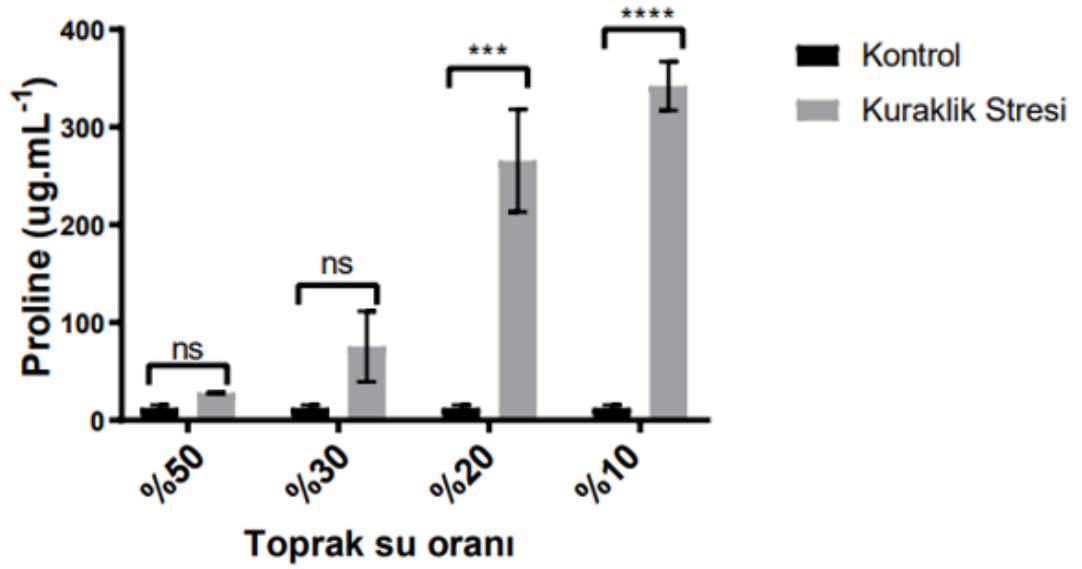
Sayım40 çeşidinin, kuraklığın farklı günlerinde ölçülmüş prolin seviyeleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Kontrol grupları ile kıyaslandığında, kuraklık stresiyle beraber değerlerde kademeli bir artış gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %30 altına düştüğünde 130,77 değerini (p<0.0001), %20 altına düştüğünde 301,59 değerini (p<0.0001), %10 altına düştüğü zamanda ise 335,11 ile en yüksek değerini (p<0.0001) vermiştir.



Şekil 4.10 Kuraklık stresi koşullarında Sayım40 çeşidi prolin seviyeleri

(*p< 0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

Misket çeşidinin, kuraklığın farklı günlerinde ölçülmüş prolin seviyeleri Şekil 4.11’da gösterilmiştir. Kontrol grupları ile kıyaslandığında, kuraklık stresiyle beraber değerlerde kademeli bir artış gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %20 altına düştüğünde 265,65 değeri (p<0.001); toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zamanda ise 342,30 ile en yüksek değerini (p<0.0001) vermiştir.



Şekil 4.11 Kuraklık stresi koşullarında Misket çeşidi prolin seviyeleri

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

4.3 Belirlenen Genlerin qRT-PCR Yöntemi İle İfade Profillerinin İncelenmesi

4.3.1 Total RNA izolasyonu

Tarm92, Avcı2002, Misket, Sayım40 çeşitlerinden ve *Hordeum spontaneum* (HSPON (NE)-5) yabani formundan elde edilen RNA miktarları nanodrop ile ölçülmüştür. Sonuçlar çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Kit protokolü ile elde edilen RNA miktar ve kaliteleri

Genotip	Örnek alım zamanı	ng/μL	260/280	Genotip	Örnek alım zamanı	ng/μL	260/280
<i>H.spontaneum</i>	%70	1710	1,93	Avc2002	%70	1720,1	1,93
	%70	1622	1,93		%70	1806	1,94
	%50	1737	1,94		%50	1700,4	1,93
	%50	1621,1	1,92		%50	1681,2	1,93
	%30	2746,9	1,93		%30	1701,7	1,93
	%30	1573,7	1,92		%30	1885,1	1,94
	%20	1518,3	1,91		%20	1683	1,92
	%20	1548,4	1,91		%20	1514,3	1,91
	%10	1632	1,93		%10	2038	1,95
	%10	1843,6	1,94		%10	1779	1,94
Tarn92	%70	1647	1,93	Anka09 (Sayım)	%70	1858	1,94
	%70	1531	1,93		%70	1734	1,94
	%50	1824,3	1,94		%50	1394,4	1,92
	%50	1771,9	1,94		%50	1720,2	1,93
	%30	1022	1,85		%30	1114	1,82
	%30	740	1,78		%30	995	1,84
	%20	1780	1,93		%20	2221,3	1,89
	%20	1933	1,94		%20	1795,4	1,93
	%10	2004,6	1,93		%10	1909,1	1,94
	%10	1763,6	1,94		%10	1432,3	1,88
Anka10 (Misket)	%70	1807	1,94				
	%70	1840,3	1,94				
	%50	1763,1	1,94				
	%50	1746,4	1,94				
	%30	1824	1,90				
	%30	2358,3	1,93				
	%20	2014,7	1,95				
	%20	1688	1,93				
	%10	1618,8	1,91				
	%10	1992,9	1,92				

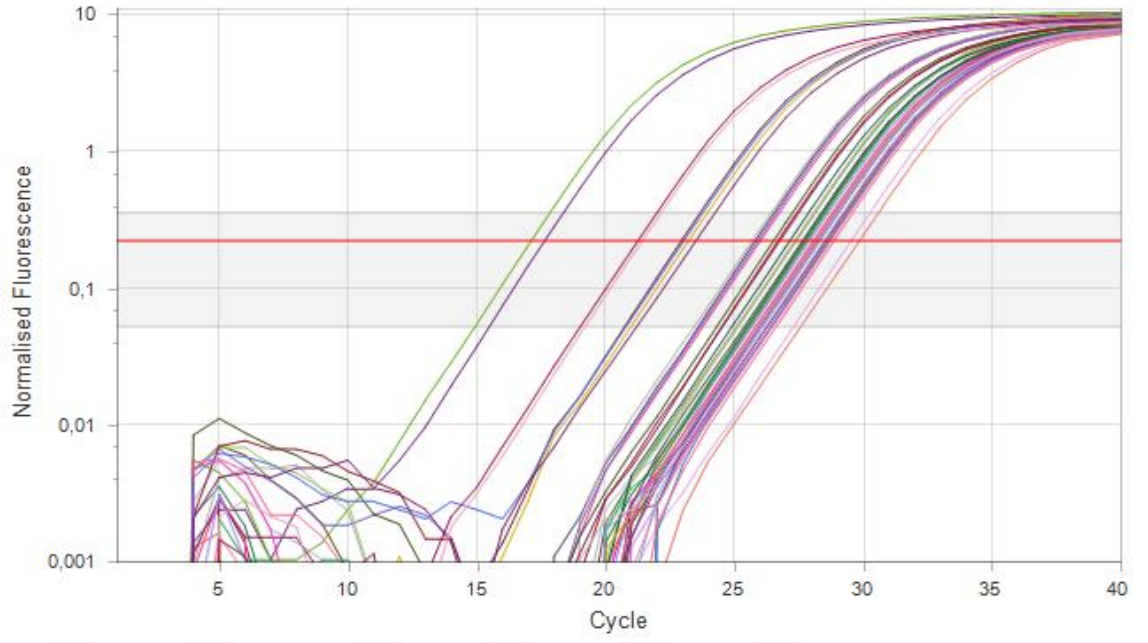
İzole edilen RNA'lar kit kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA miktarları nanodrop ile ölçülmüştür. Sonuçlar çizelge 4.8. de verilmiştir.

Çizelge 4.8 cDNA miktar ve kaliteleri

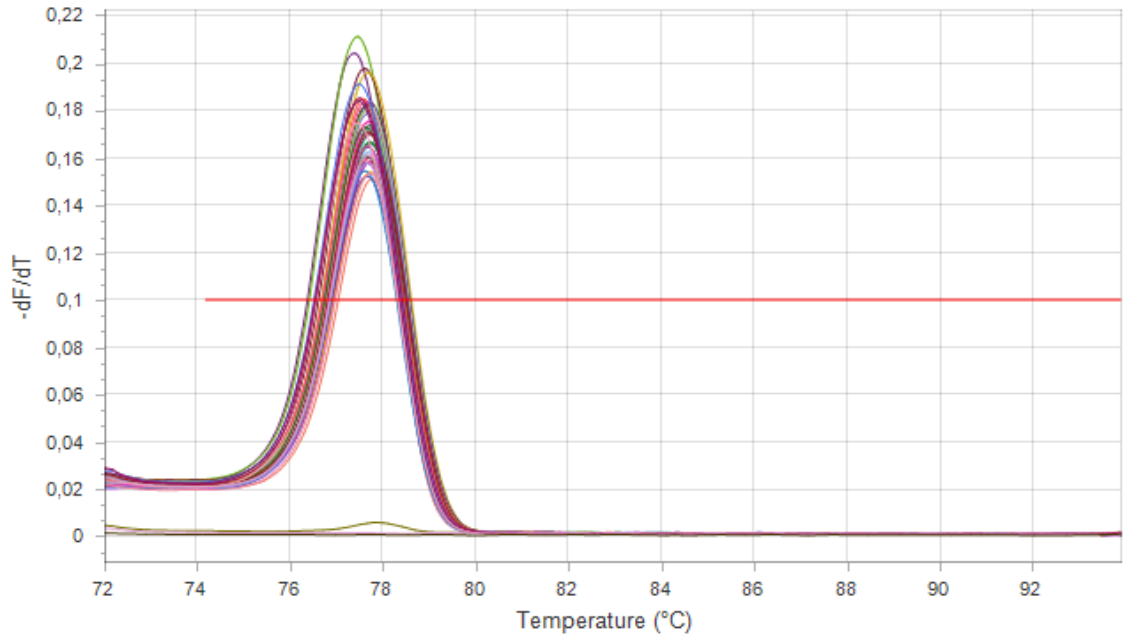
Genotip	Örnek alım zamanı	ng/μL	260/280	Genotip	Örnek alım zamanı	ng/μL	260/280
<i>H.spontanum</i>	%70	397,4	2,16	Avcı2002	%70	361,1	2,17
	%70	259,3	2,16		%70	322,8	2,16
	%50	235,5	2,17		%50	200,5	2,16
	%50	105,5	2,13		%50	357,4	2,16
	%30	216,1	2,15		%30	344,3	2,15
	%30	237,4	2,15		%30	182,3	2,15
	%20	184,4	2,15		%20	346	2,15
	%20	173,2	2,15		%20	226	2,15
	%10	237,4	2,14		%10	499	2,14
	%10	466,3	2,14		%10	408,1	2,14
Tarm92	%70	554,6	2,16	Sayım	%70	473,1	2,16
	%70	370,7	2,17		%70	244,2	2,16
	%50	433,5	2,16		%50	610,7	2,16
	%50	285	2,16		%50	508	2,16
	%30	188,7	2,16		%30	235,5	2,16
	%30	245,8	2,16		%30	28,8	2,16
	%20	246,5	2,15		%20	265,2	2,15
	%20	290	2,14		%20	350,8	2,15
	%10	315,2	1,81		%10	187,9	2,08
	%10	230,8	2,14		%10	237,9	2,13
Misket	%70	321,9	2,16				
	%70	347,1	2,16				
	%50	250	2,15				
	%50	240,4	2,16				
	%30	194	2,16				
	%30	141,5	2,15				
	%20	342,4	2,15				
	%20	435,2	2,14				
	%10	207,4	2,12				
	%10	183,3	2,16				

4.3.2 Gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri ve erime eğrisi (Melting Curve)

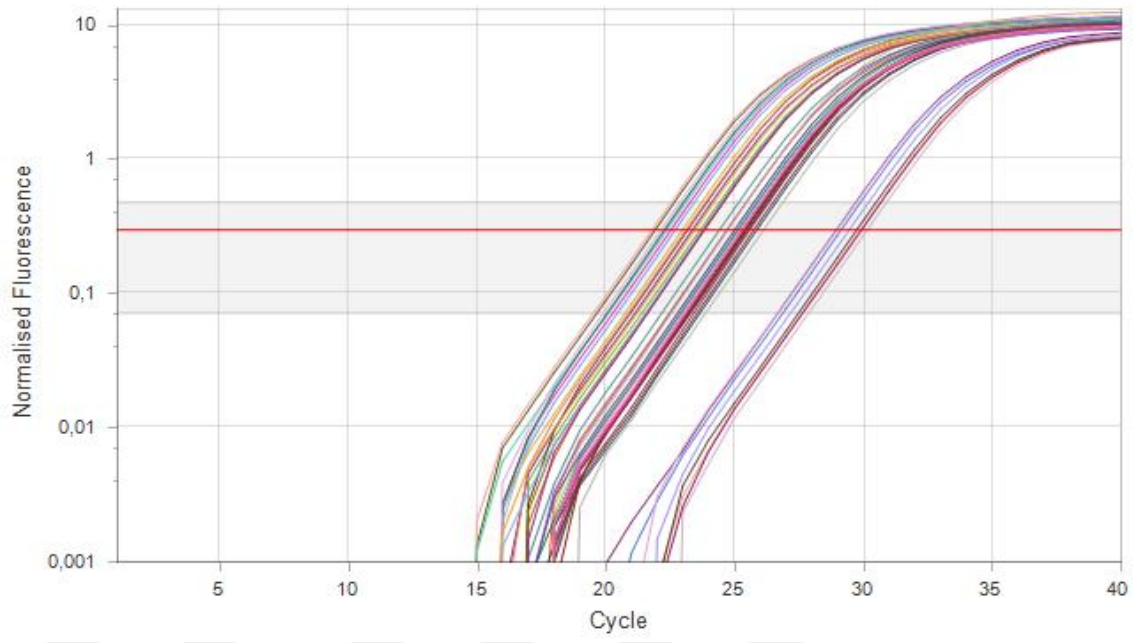
Tez kapsamında gen ifade profilleri oluşturulan *HVA1* (Şekil 4.12, 4.13), *Dhn3* (Şekil 4.14, 4.15), *HvSNAC1* (Şekil 4.16, 4.17), *HvCBF4* (Şekil 4.18, 4.19) ve *HSP17.8* (Şekil 4.20, 4.21) genlere ait primerlerin gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri ve erime eğrileri (Melting Curve) aşağıda verilmiştir.



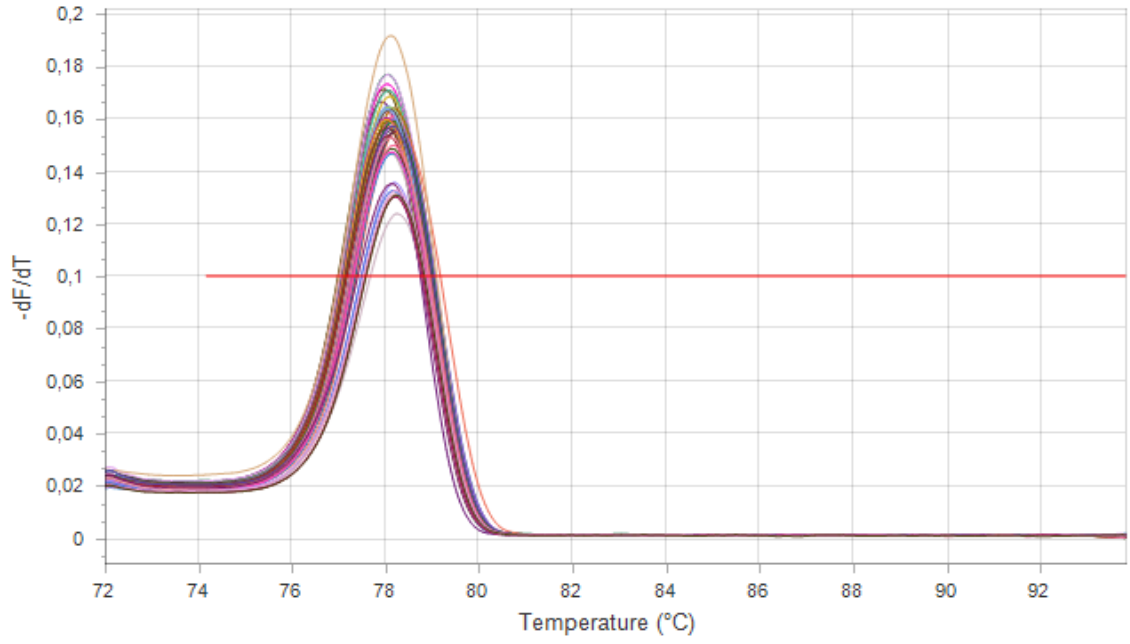
Şekil 4.12 *HVA1* primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri



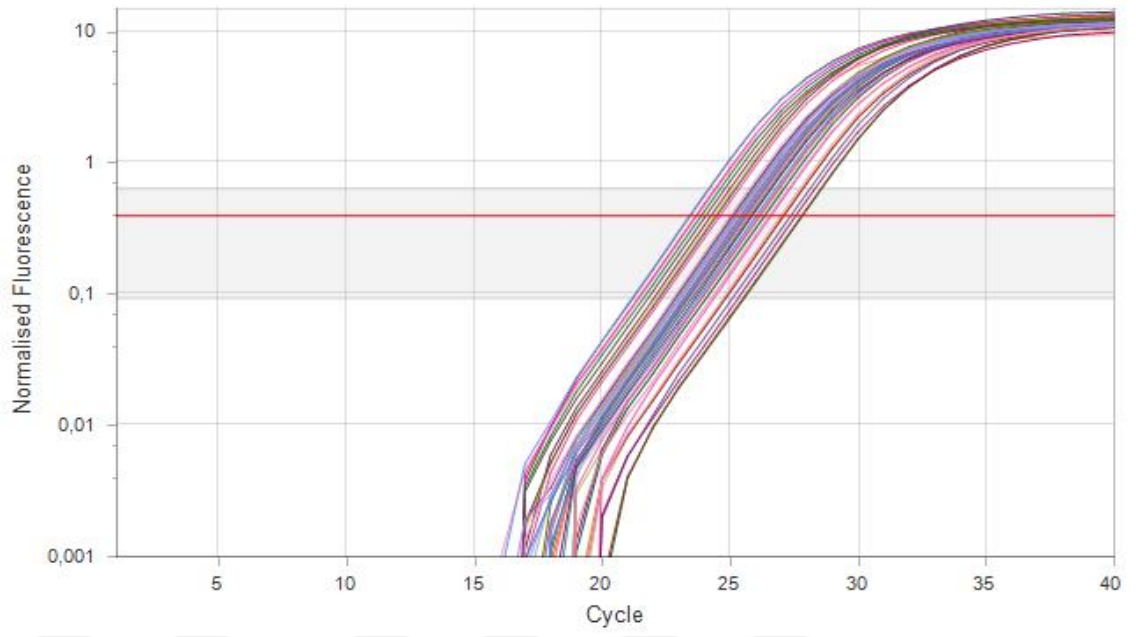
Şekil 4.13 *HVA1* primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği



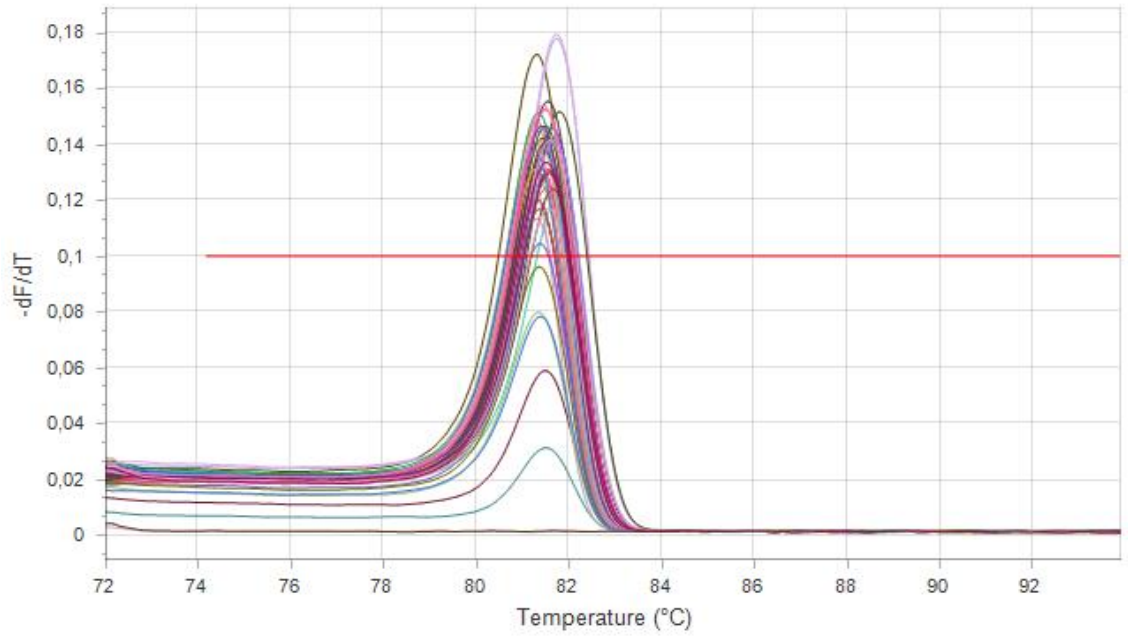
Şekil 4.14 *Dhn3* primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri



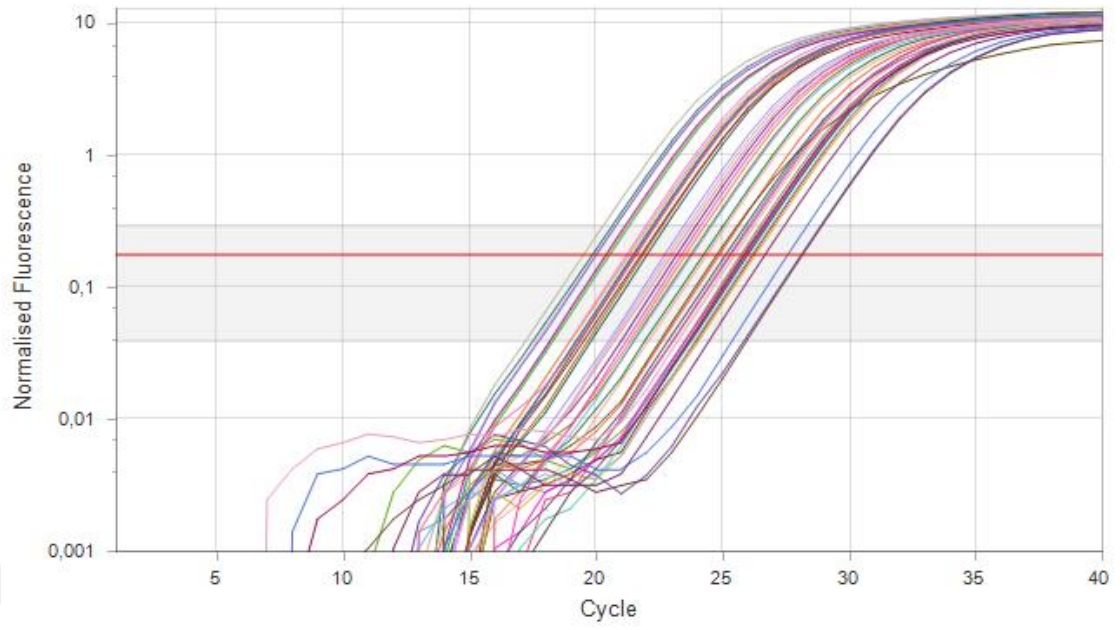
Şekil 4.15 *Dhn3* primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği



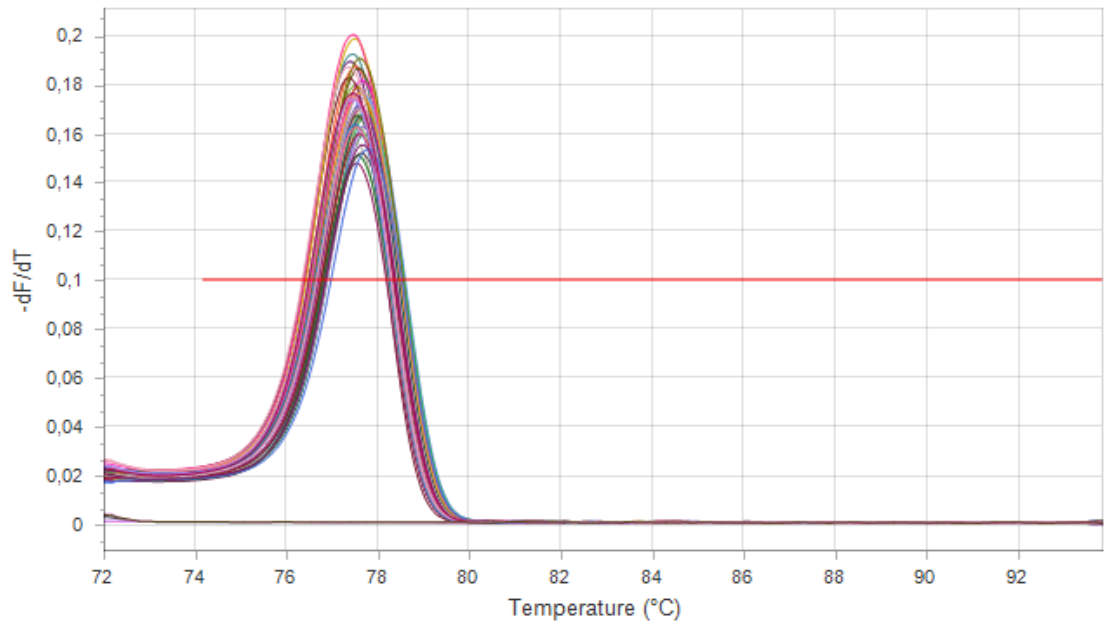
Şekil 4.16 *HvSNAC1* primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri



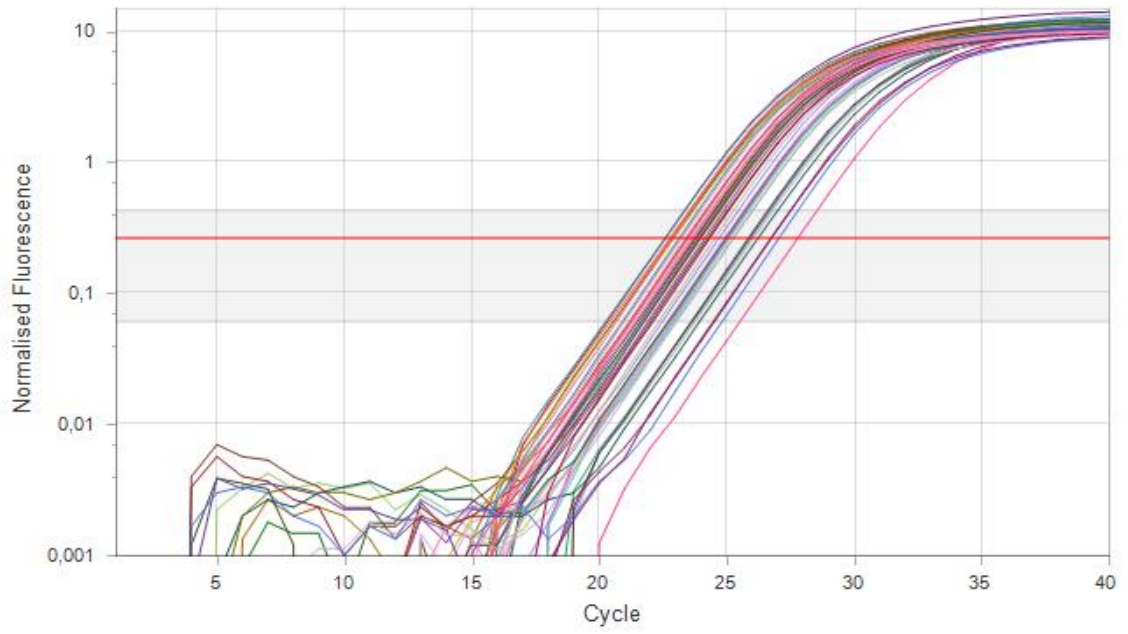
Şekil 4.17 *HvSNAC1* primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği



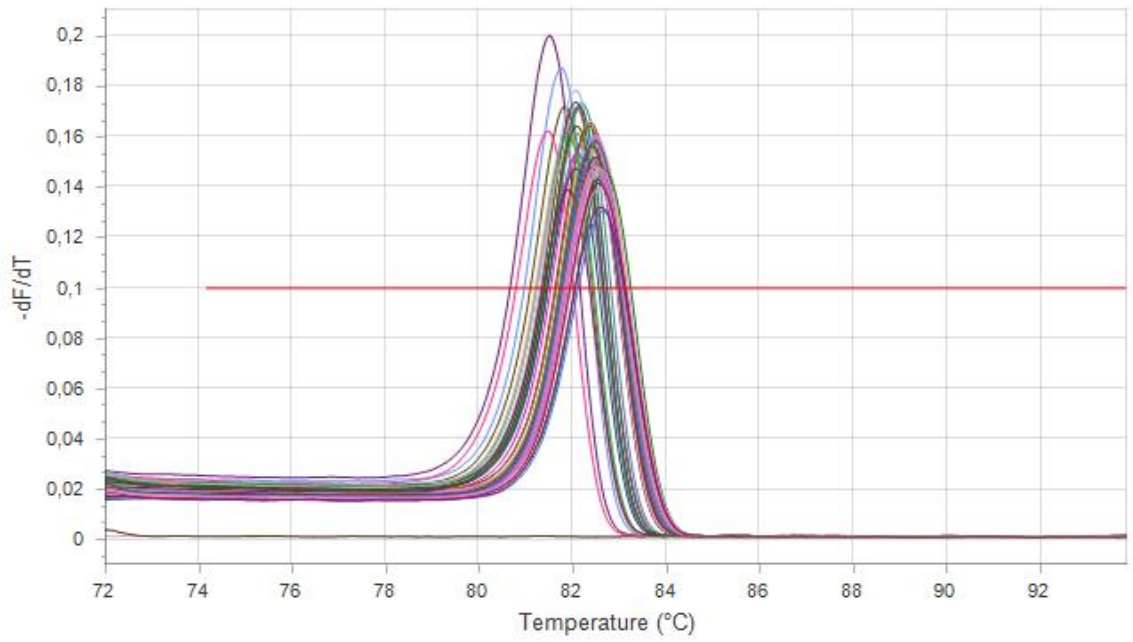
Şekil 4.18 *HvCBF4* primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.19 *HvCBF4* primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği



Şekil 4.20 *HSP17.8* primerine ait örneklerin amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.21 *HSP17.8* primerine ait örneklerin erime eğrisi grafiği

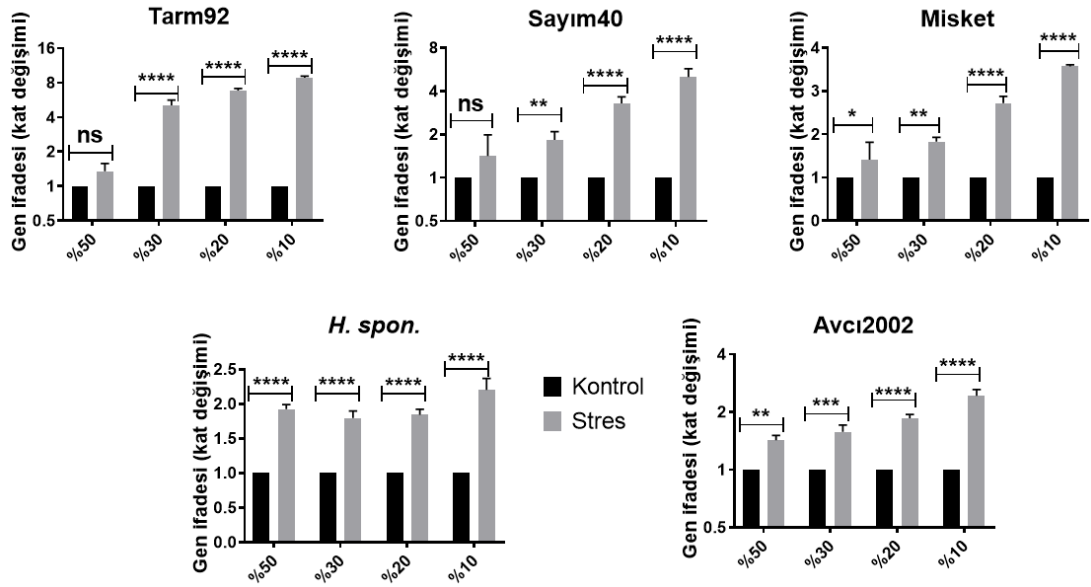
4.3.3 Gen ifadesi çalışmalarına ait bulgular

Tarm92, Avcı2002, Misket, Sayım40 ve *Hordeum spontaneum* (HSPON (NE)-5) genotiplerine kuraklık stresi uygulanmıştır. Sulama kesildikten sonra toprak su kapasitesine göre örnekler alınmış ve kuraklık stresinin etkisi farklı sürelerde araştırılmıştır. Literatür taramaları ile belirlenen, abiyotik stresle ilişkisi olduğu bilinen *HVA1*, *Dhn3*, *HvSNAC1*, *HvCBF4*, *HSP17.8* genleri arpa çeşitleri üzerinden qRT-PCR analizi ile değerlendirilmiş ve gen ifade profilleri oluşturulmuştur. Elde edilen qRT-PCR verilerinin analizi için, göreceli bir kantifikasyon stratejisi olarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerde ANOVA testi uygulanmış, p değerleri belirlenmiştir (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$).

HVA1 genine ait bulgular

Tarm92, Avcı2002, Misket, Sayım40 ve *Hordeum spontaneum* genotiplerinde *HVA1* geninin ifade seviyeleri, toprak su kapasitesinin düştüğü ayrıca kuraklık stresi etkisinin arttığı günlerde kontrol gruplarıyla kıyaslanarak gene ait ifade profilleri oluşturulmuştur. İstatistiki olarak anlamlılık düzeyi grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.22).

HVA1 geni kontrol grupları ile kıyaslandığında kurak stresle beraber ifadesinde kademeli bir artış gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zamanda her 5 genotip için de en yüksek değerini vermiştir ($p<0.0001$). Tarm92 çeşidinin ifadesi diğer genotiplere göre, *HVA1* geni için en yüksek ifade (8,84) oluşturan çeşit olmuştur. Avcı2002 çeşidi 2,42; *H. spontaneum* genotipi 2,20 değerleri ile birbirine yakın ifade seviyelerinde bulunmuştur. Tarm92 çeşidini Sayım40 (5,01) ve Misket (3,57) çeşitleri takip etmiştir.



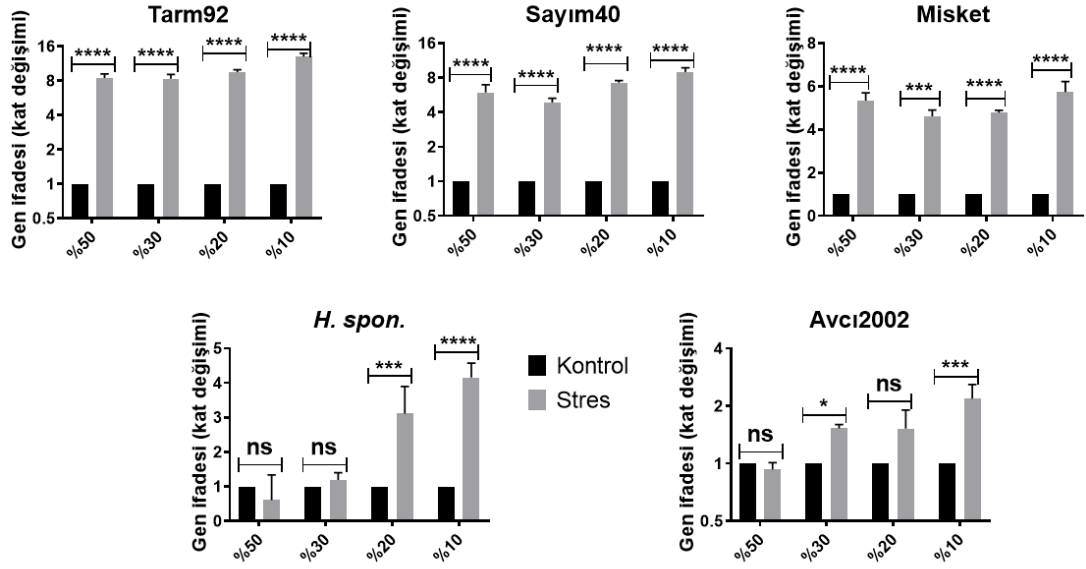
Şekil 4.22 *HVA1* genine ait bulgular

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

Dhn3 genine ait bulgular

Tarm92, Avcı2002, Misket, Sayım40 ve *Hordeum spontaneum* genotiplerinde *Dhn3* geninin ifade seviyeleri, toprak su kapasitesinin düştüğü ayrıca kuraklık stresi etkisinin arttığı günlerde kontrol gruplarıyla kıyaslanarak gene ait ifade profilleri oluşturulmuştur. İstatistiki olarak anlamlılık düzeyi grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.23).

Dhn3 geni kontrol grupları ile kıyaslandığında kurak stresiyle beraber ifadesinde artış gözlenmiştir. Özellikle Tarm92, Sayım40 ve Misket çeşitleri toprak su kapasitesi %50'ye düştüğü gün aradaki kat sayı değişiminin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Toprak su kapasitesi %10'a düştüğü zamandaki ölçümlerde Tarm92 çeşidi, 13,02 değeri ile Sayım40 çeşidi ise 8,96 değeri ile en yüksek ifadeye sahip çeşitler olarak kaydedilmiştir ($p < 0.0001$). Avcı2002 çeşidi aynı gün alınan ölçümlerde ise 2.18 değeri ile diğer genotipler arasında en düşük ifade seviyesini vermiştir.



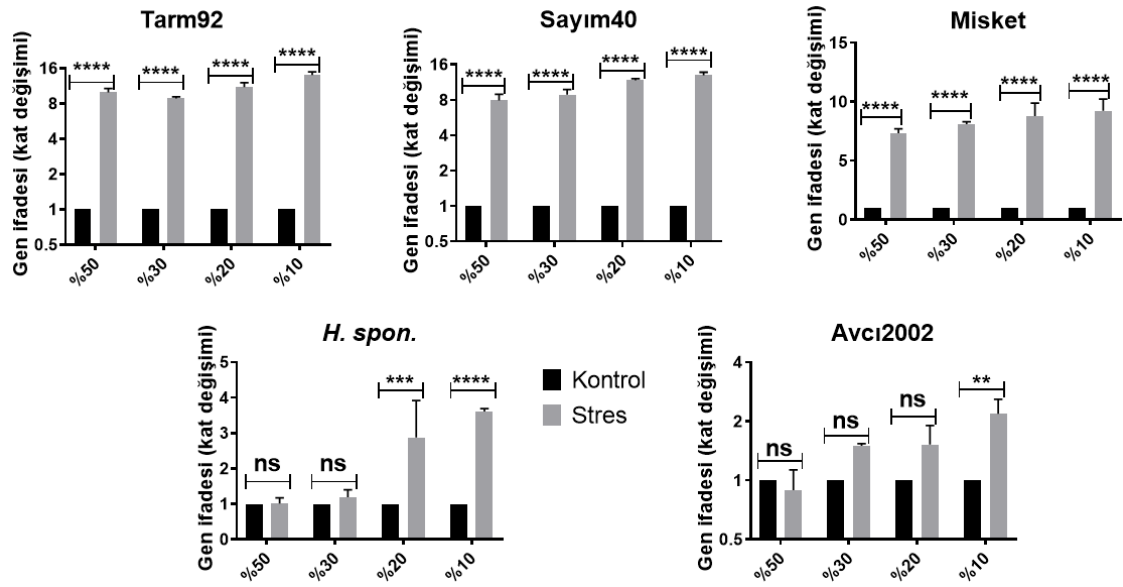
Şekil 4.23 *Dhn3* genine ait bulgular

(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

HvSNAC1 genine ait bulgular

Tarm92, Avcı2002, Misket, Sayım40 ve *Hordeum spontaneum* genotiplerinde *HvSNAC1* geninin ifade seviyeleri, toprak su kapasitesinin düştüğü ayrıca kuraklık stresi etkisinin arttığı günlerde kontrol gruplarıyla kıyaslanarak gene ait ifade profilleri oluşturulmuştur. İstatistiki olarak anlamlılık düzeyi grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.24).

HvSNAC1 geni kontrol grupları ile kıyaslandığında kurak stresiyle beraber kat sayı değişimleri gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zamanda her 5 genotip için de en yüksek değerini vermiştir. Tarm92 çeşidi 14,02 ile, Sayım40 çeşidi 12,96 ile birbirine yakın ve istatistiksel olarak anlamlı (p<0.000) bulunmuştur. Misket çeşidi toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zamanda 9,23 değerini verirken, Sayım40 ve Tarm92 çelişleri gibi toprak su oranı düşmeye başladığında ifadesini arttırmıştır. *H. spontaneum* genotipinin toprak su oranı %20 ve %10'a düştüğü günlerde alınan örneklemelerinde, ifade seviyeleri anlamlı bulunmuştur; sırasıyla 2,87 (p<0.001) ve 3,61 (p<0.0001) olarak ölçülmüştür. Avcı2002 çeşidi toprak su oranı %10'a düştüğü gün 2,18 değeriyle diğer genotiplere göre en düşük, p<0.01 değeriyle anlamlı bulunmuştur.



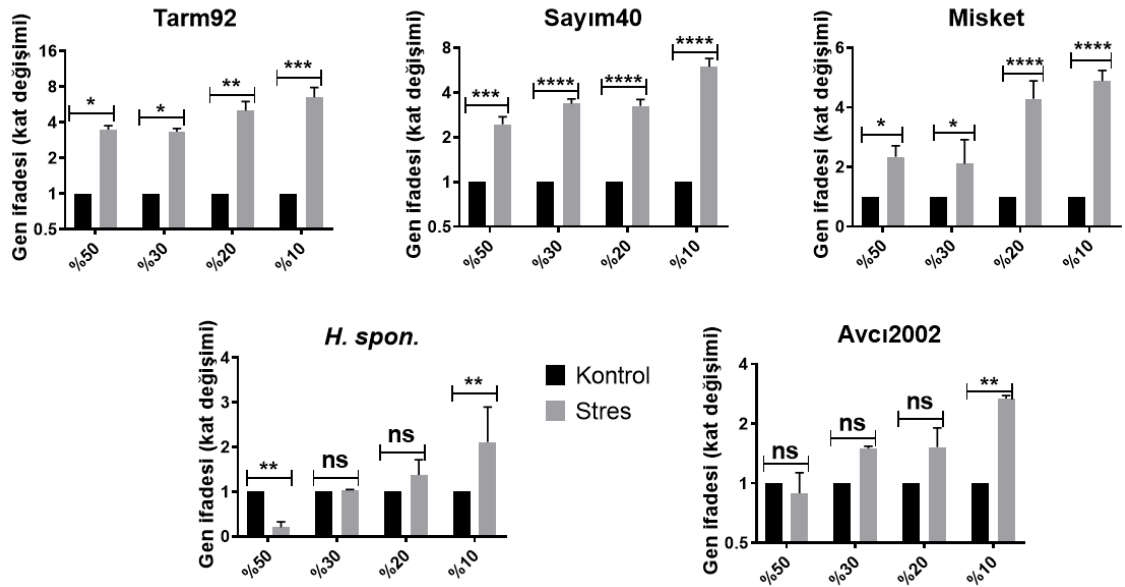
Şekil 4.24 *HvSNAC1* genine ait bulgular

(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

HvCBF4 genine ait bulgular

Tarm92, Avcı2002, Misket, Sayım40 ve *Hordeum spontaneum* genotiplerinde *HvCBF4* geninin ifade seviyeleri, toprak su kapasitesinin düştüğü ayrıca kuraklık stresi etkisinin arttığı günlerde kontrol gruplarıyla kıyaslanarak gene ait ifade profilleri oluşturulmuştur. İstatistiki olarak anlamlılık düzeyi grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.25).

HvCBF4 geni kontrol grupları ile kıyaslandığında kurak stresiyle beraber ifadesinde kademeli bir artış gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zamanda her 5 genotip için de en yüksek değerini vermiştir. Toprak su kapasitesi %20'ye düştüğü gün, Tarm92 çeşidi 5,02 değeri, Misket çeşidi 4,28 değeri, Sayım40 çeşidi ise 3,25 değeri göstermiştir. *HvCBF4* geni için toprak su kapasitesi %20 altında düştüğü gün Tarm92 ve Misket çeşidinin birbirine yakın değerler verdiği kaydedilmiştir. Stresin etkileri arttığında Sayım40 çeşidi ifadesini 5,96 değerine yükseltmiştir. Aynı gün alınan örneklerde Tarm92 çeşidi 6,53; Misket çeşidi 4,88 değerleri ile anlamlı bulunmuştur (p<0.0001). *H. spontaneum* genotipi 2,11 ve Avcı2002 çeşidi ise 2,68 ifade değeri ile istatistiksel olarak (p<0.01) toprak su kapasitesi %10'a düştüğü günden sonra anlamlı bulunmuştur.



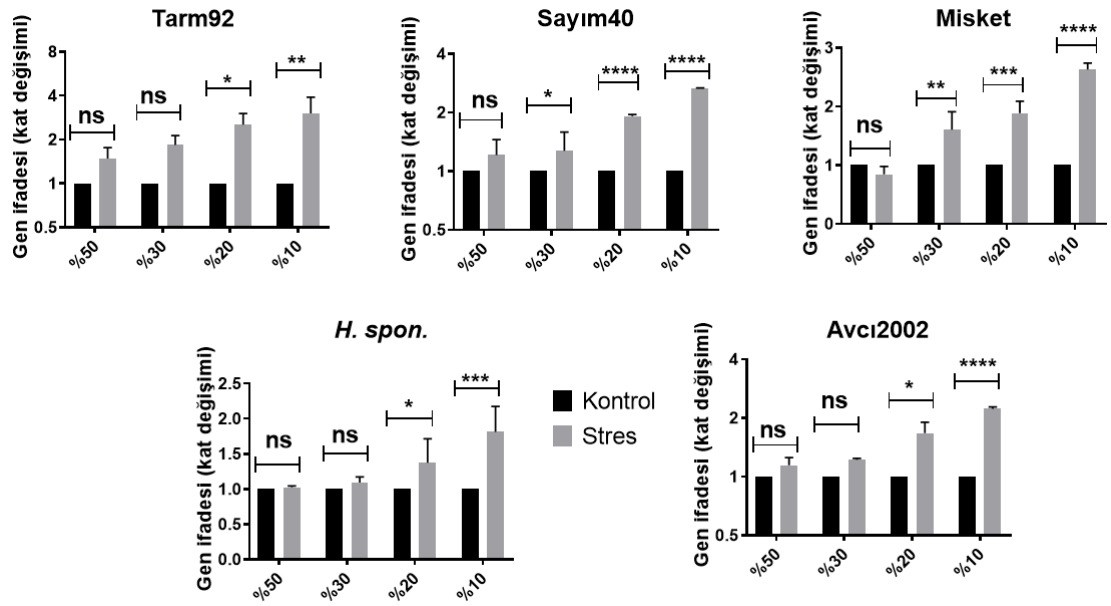
Şekil 4.25 *HvCBF4* genine ait bulgular

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

***HSP17.8* genine ait bulgular**

Tarm92, Avcı2002, Misket, Sayım40 ve *Hordeum spontaneum* genotiplerinde *HSP17.8* geninin ifade seviyeleri, toprak su kapasitesinin düştüğü ayrıca kuraklık stresi etkisinin arttığı günlerde kontrol gruplarıyla kıyaslanarak gene ait ifade profilleri oluşturulmuştur. İstatistiki olarak anlamlılık düzeyi grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.26).

HSP17.8 geni kontrol grupları ile kıyaslandığında kurak stresle beraber ifadesinde kademeli bir artış gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zamanda her 5 genotip için de en yüksek değerini vermiştir. Toprak su kapasitesi %10'a düştüğü gün, Tarm92 çeşidi 3,02 değeri ile en yüksek ifade seviyesindeki genotip olarak belirtilirken; Sayım40 çeşidi 2,66 ve Misket çeşidi ise 2,63 değeri ile *HvCBF4* geni için birbirlerine yakın ifade seviyeleri vermiştir. Yine aynı gün alınan yaprak örneklerinde *H. spontaneum* genotipi 1,81 ve Avcı2002 çeşidi ise 2,23 ifade değeri ölçülmüştür. Her iki genotip toprak su kapasitesi %20'ye düştüğü günden sonra ölçülen ifade seviyeleri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.26 *HSP17.8* genine ait bulgular

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Abiyotik stres faktörlerinden kuraklık doğal ekosistemlerin ve tarım alanlarının en büyük tehditlerinden biridir. Uzun süreli yağış eksikliği, su kaynaklarının azalması ve sıcak hava dalgaları, önemli fizyolojik süreçleri ve biyokimyasal mekanizmaları olumsuz yönde etkilemektedir. Bitkiler kuraklık stresinin etkilerini hafifletmek için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Çalışmamızda kuraklık stresi altında incelenen 5 genotipin fide boyu, taze/kuru ağırlık, yaprak bağıl su içeriği ve yaprak klorofil içeriği morfolojik ve fizyolojik değişiklikler başlığında incelenmiştir. Çalışmaya alınan biyokimyasal ölçümlerden prolin birikimi ise, kuraklık stresi tepkilerinden dolayı belirteç olarak kabul edildiği yapılan literatür çalışması ile belirlenmiştir. Yine literatür taramaları ile belirlenen, abiyotik stresle ilişkisi olduğu bilinen *HVA1*, *Dhn3*, *HvSNAC1*, *HvCBF4*, *HSP17.8* genleri arpa çeşitleri üzerinden qRT-PCR analizi ile değerlendirilmiş ve gen ifade profilleri oluşturulmuştur. Tüm bu analizler değerlendirilerek Tarm92, Sayım40, Misket, *H. spontaneum* ve Avcı2002 genotiplerinin kuraklık tepkileri incelenmiş, tolerans bakımından sıralamaya tabi tutulmuş ve aralarındaki ilişki değerlendirilmiştir.

Bitkilerin kuraklığa karşı adaptasyonları, bitki büyümesi ve yapısındaki değişiklikler, büyüme hızı, doku ozmotik potansiyeli ve antioksidan savunma stratejileri gibi fizyolojik süreçlerde uyarlanabilir değişikliklere yol açan farklı olayların sonucudur (Duan vd. 2016).

Kuraklığın ilk ve en önemli belirtisi zayıf morfolojik durumun oluşmasıdır. Turgor basıncındaki azalmaya bağlı olarak hücre büyümesinin yavaşlaması, kuraklığa en duyarlı fizyolojik süreçlerden biri olarak kabul edilir. Büyüme, meristematik hücre bölünmeleri ile genç hücrelerin genişleyerek yayılması sonucu kardeş hücre üretiminin bir sonucudur. Şiddetli kuraklık altında büyüme, bitkilerin hücre uzaması ve ksilemden çevre hücrelere doğru su akışının kesilmesiyle engellenir (Hussain vd. 2008). Çalışmamızda kontrol ve stres gruplarının fide boyları değerlendirildiğinde, stres grubunda büyümenin azaldığı, kuraklıktan etkilendiği kaydedilmiştir. Genotipler arası farklılığın az olmasından dolayı bitki boyunun tek başına kuraklık hassasiyet/dayanıklılık için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışma sonuçlarına benzer şekilde, bitkilerin kuraklığa dayanıklılığının fide

morfolojisindeki değişimlerle değerlendirildiği bir araştırmada (ICARDA 2000), yapılan arpa tohumlarının erken fide dönemindeki bitki boyu ve fide kuru ağırlıklarının ölçümleri yapılmış, bitki boyunda önemli bir farklılık bulunmazken, fide kuru ağırlığında önemli farklılıklar bulunmuştur. Bitki boyunun kuraklık ile kaydedeğer fark olmadığını gösteren bir başka çalışma da Dencic ve arkadaşları (2000) tarafından yapılmıştır. 51 buğday genotipinin kuraklık stresi altında bazı morfolojik özellikleri incelenmiş, diğer parametrelerin bitki boyuna göre kuraklığa daha hassas olduğu belirtilmiştir.

Bitkideki kuraklık stresi altında yapılan taze ve kuru ağırlık ölçümleri, bitkinin su içeriği ve büyümesi hakkında bilgi sağlar. Taze ağırlık, bitkinin tüm organlarının su içeriği dahil olmak üzere tamamen doğal durumunda olan ağırlığını ifade eder. Kuru ağırlık ise, bitkinin tüm suyunu kaybettikten sonra kalan ağırlığını ifade eder. Kuraklığa hassas olarak teze alınan Avcı2002 eşidi, stres gruplarının her birinde taze ve kuru ağırlığı en düşük değeri vermiştir. Fakat *H. spontaneum* ile Avcı2002 eşidi hem kontrol hem stres grubunda çok yakın sonuçlar vermiştir. Taze ve kuru ağırlık ölçüm değerleri çeşitler arasında en yüksekte başlayarak Tarm92, Misket ve Sayım40 olarak sıralansa da değerler birbirine çok yakın kaydedilmiştir. Kontrol ve stres gruplarının taze ve kuru ağırlıkları değerlendirildiğinde, stres grubundaki her genotipin kuraklıktan etkilendiği sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlara paralel olarak, kuraklık stresi altında arpa hatlarının kullanıldığı bir çalışmada (ICARDA 2000) ve yine kuraklık stresi altında buğday genotiplerinin değerlendirildiği bir çalışmada (Deniv vd. 2000), fide kuru ağırlıklarının kuraklık stresiyle düştüğü kaydedilmiştir. Anjum ve arkadaşları (2011b) kuraklık stresinin kuru maddeyi ve büyümeyi sınırlandırdığını, ayrıca stomaların su noksanlığıyla kapanmasına ek olarak su alımında ve fotosentezde düşme olduğu gösterilmiştir. Aynı türdeki bitkilerin genetik yapısındaki farklılıktan dolayı, bitkilerin büyüme hızı, yaprak boyutu, kök gelişimi gibi özelliklerinin etkilenebileceğini ve bu nedenle, aynı türdeki bitkiler arasında taze/ kuru ağırlık farklılıklarının görülebileceğini belirtmişlerdir.

Yaprak bağıl su içeriği, bitkinin su tutma kapasitesini ve su stresine tepkisini değerlendiren bir göstergedir. Değişen bu değerler, bitkinin kuraklık koşullarına ne kadar iyi uyum sağlayabildiğini ve su kaybını ne kadar etkili bir şekilde kontrol edebildiğini

gösterir. Yaprak bağıl su içeriğinin hesaplanmasında formüle göre, taze yaprak ağırlığı ile kurutulmuş yaprak ağırlığı arasındaki fark, yaprağın suyunu kaybetme miktarını yani su stresini yansıtır. Aynı zamanda, yaprağın tamamen su emdiği durum (turgor) ile kurutulmuş durumu arasındaki fark, yaprağın suyu ne kadar iyi depolayabildiğini gösterir. Eğer kuraklık koşulları altında yaprak bağıl su içeriği azalıyorsa, bu genellikle bitkinin su kaybını minimize etmek ve suyu daha iyi korumak için adaptasyonlar geliştirdiğini gösterebilir. Bitki, stomalarını (gözenekleri) kapatma, daha ince yapraklar geliştirme veya su depolama kapasitesini artırma gibi mekanizmalar kullanarak su kaybını azaltmaya çalışıyor olabilir. Kontrol ve stres gruplarının yaprak bağıl su içerikleri değerlendirildiğinde, yüksek farklardan dolayı stres grubundaki her genotipin kuraklıktan etkilendiği sonucuna varılmıştır. Kuraklığa hassas olarak teze alınan Avcı2002 çeşidi, kontrol ve stres gruplarının her birinde en düşük değeri vermiştir. Tarm92 çeşidi kontrol gruplarında diğer genotiplere göre en yüksek oranı verirken, toprak su kapasitesinin düşerek, kuraklık etkilerinin hissedildiği dönemde *H. spontaneum* stres grubundaki diğer genotiplerden daha yüksek değer vermiştir. Ölçümler değerlendirildiğinde, yabani form olarak çalışmaya alınan *H. spontaneum*'un yaprak su tutma kapasitesinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı bitki türü içindeki yaprak bağıl su içeriğinin kuraklıkla değişiminin yorumlanması, bitkinin kuraklık stresine nasıl tepki verdiğini anlamak için önemlidir. Bu tez çalışmasının diğer araştırmacıların bulgularına paralel olarak, Allahverdiyev ve arkadaşlarının (2015) buğday genotiplerinde kuraklık stresinin fizyolojik parametrelerini inceledikleri çalışmada, stresin fotosentez ve solunum oranını, bayrak yapraktaki suyu düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Siddique ve arkadaşlarının (2001) *Triticum aestivum* çeşitlerini, Sah ve arkadaşlarının (2020) mısır, Makbul ve arkadaşlarının (2011) soya fasulyelerini incelediği çalışmada yine kuraklığın yaprak su içeriğini düşürdüğünü belirtmişlerdir. Yang ve arkadaşlarının (2021) iki kavak türünde yaptığı çalışmada, kuraklık stresi ile yaprak bağıl su oranı (LRWC) hesaplanmış ve birinde %16 azalırken, diğer türde %24 oranında azalmıştır. Bu durum, LRWC'nin kuraklık şiddetinin türler arasındaki etkileşimine, kuraklık süresine ve farklı türler olmalarına bağlanmıştır. Bizim çalışmamızdaki farklı arpa genotiplerinin farklı LRWC değerleri bu çalışma ile açıklanmaktadır. Yaprak bağıl su içeriğindeki değişiklikleri yorumlarken geniş bir perspektif ve diğer faktörleri de göz önünde bulundurmak önemlidir.

Klorofil, bitkilerin fotosentez yapabilmesi için gereken pigmentlerden biridir. Fotosentez, bitkilerin güneş ışığını kullanarak karbondioksit ve suyu enerjiye dönüştürdüğü temel süreçtir. Dolayısıyla, klorofil miktarı bitkilerin fotosentez yeteneklerini ve dolayısıyla büyüme ve gelişmelerini doğrudan etkiler. Kuraklık koşullarında klorofil üretimini ve dolayısıyla yeşil rengini azaltabilir, stomalarını kapatabilir, stresin şiddetiyle beraber klorofil parçalanmaları olabilir (Lv 2023). Curran ve arkadaşları (1990) klorofil içeriğinin belirlenmesi, bitkilerin gelişim, stres, fotosentez kapasitesi ve verim gibi özelliklerinin belirlenmesinde belirteç olabileceğini söylemişlerdir. Çalışmada kuraklık stresinin bir parametresi olan yaprak klorofil miktarındaki değişikliği SPAD cihazı ile ölçerek genotipler arası farklılık değerlendirilmiştir. Kontrol ve stres gruplarının yaprak klorofil miktarları değerlendirildiğinde, stres grubundaki her genotipin kuraklıktan etkilendiği sonucuna varılmıştır. Kuraklığa hassas olarak teze alınan Avcı2002 çeşidi, yaprak klorofil içeriği ölçümlerinde stres gruplarında en düşük değeri vermiştir. *H. spontaneum* genotipi ise, stres grubunda diğer genotiplerden daha yüksek yaprak klorofil içeriği ile kaydedilmiştir. Ölçümler değerlendirildiğinde, yabani form olarak çalışmaya alınan *H. spontaneum*'un yaprak klorofil miktarının yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu tez çalışmasının diğer araştırmacıların bulgularına paralel olarak, stresle beraber klorofil içeriğinde azalma gözlenmiştir. Çalışmaya paralel, düşen klorofil miktarı, yaprak su içeriği ve bitki yaş/kuru ağırlığı ile ilgili, Sah ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmada, kuraklığın yaprak klorofilinde azalmaya neden olduğu, yaprak su içeriğinin, stoma miktarının ve kuru ağırlığın da düştüğünü gözlemlemişlerdir. Su stresi (Demirel vd. 2010) ve tuz stresi (Acar vd. 2011) altında klorofil içeriğinin düştüğü belirtilmiştir. Makbul ve arkadaşları (2011) kuraklık stresi altında soya fasulyelerini incelediğinde, klorofil içeriğinin azaldığını belirtmişlerdir. Atar ve Bayraktar (2022), fotosentez, yaşlanma ve stres etkilerinin belirlenmesi için klorofil miktar ölçümlerinin önemini, toplam klorofil içeriğinin yine aynı yapraklar üzerinde, tahribatsız portatif ölçer (SPAD) ile ölçülmesini vurgulamışlardır. Türler arasındaki yaprak klorofil miktarındaki farklılıklar bitkilerin fotosentez yetenekleri, adaptasyon mekanizmaları, su ve besin alımı, stres toleransı ve genel fizyolojik özellikleri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Bu farklılıkların altında yatan nedenleri anlamak, bitkilerin yaşamlarını ve çevreleriyle nasıl etkileşime girdiklerini daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

Bitkilerin kuraklık stresini hafifletmek için geliştirdiği adaptif metabolik tepkilerden biri de prolin birikimidir (Bandurska vd. 2017). Prolin birikimi, birçok bitkide çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı yaygın bir fizyolojik tepkidir ve stres koşullarında bitkilerde ozmotik ayarlamalar sağladığı bilinmektedir (Szabados ve Savoure 2010). Bu tepkiden dolayı strese karşı biyokimyasal bir belirteç olarak kabul edilir (Per vd. 2017). Çalışma kapsamında, stres koşullarına yanıt olarak prolin seviyesindeki değişiklikleri belirlemek amacıyla yapılan prolin analizinde, kuraklık stresi uygulanan arpa bitkisinde kontrol grubuna göre anlamlı seviyede artışlar belirlenmiştir. Toprak su kapasitesi %50 olduğu gün alınan örneklerde prolin miktarı kontrol gruplarıyla benzer seviyeler gösterirken, toprak su kapasitesi %30, %20 ve %10'a düştüğü günlerde kademeli bir artış yaşandığı belirlenmiştir. Toprak su kapasitesinin %10 olduğu gün sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek oran Tarm92 çeşidinde, en düşük oran da *H. spontaneum* genotipinde belirlenmiş olsa da *H. spontaneum* genotipi ve Avcı2002 çeşidinin; Sayım40, Tarm92 ve Misket çeşitlerinin birbirine yakın seviyelerde olduğu ölçülmüştür.

Kuraklık stresıyla beraber bitki genotiplerde ölçülen farklı prolin artışlarına, Chaves (2009), stresin varlığına, bitki adaptasyonuna, sinyalleşmedeki çoklu fonksiyonlara ve prolinin uyumlu bir osmolit olduğuna vurgu yapmıştır. Hanif ve arkadaşları (2021) kuraklık ve sıcaklık stresi altındaki pirinç bitkilerine dışardan prolin takviyesi yaparak oksidatif stresi azaltarak pirinç verimini arttırmışlardır. Abdelaal ve arkadaşları (2020) arpada yine prolin seviyelerini arttırdıkları çalışmalarında kuraklık stresi aracılı oksidatif hasarı sinerjik olarak hafiflettiği bildirilmiştir. Buğdayda yapılan bir çalışmada, kuraklık stresi ile prolin seviyesinde artış gözlenmiştir (Nayyar ve Walia 2003). El- Beltagi ve arkadaşları (2020) nohutta, prolinin glutatyon ve askorbik asit gibi diğer önemli organik bileşiklerle birlikte uygulanmasının, nohut bitkilerinde su eksikliğine bağlı oksidatif stres toleransını iyileştirdiğini, bu da enzimatik antioksidan aktivitelerin (CAT, SOD, POX, APX ve GR) ve enzimatik olmayan antioksidanların (AsA, GSH ve Pro) seviyelerinin artmasıyla sonuçlandığını belirlemiştir. Furlan ve arkadaşları (2020), kuraklık stresi altında hassas ve toleranslı yer fıstığı çeşitlerinde *P5CS1*, *P5CS2a*, *P5CS2b* ve *P5CR* (Prolin biyosentez genleri) ifadesinin arttığını, *ProDH1*, *ProDH2*'nin (Prolin katabolizma genleri) ise sadece kuraklığa duyarlı çeşitlerde arttığını bildirmiştir. Anjum ve arkadaşlarının (2011a) mısır bitkisinde kuraklık stresi altında prolin birikimini

gözlemledikleri çalışmalarında, prolinin kuraklık stresi süresi ilerledikçe arttığını, on günlük stres sonrası kaydedilmiş en üst seviyesine ulaştığını ve daha sonra on beş günlük stres sonrasında devam eden şiddetli kuraklık stresi altında azaldığını belirtmişlerdir. Alkahtani ve arkadaşları (2021) şeker pancarında prolin ile ilgili yaptığı çalışmada prolinin su eksikliği toleransını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak prolin, strese karşı değişen değerlerinden dolayı biyokimyasal bir belirteç olmasının yanında, bitkilerin hayatta kalma ve adaptasyon şansını artıran önemli de bir bileşiktir. Bu nedenle, prolin düzeylerini artırmaya yönelik genetik mühendislik ve ıslah çalışmaları, tarım alanında kuraklığa dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde potansiyel bir strateji olarak düşünülmelidir.

Tarımsal ürünlerin karşılaştığı en önemli abiyotik stresin başında kuraklık gelmektedir. Bu strese cevapta rol oynayan sinyal yollarının ve mekanizmanın, bunların sorumlu olduğu genlerin incelenmesi sorunun çözümü için çok önemlidir. Gen ifadelerinin değerlendirilmesinde genellikle gerçek zamanlı RT-PCR (qRT-PCR) kullanılmaktadır. Normalizasyon amaçlı referans gen(ler) seçimi bu teknikte dikkat gerektirmektedir. Janská ve arkadaşlarının (2013) çalışmasında, kuraklık stresi altında arpa fidelerinin yaprakları kullanılarak gen ekspresyonu çalışmaları için 13 referans genin karşılaştırmasını, 3 farklı yazılımla yapmıştır. Çalışmalarında, bizim de teze referans gen olarak aldığımız *GADPH* geninin, arpada kuraklık ile ilgili olduğunu ve bu sonucun her üç yazılım için de kararlı olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak, arpada gen ifadesi çalışmalarında qRT-PCR'ın yaygın olarak kullanıldığını fakat farklı stres koşullarında farklı referans genlerin olduğunun göz önünde bulundurulmasını belirtmişlerdir. Kowalik ve Groszyk (2023), arpa (*Hordeum vulgare* L.), buğday (*Triticum aestivum* L.) ve çavdarın (*Secale graine* L.) çimlenme sırasında belirledikleri genlerin ifade seviyelerine baktıkları çalışmada, kontrol olarak arpa ADP-ribosilasyon faktör ve *GADPH* referans genlerini kullanmışlardır. Gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması için bu gen çalışmamızda referans (Housekeeping) gen olarak seçilmiştir.

Kuraklık toleransından sorumlu gen ve alellerin başarılı seçilimindeki ana zorluk, strese karşı bitki yanıtının karmaşıklığıdır. Transkriptomik çalışmalar bu karmaşıklığın derinlemesine profillenmesine olanak sağlayan stratejilerdendir. Transkriptom “bir

organizmanın genlerinden ifade edilen veya edilmeyen RNA moleküllerinin toplamı” olarak adlandırılmaktadır (Ozsolak ve Milos 2011). Transkriptom analizi, başka hiçbir genomik bilginin olmadığı model olmayan bir türdeki eksprese edilen genlerin başlangıç karakterizasyonundan, iyi açıklanmış referans genom dizisinin bilindiği model organizmanın organlar, dokular veya hatta tek tek hücreler arasında alternatif splicing ve gen ekspresyonunun detaylı analizini kapsayan çok geniş bir konudur. Çalışmamızda, literatür taramaları ile belirlenen *HVA1*, *Dhn3*, *HvSNAC1*, *HvCBF4*, *HSP17.8* genleri arpa çeşitleri üzerinden qRT-PCR analizi ile değerlendirilmiş ve gen ifade profilleri oluşturulmuştur.

HVA1 (Highly ABA-Induced 1) geni bitkilerin kuraklık ve tuz stresine karşı yanıt vermesinde önemli rol oynayan, arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinde LEA-3 protein grubu bir gen olarak bilinir. LEA proteinleri, tohum oluşumunda, vejetatif dokularda kuraklık, sıcak, soğuk ve tuz stresi koşullarında veya absisik asit (ABA) uyarılmasını takiben birikir. *HVA1* geni, ABA fitohormonunun varlığında ifade edilir. ABA, bitkilerin stres koşullarına uyum sağlamasında kritik bir rol oynar. *HVA1* geni, ABA'nın sinyalini alır ve bu sinyale yanıt olarak aktive olur (Kader vd. 2012). Bu genin ifadesinin, *H. vulgare ssp. vulgare*'nin stres altındayken su kaybını azalttığına, hücrel hasarı önlemelerine ve stomalarını (gözeneklerini) kapatmalarına yardımcı olduğu, vejetatif büyümeyi geciktirdiği, toplam taze biyokütlesini sınırladığı Liang ve arkadaşları (2012) tarafından belirtilmiştir. Gürel ve arkadaşları (2016), membran fosfolipitlerini kodlayarak su ve iyon stresine karşı hücreyi koruduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda, 5 genotipin de *HVA1* geninin ifadesinin kurak stresle beraber kademeli arttığı gözlenmiştir. Ttoprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zaman her 5 genotip için de en yüksek değeri vermiştir. Genotipler arasında en yüksek ifadeyi Tarm92 çeşidi, en düşük ifadeyi de Avcı2002 çeşidi vermiştir. Avcı2002 çeşidi ve *H. spontaneum* genotipinin değerleri birbirine yakın ifade seviyelerinde bulunmuştur. *HVA1* gen ifadesi için Sayım40 çeşidi, Tarm92 çeşidinden düşük ama Misket çeşidinden yüksek ölçülmüştür. Kuraklık stresi ile birlikte *HVA1* geninin ifadesinin arttığı bizim çalışmamıza paralel başka çalışmalarla da desteklenmiştir. Xu ve arkadaşları tarafından (1996) gen aktarımı yaptıkları çalışmada, arpadan aktarılan *HVA1* geninin çeltik

bitkilerinde stres koşullarına karşı kontrol grubu bitkilere oranla daha dayanıklı olduklarını; özellikle su eksikliği ve tuzluluk koşullarında *HVA1* geninin aktarıldığı ikinci generasyon çeltik bitkilerinin daha yüksek oranda tolerans gösterdikleri bildirilmiştir. Sivamani ve arkadaşlarının (2000) sera koşullarında yaptıkları çalışmada, arpadan aktarılan *HVA1* geninin bazı transgenetik buğday hatlarında (T₃) daha verimli su kullanımını sağladığı bulunmuştur. Arpada bulunan grup3 LEA proteinlerinden *HVA1* geni, arpa, çeltik ve buğdayda kuraklığa dayanıklılığı arttırdığı gözlenmiştir (Chandra Babu vd. 2004). Oraby ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada, arpadan aktarılan *HVA1* genine sahip üçüncü generasyon transgenetik yulaf (*Avena sativa* L.) bitkilerinin kontrol grubu bitkilere göre daha iyi büyüme ve gelişme ile beraber tuzluluğa (200 mM) tolerans gösterdiği rapor edilmiştir. *HVA1* promotörlerinin transkripsiyon kontrolü altında bulunan *HsDREB1A* geni yabancı arpadan (*H. spontaneum*) parlak yalancı darıya (*Paspalum notatum* Flugge) aktararak yapılan bir çalışmada, James ve arkadaşlarının (2008), transgenik bitkilerin, transgenik olmayan bitkilerle karşılaştırıldığında şiddetli tuz stresini ve tekrarlanan ciddi dehidrasyon stresini tolere ettiklerini rapor etmişlerdir. Liang ve arkadaşlarının (2012) kuraklığa dayanıklı 48 kavuzsuz Tibet arpası (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) kullanılarak yapılan bir çalışmada, *HVA1* geni susturulduğunda bitkilerde önemli oranda su kaybı olduğunu bildirilmiştir. Samtani ve arkadaşları (2022) arpadan aktarılan *HVA1* genini bulunduran doubled haploid buğdayların kuraklık ve sıcaklık stresine karşı tolerans gösterdiklerini, Habib ve arkadaşlarının (2022) da aynı geni buğdaya aktardıkları çalışmada transgenetik buğday bitkilerinin kuraklık stresi altında daha iyi çimlenme ve gelişme gösterdiklerini, kuraklık stresine tolerans gösterdiklerini bildirilmiştir.

Dhn3 geni, dehidrin (DHN) olarak adlandırılan dehidrasyon proteinleri içinde, LEA-2 familyasındaki bir alt aileye aittir. Bu proteinler, bitkilerin kuraklık, soğuk, tuzluluk ve diğer abiyotik streslere karşı yanıt verme mekanizmalarının bir parçası olarak ifade edilmektedir. *Dhn3*, bu dehidrin ailesinin bir üyesidir ve bitkilerin stres koşullarına uyum sağlamasına, özellikle su kaybına (dehidrasyona) karşı stabil kalmasına, kaybı azaltmasına ve stres koşullarında belirli transkript faktörleri ile etkileşime girerek, stres yanıtındaki genlerin ifadesinin düzenlenmesine yardımcı olduğu belirtilmektedir (Malik vd. 2017, Güler ve Terzi 2020).

Çalışmamızda *Dhn3* geni kontrol grupları ile kıyaslandığında kurak stresle beraber ifadesinde artış gözlenmiştir. Özellikle Tarm92, Sayım40 ve Misket çeşitleri toprak su kapasitesi %50'ye düştüğü gün aradaki kat sayı değişiminin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Toprak su kapasitesi %10'a düştüğü gün, Tarm92 çeşidi ve ardından Sayım40 çeşidi en yüksek ifadeye sahip çeşitler olarak kaydedilmiştir. Avcı2002 çeşidi için toprak su kapasitesi %10'a düştüğü gün, diğer genotipler arasında en düşük ifade seviyesini vermiştir. Kuraklık stresi ile birlikte *Dhn3* geninin ifadesinin arttığı bizim çalışmamıza paralel başka çalışmalarla da desteklenmiştir. Park ve arkadaşlarının (2006) kuraklığa dayanıklı ve dayanıksız olmak üzere iki arpa çeşidi üzerine yürüttüğü çalışmada, kuraklığa dayanıklı genotiplerin erken gelişme döneminde dehidrasyona tepki olarak *Dhn3* ifadesini arttırdığı gözlenmiştir. Bu durum kuraklığa hassas genotiplerde görülmemiştir. Guo ve arkadaşlarının (2009) arpa genotiplerinde kuraklık stresinin etkilerini araştırdıkları çalışmada, kuraklıkla *Dhn3* geninin ifadesinin arttığı ayrıca bu genin protein ve membran stabilitesini koruduğu vurgulanmıştır. Skodacek ve Prasil (2011)'in arpa çeşitlerinde kuraklık toleransını değerlendirdiği çalışmada, dehidrin proteinlerinin düşük tarla su kapasitesinde arttığı belirtilmiştir. Karami ve arkadaşlarının (2013), iki farklı arpa çeşidinde kuraklık etkilerini gözlemledikleri çalışmada, *Dhn3* geninin yüksek oranda ifade edildiği belirtilmiştir. Ayrıca bu ekspresyonun verim ve bitki biokütlesi gibi önemli özellikler ile pozitif korelasyonlu olduğu bulunmuştur. Al-anany ve arkadaşlarının (2023), *Dhn3* üzerine yaptıkları çalışmada, çeltik bitkisinin kuraklığa toleransını arttırmasının yanında tuz stresine karşı da ifadesinin arttığı vurgulanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen LEA grup üyesi bu iki gen bitkilerin abiyotik streslere karşı dayanıklılığını arttırmada önemli bir rol oynamaktadır. İki genin de birlikte dahil edildiği çalışmalar mevcuttur. Marzin ve arkadaşlarının (2008) kuraklık stresi altında 3 farklı arpa genotipinin gen ifadelerini inceledikleri çalışmada, dehidrin ve *HVA1* genlerinin ifadelerinin arttığı belirtilmiştir. Gürel ve arkadaşlarının (2016), *HVA1* ve *Dhn3* genlerinin membran fosfolipitlerini kodlayarak su ve iyon stresine karşı hücreyi koruduğu bildirilmiştir. LEA genlerinden *HVA1* ve *Dhn6*'nın kuraklığa karşı yanıt oluşturduğu, vejetatif büyümeyi geciktirdiği, *H. vulgare ssp. vulgare*'nin toplam taze biyokütlesini sınırladığı gösterilmiştir (Liang vd. 2012). *Dhn3* ve *HVA1* genleri, bitkilerin özellikle kuraklık ve tuzluluk stresine karşı yanıt vermesini düzenleyen genler olarak bitki

biyoteknolojisi alanında önemli bir araştırma konusu olmaktadır. Bu genlerin işlevi, bitkilerin stres koşullarına adapte olma yeteneklerini anlamak ve gelecekte daha dayanıklı bitkilerin geliştirilmesine katkıda bulunmak için önem arz etmektedir.

HvSNAC1 geni, arpa bitkisinde bulunan, SNAC (Stress-Responsive NAC) ailesine ait bir gendir. SNAC genleri, bitkilerin abiyotik streslere (kuraklık, tuzluluk, soğuk stresi) yanıt verme mekanizmalarında önemli bir rol oynayan bir protein ailesidir. *HvSNAC1* geni, abiyotik streslere karşı arpa bitkisinin yanıtını düzenler. Özellikle kuraklık, tuz stresi ve soğuk stresi gibi koşullarda bu genin ifadesi artabilir. Diğer taraftan bir transkript faktörü olarak işlev görür. Bu, diğer genlerin ifadesini düzenleme yeteneği anlamına gelir. Stres koşullarında aktive olduğunda, çeşitli stres yanıtı genlerinin ifadesini artırabilir veya düzenleyebilir. Stomaların regülasyonunda rol oynayabilir. Stoma kontrolü, bitkilerin su kaybını ve gaz alışverişini düzenlemelerine yardımcı olur. Bu, özellikle kuraklık stresi altında önemlidir. Yine bu genin tuzluluk stresine yanıt verme mekanizmalarını düzenlediği bilinmektedir. Bu, arpa bitkisinin tuzlu topraklarda büyüme yeteneğini artırabilir (McGrann vd. 2015, Röhrig ve Dussart 2022). Model bitki *Arabidopsis thaliana*'da yaşlanmayı geciktiren NAC gen mutantları aynı zamanda abiyotik streslere karşı gelişmiş tolerans göstererek yaşlanma ve stres arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. NAC transkripsiyon faktörleri, ROS ve hormon yollarının manipülasyonu da dahil olmak üzere farklı süreçler yoluyla yaşlanmayı düzenlemektedir (Lee vd. 2012, Wu vd. 2012).

Çalışmamızda, 5 genotipin de *HvSNAC1* geninin ifadesinin kurak stresle beraber kademeli arttığı gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zaman her 5 genotip için de en yüksek değerini vermiştir. Genotipler arasında en yüksek ifadeyi Tarm92 çeşidi vermiştir. Sayım40 çeşidi ile ifade seviyeleri birbirine yakın ölçülmüştür. Misket çeşidinin ifade seviyesi, kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir ($p<0.0001$). Avcı2002 çeşidinin artışı, toprak su kapasitesi %10'a düştükten sonra ($p<0.01$); *H. spontaneum* genotipinin artışı ise toprak su kapasitesi %20'ye düştükten sonra ($p<0.001$) anlamlı olarak ifadelenmiştir. Avcı2002 çeşidi ve *H. spontaneum* genotipi, *HvSNAC1* geni için, kuraklık etkileri arttıktan sonra ifadelenmiştir denebilir. İki genotip birbirine yakın değerler vermiştir. *HvSNAC1* geninin ve bu genin bulunduğu

SNAC ailesindeki genlerin, kuraklıkla birlikte ifadesinin arttığı çalışmalar mevcuttur. Puramık ve arkadaşlarının (2012), NAC transkripsiyon faktörleri ile yaptığı çalışmada, ikincil hücre duvarı biyosentezi, yaşlanma ve biyotik ve abiyotik stres toleransı dahil olmak üzere birçok gelişimsel sürecin düzenlenmesinde rol oynadığını belirtmiştir. Ayrıca tahıllarda ROS metabolizması homeostazısının teşvik edilmesinde ve düzenlenmesinde (Lee vd. 2012, Wu vd. 2012, You vd. 2013), kuraklık, soğuk ve tuzluluk streslerine karşı tepkilerin düzenlenmesinde, patojenlere karşı etki gösterilmesinde (Chen vd. 2013, Sun vd. 2013), çoklu streslerin düzenlenmesinde (Nuruzzaman vd. 2010) rol oynadığı gösterilmektedir. McGrann ve arkadaşları (2015), arpa stresine duyarlı NAC transkripsiyon faktörünün (*HvSNAC1*) ekspresyonunun, tuza ve kuraklığa toleransa verilen yanıtların düzenlenmesinde yer aldığını, ayrıca strese duyarlı genlerin ekspresyonunu değiştirdiğini ve ROS homeostazının yanı sıra stoma kapanmasını kontrol eden genleri hedeflediğini belirtmiştir. Strese duyarlı NAC1 (*SNAC1*) ile yapılan diğer çalışmalarda, Hu ve arkadaşları (2006), ilk olarak transgenik pirinçte (*OsSNAC1*) karakterize edilen ve bu transkripsiyon faktörünün kuraklık ve tuz toleransında olumlu bir rol oynadığı gösterilen *OsSNAC1*'in strese duyarlı genlerin ekspresyonunu artırarak abiyotik ve oksidatif stres toleransını düzenlediğini göstermiştir. You ve arkadaşları (2013), aynı transkripsiyon faktörünün stoma kapanması ve ROS homeostazını kontrol eden genleri hedeflediği belirtilmiştir. Al Abdallat ve arkadaşları (2014), NAC transkripsiyon faktörü ailesinden *OsSNAC1*'in ortolog arpa geni *HvSNAC1*'in aşırı ekspresyonunun da arpa bitkilerinde kuraklığa toleransı arttırdığını gözlemlemiştir. McGrann ve arkadaşlarının (2015), *HvSNAC1* transkripsiyon faktörünün aşırı ekspresyonu sonucu, arpada kuraklığa dayanıklılığı artırması yanında *Ramularia collo-cygni* mantar kolonizasyonu sonucu oluşan *Ramularia* yaprak lekesi semptomlarının şiddetini azalttığı belirtilmiştir. Gürel ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada, *HvSNAC1*'in aşırı ekspresyonunun, transgenik arpa bitkilerinin farklı gelişim aşamalarında yabani tip ve hatta ekili arpa ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir kuraklık toleransı ortaya koyduğunu göstermiştir. Bunun nedeninin, *HvSNAC1*'in bitkinin su durumunu iyileştirmesi, fotosentetik aktiviteleri artırması, biyolojik verimi teşvik ederek su kaybını azaltması olarak bildirilmiştir.

HvCBF4 geni, soğuk stresine karşı yanıt veren bir gen olarak bilinse de, kuraklık stresi ile de ilişkilendirilmiştir. Bu genin kuraklık stresine karşı arpa bitkisinin yanıtını etkilediği ve kuraklık dayanıklılığını artırdığı belirtilmiştir. Buna ek olarak, ABA adı verilen bir fitohormonun yanıtını düzenleyebilir. ABA, kuraklık stresi koşullarında üretilir ve bitkilerin suyu daha verimli kullanmalarına yardımcı olur. *HvCBF4* geni, ABA yanıtını etkileyerek bitkinin kuraklık stresine daha iyi adapte olmasına katkıda bulunabilir. *HvCBF4* ve benzeri genler, stomaların regülasyonunda rol oynayabilir. Stomalar, bitkilerin su kaybını kontrol etmelerine yardımcı olur. *HvCBF4* geninin etkisiyle, stomaların kapanması ve su kaybının azaltılması sağlanabilir. *HvCBF4* geninin içinde olduğu, transkripsiyon faktörleri içerisinde olan CBF/DREB ailesinin hücredeki görevi, genlerin ekspresyonunu düzenlemek, sinyal yollarında işlev görmek, bitkilerde düşük sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk toleransı ile ilgili sinyal iletim yollarında rol oynamak olarak tanımlanmıştır (Morran vd. 2011, Wu vd. 2011). Kizis ve arkadaşları (2001), DRE'ye bağlanan proteinlerden DREB1 ve DREB2 transkripsiyon faktörlerinin, DRE elementini taşıyan haberci (reporter) genin transkripsiyonunu sağladığını, arpada (*Hordeum vulgare* L. var. Tokak) PEG ile kuraklık uygulamasında abiyotik stres toleransının antioksidan savunma sistemindeki enzimlerle (peroksidaz, katalaz ve süperoksit dizmutaz) ilişkili olduğunu ve stres durumunda bu enzimlerin yüksek aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir. Ayrıca DREB2 transkripsiyon faktörlerinin hem tuz hem kuraklık stresi altında gen anlatımlarının arttığı qRT-PCR analizleri ile saptanmıştır. *Arabidopsis thaliana*'da bulunan DRE bağımlı CBF/DREB1 transkripsiyon faktörünü kodlayan gen ile arpada bulunan *HvCbf3*'ü kodlayan genin benzer olduğu Choi ve arkadaşları (2002) tarafından bildirilmiştir. Birçok bitki çeşidinde de CBF3 ve CBF4'ün ekspresyonunun kuraklık ve tuzluluk stresiyle arttığı, Haake ve arkadaşları (2002) tarafından belirtilmiştir. Skinner ve arkadaşları tarafından (2005), arpada *HvCBF1*, *HvCBF3* ve *HvCBF4* alt grubu olarak sınıflandırılan en az 20 CBF geni tespit edilmiştir. Örneğin arpa *HvCBF4* geni, *Arabidopsis*, *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da CBF/DREB1'e yakın homolog bir proteini kodladığı belirtilmiştir (Xiao vd. 2008).

Çalışmamızda, 5 genotipin de *HvCBF4* geninin ifadesinin kurak stresiyle beraber kademeli arttığı gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zaman her 5 genotip için de en yüksek değeri vermiştir. Genotipler arasında en yüksek ifadeyi

Tarm92 çeşidi vermiştir. Sayım40 ve Misket çeşitleri, Tarm92 çeşidine yakın değerler vererek sıralanmıştır. En düşük ifade değeri *H. spontaneum* genotipinde ölçülse de Avcı2002 çeşidi ile birbirlerine yakın değerler ölçülmüştür. Her iki genotip için de toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zaman ölçülen ifade seviyesi, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). *HvCBF4* geni ile kuraklık arasındaki ilişki, genellikle bitkilerin su stresine ve abiyotik streslere karşı yanıt verme mekanizmalarını anlamak ve bitkilerin daha dayanıklı hale getirilmesine yönelik çalışmalarda araştırılmıştır. Bu genin ifadesinin artırılması, bitkilerin kuraklık koşullarına karşı daha iyi adapte olmalarına ve daha yüksek kuraklık dayanıklılığına sahip olmalarına katkıda bulunabilir. Oh ve arkadaşlarının (2007) bir arpa geni olan *HvCBF4*'ü izale ederek yaptıkları çalışmada, transgenetik çeltik bitkilerinde *HvCBF4*'ün aşırı ekspresyonu sonucu olarak herhangi bir gelişme geriliği olmadan kuraklığa, yüksek tuzluluk ve düşük sıcaklık stresine karşı tolerans artışına neden olduğunu bildirmişlerdir. Wu ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada *HvCBF4* geninin Tibet yabani arpasında tuzluluk toleransı ile önemli oranda ilişkili olduğu, tuzlulukla ifadesinin arttığı bulunmuştur. Lourenço ve arkadaşlarının (2011) yalnızca *HvCBF4*'ü ifade eden transgenetik çeltik bitkilerinin kuraklık stresine karşı kontrol grubu olan transgenetik olmayan bitkilere kıyasla daha dayanıklı olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, bu bitkilerin kontrol grubuna göre fotosentez kapasitelerinin daha yüksek olduğunu ve stres koşullarına yanıt veren genlerin (>400) regülasyonunun arttığını vurgulamışlardır. *HvCBF4* genlerinin arpada abiyotik stres koşullarına karşı önemli rol oynadığı yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir. Örnek olarak Francia ve arkadaşlarının (2016) arpada *HvCBF4*'ün kopya sayısının arttığı genotiplerde dona dayanıklılığın da doğru orantılı olarak arttığını bulmuşlardır.

HSP17.8 geni, abiyotik streslere karşı bitkilerin yanıt verme mekanizmalarının bir parçası olarak ifade edilen bir sıcaklık şok proteinidir (heat shock protein, HSP). Ayrıca "small heat shock protein (sHSP)" olarak da adlandırılır. *HSP17.8* bitkilerin stres koşullarına karşı dayanıklılığını artırmada önemli bir rol oynarlar. Bu proteinler, proteinin yanlış katlanmasını veya toplanmasını önledikleri için kontrol ve stres koşulları altında protein işlevselliğini sağlar. Ayrıca normal büyüme, gelişme ve çeşitli streslere yanıt için çok önemlidir (Wu vd. 2022, Ghouili vd. 2023).

Çalışmamızda, 5 genotipin de *HSP17.8* geninin ifadesinin kurak stresiyle beraber kademeli arttığı gözlenmiştir. Toprak su kapasitesi %10 altına düştüğü zaman her 5 genotip için de en yüksek değerini vermiştir. Genotipler arasında en yüksek ifadeyi Tarm92 çeşidi vermiştir. Sayım40 ve Misket çeşitlerinin ifade seviyeleri birbirlerine çok yakın ölçülmüştür. En düşük ifade değeri *H. spontaneum* genotipinde ölçülmüştür. Avcı2002 çeşidi, *H. spontaneum* genotipine yakın ifade seviyesinde kaydedilmiştir. Her iki genotip toprak su kapasitesi %20'ye düştüğü günden sonra ölçülen ifade seviyeleri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). HSP'lerin kuraklık stresi altında nasıl davrandığı bitki türüne, stres düzeyine ve genel büyüme koşullarına bağlı olarak değişebilir. Ancak genel olarak, HSP'lerin ifade seviyelerinin artması, bitkilerin kuraklık stresine karşı koruma mekanizmalarını harekete geçirdiğini ve hücrel sağlığı sürdürmeye çalıştığını gösterebilir. Gerçekleştirilen abiyotik stres araştırmalarında bitkilerin birçoğunda HSP'lerin kuraklık stresi ile indüklendiği görülmüştür (Mikolajczak vd. 2023). Guo ve arkadaşları (2009) arpanın (*Hordeum vulgare* L.) kuraklık stresine adaptasyonundaki genetiksel cevabını tanımlamak için, mikroarray yöntemi kullanarak stres altındaki yaprakların transkripsiyonel değişimlerini belirlemiştir. Membranların ve proteinlerin stabilizasyonu (ısı-şok proteinlerinden *HSP17.8* ve dehidrin proteinlerinden *DHN3*) ile ilgili genler, toleranslı çeşitler tarafından ifade edilmiş ve bu genlerin kodladığı proteinlerin kuraklık stresine toleransı arttırdığı bulunmuştur. Kasım ve arkadaşları (2012), buğdayda yapılan kuraklık çalışmasında, stresin etkisiyle taze ağırlık, kuru ağırlık ve su içeriğinde düşme, kuraklık stresi ile ilgili olan *APX1*, *SAMS1* ve *HSP17.8* genlerinin ifadesinde artma olduğunu gözlemlemiştir. Sun ve arkadaşlarının (2001), transgenik Arabidopsis bitkisinde kuraklık ve tuzluluk stresi etkilerini çalıştıkları araştırmada *AtHSP17.7* geninin ifadesinin arttığını ve bitkiyi kuraklık ve tuzluluk stresine karşı tolere ettiği saptanmıştır. Cocetta ve arkadaşlarının (2022) yaptığı çalışmada, bazı HSP'lerin bitki gelişimi sırasında rol oynadıklarını öne sürerken, *HSP 70* ve küçük ısı şoku proteini (sHSP) gibi diğer HSP'lerin ısı stresi altında yukarı regüle edildiğini, bu da bunların ısı stresi dahil abiyotik strese karşı koruyucu bir işlev sergilediklerini öne sürdüğünü belirtmişlerdir.

6. SONUÇ

Abiyotik stres, dünya genelinde, gıda üretimi ve güvenliğini kısıtlayan en büyük etmenlerden biridir. Bitkideki abiyotik streslerin etkisi, iklim değişikliği ile birlikte hızla artmaktadır. Özellikle kuraklık stresi, tarımsal alanların kullanılabilirliği ve kalitesini olumsuz etkilemesinin yanı sıra bitkiler üzerinde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Daha verimli bitki yetiştiriciliği için, strese cevap ve tolerans mekanizmalarının aydınlatılması çok önemlidir.

Strese karşı bitkilerin verdiği tepkiler, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler şekilde çok çeşitli olabilmektedir. Bu tez çalışmasında da erken fide döneminde kuraklık stresi uygulanan Tarm92, Sayım40, Misket, Avcı2002 ve *H. spontaneum* arpa genotiplerinin strese verdikleri tepkiler incelenmiştir. Kuraklık stresi arttıkça bitki büyümesi, taze/kuru ağırlıkları, yaprak içerisindeki suyun miktarı ve yapraklardan ölçülen klorofil miktarı düşmüştür. Tarm92 çeşidinin diğer genotiplere göre yüksek değer verdiği ölçülmüştür. Pek çok bitki türünde stres altında prolin birikiminin, stres toleransı ile ilişkili olduğu ve konsantrasyonunun strese duyarlı bitkilerde strese toleranslı bitkilere oranla daha yüksek olduğu daha önce yapılan çalışmalarda ve bizim çalışmamızda da belirtilmiştir. Tarm92 çeşidi, toprak su kapasitesi %20 ve %10'a düştüğü günlerde prolin ifadesini en çok arttıran genotip olmuştur. Sayım40 ve Misket çeşitleri de Tarm92 çeşidine çok yakın prolin değerleri vermiştir. Strese cevapta rol oynayan sinyal yollarının ve mekanizmanın, bunların sorumlu olduğu genlerin incelenmesi, genotiplerin strese tolerans mekanizmasının ve farklılıklarının anlaşılması hangi genlerin etkinleştiği ve hangi sinyal yollarının devreye girdiğini anlamada çok önemlidir. *HVA1*, *Dhn3*, *HvSNAC1*, *HvCBF4*, *HSP17.8* gen ifadelerinin incelendiği çalışmamızda Tarm92 çeşidi tümünde en yüksek ifadeyi vermiştir.

Morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler ölçümler, bitkilerin kuraklık stresine nasıl tepki verdiğini anlamak için farklı açılardan yaklaşan farklı araştırma yöntemleridir. Çalışmamız içinde tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, Tarm92, Sayım40 ve Misket çeşitlerinin kuraklığa; Avcı2002 çeşidi ve *H. spontaneum* genotipinden daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. Birçok çalışma farklı bitki türlerinin kuraklık stresine

karşı farklı tepkiler verdiğini, bitkilerin kuraklık stresine duyarlılığının, stres derecesine, farklı stres faktörlerine, bitki türlerine ve gelişim evrelerine bağlı olarak şekillendiğini belirtmiştir. Bu tez çalışmasının, bitki metabolizmasının kuraklığa karşı verimini ve çevresel baskılara karşı toleransını artıracak moleküler mekanizmaların daha fazla araştırılması için iyi bir kaynak olacağı düşünülmektedir. Kurağa dayanıklılığı iyi olan çeşitlerin geliştirilmesi ve mevcut alanda üretimi arttırma yollarının araştırılması ıslahçıların temel hedefleri arasında olmalıdır. Morfolojik, fizyolojik ve moleküler ölçümler arasındaki kıyaslama, bitkinin stres yanıtını daha derinlemesine anlamak için çok önemlidir. Birleştirilmiş yaklaşımlar, bitkinin stresle nasıl etkileşime girdiğini daha geniş bir perspektifle ortaya koyabilir ve böylece daha iyi stratejiler geliştirmemize yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- Abdelaal, K. A., Attia, K. A., Alamery, S. F., El-Afry, M. M., Ghazy, A. I., Tantawy, D. S., Al-Doss, A. A., El-Shawy, E.-S. E., M. Abu-Elsaoud, A., and Hafez, Y. M. (2020). Exogenous application of proline and salicylic acid can mitigate the injurious impacts of drought stress on barley plants associated with physiological and histological characters. *Sustainability*, 12(5), 1736.
- Abdul Aziz, M., Sabeem, M., Mullath, S. K., Brini, F., and Masmoudi, K. (2021). Plant group II LEA proteins: intrinsically disordered structure for multiple functions in response to environmental stresses. *Biomolecules*, 11(11), 1662.
- Acar, R., Yorgancilar, M., Atalay, E., ve Yaman, C (2011). Farklı Tuz Uygulamalarının Bezelyede (*Pisum sativum* L.) Bağlı Su İçeriği, Klorofil ve Bitki Gelişimine Etkisi.
- Agarwal, P., and Jha, B. (2010). Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*, 54(2), 201-212.
- Aggarwal, M., Sharma, S., Kaur, N., Pathania, D., Bhandhari, K., Kaushal, N., Kaur, R., Singh, K., Srivastava, A., and Nayyar, H. (2011). Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Biological trace element research*, 140, 354-367.
- Aghdam, M. S., Luo, Z., Jannatizadeh, A., Sheikh-Assadi, M., Sharafi, Y., Farmani, B., Fard, J. R., and Razavi, F. (2019). Employing exogenous melatonin applying confers chilling tolerance in tomato fruits by upregulating ZAT2/6/12 giving rise to promoting endogenous polyamines, proline, and nitric oxide accumulation by triggering arginine pathway activity. *Food Chemistry*, 275, 549-556.
- Akinwale, R., Ogunniyi, O., and Umunnakwe, E. (2016). Differential Response of Early And Extra-Early Maize Hybrids To Drought Imposed At Seedling And Flowering Stages. *Ife Journal of Agriculture*, 28(2), 12-23.
- Aktaş, H. (2017). Türkiye’de Yoğun Ekim Alanına Sahip Arpa (*Hordeum Vulgare* L.) Çeşitlerinin Destek Sulamalı ve Yağışa Dayalı Şartlarda Değerlendirilmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(3), 86-97.
- Al-anany, F., Eldenary, M., and Hegab, A. (2023). Up-Regulation Of Some Stress Related Genes Associated With Salinity Tolerance In *Oryza Sativa* Plants Under Phosphate Starvation Condition. *Journal of Sustainable Agricultural and Environmental Sciences*, 2(2), 1-16.
- Al Abdallat, A., Ayad, J., Abu Elenein, J., Al Ajlouni, Z., and Harwood, W. (2014). Overexpression of the transcription factor HvSNAC1 improves drought tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Breeding*, 33, 401-414.
- Alghabari, F., Ihsan, M. Z., Hussain, S., Aishia, G., and Daur, I. (2015). Effect of Rht alleles on wheat grain yield and quality under high temperature and drought stress

- during booting and anthesis. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 15506-15515.
- Alghabari, F., Ihsan, M. Z., Khaliq, A., Hussain, S., Daur, I., Fahad, S., and Nasim, W. (2016). Gibberellin-sensitive Rht alleles confer tolerance to heat and drought stresses in wheat at booting stage. *Journal of cereal science*, 70, 72-78.
- AlKahtani, M. D., Hafez, Y. M., Attia, K., Rashwan, E., Husnain, L. A., AlGwaiz, H. I., and Abdelaal, K. A. (2021). Evaluation of silicon and proline application on the oxidative machinery in drought-stressed sugar beet. *Antioxidants*, 10(3), 398.
- Alkharabsheh, H. M., Seleiman, M. F., Hewedy, O. A., Battaglia, M. L., Jalal, R. S., Alhammad, B. A., Schillaci, C., Ali, N., and Al-Doss, A. (2021). Field crop responses and management strategies to mitigate soil salinity in modern agriculture: A review. *Agronomy*, 11(11), 2299.
- Allahverdiyev, T. I., Talai, J. M., Huseynova, I. M., and Aliyev, J. A. (2015). Effect of drought stress on some physiological parameters, yield, yield components of durum (*Triticum durum* desf.) and bread (*Triticum aestivum* L.) wheat genotypes. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*, 1(1), 50-62.
- Anjum, S. A., Farooq, M., Xie, X.-y., Liu, X.-j., and Ijaz, M. F. (2012). Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. *Scientia horticulturae*, 140, 66-73.
- Anjum, S. A., Xie, X., Farooq, M., Wang, L., Xue, L., Shahbaz, M., and Salhab, J. (2011b). Effect of exogenous methyl jasmonate on growth, gas exchange and chlorophyll contents of soybean subjected to drought. *African Journal of Biotechnology*, 10(47), 9647-9656.
- Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., and Lei, W. (2011a). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, 6(9), 2026-2032.
- Aprile, A., Havlickova, L., Panna, R., Marè, C., Borrelli, G. M., Marone, D., Perrotta, C., Rampino, P., De Bellis, L., and Curn, V. (2013). Different stress responsive strategies to drought and heat in two durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency. *BMC genomics*, 14(1), 1-18.
- Arjenaki, F. G., Jabbari, R., and Morshedi, A. (2012). Evaluation of drought stress on relative water content, chlorophyll content and mineral elements of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)*, 4(11), 726-729.
- Aroca, R. (2012). Plant responses to drought stress. *From Morphological to Molecular Features*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1-5.
- Ashraf, M., and Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216.

- Atar, F., ve Bayraktar, A. (2022). Klorofil İçeriğinin Tespitinde Ekstraksiyon Yöntemi ve Klorofilmetre (Spad) Ölçümleri Arasındaki İlişki. *Ziraat, Orman ve Su Ürünleri Alanında Uluslararası Araştırmalar IV*, 5.
- Babu, R. C., Zhang, J., Blum, A., Ho, T.-H. D., Wu, R., and Nguyen, H. (2004). HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant science*, 166(4), 855-862.
- Badr, A., Sch, R., Rabey, H. E., Effgen, S., Ibrahim, H., Pozzi, C., Rohde, W., and Salamini, F. (2000). On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 499-510.
- Bahieldin, A., Mahfouz, H. T., Eissa, H. F., Saleh, O. M., Ramadan, A. M., Ahmed, I. A., Dyer, W. E., El-Itriby, H. A., and Madkour, M. A. (2005). Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, 123(4), 421-427.
- Baik, B.-K., and Ullrich, S. E. (2008). Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of cereal science*, 48(2), 233-242.
- Bandurska, H., Niedziela, J., Pietrowska-Borek, M., Nuc, K., Chadzinikolau, T., and Radzikowska, D. (2017). Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. *Plant physiology and biochemistry*, 118, 427-437.
- Bashir, S. S., Hussain, A., Hussain, S. J., Wani, O. A., Zahid Nabi, S., Dar, N. A., Baloch, F. S., and Mansoor, S. (2021). Plant drought stress tolerance: Understanding its physiological, biochemical and molecular mechanisms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1912-1925.
- Bates, L. S., Waldren, R. a., and Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhriss, M., and Ben Abdullah, F. (2010). Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4216-4222.
- Berger, J., Palta, J., and Vadez, V. (2016). An integrated framework for crop adaptation to dry environments: Responses to transient and terminal drought. *Plant science*, 253, 58-67.
- Bhardwaj, S., Verma, T., Raza, A., and Kapoor, D. (2023). Silicon and Nitric Oxide-Mediated Regulation of Growth Attributes, Metabolites and Antioxidant Defense System of Radish (*Raphanus sativus* L.) under Arsenic Stress. *Phyton (0031-9457)*, 92(3).
- Bhargava, S., and Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant breeding*, 132(1), 21-32.

- Bielach, A., Hrtyan, M., and Tognetti, V. B. (2017). Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1427.
- Bijalwan, P., Sharma, M., and Kaushik, P. (2022). Review of the effects of drought stress on plants: A systematic approach.
- Bitterlich, M., Franken, P., and Graefe, J. (2019). Atmospheric drought and low light impede mycorrhizal effects on leaf photosynthesis—a glasshouse study on tomato under naturally fluctuating environmental conditions. *Mycorrhiza*, 29, 13-28.
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current opinion in cell biology*, 12(4), 431-434.
- Boudsocq, M., and Lauriere, C. (2005). Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant physiology*, 138(3), 1185-1194.
- Bray, E. A. (2000). Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and molecular biology of plants*, 1158-1203.
- Britannica, T. (2020). Editors of encyclopaedia. Argon. *Encyclopedia Britannica*.
- Brodersen, C. R., Roddy, A. B., Wason, J. W., and McElrone, A. J. (2019). Functional status of xylem through time. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 407-433.
- Bukhari, S. A. H., Peerzada, A. M., Javed, M. H., Dawood, M., Hussain, N., and Ahmad, S. (2019). Growth and development dynamics in agronomic crops under environmental stress. *Agronomic Crops: Volume 1: Production Technologies*, 83-114.
- Büyük, İ. (2014). Tuz ve kuraklık stresi altında geliştirilmiş farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşitlerinde lea-3 geni mRNA ifade seviyelerinin kantitatif real-time pcr yöntemiyle incelenmesi.
- Büyük, İ., SOYDAM-AYDIN, S., and Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2).
- Büyük, İ., İlhan, E., Şener, D. et al. Genome-wide identification of CAMTA gene family members in *Phaseolus vulgaris* L. and their expression profiling during salt stress. *Mol Biol Rep* 46, 2721–2732 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04716-8>
- Cai, J., Chang, T., Zhao, Y., He, H., Li, J., Xi, Q., Fu, J., and Zhao, Y. (2022). Effects of varying temperature on rhythmic expression of abiotic stress-responding genes in Tibetan hullless barley. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(3), 38.
- Can, H. (2015). *Farklı buğday genotiplerinin tuz stresine tepkileri ile besin elementi içeriği arasındaki ilişkilerin belirlenmesi* [Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.-W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., Marè, C., Tondelli, A., and Stanca, A. M. (2008). Drought tolerance

- improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field crops research*, 105(1-2), 1-14.
- Chaudhry, S., and Sidhu, G. P. S. (2022). Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review. *Plant cell reports*, 41(1), 1-31.
- Chaves, M. M., Flexas, J., and Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4), 551-560.
- Checker, V. G., Chhibbar, A. K., and Khurana, P. (2012). Stress-inducible expression of barley Hva1 gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress. *Transgenic research*, 21, 939-957.
- Chen, F., Dong, J., Wang, F., Wu, F., Zhang, G., Li, G., Chen, Z., Chen, J., and Wei, K. (2007). Identification of barley genotypes with low grain Cd accumulation and its interaction with four microelements. *Chemosphere*, 67(10), 2082-2088.
- Chen, Y.-J., Perera, V., Christiansen, M. W., Holme, I. B., Gregersen, P. L., Grant, M. R., Collinge, D. B., and Lyngkjær, M. F. (2013). The barley HvNAC6 transcription factor affects ABA accumulation and promotes basal resistance against powdery mildew. *Plant molecular biology*, 83, 577-590.
- Choi, D.-W., Rodriguez, E. M., and Close, T. J. (2002). Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location. *Plant physiology*, 129(4), 1781-1787.
- Choi, H.-i., Hong, J.-h., Ha, J.-o., Kang, J.-y., and Kim, S. Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1723-1730.
- Choudhary, N., Sairam, R., and Tyagi, A. (2005). Expression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.).
- Cocetta, G., Landoni, M., Pilu, R., Repiso, C., Nolasco, J., Alajarin, M., Ugena, L., Levy, C. C., Scatolino, G., and Villa, D. (2022). Priming treatments with biostimulants to cope the short-term heat stress response: A transcriptomic profile evaluation. *Plants*, 11(9), 1130.
- Corso, D., Delzon, S., Lamarque, L. J., Cochard, H., Torres-Ruiz, J. M., King, A., and Brodribb, T. (2020). Neither xylem collapse, cavitation, or changing leaf conductance drive stomatal closure in wheat. *Plant, cell & environment*, 43(4), 854-865.
- Cramer, G. R., Ergül, A., Grimplet, J., Tillett, R. L., Tattersall, E. A., Bohlman, M. C., Vincent, D., Sonderegger, J., Evans, J., and Osborne, C. (2007). Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional & integrative genomics*, 7, 111-134.
- Cseuz, L. (2002). Wheat breeding for tolerance to drought stress at the Cereal Research Non-Profit Company. *Acta Biologica Szegediensis*, 46(3-4), 25-26.

- Curran, P. J., Dungan, J. L., and Gholz, H. L. (1990). Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll content in slash pine. *Tree physiology*, 7(1-2-3-4), 33-48.
- Çulha Erdal, Ş. (2017). Aspir Genotiplerinde Kuraklığa Dayanıklılığın Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Düzeyde İncelenmesi.
- Dar, M. I., Naikoo, M. I., Rehman, F., Naushin, F., and Khan, F. A. (2016). Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies*, 155-166.
- Dawson, I. K., Russell, J., Powell, W., Steffenson, B., Thomas, W. T., and Waugh, R. (2015). Barley: a translational model for adaptation to climate change. *New Phytologist*, 206(3), 913-931.
- Demirel, K., Genç, L., Çamoğlu, G., and Aşık, Ş. (2010). Assessment of water stress using chlorophyll readings and leaf water content for watermelon. *Journal of Tekirdag agricultural faculty*, 7(3), 155-162.
- Denčić, S., Kastori, R., Kobiljski, B., and Duggan, B. (2000). Evaluation of grain yield and its components in wheat cultivars and landraces under near optimal and drought conditions. *Euphytica*, 113, 43-52.
- Deng, G., Liang, J., Xu, D., Long, H., Pan, Z., and Yu, M. (2013). The relationship between proline content, the expression level of P5CS (Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase), and drought tolerance in Tibetan hulless barley (*Hordeum vulgare* var. nudum). *Russian Journal of Plant Physiology*, 60, 693-700.
- DeVincentis, A. J., Guillon, H., Díaz Gómez, R., Patterson, N. K., van den Brandeler, F., Koehl, A., Ortiz-Partida, J. P., Garza-Díaz, L. E., Gamez-Rodríguez, J., and Goharian, E. (2021). Bright and blind spots of water research in Latin America and the Caribbean. *Hydrology and Earth System Sciences*, 25(8), 4631-4650.
- Dirik, K. Ö., Sakin, M. A., İnanç, M., ve Sönmez, F. (2022). Bazı Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşitlerinin Tokat-Kazova Koşullarında Verim ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(4), 800-810.
- Dolferus, R. (2014). To grow or not to grow: a stressful decision for plants. *Plant science*, 229, 247-261.
- Duan, Z., Kong, F., Zhang, L., Li, W., Zhang, J., and Peng, L. (2016). A bestrophin-like protein modulates the proton motive force across the thylakoid membrane in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(10), 848-858.
- Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H. D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., and Sung, Z. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant molecular biology*, 12, 475-486.

- Egert, M., and Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 43-49.
- Eğilmez, S. (2022). Ürün Raporu Arpa. Kasım 2022. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, *Tepge Yayın* No: 361, ISBN: 978-625-8451-56-6
- Ejaz, B., Sajid, Z. A., and Aftab, F. (2012). Effect of exogenous application of ascorbic acid on antioxidant enzyme activities, proline contents, and growth parameters of *Saccharum* spp. hybrid cv. HSF-240 under salt stress. *Turkish Journal of Biology*, 36(6), 630-640.
- El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I., and Sofy, M. R. (2020). Role of ascorbic acid, glutathione and proline applied as singly or in sequence combination in improving chickpea plant through physiological change and antioxidant defense under different levels of irrigation intervals. *Molecules*, 25(7), 1702.
- El Moukhtari, A., Cabassa-Hourton, C., Farissi, M., and Savouré, A. (2020). How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development? *Frontiers in plant science*, 11, 1127.
- Ergun, N., Aydogan, S., and Sarı, A. (2012). Cereal production and agronomic innovation in Turkey. *Watch Letter*, 23, 36-39.
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., and Saud, S. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in plant science*, 1147.
- Fahrettin, A., and GÜNEY, D. (2021). Doğu gürgeni (*Carpinus orientalis* Mill.) fidanlarında farklı önilem ve yükseltiye bağlı olarak klorofil içeriğinin değişimi. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 23(1), 236-243.
- Farooq, M., Gogoi, N., Barthakur, S., Baroowa, B., Bharadwaj, N., Alghamdi, S. S., and Siddique, K. H. (2017). Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(2), 81-102.
- Forster, B., Ellis, R., Thomas, W., Newton, A., Tuberosa, R., This, D., El-Enein, R., Bahri, M., and Ben Salem, M. (2000). The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. *Journal of Experimental Botany*, 51(342), 19-27.
- Fougere, F., Le Rudulier, D., and Streeter, J. G. (1991). Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant physiology*, 96(4), 1228-1236.
- Francia, E., Morcia, C., Pasquariello, M., Mazzamurro, V., Milc, J. A., Rizza, F., Terzi, V., and Pecchioni, N. (2016). Copy number variation at the HvCBF4–HvCBF2 genomic segment is a major component of frost resistance in barley. *Plant molecular biology*, 92, 161-175.

- Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F., and Bartels, D. (2000). Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Cell*, 12(1), 111-123.
- Furlan, A. L., Bianucci, E., Giordano, W., Castro, S., and Becker, D. F. (2020). Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. *Plant physiology and biochemistry*, 151, 566-578.
- Ganguly, M., Datta, K., Roychoudhury, A., Gayen, D., Sengupta, D. N., and Datta, S. K. (2012). Overexpression of Rab16A gene in indica rice variety for generating enhanced salt tolerance. *Plant signaling & behavior*, 7(4), 502-509.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.-F., and Dommes, J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37, 263-285.
- Ghane, S., Lokhande, V., and Nikam, T. (2012). Differential growth, physiological and biochemical responses of niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) cultivars to water-deficit (drought) stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 215-225.
- Ghani, M., Sato, C., and Rogaeva, E. (2013). Segmental duplications in genome-wide significant loci and housekeeping genes; warning for GAPDH and ACTB. *Neurobiology of aging*, 34(6), 1710. e1711-1710. e1714.
- Ghouili, E., Sassi, K., Hidri, Y., M'Hamed, H.C., Somenahally, A., Xue, Q., Jebara, M.; Nefissi Ouertani, R., Riahi, J., de Oliveira, A.C., et al. (2023). Effects of Date Palm Waste Compost Application on Root Proteome Changes of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plants*. 12, 526.
- Gill, S. S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Goche, T., Shargie, N. G., Cummins, I., Brown, A. P., Chivasa, S., and Ngara, R. (2020). Comparative physiological and root proteome analyses of two sorghum varieties responding to water limitation. *Scientific reports*, 10(1), 11835.
- Godoy, F., Olivos-Hernández, K., Stange, C., and Handford, M. (2021). Abiotic stress in crop species: improving tolerance by applying plant metabolites. *Plants*, 10(2), 186.
- González-Villagra, J., Kurepin, L. V., and Reyes-Díaz, M. M. (2017). Evaluating the involvement and interaction of abscisic acid and miRNA156 in the induction of anthocyanin biosynthesis in drought-stressed plants. *Planta*, 246, 299-312.
- Gozukirmizi, N., and Karlik, E. (2017). Barley (*Hordeum vulgare* L.) improvement past, present and future. *Brewing Technology*, 49-78.
- Graether, S. P., and Boddington, K. F. (2014). Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Frontiers in plant science*, 5, 576.

- Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., Von Korff, M., Varshney, R. K., Graner, A., and Valkoun, J. (2009). Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of experimental botany*, 60(12), 3531-3544.
- Guo, Y., Yu, H., Yang, M., Kong, D., and Zhang, Y. (2018). Effect of drought stress on lipid peroxidation, osmotic adjustment and antioxidant enzyme activity of leaves and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. seedling. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65, 244-250.
- Gupta, A., Rico-Medina, A. & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368, 266–269.
- Gül, V. 2022. Stres Terminolojisi. İksad yayınevi, syf. 7, Ankara. *Bitkilerde Abiyotik ve Biyotik Stres Yönetimi*. Seçkin-Dinler, B. ve Gül, V. ISBN: 978-625-6380-66-0.
- Güler, N. S., and Terzi, R. (2020). Dehydrins: an overview of current approaches and advancement. *Turkish Journal of Botany*, 44(5), 481-492.
- Gürel, A., and Avcıoğlu, R. (2001). Bitkilerde strese dayanıklılık fizyolojisi. *Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, 21, 308-313.
- Gürel, F., Öztürk, Z. N., Uçarlı, C., and Rosellini, D. (2016). Barley genes as tools to confer abiotic stress tolerance in crops. *Frontiers in plant science*, 7, 1137.
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J. L., Pineda, O., Thomashow, M. F., and Zhang, J. Z. (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 130(2), 639-648.
- Habib, I., Shahzad, K., Rauf, M., Ahmad, M., Alsamadany, H., Fahad, S., and Saeed, N. A. (2022). Dehydrin responsive HVA1 driven inducible gene expression enhanced salt and drought tolerance in wheat. *Plant physiology and biochemistry*, 180, 124-133.
- Hanif, S., Saleem, M. F., Sarwar, M., Irshad, M., Shakoore, A., Wahid, M. A., and Khan, H. Z. (2021). Biochemically triggered heat and drought stress tolerance in rice by proline application. *Journal of plant growth regulation*, 40, 305-312.
- Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., and Kuboi, T. (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217, 290-298.
- Harwood, W. (2016). Barley as a cereal model for biotechnology applications. In *Biotechnology of major cereals* (pp. 80-87). CABI Wallingford UK.
- He, J., Du, Y.-L., Wang, T., Turner, N. C., Yang, R.-P., Jin, Y., Xi, Y., Zhang, C., Cui, T., and Fang, X.-W. (2017). Conserved water use improves the yield performance of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under drought. *Agricultural Water Management*, 179, 236-245.

- Hien, D.T., Jacobs, M., Angenon, G., Hermans, C., Thu, T.T., Son, L.V. and Roosens, N.H. (2003). Proline accumulation and Δ^1 -pyrroline-5- carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. *Plant Sci.* 165, 1059–1068.
- Honsdorf, N., March, T. J., Hecht, A., Eglinton, J., and Pillen, K. (2014). Evaluation of juvenile drought stress tolerance and genotyping by sequencing with wild barley introgression lines. *Molecular Breeding*, 34, 1475-1495.
- Houde, M., Dallaire, S., N'Dong, D., and Sarhan, F. (2004). Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnology Journal*, 2(5), 381-387.
- Hsu, S., Hsu, Y. T., and Kao, C. H. (2003). Ammonium ion, ethylene, and abscisic acid in polyethylene glycol-treated rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46, 239-242.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., and Xiong, L. (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 103(35), 12987-12992.
- Hussain, M., Malik, M., Farooq, M., Ashraf, M., and Cheema, M. (2008). Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(3), 193-199.
- ICARDA (2000). Stress Physiology. Germplasm Program. Annual Report, 46-48. ICARDA, Aleppo.
- James, V. A., Neibaur, I., and Altpeter, F. (2008). Stress inducible expression of the DREB1A transcription factor from xeric, *Hordeum spontaneum* L. in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge) enhances abiotic stress tolerance. *Transgenic research*, 17, 93-104.
- Janská, A., Hodek, J., Svoboda, P., Zámečník, J., Prášil, I. T., Vlasáková, E., Milella, L., and Ovesná, J. (2013). The choice of reference gene set for assessing gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) under low temperature and drought stress. *Molecular genetics and genomics*, 288, 639-649.
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Satish, L., Pandian, S. K., Chen, J.-T., Ahmar, S., Wang, X., Mora-Poblete, F., and Ramesh, M. (2021). An overview of abiotic stress in cereal crops: negative impacts, regulation, biotechnology and integrated omics. *Plants*, 10(7), 1472.
- Jung, J., Won, S. Y., Suh, S. C., Kim, H., Wing, R., Jeong, Y., Hwang, I., and Kim, M. (2007). The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Planta*, 225, 575-588.
- Kacar, B., Katkat, A., and Öztürk, Ş. (2002). Bitki fizyolojisi. uludağ üniversitesi güçlendirme vakfı Yayın No: 198. *VİPAŞ AŞ Yayın*(74).

- Kader, A. A., Almeslemani, M., Baghdady, A., Alzubi, H., Alasaad, N., Basha, N. A., Dameriha, A., Jacobsen, H., and Hassan, F. (2012). Isolation, characterization of the *hva1* gene from Syrian barley varieties and cloning into a binary plasmid vector. *International Journal of Botany*, 8(3), 117-126.
- Kadioilu, I. (2004). Allelopathic effects of plant extracts against seed germination of some weeds. *Asian J. Plant Sci.*, 3, 472-475.
- Kamran, M., Shahbaz, M., Ashraf, M., and Akram, N. A. (2009). Alleviation of drought-induced adverse effects in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) using proline as a pre-sowing seed treatment. *Pak. J. Bot.*, 41(2), 621-632.
- Kang, J., Hwang, J.-U., Lee, M., Kim, Y.-Y., Assmann, S. M., Martinoia, E., and Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 107(5), 2355-2360.
- Kano, M., Inukai, Y., Kitano, H., and Yamauchi, A. (2011). Root plasticity as the key root trait for adaptation to various intensities of drought stress in rice. *Plant and Soil*, 342, 117-128.
- Karami, A., Shahbazi, M., Niknam, V., Shobbar, Z. S., Tafreshi, R. S., Abedini, R., and Mabood, H. E. (2013). Expression analysis of dehydrin multigene family across tolerant and susceptible barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes in response to terminal drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 2289-2297.
- Kasim, W. A., Osman, M. E., Omar, M. N., Abd El-Daim, I. A., Bejai, S., and Meijer, J. (2013). Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. *Journal of plant growth regulation*, 32, 122-130.
- Kaur, G., and Asthir, B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum*, 59, 609-619.
- Kaur, G., and Asthir, B. (2017). Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*, 61, 201-209.
- Kaur, S., Tiwari, V., Kumari, A., Chaudhary, E., Sharma, A., Ali, U., & Garg, M. (2022). Protective and defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: An emerging application in sustainable agriculture. *Journal of Biotechnology*.
- Kaushal, N., Gupta, K., Bhandhari, K., Kumar, S., Thakur, P., and Nayyar, H. (2011). Proline induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17, 203-213.
- Kavi Kishor, P. B., & Sreenivasulu, N. E. S. E. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant, cell & environment*, 37(2), 300-311.

- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W., and Cuypers, A. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, cell & environment*, 36(7), 1242-1255.
- Khazaei, Z., Esmailpour, B., and Estaji, A. (2020). Ameliorative effects of ascorbic acid on tolerance to drought stress on pepper (*Capsicum annuum* L) plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 1649-1662.
- Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Wahid, A. A. A., Quick, W. P., and Abogadallah, G. M. (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of experimental botany*, 54(392), 2553-2562.
- Khoyerd, F. F., Shamshiri, M. H., and Estaji, A. (2016). Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress. *Scientia horticulturae*, 198, 44-51.
- Kizis, D., Lumberras, V., and Pagès, M. (2001). Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS letters*, 498(2-3), 187-189.
- Konur, C., and Akgün, İ. (2022). Melezleme ve Mutasyonla Elde Edilen İki Sıralı Arpa Genotiplerinde Bazı Tarımsal Özelliklerin Belirlenmesi. *Türk Bilim ve Mühendislik Dergisi*, 4(2), 67-75.
- Kooyers, N. J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant science*, 234, 155-162.
- Korkmaz, H., and Durmaz, A. (2017). Bitkilerin abiyotik stres faktörlerine karşı geliştirilen cevaplar. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2), 192-207.
- Kosová, K., Vítámvás, P., and Prášil, I. T. (2014). Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity—what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? *Frontiers in plant science*, 5, 343.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., and Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics*, 74(8), 1301-1322.
- Kowalik, S., and Groszyk, J. (2023). Profiling of Barley, Wheat, and Rye FPG and OGG1 Genes during Grain Germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12354.
- Köten, M., Ünsal, S., and Atlı, A. (2013). Arpanın insan gıdası olarak değerlendirilmesi. *Turkish Journal Of Agriculture-Food Science And Technology*, 1(2), 51-55.
- Krasensky, J.; Jonak, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **2012**, 63, 1593–1608.
- Kumar, M., Kesawat, M. S., Ali, A., Lee, S.-C., Gill, S. S., and Kim, H. U. (2019). Integration of abscisic acid signaling with other signaling pathways in plant stress responses and development. *Plants*, 8(12), 592.

- Kuromori, T., Fujita, M., Takahashi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2022). Inter-tissue and inter-organ signaling in drought stress response and phenotyping of drought tolerance. *The Plant Journal*, 109(2), 342-358.
- Larcher, W. (1995). Plants under stress. *Physiological plant ecology*, 321-448.
- Lee, S., Seo, P. J., Lee, H. J., and Park, C. M. (2012). A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 70(5), 831-844.
- Levitt, J. (1980). Response of plants to environmental stresses: chilling, freezing, and high temperature stresses. *Physiological ecology: a series of monographs, texts, and treatises*, 1, 23-64.
- Li, L., and Wang, Y. (2023). Independent and combined influence of drought stress and nitrogen deficiency on physiological and proteomic changes of barley leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 210, 105346.
- Li, R.-h., Guo, P.-G., Michael, B., Stefania, G., and Salvatore, C. (2006). Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China*, 5(10), 751-757.
- Liang, J., Deng, G., Long, H., Pan, Z., Wang, C., Cai, P., Xu, D., Nima, Z.-X., and Yu, M. (2012). Virus-induced silencing of genes encoding LEA protein in Tibetan hulless barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) and their relationship to drought tolerance. *Molecular Breeding*, 30, 441-451.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., and Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & redox signaling*, 19(9), 998-1011.
- Limantara, L., Dettling, M., Indrawati, R., and Brotosudarmo, T. H. P. (2015). Analysis on the chlorophyll content of commercial green leafy vegetables. *Procedia Chemistry*, 14, 225-231.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lourenço, T., Saibo, N., Batista, R., Pinto Ricardo, C., and Oliveira, M. M. (2011). Inducible and constitutive expression of HvCBF4 in rice leads to differential gene expression and drought tolerance. *Biologia Plantarum*, 55(4), 653.
- Lv, X., Li, Y., Chen, R., Rui, M., and Wang, Y. (2023). Stomatal Responses of Two Drought-Tolerant Barley Varieties with Different ROS Regulation Strategies under Drought Conditions. *Antioxidants*, 12(4), 790.
- Mahajan, S., and Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
- Majumdar, R., Barchi, B., Turlapati, S. A., Gagne, M., Minocha, R., Long, S., and Minocha, S. C. (2016). Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: the pathway is regulated at the post-transcriptional level. *Frontiers in plant science*, 7, 78.

- Makbul, S., GÜLER, N. S., DURMUŞ, N., and GÜVEN, S. (2011). Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. *Turkish Journal of Botany*, 35(4), 369-377.
- Malik, A. A., Veltri, M., Boddington, K. F., Singh, K. K., and Graether, S. P. (2017). Genome analysis of conserved dehydrin motifs in vascular plants. *Frontiers in plant science*, 8, 709.
- Mansour, M. M. F. (1998). Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant physiology and biochemistry*, 36(10), 767-772.
- Marzin, S., Mihaly, R., Pauk, J., and Schweizer, P. (2008). A transient assay system for the assessment of cell-autonomous gene function in dehydration-stressed barley. *Journal of experimental botany*, 59(12), 3359-3369.
- Mascher, M., Gundlach, H., Himmelbach, A., Beier, S., Twardziok, S. O., Wicker, T., Radchuk, V., Dockter, C., Hedley, P. E., and Russell, J. (2017). A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*, 544(7651), 427-433.
- Masoudi-Sadaghiani, F., Babak, A. M., Zardoshti, M. R., Hassan, R.-S. M., and Tavakoli, A. (2011). Response of proline, soluble sugars, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes in potato (*Solanum tuberosum* L.) to different irrigation regimes in greenhouse condition. *Australian Journal of Crop Science*, 5(1), 55-60.
- Mattioli, R., Biancucci, M., El Shall, A., Mosca, L., Costantino, P., Funck, D., and Trovato, M. (2018). Proline synthesis in developing microspores is required for pollen development and fertility. *BMC Plant Biology*, 18(1), 1-15.
- Mattioli, R., Costantino, P., and Trovato, M. (2009). Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant signaling & behavior*, 4(11), 1016-1018.
- Mattioli, R., Francioso, A., and Trovato, M. (2022). Proline affects flowering time in *Arabidopsis* by modulating FLC expression: a clue of epigenetic regulation? *Plants*, 11(18), 2348.
- McGrann, G. R., Steed, A., Burt, C., Goddard, R., Lachaux, C., Bansal, A., Corbitt, M., Gorniak, K., Nicholson, P., and Brown, J. K. (2015). Contribution of the drought tolerance-related Stress-responsive NAC 1 transcription factor to resistance of barley to *Ramularia* leaf spot. *Molecular plant pathology*, 16(2), 201-209.
- Mikołajczak, K., Kuczyńska, A., Krajewski, P., Kempa, M., and Nuc, M. (2023). Transcriptome profiling disclosed the effect of single and combined drought and heat stress on reprogramming of genes expression in barley flag leaf. *Frontiers in plant science*, 13, 1096685.
- Miranda, M. T., Da Silva, S. F., Silveira, N. M., Pereira, L., Machado, E. C., and Ribeiro, R. V. (2021). Root osmotic adjustment and stomatal control of leaf gas exchange

- are dependent on citrus rootstocks under water deficit. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 11-19.
- Molina-Cano, J. L., Moralejo, M., Igartua, E., and Romagosa, I. (1999). Further evidence supporting Morocco as a centre of origin of barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 913-918.
- Molla, M. R., Ali, M. R., Hasanuzzaman, M., Al-Mamun, M. H., Ahmed, A., Nazim-Ud-Dowla, M., and Rohman, M. M. (2014). Exogenous proline and betaine-induced upregulation of glutathione transferase and glyoxalase I in lentil (*Lens culinaris*) under drought stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(1), 73-80.
- Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., Eliby, S., Shirley, N., Langridge, P., and Lopato, S. (2011). Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*, 9(2), 230-249.
- Muhammad Aslam, M., Waseem, M., Jakada, B. H., Okal, E. J., Lei, Z., Saqib, H. S. A., Yuan, W., Xu, W., & Zhang, Q. (2022). Mechanisms of Absciscic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1084. <https://doi.org/10.3390/ijms23031084>
- Muzammil, S., Shrestha, A., Dadshani, S., Pillen, K., Siddique, S., Léon, J., and Naz, A. A. (2018). An ancestral allele of Pyrroline-5-carboxylate synthase1 promotes proline accumulation and drought adaptation in cultivated barley. *Plant physiology*, 178(2), 771-782.
- Nayyar, H., and Walia, D. (2003). Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum*, 46, 275-279.
- NDong, C., Danyluk, J., Wilson, K. E., Pocock, T., Huner, N. P., and Sarhan, F. (2002). Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant physiology*, 129(3), 1368-1381.
- Nguyen, T. Q., Do, T. K., Nguyen, V. Q., Truong, N. M., and Tran, D. X. (2017). Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of vanillic acid and p-hydroxybenzoic acid. Proceedings of the Korean society of crop science conference,
- Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A. M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H., and Kikuchi, S. (2010). Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465(1-2), 30-44.
- Oh, S. J., Kwon, C. W., Choi, D. W., Song, S. I., and Kim, J. K. (2007). Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, 5(5), 646-656.

- Oraby, H. F., Ransom, C. B., Kravchenko, A. N., and Sticklen, M. B. (2005). Barley HVA1 gene confers salt tolerance in R3 transgenic oat. *Crop Science*, 45(6), 2218-2227.
- Orsini, F., Pennisi, G., Mancarella, S., Al Nayef, M., Sanoubar, R., Nicola, S., and Gianquinto, G. (2018). Hydroponic lettuce yields are improved under salt stress by utilizing white plastic film and exogenous applications of proline. *Scientia Horticulturae*, 233, 283-293.
- Ozsolak, F., and Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews genetics*, 12(2), 87-98.
- Öncel, I., and Keleş, Y. (2003). Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde büyüme, pigment içeriği ve çözünür madde kompozisyonunda değişimler. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 23(2).
- Öztürk, N. Z. (2015). Bitkilerin kuraklık stresine tepkilerinde bilinenler ve yeni yaklaşımlar. *Turkish Journal Of Agriculture-Food Science And Technology*, 3(5), 307-315.
- Öztürk, E. ve Sefaoğlu, F. 2022. Kuraklık (Su) Stresi. İksad yayınevi, syf. 57, Ankara. *Bitkilerde Abiyotik ve Biyotik Stres Yönetimi*. Seçkin-Dinler, B. ve Gül, V. ISBN: 978-625-6380-66-0.
- Paech, K., Simonis, W., Paech, K., and Simonis, W. (1952). Photosynthese. In: Springer.
- Pál, M., Tajti, J., Szalai, G., Peeva, V., Végh, B., and Janda, T. (2018). Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. *Scientific reports*, 8(1), 12839.
- Pankin, A., Altmüller, J., Becker, C., and von Korff, M. (2018). Targeted resequencing reveals genomic signatures of barley domestication. *New Phytologist*, 218(3), 1247-1259.
- Park, S.-Y., Noh, K.-J., Yoo, J.-H., Yu, J.-W., Lee, B.-W., Kim, J.-G., Seo, H. S., and Paek, N.-C. (2006). Rapid upregulation of Dehydrin3 and Dehydrin4 in response to dehydration is a characteristic of drought-tolerant genotypes in barley. *Journal of Plant Biology*, 49, 455-462.
- Passioura, J., and Angus, J. (2010). Improving productivity of crops in water-limited environments. *Advances in agronomy*, 106, 37-75.
- Patade, V. Y., Lokhande, V. H., and Suprasanna, P. (2014). Exogenous application of proline alleviates salt induced oxidative stress more efficiently than glycine betaine in sugarcane cultured cells. *Sugar Tech*, 16, 22-29.
- Per, T. S., Khan, N. A., Reddy, P. S., Masood, A., Hasanuzzaman, M., Khan, M. I. R., and Anjum, N. A. (2017). Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant physiology and biochemistry*, 115, 126-140.

- Porra, R., Thompson, W., and Kriedemann, P. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 975(3), 384-394.
- POWO (2023). "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> Retrieved 23 April 2023."
- Prakash, V., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Sharma, S., and Corpas, F. J. (2019). Crosstalk between nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) signalling molecules in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 41-49.
- Priya, M., Sharma, L., Singh, I., Bains, T., Siddique, K. H., Bindumadhava, H., Nair, R. M., and Nayyar, H. (2019). Securing reproductive function in mungbean grown under high temperature environment with exogenous application of proline. *Plant physiology and biochemistry*, 140, 136-150.
- Puhakainen, T., Hess, M. W., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P., and Palva, E. T. (2004). Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 54, 743-753.
- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S., and Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in plant science*, 17(6), 369-381.
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Raza, A. (2020). Metabolomics: a systems biology approach for enhancing heat stress tolerance in plants. *Plant cell reports*, 1-23.
- Raza, A., Charagh, S., Abbas, S., Hassan, M. U., Saeed, F., Haider, S., Sharif, R., Anand, A., Corpas, F. J., and Jin, W. (2023). Assessment of proline function in higher plants under extreme temperatures. *Plant Biology*, 25(3), 379-395.
- Rodríguez-Ruiz, M., Aparicio-Chacón, M. V., Palma, J. M., and Corpas, F. J. (2019). Arsenate disrupts ion balance, sulfur and nitric oxide metabolisms in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 143-156.
- Röhrig, L., and Dussart, F. (2022). Does Abiotic Host Stress Favour Dothideomycete-Induced Disease Development? *Plants*, 11(12), 1615.
- Sah, R., Chakraborty, M., Prasad, K., Pandit, M., Tudu, V., Chakravarty, M., Narayan, S., Rana, M., and Moharana, D. (2020). Impact of water deficit stress in maize: Phenology and yield components. *Scientific reports*, 10(1), 2944.

- Saisho, D., and Takeda, K. (2011). Barley: emergence as a new research material of crop science. In (Vol. 52, pp. 724-727): Oxford University Press.
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., and Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant physiology and biochemistry*, 109, 54-61.
- Samtani, H., Sharma, A., and Khurana, P. (2022). Overexpression of HVA1 enhances drought and heat stress tolerance in *Triticum aestivum* doubled haploid plants. *Cells*, 11(5), 912.
- Sánchez, F. J., Manzanares, M. a., de Andres, E. F., Tenorio, J. L., and Ayerbe, L. (1998). Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field crops research*, 59(3), 225-235.
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., and Battaglia, M. L. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10(2), 259.
- Seleiman, M. F., Refay, Y., Al-Suhaibani, N., Al-Ashkar, I., El-Hendawy, S., and Hafez, E. M. (2019). Integrative effects of rice-straw biochar and silicon on oil and seed quality, yield and physiological traits of *Helianthus annuus* L. grown under water deficit stress. *Agronomy*, 9(10), 637.
- Serraj, R., and Sinclair, T. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, cell and environment*, 25(2), 333-341.
- Shabnam, N., Tripathi, I., Sharmila, P., and Pardha-Saradhi, P. (2016). A rapid, ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline. *Protoplasma*, 253, 1577-1582.
- Shahid, M., Saleem, M. F., Anjum, S. A., Shahid, M., and Afzal, I. (2017). Effect of terminal heat stress on proline, secondary metabolites and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Philipp. Agric. Sci*, 100(3), 278-286.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., and Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
- Shibaeva, T., Mamaev, A., and Sherudilo, E. (2020). Evaluation of a SPAD-502 plus chlorophyll meter to estimate chlorophyll content in leaves with interveinal chlorosis. *Russian Journal of Plant Physiology*, 67, 690-696.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 221-227.
- Siddique, K., Regan, K., Tennant, D., and Thomson, B. (2001). Water use and water use efficiency of cool season grain legumes in low rainfall Mediterranean-type environments. *European Journal of Agronomy*, 15(4), 267-280.

- Singh, J., Reddy, P. S., Reddy, C. S., and Reddy, M. K. (2015). Molecular cloning and characterization of salt inducible dehydrin gene from the C4 plant *Pennisetum glaucum*. *Plant Gene*, 4, 55-63.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., and Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14, 407-426.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J. M., Al-Niemi, T., Dyer, W. E., Ho, T.-H. D., and Qu, R. (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant science*, 155(1), 1-9.
- Skinner, J. S., von Zitzewitz, J., Szűcs, P., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Amundsen, K., Stockinger, E. J., Thomashow, M. F., Chen, T. H., and Hayes, P. M. (2005). Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant molecular biology*, 59, 533-551.
- Škodáček, Z., and Prášil, I. (2011). New possibilities for research of barley (*Hordeum vulgare* L.) drought resistance. *Úroda*, 8, 24-29.
- Sreenivasulu, N., Sopory, S., and Kishor, P. K. (2007). Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene*, 388(1-2), 1-13.
- Stauss, R. (1994). Compendium of growth stage identification keys for mono- and dicotyledonous plants. *Extended BBCH scale*. CIBA Publ., Basel, Switzerland.
- Stockinger, E. J., Skinner, J. S., Gardner, K. G., Francia, E., and Pecchioni, N. (2007). Expression levels of barley Cbf genes at the Frost resistance-H2 locus are dependent upon alleles at Fr-H1 and Fr-H2. *The Plant Journal*, 51(2), 308-321.
- Sun, L., Zhang, H., Li, D., Huang, L., Hong, Y., Ding, X. S., Nelson, R. S., Zhou, X., and Song, F. (2013). Functions of rice NAC transcriptional factors, ONAC122 and ONAC131, in defense responses against *Magnaporthe grisea*. *Plant molecular biology*, 81, 41-56.
- Sun, W., Bernard, C., Van De Cotte, B., Van Montagu, M., and Verbruggen, N. (2001). At-HSP17. 6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal*, 27(5), 407-415.
- Suprunova, T., Krugman, T., Fahima, T., Chen, G., Shams, I., Korol, A., and Nevo, E. (2004). Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant, cell & environment*, 27(10), 1297-1308.
- Suzuki, N., and Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia plantarum*, 126(1), 45-51.

- Szabados, L., and Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.
- Thangthong, N., Jogloy, S., Jongrungklang, N., Kvien, C., Pensuk, V., Kesmala, T., and Vorasoot, N. (2018). Root distribution patterns of peanut genotypes with different drought resistance levels under early-season drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 204(2), 111-122.
- Thomason, W., and Battaglia, M. (2020). Early defoliation effects on corn plant stands and grain yield. *Agronomy Journal*, 112(6), 5024-5032.
- Toksoy, S., ve Doğru, A. (2021). Ekzojen Salisilik Asit Uygulamalarının Tuz Stresi Altındaki Hıyar Bitkilerinde Fotosistem II Aktivitesi Üzerindeki Etkileri. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(1), 418-429.
- Tommasini, L., Svensson, J. T., Rodriguez, E. M., Wahid, A., Malatrasi, M., Kato, K., Wanamaker, S., Resnik, J., and Close, T. J. (2008). Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional and integrative genomics*, 8, 387-405.
- TUİK (2022). Türkiye İstatistik Kurumu (<https://www.tuik.gov.tr>).
- TUİK (2023). Sayı: 49456. Erişim Tarihi: 31 Mart 2023. <http://www.tuik.gov.tr>.
- Turyagyenda, L. F., Kizito, E. B., Ferguson, M., Baguma, Y., Agaba, M., Harvey, J. J., and Osiru, D. S. (2013). Physiological and molecular characterization of drought responses and identification of candidate tolerance genes in cassava. *AoB plants*, 5, plt007.
- USDA (2022). The United States Department of Agriculture, Foreign Agriculture Service. <https://plants.usda.gov/home/> (Erişim tarihi: 17.06.2022).
- Vinocur, B., and Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 123-132.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R., and Pandey, M. (2017). Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161.
- Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1-14.
- Wang, Y., Ren, X., Sun, D., and Sun, G. (2016). Molecular evidence of RNA polymerase II gene reveals the origin of worldwide cultivated barley. *Scientific reports*, 6(1), 36122.

- Wehner, G., Balko, C., Humbeck, K., Zyprian, E., and Ordon, F. (2016a). Expression profiling of genes involved in drought stress and leaf senescence in juvenile barley. *BMC Plant Biology*, 16, 1-12.
- Wehner, G., Balko, C., and Ordon, F. (2016b). Experimental design to determine drought stress response and early leaf senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Bio-protocol*, 6(5), e1749-e1749.
- Wehner, G. G., Balko, C. C., Enders, M. M., Humbeck, K. K., and Ordon, F. F. (2015). Identification of genomic regions involved in tolerance to drought stress and drought stress induced leaf senescence in juvenile barley. *BMC plant biology*, 15(1), 1-15.
- Wu, A., Allu, A. D., Garapati, P., Siddiqui, H., Dortay, H., Zanol, M.-I., Asensi-Fabado, M. A., Munne-Bosch, S., Antonio, C., and Tohge, T. (2012). JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(2), 482-506.
- Wu, D., Qiu, L., Xu, L., Ye, L., Chen, M., Sun, D., Chen, Z., Zhang, H., Jin, X., and Dai, F. (2011). Genetic variation of HvCBF genes and their association with salinity tolerance in Tibetan annual wild barley. *PLoS one*, 6(7), e22938.
- Wu, J., Gao, T., Hu, J., Zhao, L., Yu, C., and Ma, F. (2022). Research advances in function and regulation mechanisms of plant small heat shock proteins (sHSPs) under environmental stresses. *Science of The Total Environment*, 825, 154054.
- Xiao, B., Huang, Y., Tang, N., and Xiong, L. (2007). Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 115, 35-46.
- Xiao, H., Tattersall, E. A., Siddiqua, M. K., Cramer, G. R., and Nassuth, A. (2008). CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant, cell and environment*, 31(1), 1-10.
- Xiong, X., James, V. A., Zhang, H., and Altpeter, F. (2010). Constitutive expression of the barley HvWRKY38 transcription factor enhances drought tolerance in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge). *Molecular Breeding*, 25, 419-432.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.-H. D., and Wu, R. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant physiology*, 110(1), 249-257.
- Xu, Z.-S., Ni, Z.-Y., Li, Z.-Y., Li, L.-C., Chen, M., Gao, D.-Y., Yu, X.-D., Liu, P., and Ma, Y.-Z. (2009). Isolation and functional characterization of HvDREB1—a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*. *Journal of Plant Research*, 122, 121-130.
- Xue, G. P., and Loveridge, C. W. (2004). HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional

- activators, interacting preferably with a CT-rich element. *The Plant Journal*, 37(3), 326-339.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6(2), 251-264.
- Yan, M. (2015). Seed priming stimulate germination and early seedling growth of Chinese cabbage under drought stress. *South African Journal of Botany*, 99, 88-92.
- Yan, Z., Guo, S., Shu, S., Sun, J., and Tezuka, T. (2011). Effects of proline on photosynthesis, root reactive oxygen species (ROS) metabolism in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) under NaCl stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(80), 18381-18390.
- Yang, S., Chen, K., Wang, S., and Gong, M. (2015). Osmoregulation as a key factor in drought hardening-induced drought tolerance in *Jatropha curcas*. *Biologia Plantarum*, 59(3), 529-536.
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., and Chen, S. (2021). Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae* 2021, 7, 50. *Drought Stress in Horticultural Plants*, 185.
- Yang, Y., Zhang, Y., Wei, X., You, J., Wang, W., Lu, J., and Shi, R. (2011). Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(4), 733-740.
- You, J., Zong, W., Li, X., Ning, J., Hu, H., Li, X., Xiao, J., and Xiong, L. (2013). The SNAC1-targeted gene OsSRO1c modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice. *Journal of experimental botany*, 64(2), 569-583.
- Yu, J., Lai, Y., Wu, X., Wu, G., and Guo, C. (2016). Overexpression of OsEm1 encoding a group I LEA protein confers enhanced drought tolerance in rice. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(2), 703-709.
- Yüksel, B., and Aksoy, Ö. (2017). Su stresi koşullarında bitkilerde gözlenen değişimler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10(2), 1-5.
- Zandalinas, S. I., Fritschi, F. B., and Mittler, R. (2020). Signal transduction networks during stress combination. *Journal of Experimental Botany*, 71(5), 1734-1741.
- Zegaoui, Z., Planchais, S., Cabassa, C., Djebbar, R., Belbachir, O. A., and Carol, P. (2017). Variation in relative water content, proline accumulation and stress gene expression in two cowpea landraces under drought. *Journal of Plant Physiology*, 218, 26-34.
- Zeng, X., Guo, Y., Xu, Q., Mascher, M., Guo, G., Li, S., Mao, L., Liu, Q., Xia, Z., and Zhou, J. (2018). Origin and evolution of qingke barley in Tibet. *Nature communications*, 9(1), 5433.

- Zhang, G., Wang, Y., Wu, K., Zhang, Q., Feng, Y., Miao, Y., and Yan, Z. (2021). Exogenous application of chitosan alleviate salinity stress in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Horticulturae*, 7(10), 342.
- Zhou, M. (2009). Barley production and consumption. In *Genetics and improvement of barley malt quality* (pp. 1-17). Springer.
- Zhu, D., Zhu, G., Zhang, Z., Wang, Z., Yan, X., and Yan, Y. (2020). Effects of independent and combined water-deficit and high-nitrogen treatments on flag leaf proteomes during wheat grain development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2098.
- Zhu, J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2), 66-71.
- Zhu, J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53(1), 247-273.