



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Doktora Tezi

**KURAKLIK STRESİ UYGULANMIŞ MERCİMEK (*Lens culinaris*
Medik.) BİTKİSİNİN RNA DİZİLEME YÖNTEMİ ile
TRANSKRİPSİYONEL ANALİZİ**

Hande MORGİL

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ**

**II. DANIŞMAN
Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI**

Haziran, 2019

İSTANBUL

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 21207 ve 22583 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öncelikle çalışmalarım sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan, ayrıca akademik ortamda engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan, bir hocadan daha fazlası olarak hissettiğim çok değerli danışmanım Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ'e

Çalışmalarımı yürütebilmem için yüksek lisansından bu yana bana laboratuvarını açan, doktora çalışmamı ve ilgili araştırmaları sabır ve motivasyonu ile teşvik ederek sürekli destekleyen, beni bir araştırmacı olarak yetiştiren ve en önemlisi bana bilimsel bakış açısı kazandıran çok değerli hocam Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI'ya,

Bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım ve her konuda desteğini benden esirgemeyen tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Mahmut Çalışkan ve Doç. Dr. İbrahim Barış'a teşekkürlerimi sunarım.

Öğretici ve destekleyici yardımlarını benden esirgemeyen Kavaklı laboratuvarının önceki ve şimdiki tüm üyelerine ve özellikle bana tüm deneysel bilgisini aktaran, çalışmamda beni teşvik eden arkadaşım Dr. Mehmet Tardu'ya minnetlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan sevgili çalışma arkadaşlarım Prof. Dr. Osman Erol, Dr. Almıla Çiftçi, Kadir Boztaş, Yiğit Sabri Ünlü, Kayhan Derecik ve Kübra Karaman'a destekleri, yardımları ve eğlenceli dostluklarından dolayı çok teşekkür ederim.

Bu süreçte yanımda olan, Rıza Gerçek, Derya Gerçek ve Ayşegül Gerçek'e, tüm sevgili arkadaşlarıma ve yaşamımı güzel kılan kuzenlerime desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim, iyi ki varsınız.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, benden destek, ilgi ve sevgilerini eksik etmeyen abim Mustafa Morgil, ablam Gözde ve eşi Yılmaz Demircioğlu'na sabırları ve yardımlarından dolayı içtenlikle teşekkür ederim. Ve tabi ki varlığı ile yaşama sevincimi arttıran minik yeğenim Duru'ya farkında olmadan yarattığı motivasyondan ötürü teşekkürü bir borç bilirim.

Desteği, sabrı ve en önemlisi her zorluğun üstesinden gelmemi sağlayan sonsuz sevgisinden dolayı sevgili eşim Yusuf Can Gerçek'e teşekkür ederim.

Tezimi, beni koşulsuz destekleyen, sevgi ve fedakarlığı ile bugünlere gelmemde en büyük katkısı olan annem Fatma MORGİL ve varlığını her an yanımda hissederek güç aldığım rahmetli babam Ali Oktay MORGİL'e ithaf ediyorum.

Haziran 2019

Hande MORGİL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. <i>LENS CULINARIS</i> MEDİK. BİTKİSİ	4
2.2. ABİYOTİK STRES FAKTÖRÜ OLARAK KURAKLIK	6
2.3. BİTKİLERİN KURAKLIK STRESİNE KARŞI OLUŞTURDUKLARI CEVAPLAR	8
2.4. KURAKLIĞIN BAKLAGİL TARIMI ÜZERİNE ETKİLERİ	17
2.5. TRANSKRİPTOM KAVRAMI.....	19
2.6. BAKLAGİL BİTKİLERİNDE TRANSKRİPTOM ÇALIŞMALARI	23
2.7. KURAKLIK STRESİNDE TRANSKRİPTOMİK YAKLAŞIMLAR	28
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ VE OPTİMUM KURAKLIK KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ	31
3.2. BİTKİLERİN SU KÜLTÜRÜNE ALINMASI VE KURAKLIK STRESİ UYGULANMASI	32
3.3. KURAKLIĞA BAĞLI FİZYOLOJİK TOLERANS MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ	33
3.3.1. Nispi Su İçeriğinin Belirlenmesi	33
3.3.2. Total Klorofil Miktarının Belirlenmesi	34
3.3.3. Lipid Peroksidasyonuna Bağlı Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi.....	34
3.3.4. Prolin Miktarının Belirlenmesi	34
3.3.5. Klorofil Floresansının Belirlenmesi	35
3.4. RNA İZOLASYONU.....	35

3.5. RNA-SEK İÇİN CDNA KÜTÜPHANELERİNİN HAZIRLANMASI VE SEKANSLANMASI	36
3.6. HAM VERİLERİN KONTROLÜ VE <i>DE NOVO</i> TRASKRİPTOM İNŞAASI.....	39
3.7. FARKLI EKSPRESE OLAN GENLERİN (DEGS) ANALİZİ	41
3.8. TRASKRİPTLERİN GEN ONTOLOJİSİNİN (GO) VE KEGG METABOLİK YOLAKLARININ BELİRLENMESİ.....	41
3.9. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF PCR (RT-PCR) İLE RNA-SEK SONUÇLARININ DOĞRULANMASI.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. ÇİMLENMENİN KURAKLIK STRESİNE CEVABI VE FİZYOLOJİK ANALİZLER.....	44
4.2. RNA İZOLASYONU VE KÜTÜPHANE HAZIRLIĞI.....	47
4.3. TRASKRİPTOM DİZİLEME ANALİZLERİ	48
4.3.1. Sekanslama ve <i>De novo</i> birleştirme analizleri.....	48
4.3.2. <i>L. culinaris De novo</i> Transkriptom Analizinin Kalite ve Doğruluğunun Değerlendirilmesi	50
4.3.3. Transkript Annotasyon Sonuçları.....	51
4.3.4. Gen Ontoloji (GO) ve Metabolik Yolak Analizi (KEGG)	52
4.3.5. Kuraklık Stresi Altındaki Yaprak ve Kök Dokularında Farklı Eksprese Olan Genlerin (DEGs) Tanımlanması	55
4.3.6. Kısa ve Uzun Süreli Kuraklık Koşullarında Kök ve Yapraklar Arasındaki DEG'lerin Karşılaştırılması.....	58
4.4. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF PCR (RT-PCR) İLE RNA-SEK SONUÇLARININ DOĞRULANMASI.....	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	71
KAYNAKLAR.....	88
EKLER	107
ÖZGEÇMİŞ	127

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: <i>Lens culinaris</i> bitkisi illüstrasyonu	4
Şekil 2.2: Kuraklığın bitkiler üzerine etkilerini özetleyen şema	9
Şekil 2.3: Yeni Nesil Sekanslama Teknolojisinin açılımları.	23
Şekil 3.1: Optimum kuraklık konsantrasyonlarını belirlemek amacı ile yapılan petri denemeleri.	32
Şekil 3.2: Su kültürüne alınmış kontrol grubu ve kuraklık stresi uygulanan bitkiler.....	33
Şekil 3.3: RNA-sek kütüphane hazırlama protokolü. Kütüphane hazırlığı, manyetik boncuklarla 100 ng-1ug total RNA'dan poli-A seçilimi (A) ile başlar. Çift zincirli cDNA (B) fosforilasyon ve A-uyruk eklenmesi ile adaptör ligasyonuna hazır hale gelir. PCR ile çoğaltılan kütüphane (D) kümeleme ve dizileme için hazır hale gelir (Illumina RNA-sek protokolü v2, 2015).	37
Şekil 3.4: Illumina dizileme reaksiyonu genel iş akışı (Illumina RNA-sek protokolü v2, 2015).....	39
Şekil 4.1: Farklı kuraklık stresi koşullarında <i>L. culinaris</i> fide dayanıklılığı yüzdesi (%0 (kontrol), %15, %20 ve %25 PEG) (a). Hata çubukları standart sapmayı (SD) (n = 30) temsil eder. <i>L. culinaris</i> 'in fizyolojik analizi (b) nispi su içeriği, (c) toplam klorofil (Chl) içeriği, (d) malondialdehit içeriği ve (e) prolin içeriği kontrol (- stres) ve kuraklıktaki (+ stres) değişimlere göre ayrılır. Testler, stres uygulanmasının 24. (1. gün) ve 96. saati (4. gün) sonunda yapıldı. Üç biyolojik ve üç teknik replikanın standart hataları anlamına gelir. Veriler, iki yönlü ANOVA varyans analizi (Brown-Forsythe Test) kullanılarak analiz edildi. Yıldızlar, kontrol örneklerine karşı * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005 anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir (Morgil ve diğ., 2019).	46
Şekil 4.2: Elde edilen RNA kütüphanelerinin Bioanalyzer cihazı ile kalite ve miktar kontrollerini gösteren elektroferogram ve jel görüntüleri.	48
Şekil 4.3: Transkriptlerin UniProt Top-Hit tür dağılımı (Morgil ve diğ., 2019).	52
Şekil 4.4: <i>L. culinaris</i> 'deki transkriptlerin gen ontolojisi (GO) fonksiyonel sınıflandırması. GO dağılımının görselleştirilmesi, WEGO yazılım aracıyla üç ana kategori (biyolojik süreç, moleküler fonksiyon, hücresel bileşen) için GO seviye tanımlamaları kullanılarak yapılmıştır (Morgil ve diğ., 2019).	53
Şekil 4.5: İlk en yüksek transkript sayısına sahip olarak eşleşme gösteren 10 KEGG yolağı. Pasta grafikteki sayılar, KEGG yolaqları ile eşleşme gösteren transkript sayısını temsil eder (Morgil ve diğ., 2019).....	55

- Şekil 4.6:** Kuraklık stresi (KS (+)) ve stressiz koşullar (KS (-)) altındaki 1. gün ve 4. gün kök ve yaprak örneklerinin biyolojik replikatlar arasındaki transkriptlerin tekrarlanabilirliğinin karşılaştırılmasını gösteren korelasyon haritası. Her bir numunenin transkript (CPM, milyonda okuma sayısı) seviyesi için biyolojik replikatları arasında güçlü bir korelasyon ($R^2 > 0.95$) olduğu belirlenmiştir (Morgil ve diğ., 2019).....56
- Şekil 4.7:** 1. ve 4. günlerde yaprak ve kök örneklerinde kuraklık stresi altında (a) farklı olarak ifade edilen genlerin sayısı (DEG). (b) Venn diyagramı, kuraklık stresinin 1. ve 4. günlerinden sonra yaprak ve kök dokularındaki DEG'lerin sayısını ve her bir gen kümesi arasındaki örtüşmeyi gösterir (Morgil ve diğ., 2019).58
- Şekil 4.8:** Her iki zaman ve dokuda belirlenmiş ortak 195 DEGs'in önemli ölçüde zenginleştirilmiş ($p < 0.05$) GO terimi analizi; (a) biyolojik süreçler, (b) moleküler fonksiyonlar ve (c) hücresel bileşenler (Morgil ve diğ., 2019).60
- Şekil 4.9:** *L. culinaris*'in yaprak ve kök dokularında önemli ölçüde zenginleştirilmiş gen ontolojisi (GO) biyolojik süreçleri (BP). Her bir panel, (a) yaprakta 1. gün ve 4. gün örneklerinde ve (b) 1. gün ve 4. gün örneklerinde önemli ölçüde zenginleştirilmiş GO biyolojik süreçlerini göstermektedir. Yıldızlar, 1. gün ve 4. gün örneklerinde önemli ölçüde düzenlenmiş BP terimlerini belirtir. Her bir BP terimi için zenginleştirilmiş genlerin sayısı hem mavi hem de kırmızı renklerle temsil edilir. Azalan ekspresyon gösteren genler mavi renkle temsil edilirken artan ekspresyon gösteren genler kırmızı renkle temsil edildi (Morgil ve diğ., 2019).62
- Şekil 4.10:** Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün yaprak örneklerinin biyolojik işlemler kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.64
- Şekil 4.11:** Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün yaprak örneklerinin moleküler fonksiyon kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.65
- Şekil 4.12:** Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün yaprak örneklerinin hücresel bileşen kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.66
- Şekil 4.13:** Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün kök örneklerinin biyolojik işlemler kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.67

Şekil 4.14: Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün kök örneklerinin moleküler fonksiyon kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.68

Şekil 4.15: Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün kök örneklerinin hücresel bileşen kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.69

Şekil 4.16: Seçilen primerlerin RNA-sek sonuçları, üç bağımsız biyolojik kopya ile RT-PCR sonuçları ile doğrulandı (Hata çubuğu: SD; $n = 6$). Y eksenini, transkript değişikliklerini (\log_2 kat) ve x eksenini gen kimliklerini gösterir. (a) DEG'ler 1. gün kök ve yaprak örneklerine aittir. (b) DEG'ler 4. gün kök ve yaprak örneklerine aittir.70

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Baklagil transkriptome çalışmalarında kullanılan veri tabanları.....	25
Tablo 2.2: Çeşitli abiyotik stresler altında baklagil bitkilerinin NGS bazlı transkriptom analizleri (Kudapa ve diğ., 2013).	27
Tablo 3.1: RT-PCR ileri ve geri primer dizileri (Morgil ve diğ., 2019).	43
Tablo 4.1: Kuraklık stresinin (KS) klorofil flüoresans parametreleri (F_v / F_m) üzerindeki etkisi ve <i>L. culinaris</i> fidelerinde ışık tutma ve enerji kullanımı dengesi üzerine olan değişiklikler	47
Tablo 4.2: Dokuya özgü gerçekleştirilen total RNA izolasyonlarının kalite ve miktar sonuçları	48
Tablo 4.3: <i>Lens culinaris</i> Medik. Sultan çeşidinin transkriptom dizilemesi ve birleştirme analizi istatistikleri (Morgil ve diğ., 2019).....	49
Tablo 4.4: Transkriptlerin, BlastX kullanılarak Uniprot protein veritabanında belirlenmesi (Morgil ve diğ., 2019).....	50

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde Değeri
°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
µmol	: Mikromolar
µg	: Mikrogram
cm	: Santimetre
g	: Gram
kb	: Kilobaz
kj	: Kilojul
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MPa	: Megapaskal
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre

Kısaltmalar	Açıklama
ABA	: Absisik Asit
bp	: Baz çifti
CDD	: Korunan Etki Alanları Veritabanı
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
Chl	: Klorofil
CTDB	: Nohut Transkriptom Veri Tabanı
cv.	: Kültivar
DEGs	: Farklı Eksprese Olan Genler
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNAz	: Deoksiribonükleaz
ESTs	: Eksprese Dizi Etiketleri
ETR	: Fotosentetik Elektron Transportu
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü

FDR	: Yanlış Keşif Oranı
Fv/Fm	: Fotosistem II verimliliği
GAIN	: Küresel Tarım Bilgi Ağı
Gbp	: Giga Baz Çifti
GO	: Gen Ontolojisi
KAAS	: KEGG Anotasyon Veri Tabanı
KEGG	: Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
lncRNA	: Uzun Kodlanmayan RNA 'lar
MDA	: Malondealdehit
mRNA	: Mesajcı RNA
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NGS	: Yeni Nesil Sekanslama
nt	: Nükleotit
O.D	: Optik dansite
Oligo (dT)	: Oligonükleotid Deoksitimin
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilen Glikol
poly (A)	: Poli-adenin
PPFD	: Fotosentetik Foton Akışı Yoğunluğu
PSII	: Fotosistem II
qP	: Fotokimyasal söndürme
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIN	: RNA İntegrity Number
RNA	: Ribonükleik Asit
RNA-sek	: RNA Sekanslama
RNAz	: Ribonükleaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPKM	: Haritalanmış milyon okuma başına kilo baz okuma
rpm	: Dakika devir sayısı
rRNA	: Ribozomal RNA
RWC	: Nispi Su İçeriği
S.D	: Standart Sapma
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizmi

TBA	: Tiyobarbütirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
ΦPSII	: Fotosistem II verimliliğinin faaliyeti
ϕNO	: Düzenlenmemiş Enerji Yayılımı
ϕNPQ	: Fotokimyasal Olmayan Söndürme Verimliliği

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KURAKLIK STRESİ UYGULANMIŞ MERCİMEK (*Lens culinaris* Medik.) BİTKİSİNİN RNA DİZİLEME YÖNTEMİ ile TRANSKRİPSİYONEL ANALİZİ

Hande MORGİL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

II. Danışman : Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI

Kuraklık stresi, mercimek de dahil olmak üzere, tarımı yapılan bitkilerin büyümesini ve verimliliğini etkileyen ana çevresel faktörlerden biridir. Bu tez çalışması kısa ve uzun süreli kuraklık koşullarında yetiştirilen mercimek fidelerinin kök ve yapraklarında genom boyunca meydana gelen transkripsiyonel düzenlemeler hakkında bilgi edinmek amacı ile *Lens culinaris* Medik. cv. Sultan çeşidi kullanılarak yapılmıştır. Biyokimyasal ve fizyolojik parametreler ölçülerek mercimek için kuraklık stres koşulları oluşturduktan sonra, örnekler *de novo* RNA sekanslama bazlı transkriptom analizine tabi tutulmuştur. Bu transkriptler üzerinde farklı eksprese edilen gen (DEG) analizi, kuraklık stres süresinin, mercimek kökündeki transkripsiyonel düzenleme üzerinde daha büyük bir etkisi olduğunu göstermiştir. Kısa süreli kuraklık stresi altında DEG'lerin sayısı 2.915 iken, kökteki uzun süreli kuraklık stresi altında bu sayısı 18.327'ye yükselmiştir. Ayrıca, gen ontolojisi analizi; protein fosforilasyonu, sinyal iletimi, transkripsiyonun düzenlenmesi, DNA replikasyonu ve kök meristem kimliğinin korunması gibi biyolojik işlemlerin uzun süreli kuraklık stresine cevap olarak farklı şekilde

düzenlendiğini ortaya çıkarmıştır. Ek olarak, sirkadiyen ritim ve fotorespirasyonda rol oynayan DEG'lerin varlığı, bitki büyümesini ve hayatta kalmasını düzenleyen iç osilatörler üzerinde kuraklık stresinin olumsuz bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, bu çalışma, kısa ve uzun süreli kuraklık koşullarında mercimek bitkisinin kök ve yapraklarında karşılaştırılabilir nitelikte olan ayrıntılı bir transkriptom yanıtının varlığını ortaya çıkarmıştır. Bulgularımız, kuraklık stresi karşısında yapraklardaki genlerin düzenlenmesine ek olarak, aynı zamanda köklerde düzenlenen genlerin de önemli olduğunu ve mercimek kuraklık toleransının iyileştirilmesi için göz önünde bulundurulması gerektiğini düşündürmektedir.

Haziran 2019, 145 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Lens culinaris*, Kuraklık stresi, Kök, Yaprak, *De novo* RNA sekanslama

SUMMARY

Ph.D. THESIS

Transcriptional Analysis of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Plant Exposed to Drought Stress by RNA Sequencing Method

Hande MORGİL

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

Co-Supervisor : Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI

Drought stress is one of the main environmental factors affecting the growth and productivity of the cultivated crops. In this thesis, we aimed to obtain information about genome wide transcriptional regulation of *Lens culinaris* Medik. cv. Sultan roots and leaves in short and long term drought conditions. After drought stress conditions for lentil were generated by measuring biochemical and physiological parameters, samples were subjected to *de novo* RNA sequencing-based transcriptome analysis. Analysis of differentially expressed genes (DEGs) on these transcripts has shown that the duration of drought stress has a greater effect on the transcriptional regulation at the lentil root. While the number of DEGs under short-term drought stress was 2.915, in the long-term drought stress of the root, the number of DEGs increased to 18.327. Furthermore, the Gene Ontology analysis revealed that biological processes such as protein phosphorylation, signal transduction, transcription regulation, DNA replication, and

preservation of root meristem identity were arranged differently in response to long-term drought stress. In addition, DEGs that play a role in circadian rhythm and photoreceptions show that drought stress has a negative impact on internal oscillators that may have detrimental consequences on plant growth and survival. In conclusion, this study revealed a detailed comparative transcriptome response in the roots and leaves of lentil plants in short and long-term drought conditions. Our findings suggest that not only the regulation of the genes in the leaves is important, but also the genes regulated in the roots are important in terms of drought stress and it should be considered for the improvement of lentil plant against drought tolerance.

June 2019, 145 pages.

Keywords: *Lens culinaris*, Drought stress, Leaf, Root, *De novo* RNA sequencing

1. GİRİŞ

Kuraklık stresinin çeşitli bitkiler üzerindeki etkilerini anlamak adına fizyolojik, moleküler ve biyokimyasal düzeylerde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fizyolojik ve biyokimyasal seviyelerde kuraklık stresi, yaygın kullanılan tahıl ürünlerinde geniş kapsamlı olarak çalışılmıştır (Lamaoui ve diğ., 2018). Bitkiler, su kaybını en aza indirmek ve su miktarını en üst düzeyde tutmak için gelişmiş kök yapısı, azalan yaprak alanı, stoma sayısı ve iletkenliği, artan yaprak kalınlığı gibi çeşitli morfolojik değişiklikler sergilerler (Sicher ve diğ., 2012). Kuraklık koşulları devam ettikçe, bitki dehidratasyon etkisini en aza indirmek için hava ile temasını kısıtlayacak şekilde kütikül üretir (Lee ve Suh, 2013). Bitkiler, suyun etkisini en aza indirmek ve hücrenin çeşitli bileşenlerini korumak için prolin ve glisin betain gibi osmolitler üreterek biyokimyasal düzeyde kuraklığa direnç göstermektedirler (Lamaoui ve diğ., 2018).

Mikroarray veya RNA-sek gibi genomik yaklaşımlar, moleküler düzeyde çeşitli bitkilerde bahsedilen tüm fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin genom çapında düzenlenmesini anlamak için kullanılmaktadır. Araştırmacılar, bitkilerin uygun cevabı üretmesini belirlemek için farklı transkripsiyon faktörleri arasındaki karmaşık etkileşim ağını ortaya çıkarmıştır. Buna ek olarak genomik çalışmalar, aynı bitki türlerinin farklı kültürleri arasında, bir genin transkripsiyonel seviyesini farklı koşullar altında değiştirebilme kapasitesi olarak tanımlanan transkripsiyonel plastisitenin önemini vurgulayarak, daha fazla genom düzeyinde araştırmanın gerekliliğini belirtmektedirler (Kulkarni ve diğ., 2017).

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.), kuraklık stresinden etkilenen ve %6-54 verim kaybına uğrayan baklagil bitkilerinden biridir (Johansen ve diğ., 1994; Oweis ve diğ., 2004; Stoddard ve diğ., 2006; Sehgal ve diğ., 2017). Mercimek hatlarının farklı genotiplerinin yetiştirilmesi ile kuraklığa toleranslı çeşitlere ulaşmak için belirli yetiştirme programları başlatılmıştır. (Singh ve diğ., 2016). Son zamanlarda, etkilenen biyolojik süreci tanımlamak için kuraklığa duyarlı ve dirençli mercimek hatlarının yaprak dokuları üzerinde genom çapında bir çalışma gerçekleştirilmiştir (Singh ve diğ., 2017). Şu anda mercimek bitkisinin, kısa ve uzun vadeli kuraklık stresi koşulları altında farklı dokularında transkripsiyonel düzenlemenin nasıl etkilendiği ve kısa ve uzun süreli kuraklık koşullarında genotipe bağlı olarak transkripsiyonel

plastisitenin nasıl oluştuğu hala bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada kuraklığa duyarlı mercimek (*Lens culinaris* Medik. cv. Sultan) eşidinin kök, gövde ve yaprak dokularında transkripsiyonel yanıtı ve plastisiteyi anlamak için genom çapında bir çalışma yapılmıştır.

Başlangıçta mercimek (*Lens culinaris* Medik. cv. Sultan)'ın kuraklık stresi koşulları nispi su içeriği, toplam klorofil içeriği, malondialdehit ve prolin içeriği gibi biyokimyasal parametreler llerek belirlenmiştir. Daha sonra, RNA-sek okumaları için bitkinin referans genomunun tam olarak mevcut olmamasından dolayı kök, gövde ve yaprak dokularından farklı zaman noktalarında toplanan örneklerden *de novo* transkriptom analizi yapılmıştır. Farklı dokularda, genom genelinde kuraklık stresinin etkisini anlamak için farklı olarak ifade edilen gen (DEG) analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, uzun vadeli kuraklık stresi altındaki yapraklara kıyasla kök dokularında belirgin şekilde transkripsiyonel değişikliklerin meydana geldiğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında öncelikle mercimek tohumlarının farklı PEG 6000 konsantrasyonlarına karşı hayatta kalabilme kabiliyetleri gözlemlenmiş ve buna göre optimum kuraklık konsantrasyonu belirlenmiştir (%15 PEG 6000). Optimum konsantrasyonun belirlenmesinden sonra iklim odasında kontrollü koşullar altında çimlendirilen 7 günlük mercimek bitkileri, 7. günün sonunda %15 PEG 6000 içeren su kültürüne alınarak kuraklık stresi uygulanması yapılmıştır. Stres uygulanmasını takiben 1. ve 4. günde bitkiler kök, gövde ve yaprak kısımlarından hasat edilerek RNA izolasyonu yapılmış ve RNA-sek analizleri için kütüphane hazırlığı yapılarak dizilenmiştir. Dizilemeyi takiben *de novo* birleştirme ve transkriptom analizleri gerçekleştirilmiş, son olarak kuraklık stresi koşullarında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ifade edilen transkriptlerin validasyonu gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile belirlenmiştir. Bu tez çalışması ile kuraklık stresine karşı oluşan tepki mekanizmaları ayrıntılı şekilde ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bulgularımız, farklı dokularda kısa ve uzun süreli kuraklık stresinde mercimek bitkisinin oluşturduğu tepki mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayarak, kuraklık stresi altındaki bitkilerin verimini attırmak için kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu amaçla tezin “Genel Kısımlar” bölümü mercimek bitkisinin önemi, abiyotik stres faktörü olarak kuraklığın bitkiler üzerindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkileri, transkriptom kavramı

ve kuraklık stresine karşı transkriptomik yaklaşımların önemi ile ilgili literatür incelemesi sonucu elde edilen bilgileri kapsamaktadır. “Malzeme ve Yöntem” kısmında araştırmada kullanılan mercimek bitkisinin yetiştirilmesi, kuraklık stresinin uygulanması, RNA izolasyonu sonrası RNA-sek analizi için kütüphane hazırlanması ve son olarak elde edilen verilerin biyoinformatik programlar vasıtasıyla yorumlanması ile ilgili metodlar detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Tez kapsamında elde edilen veriler “Bulgular” bölümünde tablo ve şekillerde özetlenmiştir. “Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise deney sonuçları diğeri araştırıcıların verileri ile karşılaştırılıp yorumlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *LENS CULINARIS* MEDİK. BİTKİSİ

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.), (Şekil 2.1) kendine tozlaşma gösteren tek yıllık otsu diploid ($2n = 14$) ve hipogeik çimlenme gösteren bir baklagil bitkisidir (Barulina, 1930). Mercimek tohumları yuvarlak, küçük ve disk şekilde olabilir. Mercimek türünün adı bilim adamı Medikus'un 1787'de yayınlaması sonrasında *Lens culinaris* Medik. olarak adlandırılmaya başlanmıştır.



Şekil 2.1: *Lens culinaris* bitkisi illüstrasyonu¹

Mercimek, eski bir baklagil türüdür. En eski mercimek kalıntıları (M.Ö. 11.000 tarihli) Yunanistan'da bir mağarada kömürleşmiş halde bulunmuş ve Suriye'de M.Ö. 8500-7500 yıllarına kadar uzanmaktadır (Van Zeist, 1971; Zohary, 1972; Hansen ve diğ., 1978). Mercimek yakın Doğu ve Orta Asya'ya özgüdür. Kültüre edilmiş *Lens culinaris orientalis*'in alt türlerinin

¹ <http://plantillustrations.org>

ataları Türkiye, Suriye, Lübnan, İsrail, Irak ve Özbekistan'da bulunmuştur. Arkeolojik çalışmalar, Orta Avrupa, Güney Asya ve Amerika'ya ekili mercimeklerin yayılmasını sağlayan menşei'nin Türkiye, Suriye ve Irak'ın olduğunu ortaya koymaktadır (Ladizinsky, 1979; Zohary, 1972).

Mercimek; protein, karbonhidrat ve kalori miktarı bakımından oldukça zengindir ve ayrıca kolesterol içermez (Iqbal ve diğ., 2006; Muehlbauer, 1985). Bu nedenle, insan diyetinin önemli bir bileşenidir. Ayrıca çözümlü ve çözünmez lif bakımından, tiamin, riboflavin, C Vitamini, B6 vitamini, niasin, pantotenik asit, folik asit gibi vitaminler ve potasyum, kalsiyum, magnezyum, sodyum ve fosfor gibi mineraller açısından da zengindir. Dahası, insanlar bu gibi özellikleri bakımından zengin gıdaları ucuz olmalarından dolayı kolayca temin edebilirler. Bu nedenle, özellikle Hindistan ve Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde tüketimi oldukça yüksektir (Yadav ve diğ., 2007). Mercimek tohumunun farklı anatomik parçalarının enerjisi 100 gr kuru ağırlık için 1480 ile 2010 kJ arasında değişmektedir (Yadav ve diğ., 2007). Ayrıca insan sağlığı üzerine etkileri açısından içerdiği magnezyum miktarı açısından, magnezyumun kan akışı uygun biçimde düzenlenmesi, oksijen ve besin maddesi taşınmasını sağladığı düşünüldüğünde, mercimek günlük magnezyum ihtiyacını karşılayabilir (Viadel ve diğ., 2006) ve kolesterol içermeyen, lifli yapısından dolayı mercimek tüketimi kalp hastalıklarından korunma sağlayabilmektedir. Buna ek olarak, lif tüketimi sindirimi kolaylaştırır ve kolon sağlığına katkıda bulunur, bu nedenle kolon kanseri riski bir ölçüde önlenir. Ayrıca düşük glikemik indeksi sayesinde (≤ 55), Tip II Diyabet'e karşı savunmada rol alabilmektedir. (Anon, 2006; Araya ve diğ., 2002; Flight ve diğ., 2006).

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.), nohut (*Cicer arietinum* L.) ve bezelyenin (*Pisum sativum* L.) ardından dünyanın en önemli üçüncü tüketilen baklagildir (FAO, 2015). Baklagiller, tarım sistemlerinde önemli birer bileşen olup, ürün rotasyonu yoluyla çevresel ve ekolojik faydalar sağlar, özellikle de biyolojik N₂ fiksasyonu yoluyla toprak verimliliği ve rizosfer çeşitliliğine katkıda bulunur. Küresel yıllık mercimek üretimi, 2013 yılında yaklaşık 4,3 milyon hektar seviyesinden yaklaşık 5 milyon ton olmuştur. Kanada, dünya üretiminin %38'ini gerçekleştiren en büyük üreticidir. Bunu Hindistan, Türkiye ve Avustralya takip etmiştir (FAO, 2015). Mercimek, yakın doğu menşeli, ilk evcilleştirilmiş tahıl baklagillerinden biridir (Zohary, 1999). Mercimek daha sonra Orta Asya'ya ve Akdeniz Havzası'na yayılmıştır (Cubero, 1981; Lev-Yadun ve diğ., 2000), akabinde 1930'larda ilk kez Kuzey Amerika'da, ve 1960'ların sonlarında

Kuzeybatı Amerika çayırlarında yetiştirilmeye başlanan nispeten yeni bir üründür (Muehlbauer ve diğ., 1995). Bugün dünya çapında mercimek, Akdeniz, alt tropikal savan ve kuzey ılıman olarak bilinen üç ana farklı tarımsal ekolojik bölgede yetiştirilmektedir. Bu bölgelerin her biri farklı gün uzunlukları ve ortalama sıcaklıklar sergiler, bu da tarımsal ekolojik adaptasyon bölgeleri arasındaki germplasm değişimini sınırlamaktadır (Tullu ve diğ., 2011).

Özetle Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) yaklaşık 4 Gbp (Arumuraganathan ve diğ., 1991) genom büyüklüğünde, kendi kendine tozlaşma özelliği gösteren, insan ve hayvan beslenmesi için yüksek protein, karbonhidratlar, lif ve mineraller sağlayan önemli bir baklagildir. Orta derecede kuraklığa toleranslı bir bitkidir, ancak verim, artan kuraklık stresi ile önemli ölçüde azalır (Singh ve diğ., 2017).

2.2. ABİYOTİK STRES FAKTÖRÜ OLARAK KURAKLIK

Bitkiler farklı çevresel faktörlerin etkisi altında yaşamlarını sürdürmeye çalışırlar. Bu çevresel faktörler iklim ve toprak faktörleri, doğal olmayan kirleticiler, hayvanlar ve diğer bitkiler ile rekabet şeklinde sıralanabilir. Ekonomik anlamda iyi ürün elde edebilmek için; yetiştirilen bitki türünün veya çeşidinin kendine has optimum çevre isteklerinin karşılanması gerekir. Bu optimum isteklerde meydana gelen her türlü artış veya azalış bitki için stres meydana getirir (Kumar ve diğ., 2013).

Bitkilerin büyüme ve gelişimlerini en çok etkileyen abiyotik stres koşullarından birisi kuraklıktır (Farooq ve diğ., 2009). Stres, dengeyi bozmaya eğilimli faktörlerin neden olduğu değişmiş bir fizyolojik gerilimdir. Gerilim ise bir stres tarafından üretilen herhangi bir fiziksel ve kimyasal değişimdir (Gaspar ve diğ., 2002).

Bitkilerde normal bir metabolizma, periyodik olarak dalgalanan, günlük ve mevsimsel döngüler için tahmin edilebilir olan çevresel değişikliklere yanıtın başlatılmasına izin verir. Böylece bir faktörün optimumundan sapması her zaman stresle sonuçlanmaz. Stres, düzenli metabolik faaliyetlerde kısıtlamalara veya çok tahmin edilemeyen dalgalanmalara, yaralanmaya, hastalık veya anormal fizyolojiye neden olur. Bitkiler doğada, kuraklık, düşük sıcaklık, tuz, sel, ısı, oksidatif stres ve ağır metal toksisitesi gibi pek çok strese maruz kalmaktadır (Nakayama ve diğ., 2007).

Kuraklık, meteorolojik bir terimdir ve genellikle önemli ölçüde yağışsız bir dönem olarak tanımlanır. Genellikle kuraklık stresi, topraktaki mevcut su azaldığında ve atmosferik koşullar, terleme veya buharlaşma yoluyla sürekli su kaybına neden olduğunda ortaya çıkar. Kuraklık stres toleransı hemen hemen tüm bitkilerde görülür, ancak cevaplar bitki türünden türüne hatta tür içinde bireyler arasında değişiklik gösterir. Su eksikliği, tarımsal ürünlerin sürdürülebilirliğini ve sürdürülebilir gıda üretimini için önemli bir küresel sorundur (Jaleel ve diğ., 2007). Abiyotik streslere tolerans, stres faktörleri ile bitki büyümesini ve gelişimini etkileyen çeşitli moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik fenomenler arasındaki etkileşimlere bağlı olarak değişen karmaşık bir durumdur (Razmjoo ve diğ., 2008). Kuraklık stresi altında yüksek verim potansiyeli, mahsul yetiştiriciliğinin hedeflerindedir (Blum, 1996). Kuraklık stresi, orta derecede su kaybı olarak kabul edilir, bu da stoma kapatılmasına ve gaz değişiminin sınırlanmasına yol açar. Kuruma, metabolizmanın ve hücre yapısının büyük ölçüde bozulmasına ve sonuçta enzim katalizli reaksiyonların durmasına yol açabilecek çok daha büyük bir su kaybıdır (Smirnoff, 1993). Kuraklık stresi, su içeriğinin azalması, yaprak su potansiyelinin azalması ve turgor kaybı, stomaların kapanması ve hücre büyümesinde azalma ile karakterizedir (Jaleel ve diğ., 2007). Şiddetli su stresi fotosentezin durdurulması, metabolizmanın bozulması ve nihayet bitkinin ölümü ile sonuçlanabilir (Jaleel ve diğ., 2008).

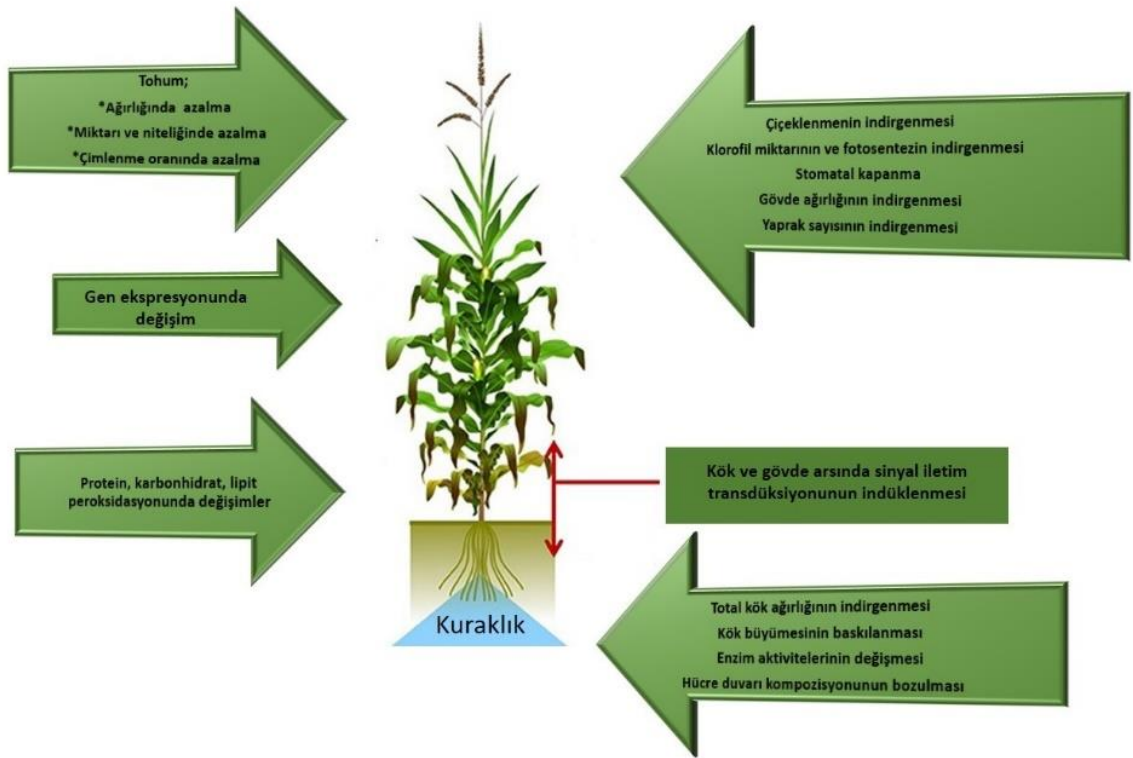
Kuraklık stresi çok boyutlu bir strestir ve bitkilerde fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerde değişikliklere neden olur. Pek çok bitki, kuraklık stresini tolere etmek için direnç mekanizmalarını geliştirmiştir, ancak bu mekanizmalar çeşitlidir ve bitki türlerine özgüdür (Lisar ve diğ., 2016).

Su, ağaçların taze ağırlığının %50'sini, diğer bitkilerin ise %89-90'ını oluşturmaktadır (Anjum ve diğ., 2011). Su sıkıntısının oluşma döneminde bitkinin gelişimi, kuraklık stresinin bitki büyüme ve gelişimine olan etkisine bağlıdır. Bitkide verimi belirleyen çok sayıda fizyolojik karakter de kuraklık koşullarından etkilenmektedir. Bitkilerin su sıkıntısına hassasiyeti en fazla generatif dönemde. Yapılan araştırmalar, tohum oluşumunun başladığı gelişim evresinde gerçekleşen şiddetli kuraklık koşullarının %95'lere varan oranda verim kaybına yol açtığını ortaya koymaktadır. Kuraklık; stresin şiddetine, süresine, diğer stres türleri ile etkileşimlerine, strese maruz kalan bitkinin genotipine ve gelişim evresine bağlı olarak bitkilerde sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevabı indüklemektedir (Vijayan, 2009).

Çevresel stres faktörlerinden biri olan kuraklığa dayanıklılık bakımından bitkiler arasında çok geniş bir varyasyon mevcuttur. Dünyanın büyük bir kısmı kurak iklim koşulları altındayken, kültürü yapılan tüm bitkiler için yetiştirme koşulları da dikkate alınarak kuraklığa dayanıklılık konusunda gerekli çalışmaların yapılması kaçınılmaz olmuştur (Kumar 2013).

2.3. BİTKİLERİN KURAKLIK STRESİNE KARŞI OLUŞTURDUKLARI CEVAPLAR

Doğada bitkiler sürekli olarak çeşitli biyotik ve abiyotik streslere maruz kalmaktadır. Bu stresler arasında kuraklık stresi, bitki büyümesi ve verimliliğini olumsuz yönde etkileyen faktörlerden biridir ve değişen iklim koşullarında sürdürülebilir mahsul üretimi için ciddi bir tehdit olarak görülmektedir. Kuraklık, hücrel metabolizmadan büyüme oranlarına ve ürün verimindeki değişikliklere kadar çok çeşitli bitki yanıtlarını tetikler. Kuraklığa karşı biyokimyasal ve moleküler tepkilerin belirlenmesi, sınırlı su koşullarında bitki direnç mekanizmalarının bütünsel bir şekilde algılanması için gereklidir (Şekil 2.2). Kuraklık stresine karşı oluşan cevaplar morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yollarla gerçekleşebilir (Anjum ve diğ., 2011).



Şekil 2.2: Kuraklığın bitkiler üzerine etkilerini özetleyen şema.

Çevresel streslere bağlı olarak bitkilerde, morfolojik cevaplar, değişmiş gen ifadesi, hücresel metabolizmada büyüme ve üretkenlikteki değişimlere kadar çok çeşitli tepkileri tetiklenir. Gıda kaynaklarının nüfus artışına ayak uydurmasını sağlamak ve tarımsal uygulamaların gelişmesi için ürün büyümesi ve gelişmesi ile ilgili süreçlerin tam olarak anlaşılması gerekmektedir. Farklı çevresel stres koşullarında bitki performansının ve mahsulün sürdürülebilirliğinin sağlanması, bitkisel vejetatif ve ürüme dönemlerinde büyümenin düzenlenme derecesine bağlı olacaktır. Bitki büyümesi, bir bitkinin iki ana organının, kök ve gövdenin, homeostatik dengeyi sağlayabilme ve sınırlandırabilme arasındaki karmaşık etkileşimin bir fonksiyonudur. Kalıcı veya geçici kuraklığın, bitki büyümesini ve gelişimini diğer çevresel faktörlerden daha fazla engellediği bilinmektedir.

Kuraklığın ilk ve en önemli belirtisi, çimlenme ve zayıf bir görünümün oluşmasıdır (Harris ve diğ., 2002). Hücre büyümesi, turgor basıncındaki azalmaya bağlı olarak, kuraklığa en çok duyarlı fizyolojik süreçlerden biri olarak kabul edilir. Büyüme, meristematik hücre bölünmeleri

sonucunda yeni hücrelerin üretilmesi ve genç hücrelerin genişlemesi ile yayılmasını izleyen bir süreçtir. Şiddetli kuraklık altında, damarlı bitkilerde ksilemden, çevresinde bulunan büyümeyi sağlayan ve genişleme gösteren hücrelere su akışının kesilmesiyle büyüme engellenir (Nonami, 1998). Kuraklık bozulmuş mitozu neden olur öyle ki bu durum hücre uzaması ve genişlemesi, büyüme ve verimin azalmasıyla sonuçlanır (Hussain ve diğ., 2008).

Kuraklık, bitki başına düşen yaprak sayısını ve toprak su potansiyelinin azalmasıyla yaprak yaşam süresini azaltır. Yaprak alanı genişlemesi, yaprak turgoruna, sıcaklığa ve büyüme için asimilasyon tedarikine bağlıdır. Yaprak alanındaki kuraklığa bağlı indirgeme, fotosentezin azalması yoluyla yaprak genişlemesinin baskılanmasına bağlıdır (Rucker ve diğ., 1995).

Su stresinin bitkiler üzerindeki bir diğer yaygın olumsuz etkisi, taze ve kuru biyokütle miktarındaki azalmadır (Zhao ve diğ., 2006). Mısır bitkisinde farklı sulama miktarı ile yapılan, kontrol grubunun altı defa sulanması, diğer fidelerin ise sırasıyla beş, dört, üç, iki ve bir defa sulanması ile ilgili bir çalışmada, bitki boyu, gövde çapı, yaprak alanının, su stresi arttıkça belirgin şekilde azaldığı sonucuna varılmıştır (Khan ve diğ., 2001). Bitki boyundaki azalma, hücre genişlemesindeki düşüşe ve bitkinin kuraklık stresi altında daha fazla yaprak yaşlanmasına maruz kaldığına bağlanabilir (Manivannan ve diğ., 2007). Aynı çalışmada kuraklık, bitki boyu, yaprak alanı, yaprak / bitki sayısı, koçan uzunluğu, taze ve kuru ağırlık / bitki sayısı gibi mısırın büyümeye bağlı özelliklerinin önemli ölçüde bozulmasına yol açmıştır. Ayrıca Kamara ve diğ., (2003), mısır bitkisinin çeşitli gelişim evrelerinde uygulanan kuraklık stresinin, toplam biyokütle miktarının, koçan püskülü verme döneminde %36, tahıl verme döneminde %34 ve olgun dönemde %21 oranında azalttığını ortaya koymuştur.

Bitkiler tüm yaşam döngüsü boyunca sürekli değişen ve belirsiz olan süreçleri bir araya getirmek, birleştirmek ve yorumlamak durumdadırlar. Tane verimi, çeşitli bitki büyüme bileşenlerinin ekspresyonu ve birlikteliğinin bir sonucudur. Kuraklık, kültür bitkilerinde, mahsul niteliğini belirgin bir şekilde zayıflatır öyle ki bu durumun muhtemelen depo ve havuz organların büyüklüğünü sınırlamakla kalmayarak, yaprak gazı değişimi özelliklerini bozmakla birlikte, floem yüklemesi, enerji maddesinin yer değiştirmesini ve parçalanmasını da bozduğunu göstermektedir (Farooq ve diğ., 2009). Kuraklık stresi kuru madde üretimini, yaprak genişlemesi, yaprak gelişimi ve sonuç olarak azaltılmış ışık kullanımını üzerindeki engelleyici etkileri ile büyük ölçüde engellemektedir (Nam ve diğ., 1998). Kuraklıkta çiçeklenme genellikle çoraklaşma ile sonuçlanır. Bunun tek bir nedeni olmasa da, en önemli nedeni,

gelişmekte olan en uygun başak tanesinin büyümesini sürdürmek için gerekli olan asimilasyon akışının eşik seviyesinin altında seyretmesidir (Yadav ve diğ., 2004). Mısır bitkileri püskül verme aşamasında kuraklık stresine maruz kaldıklarında, tahıl tanesi dizilimi / koçan, çekirdek sayısı / sırası, 100 tane tane ağırlığı, tahıl tanesi / koçan, tane verimi / bitki, biyolojik verim / hasat oranı gibi verim bileşenlerinde önemli bir azalmaya yol açmıştır (Anjum ve diğ., 2011). Bitkilerin mahsül ve mahsül bileşenlerinde kuraklığa bağlı azalma, düşük toprak su içeriğine yanıt olarak stoma kapanmasına ve bu da CO₂ alımını azaltarak sonuç olarak fotosentez veriminin azalmasına bağlıdır (Flexas ve diğ., 2004). Özetle; kuraklık bitki büyümesini ve gelişimini, çiçek üretimini ve tane verimini azaltarak daha küçük ve daha az tane üretimine yol açmaktadır. Tane verimindeki azalma, asimilasyon metabolizmasında meydana gelen bölünmelerde düşüşe bağlı olarak sakkaroz ve nişasta sentez enzimlerinin aktivitelerinin yavaşlamasından dolayı meydana gelebilir (Anjum ve diğ., 2011).

Yaygın bir kök sistemi, bitki büyümesinin erken aşamalarında bitki büyümesini desteklemek ve kolayca buharlaşmayla kaybolabilecek suyun sığ toprak katmanlarından alımını için avantajlıdır. Kuraklık stresinin kök büyümesine etkisi konusunda tartışmalı kanıtlar vardır. Cezayir menekşesinde yapılan bir çalışmada kuraklık stresi nedeniyle artan kök büyümesi belirlenmiştir (Jaleel ve diğ., 2008). Bununla birlikte, mısır bitkisinde kök büyümesi kuraklık stresi altında önemli derecede inhibe olmamıştır (Sacks ve diğ., 1997). Genel olarak, su mevcudiyeti sınırlı olduğunda, bitki kökünün gövdeye oranla hacmi artar, çünkü kökler düşük su potansiyeli ile büyümenin engellemesine gövdeye oranla daha az duyarlıdır (Wu ve Cosgrove, 2000).

Kuraklık stresi koşulları altında kökler, ksilem vasıtasıyla sürgünlere bir sinyal yolağını indükler ve sonuçta strese uyum seviyesini belirleyen fizyolojik değişimlere neden olur. Kök-sürgün sinyallemede absisik asit (ABA), sitokininler, etilen, malat ve diğer tanımlanmamış faktörler rol oynamaktadır. Terleme vasıtasıyla oluşan akım ile gerçekleşen kuraklığa bağlı kökten yaprağa sinyal iletimi, stoma kapatılması ile sonuçlanır, bu da yaprak alanındaki sınırlı su varlığına uyumu sağlar. ABA, bekçi hücrelerden K⁺ iyonlarının akışını artırır, bu da stoma kapanmasına yol açan turgor basıncının kaybına yol açar. Bitkilerde dehidratasyonun, hücre turgoru veya hücre zarı bozulmasına bağlı olarak ABA seviyesinin 50 kata kadar artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Guerrero ve Mullet, 1986). Genel olarak, ABA büyüme ve terlemeyi kontrol etmede baskın bir işaretidir, ancak diğer faktörler de önemli olabilir.

Sitokininler ayrıca köklerden sürgünlere giden önemli bir sinyal aracısı olabilir. Kökte üretilen sitokininler, besinsel yoksunluk tepkilerine yanıtta üretilmektedir ve temel olarak kökte üretiliyor olması kuraklık tepkilerinde de önemli olabildiklerini düşündürmektedir (Schachtman ve diğ., 2007).

Çevresel stresler, örneğin tilakoid elektron transportu, karbon asimilasyonun indirgenmesi, lipidlerin peroksidatif tahribi ile su dengesinin bozulması (Allen ve diğ., 2001) gibi fotosentezin özellikle temel yollarının bozunmasında doğrudan bir etkiye sahiptir.

Bitkilerin farklı ortamlara alışma kabiliyeti, doğrudan veya dolaylı olarak fotosentez düzeyinde adapte olabilmeye kabiliyetleri ile ilişkilidir, bu da biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri ve dolayısıyla tüm bitkinin büyümesini ve verimini etkiler (Chandra, 2003). Kuraklık stresi, kültür bitkilerinin gaz değişim mekanizmasını ciddi biçimde etkiler ve bu durum, yaprak genişlemesinde azalmaya, fotosentetik yapılarda bozulmaya, erken yaprak yaşlanmasına, kloroplast lipidlerin oksidasyonuna ve pigmentlerin dolayısıyla da proteinlerin yapısındaki değişikliklere neden olur (Menconi ve diğ., 1995). Mısırdaki kuraklık stresi, iyi sulanmış kontrol örneklerine oranla, net fotosentezde (%34), transpirasyon hızında (%38), stoma iletkenliğinde (%26), su kullanım verimliliğinde (%51), yapısal su kullanım verimliliğinde (%12) ve hücreler arası difüze edilen CO₂ miktarında önemli bir düşüşe neden olmuştur (Anjum ve diğ., 2011). Ayrıca pek çok çalışmada kuraklık stresi altında stoma veya stomatal olmayan mekanizmalara bağlı olarak azalan fotosentetik aktivite belirlenmiştir (Ahmadi, 1998; Blanco ve diğ., 2000; Samarah ve diğ., 2009). Stoma, su kaybının ve CO₂ emiliminin başlangıç noktasıdır ve stomaların kapatılması, azalan fotosentez oranına neden olan kuraklık stresine verilen ilk tepkilerdendir. Stomanın kapatılması yaprak hücrelerini CO₂'den mahrum bırakır ve karbon asimilasyonunu azaltır. Artan kuraklık stresine karşı oluşan fotosentetik cevap, daha fazla stoma kapatılması ile sonuçlanmaktadır. Yapraklardaki suyun mevcudiyeti her zaman stoma iletkenliği ile etkileşir ve kuraklık stresi altında bile yaprak su potansiyeli ile stoma iletkenliği arasında belirgin bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla topraktaki kurumunun teşvik ettiği ve stoma kapanmasıyla sonuçlanan, transpirasyon akımı boyunca kuraklığa bağlı kök-yaprak sinyalleşmesinin olduğu açıktır. Stomatal olmayan mekanizmalar arasında sayılabilecek bozukluklar, klorofil sentezindeki değişiklikler, kloroplastlardaki fonksiyonel ve yapısal değişiklikler ve asimilatların birikmesi, taşınması ve dağıtımını gibi süreçlerinde olan olumsuz durumlardır (Ahmadi, 1998; Blanco ve diğ., 2000; Samarah ve diğ., 2009).

Klorofil, fotosentez için başlıca kloroplast bileşenlerinden biridir ve nispi klorofil içeriği, fotosentez oranı ile pozitif bir ilişkiye sahiptir. Kuraklık stresi altında klorofil içeriğindeki azalma, tipik olarak oksidatif stres belirtisi olarak kabul edilir. Bu durum pigment foto-oksidasyonu ve klorofil degradasyonunun bir sonucu olabilir. Fotosentetik pigmentler, esas olarak ışığın yakalanması ve indirgeyici enerjinin üretimi açısından bitkiler için önemlidir. Hem klorofil a hem de b toprak dehidratasyonundan etkilenmeye eğilimlidir (Farooq ve diğ., 2009). Kuraklık stresi sırasında azalan veya değişmeyen klorofil miktarı, kuraklığın süresine ve şiddetine bağlı olarak birçok bitki türünde çalışılmıştır (Kpyoarissis ve diğ., 1995; Zhang ve Kirkham, 1996). Kuraklık stresi, total klorofil, klorofil a ve klorofil b miktarında belirgin bir azalmaya neden olmuştur (Manivannan ve diğ., 2007). Yapılan bir çalışmada devam eden kuraklık stresi karşısında iki farklı zeytin çeşidinin klorofil a ve b miktarlarında azalma oranları sırasıyla %29 ve %42 olarak belirlenmiş ve bu durum çeşitlerin kuraklığa dayanıklılık açısından farklılıkları ile açıklanmıştır (Guerfel ve diğ., 2009).

Kuraklık stresi altında fotosentezin inaktivasyonu, klorofil içeriğinin azalmasının ana nedeni olarak kabul edilir. Ayrıca, klorofil içeriğinin kuraklık stresine bağlı azalması, kloroplast membranlarında bozulma, aşırı şişme, lamellar kollenkimanın deformasyonu ve lipid damlacıklarının ortaya çıkmasından kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Kaiser ve diğ., 1981). Fotosentetik pigment konsantrasyonunun azalması, doğrudan fotosentez kapasitesini ve dolayısıyla birincil madde üretimini sınırlayabilir. Yapılan fizyolojik çalışmalar kuraklık stresine yanıt olarak bitkilerde klorofil miktarı, demet kını hücrelerine oranla mezofil hücrelerinde daha fazla bir azalma ile sonuçlanır.

Nispi su içeriği (RWC), yaprak su potansiyeli, stoma direnci, terleme hızı, yaprak sıcaklığı ve kanopi sıcaklığı bitki su ilişkilerini belirleyen önemli bir kaç karakteristik özelliştir. RWC bitkilerde su durumunu ölçen, dokulardaki metabolik aktiviteyi yansıtan ve dehidrasyon toleransının belirlenmesi için kullanılan anlamlı bir bitki su durumu belirteçidir. Yaprakların RWC'si yaprak gelişiminin ilk aşamalarında daha yüksektir ve kuru madde birikimi arttıkça ve yaprak olgunlaştıkça azalır. RWC, köklerin su alımına bağlı olduğu kadar transpirasyon ile su kaybına da bağlıdır. Kuraklık stresine tepki olarak yapraklarda çoğunlukla RWC ve su potansiyelinde belirgin bir azalma yaşanır (Nayyar ve diğ., 2006).

Bitkilerin kuraklık stresine maruz kalması yaprak su potansiyelini, RWC ve transpirasyon oranını önemli ölçüde düşürür, bu da yaprak sıcaklığının artmasına neden olur (Siddique ve

diğ., 2001). İki kavak türünde yapılan bir çalışmada bitkiler devam eden kuraklık stresine maruz kaldığında, bir türde RWC oranı %16 oranında azalırken, diğer türde %24 oranında azalma belirlenmiştir. Bu durumun, RWC'nin türler arasında kuraklık şiddeti ile etkileşimine, kuraklık olayının süresine ve türlerin farklı olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Yang ve diğ., 2010). Aslında, bitkinin su ile ilişkili yapıları suyun yokluğundan etkilense de, stoma açılması ve kapanması bu durumdan daha fazla etkilenmektedir. Ayrıca, yaprak sıcaklığındaki değişim kuraklık stresi altında yaprak suyu durumunun kontrol edilmesinde önemli bir faktör olabilir. Kuraklığa dayanıklı türler su kaybını azaltarak su kullanım verimliliğini korurlar. Bununla birlikte, bitki büyümesinin büyük ölçüde engellendiği durumlarda, suyun kullanım verimliliği de önemli ölçüde azalır (Yang ve diğ., 2010).

Bitkiler, osmotik potansiyeli düşürmek ve böylece hücre turgorunu korumak için sitosolde farklı tiplerde organik ve inorganik maddeler biriktirirler (Rhodes ve diğ., 1994). Kuraklık stresi altında yaprak turgorunun korunması ayrıca su içeriği azalmış topraktan su alımını optimize etmeye yarayan, prolin, sukroz, çözünebilir karbonhidratlar, glisin betain ve sitoplazmadaki diğer çözünen maddelerin birikimi vasıtasıyla gerçekleşen ozmotik ayarlama ile de sağlanabilir. Kuraklık stresi altında bu tür çözünen maddelerin birikim süreci, bitkinin su stresi oranına bağlı olan ozmotik ayarlama olarak bilinir. Buğdayda yapılan bir çalışmada bu uyumu sağlamaya yarayan çözünenlerin düşük seviyesi su stresine karşı toleransı arttırmak için prolin birikimi ve mobilizasyonu olarak gözlemlenmiştir (Nayyar ve diğ., 2003). Bu çözümlerden, 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, mısır bitkilerinde 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 ve diğ., 2011). Prolin, mitokondriyal fonksiyonları modüle etmek, hücre proliferasyonunu veya hücre ölümünü etkilemek ve stresten kurtulmak için gerekli olabilecek spesifik gen ekspresyonunu tetiklemede bir sinyal molekülü olarak görev yapabilir (Szabados ve diğ., 2009). 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, protein solvasyonunu etkiler ve kompleks dördüncül yapının korunmasını sağlar, dehidratasyon stresi altında membran bütünlüğünü korur ve lipid membranların oksidasyonunu veya foto-inhibisyonu

azaltır (Demiral ve diğ., 2004). Ayrıca, hücre içi yapıların stabilize edilmesine, serbest radikallerin atılmasına ve stres koşullarında hücrel redoks potansiyelinin tamponlanmasına da katkıda bulunur (Ashraf ve diğ., 2007).

Kuraklık, bitki büyümesini ve gelişimini azaltır, çiçek gibi daha küçük organların erken gelişimine yol açar ve dolayısıyla da tahıl tanesinin dolgun olmasını engeller. Tahıl tanesi dolgusunda azalma, sakaroz ve nişasta sentez enzimlerinin birikimindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkar. Kuraklık zamanlamasının, sürenin ve gelişme hızının şüphesiz bir bitkinin kuraklığa nasıl tepki verdiğinin belirlenmesinde önemli rolleri vardır. Kuraklığı takiben, stoma, fotosentez ve su kullanım verimliliğinde paralel bir düşüş kuraklığın devamlılığına bağlı olarak devam eder. Stomatal iletkenlik, yalnızca toprak su mevcudiyeti tarafından kontrol edilmez, bununla beraber içsel ve dışsal faktörlerin karmaşık bir etkileşimi ile kontrol edilir (Lisar ve diğ., 2016). Nemin mevcudiyetine bağlı olarak, karbon asimilasyon enzimlerinin ve adenosin trifosfat sentezinde yer alan metabolitlerin aktiviteleri azalır ve bazen inhibe edilir. Kuraklık stresi altında bozulmuş bitki büyümesi ve üretkenliğinden sorumlu başlıca faktörlerden biri, kloroplastlar, mitokondri ve peroksizomlar dahil olmak üzere organellerde reaktif oksijen türlerinin üretilmesidir (Ishitani ve diğ., 1997).

Reaktif oksijen türleri (ROS), ökaryotik hücrelerin biyotik ve abiyotik streslere en erken biyokimyasal tepkilerinden biridir. Oksidatif artış olarak bilinen bitkilerde ROS üretimi, kuraklık stresine karşı bitki savunma yanıtının erken bir olayıdır ve bitkilerde bir sonraki savunma reaksiyonunu tetiklemek için ikincil bir mesaj aracı olarak görev yapar. Oksijen iyonları, serbest radikaller ve peroksit içeren ROS, normal seyreden oksijen metabolizmasının ürünü olarak doğal bir form oluşturur ve hücre içi sinyal mekanizması için önemlidir. Ancak, kuraklık gibi çevresel stresler sırasında ROS seviyeleri, proteinlere, DNA'ya ve lipidlere oksidatif hasar verecek şekilde dramatik olarak artmaktadır (Apel ve diğ., 2004). Son derece reaktif olan ROS, lipid peroksidasyonunu, protein bozulmasını, DNA fragmantasyonunu ve sonuçta hücre ölümünü artırarak bitkilere ciddi zararlar verebilir. Kuraklık, reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle bitkilerde oksidatif strese neden olur (Farooq ve diğ., 2009) ve reaktif oksijen türleri, hücrel membran lipitlerinin peroksidasyonunu ve enzim proteinlerinin, nükleik asitlerin parçalanmasına neden olur. O_2^- , H_2O_2 ve $\cdot OH$ radikalleri gibi ROS, membran lipitlerine doğrudan saldırabilir ve lipid peroksidasyonunu artırabilir (Mittler, 2002). Kuraklığa bağlı ROS'un aşırı üretimi, malondialdehit (MDA) içeriğini artırır. MDA'nın içeriği, oksidatif

hasarın bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Moller ve diğ., 2007). MDA, membran lipid peroksidasyonu için uygun bir işaret olarak kabul edilir. Membran stabilitesindeki bir azalma ROS'un neden olduğu lipid peroksidasyonunun derecesini yansıtır. Ayrıca, lipid peroksidasyonu, dokularda serbest radikal reaksiyonunun yaygınlığının bir göstergesidir. Buna ek olarak her iki işlemde de dokulara oksijen alımını, peroksizomlarda fotosolunum esnasında üretilen glikolat oksidaz vasıtasıyla özellikle H_2O_2 reaktif oksijen türünün çok yüksek oranlarda oluşmasını sağlar. Yang ve Miao (2010)'nun yaptığı çalışmada farklı kavak türlerine uygulanan kuraklık stresinin MDA ve H_2O_2 konsantrasyonlarında artışa sebep olduğu ve bu artışların sırasıyla birinci tür için %89 ve %99, diğer tür içinse %40 ve %64 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Bezelye bitkilerinde, yapraklarda lipid peroksidasyon seviyeleri, kuraklık stresi arttıkça iki ila dört kat artmış ve bu protein peroksidasyonu ile yüksek düzeyde korelasyon göstermiştir (Moran ve diğ., 1994).

Çok karmaşık olan kuraklık tolerans mekanizması, bitki gelişiminin farklı aşamalarında aktive edildiğinde hücre, doku, organ ve tüm bitki düzeylerinde bir dizi fizyolojik ve biyokimyasal süreci içerir. Bu mekanizmaların örnekleri, stoma direncini arttırmak, geniş ve derin kök sistemleri geliştirerek su alımını arttırmak, osmolitlerin birikmesi ve osmoprotektant sentezi ile su kaybında azalma sağlamak olarak sayılabilir. Bitki büyüme maddeleri arasında, salisilik asit, sitokinin ve absisik asidin kuraklık toleransında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Grill ve diğ., 1998). Enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler ile reaktif oksijen türlerinin atılması, hücre membranı stabilitesi, akuaporinlerin ifadesi ve stres proteinleri de kuraklık toleransının hayati mekanizmalarıdır. Kuraklık stresine karşı etkiler, uygun bitki genotipleri, tohuma gitme, bitki büyüme düzenleyicilerinin geliştirilmesi, osmoprotektanların (prolin, trehaloz, fruktan, mannitol, glisin betain ve diğerleri) kullanımı, silikon ve diğer bazı organik maddelerin üretilmesiyle yönetilebilir.

Kuraklık toleransının fizyolojik mekanizmaları nispeten iyi anlaşılmasına rağmen, kuraklık toleransına yol açan bitki fenotipik veya genotipik esnekliğinin ve bitki kuraklığı-stres yanıtını modüle eden faktörleri belirlemek için daha ileri çalışmalar gereklidir. Bununla birlikte, büyük olasılıkla kök-sürgün sinyalleşmesini içeren, kuraklık stresine verilen kök tepkilerinin anlaşılması, tercih edilen bir araştırma alanıdır (Zhou ve diğ., 2007). Bitki kuraklığı toleransının moleküler temelini daha iyi anlaşılması için genomik, proteomik ve transkriptomik yaklaşımların uygulanması ve kuraklık altında su kullanımının etkinliğinin araştırılması

zorunludur. Reaktif oksijen türleri oluşumu ve eliminasyonu için farklı yetenekler sergileyen mutantlar veya transgenik bitkiler bu temel noktayı aydınlatmak için yararlı olabilir. Moleküler tepki ve tolerans mekanizma bilgisi, kuraklık stresi altında tatmin edici ekonomik verime dayanabilen ve ürün verebilen mühendislik çalışmalarının önünü açacaktır.

2.4. KURAKLIĞIN BAKLAGİL TARIMI ÜZERİNE ETKİLERİ

Baklagiller, insanlığın en önemli tarımsal gıda ürünleri arasında yer almaktadır. Hemen hemen her iklim bölgesinde ve çok çeşitli toprak tiplerinde yetişirler. Baklagiller, gıda güvenliğine katkısı bakımından ikinci sırada yer alan ve gelişmekte olan ülkelerde yılda yaklaşık 800 milyon dolar değerinde hacme sahip 700 milyondan fazla küçük işletme için gelir kaynağı olarak hizmet vermektedir (Abate ve diğ., 2012). Bu ekonomik değerın çoğu soya fasulyesi (%83.8), bakla (%8.8), yer fıstığı (%4.9) ve nohut (%2.4) ihracatından kaynaklanmaktadır (Abate ve diğ., 2012). Bazı baklagiller hayvan yemi olarak yetiştirilirken, bazıları toprak azotunun önemli bir kaynağıdır. Baklagiller, dönüşümlü yetiştirildiğinde ya da tahıllar ile erozyon örtü bitkileri olarak kullanıldığında verim üzerinde olumlu etkilere sahiptir; toprak karbon ve azot miktarını arttırdığı, toprağın erozyona karşı direncini arttırdığı ve bazı toprak patojenlerinin etki alanını azalttığı da bulunmuştur (Sainju ve diğ., 2005). Koruma tarımında gübre olarak kullanıldığında, baklagiller toprak gözenekliliğini artırabilir ve yığın yoğunluğunu azaltabilir (Sultani ve diğ., 2007). Gelişmekte olan ülkelerde baklagil yetiştiriciliğinin teşvik edilmesi, yoksulluk ve açlığın azaltılması, toplum sağlığının iyileştirilmesi ve çevresel sürdürülebilirliğin sağlanması için ülkelerin kalkınma hedeflerine ulaşmada etkili bir yaklaşım olarak ortaya çıkabilmektedir (Abate ve diğ., 2012).

Dünyadaki bakliyat talebinin, sadece gelişmekte olan ülkelerde değil, aynı zamanda gelişmiş ülkelerde de sağlıklı diyeteye yönelik eğilim göz önüne alındığında, yakın gelecekte büyümesi beklenmektedir. Baklagillerin terapötik kullanımının daha iyi anlaşılması ile hayvansal proteinleri tüketmenin sağlık riski olduğu görüşü kabul edilmekte ve dolayısıyla baklagil bazlı ürünlere olan talebin yukarı doğru seyrini sürdürmesi beklenmektedir. Çoğu baklagiller protein bakımından zengindir (> %20) ve çözünebilir liflerdir. Sıklıkla baklagil alımı, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, sindirim sistemi hastalıkları ve obezite riskinde azalma ile ilişkili bulunmuştur (Duranti ve diğ., 2006). Sonuç olarak, küresel baklagil üretimi 1980'lerde 150 milyon tondan 2000'lerde 300 milyon tona yükselmiştir.

Baklagil üretiminde, aynı dönemde toplam bakliyat üretiminin yaklaşık %20'sini soya fasulyesi oluşturur (Gowda ve diğ., 2009). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), baklaları bir bakla içinde 1 ila 12 taneli veya değişken büyüklük, şekil ve renkte tane veren yıllık baklagiller olarak tanımlar. Bu terim sadece kuru tane olarak hasat edilen ürünler için ayrılmıştır ve bu nedenle aşağıdakileri kapsamamaktadır: (i) sebze ekinleri olarak kabul edilen yeşil fasulye ve yeşil bezelye ve (ii) yalnızca ekim amaçlı kullanılan alfalfadır. FAO tanımı aynı zamanda soya fasülyesi ve yer fıstığını hariç tutar, çünkü bunlar çoğunlukla yağ ekstraksiyonu için yetiştirilirler (FAOSTAT, 2018).

Dünya nüfusunda 2050'ye kadar beklenen %40'lık artış, tarım sektöründe gıda üretimini %70, hatta %100'e yakın artırmaya yönelik acil bir zorunlulukla karşı karşıya bırakmaktadır (Price ve diğ., 2014). Bu zorunluluk, endüstri ve kentsel gelişimden kaynaklanan arazi ve su konularında ortaya çıkan ciddi bir rekabet ile daha da karmaşıklaşmaktadır (Postel ve diğ., 2000). Bu tür rekabet, tarımı su mevcudiyeti açısından çoğu zaman mahsul verimliliğini kısıtladığı spesifik alanlara itmektedir. Örneğin, Hindistan'daki yer fıstığı verimi, yıllık yağış miktarındaki dalgalanmaya bağlı olarak 550 ile 1100 kg ha⁻¹ arasında değişmiştir (Reddy ve diğ., 1993).

Kuraklık, C4 bitkisi olan monokotillerden (örneğin mısır), C3 bitkisi olan dikotil tahıllarına (örneğin buğday) ve baklagillere kadar bir çok tarımı yapılan bitkinin verimini olumsuz yönde etkileyebilir (Olensen ve diğ., 2011). Kurak ortamlardan yarı kurak ortamlara veya Akdeniz iklimine sahip bölgelerde (örneğin, fasulye, nohut ve mercimek gibi kuru alanlarda yetiştirilen) baklagillerin verimi, genellikle bu bölgelerde karakterize edilen nihai kuraklıklardan dolayı, değişken veya düşüktür. Öyle ki soya fasülyesi yetiştiriciliği için yeterli olduğu düşünülen iklimlere sahip Brezilya gibi kurak olmayan ülkelerde bile, birkaç hafta zarfında su eksikliği meydana gelebilir ve bu da kayda değer bir ürün kaybına neden olabilir. Hali hazırda kuraklık altında ekin üretimini destekleyici ekonomik yaklaşımlar sınırlıdır. Daha da önemlisi, kuraklığın baklagiller üzerindeki etkisinin baklagil türleri, bölgeler, tarım ekosistemleri, toprak dokusu ve kuraklık zamanlaması ile nasıl değiştiği açık değildir.

Dünya çapında tarımsal üretim, bitki büyümesini engelleyen ve mahsul yetmezliğine neden olan ve ortalama verimi %50'den fazla azaltarak olumsuz yönde etkileyen abiyotik stresler şeklinde, artan çevresel kısıtlamalara tabidir. (Buchanan ve diğ., 2000; Bartels ve Sunkar, 2005; Mittler, 2006). Mercimek tarımının yaygın olduğu yarı kurak ortamlarda, ekimdeki elverişsiz

toprak nemi sık sık tohum çimlenmesiyle sonuçlanır ancak düzensiz bir fidenin ortaya çıkmasına neden olur, bu da verim üzerinde olumsuz etkilere neden olur (Okçu ve diğ., 2005). Bu nedenlerden dolayı, çimlenme aşamasında kuraklığa tolerans, iklim değişikliğine karşı sıcak ortamlarda özel bir öneme sahiptir (IPCC, 2007).

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.), yüksek protein ve mineral içeriğinden dolayı dünya genelinde yaygın olarak tüketilen baklagil türlerinden biridir. Kırmızı, yeşil ve siyah türleri içeren bitki, diyet lifleri ve B kompleksi vitaminleri için de mükemmel bir kaynaktır. İnsan tüketimine ek olarak, mercimek, hayvansal yem olarak da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Lardy ve Anderson, 2009). Aynı zamanda azot fiksasyonu ile toprak verimliliğini sürdürme potansiyeli nedeniyle ürün rotasyonunu da destekler (Ghanem ve diğ., 2011). 2015 yılında toplam dünya mercimek üretimi yaklaşık 4,9 milyon ton olmuştur. Son on yıldan fazla bir süredir Türkiye, Kanada ve Hindistan'dan sonra dünyanın en büyük üçüncü mercimek üreticisidir (FAOSTAT 2015). Küresel Tarım Bilgi Ağı (GAIN) raporu, Türkiye'nin güney doğu kısmının, dünya genelindeki toplam kırmızı mercimek üretimine %75-80'ine katkıda bulunduğunu belirtmektedir (Sarker ve diğ., 2011). Bununla birlikte, bu bölgede mevsimsel olarak yazlar kuru olarak karakterize edilir ve çiftçilerin bitkileri sonbaharda ve yaz başında hasat etmesine neden olan nihai kuraklık stresi meydana gelmektedir. Ek olarak, aralıklı kuraklık stresi bitkisel büyüme döneminde meydana gelir ve verimi olumsuz etkiler. Son on yılda, Türkiye'nin güneydoğusundaki çiftçiler, yüksek sıcaklık ve düşük yağış nedeniyle düşük mercimek verimine sahiptir (Kahraman ve diğ., 2016). Mercimek üretimi çeşitli çevresel streslere maruz kalmaktadır, öyle ki bu çevresel streslerden olan kuraklık stresi tüm dünya genelinde mahsul verimini sınırlayan en önemli faktörlerden biri olarak belirlenmiştir (Micheletto ve diğ., 2007). Sonuç olarak kuraklık stresinin, ılımlıdan şiddetlisine tüm seviyeleri mercimek bitkisinin ve benzer bir çok baklagilin biyokütlesini, tahıl verimini ve temel bileşenleri sınırlandırarak azaltmaktadır.

2.5. TRANSKRİPTOM KAVRAMI

Çevresel stres faktörleri bitkileri, yaşamlarının devamlılığı için adaptasyona zorlayarak bu duruma karşı çeşitli stratejiler geliştirmelerini sağlar. Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi çeşitli omik yaklaşımlar, moleküler düzeyde bitkilerde meydana gelen değişiklikleri analiz etmek için kullanılmaktadır. Bunlar arasında genomik yaklaşımlar, gen düzeyinde ek açıklamalar üreterek transkriptomik ve proteomik çalışmalar için bir temel

oluşturur. Tarımsal girişimler ile 1940 ve 1970'ler arasında meydana gelen ve genellikle “Yeşil Devrim” olarak adlandırılan, bitki büyüme, gelişme ve stres biyolojisinin temel yönlerini araştıran araştırmaların artışı, modern tarımsal yönetim uygulamalarının gelişimi, küresel gıda üretiminde devrim yaratmıştır. Ancak, küresel nüfusun artmaya devam etmesi ve küresel iklim sıcaklığının tahmin edilemeyecek ölçüde artmasıyla birlikte, gelecekte sürdürülebilir gıda üretimine olan ihtiyacın mevcut ürün çeşitlerini ve modern tarım üretim yöntemlerini sınırlamaya zorlayacağı açıktır (Abdelrahman ve diğ., 2018). Bu zorlukların üstesinden gelmek, su ve diğer doğal kaynakların verimli kullanımını en üst düzeye çıkarmak için yeni keşifler ve teknolojilere ihtiyaç duyulmakta ayrıca tarımsal sürdürülebilirliği sağlamak, gıda üretimini ve dolayısıyla küresel gıda güvenliğini geliştirmek açısından yeni ürün çeşitlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Transkriptom “bir organizmanın genlerinden ifade edilen veya edilmeyen RNA moleküllerinin toplamı” olarak adlandırılmaktadır (Ozsolak ve diğ., 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. RNA sekanslama teknolojisi, beklenen hedefe göre deneysel farklılık gösteren ve sonuçta farklı eksprese olan genlerin belirlenmesi, yeni genlerin ortaya çıkarılması, uç birleştirme (gen ekspresyonu sırasında, çoklu proteinleri kodlayan tek bir gen ile sonuçlanan düzenlenmiş bir işlemdir) vb. birçok çıktının elde edildiği moleküler bir yaklaşımdır.

Milyarlarca nükleotidin okunmasına imkan sağlayan yeni nesil sekanslama (NGS) teknolojilerinin yükselişi ile, baz dizileme maliyetlerinde önemli düşüşler ve daha yüksek verim, daha büyük genom kapsama dahil olmak üzere DNA dizilemesinin hızı ve verimliliğinde artışlar olmuştur.

Yeni nesil sekanslama (NGS) kısa okuma platformları arasında 2005, 2006, 2007 ve 2010'da sırasıyla geliştirilen Roche/454 sistemi (Margulies ve diğ., 2005), Illumina platformu (Bentley ve diğ., 2008), Applied Biosystems SOLiD platformu (Valouev ve diğ., 2008) ve Ion Torrent sistemi yer almaktadır. Hatta son zamanlarda, benzeri görülmemiş bir kaliteye sahip genom düzenekleri üretebilen Nanopore sekanslama olarak adlandırılan üçüncü nesil uzun okuma yöntemleri ortaya çıkmıştır ve dahası, bu teknolojiler direkt DNA üzerindeki epigenetik

modifikasyonları doğrudan tespit edebilir ve birleştirme (assembly) gerektirmeden tüm transkripsiyon dizilemelerine izin verebilir (Dijk ve diğ., 2018). Bu platformlar, piyasaya sürülen ve dünya çapında bitki araştırmaları üzerinde büyük bir etkiye sahip olan ürünlerin, sürdürülebilir tarım olasılığı dahil olmak üzere, bir çok alanda gelişimini başlatacak genom dizilerinin ortaya çıkmasını sağlamış ve bir dönüm noktası olmuştur.

NGS ve biyoinformatik programlar, yüksek verimli veri analizi sağlamasından dolayı artık modern bitki yetiştirme programlarının temel taşı haline gelmiştir (Abdelrahman ve diğ., 2017; Pavlovich, 2017). NGS teknolojileri, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), insersiyon / delesyonlar ve diğer yapısal çeşitlilikler gibi karmaşık özelliklerin moleküler düzeyde anlaşılmasına yardımcı olmak ve genomik varyasyonlar hakkında bilgi sağlamak için birçok önemli kültür bitkisine uygulanmıştır (Rourke ve diğ., 2014; Yuan ve diğ., 2017). Bu ileri teknolojiler aynı zamanda gen ekspresyon atlaslarının gelişimini kolaylaştırmış ve bitkilerin çevresel strese karşı verdiği tepkilerle ilgili sinyal yollarını anlamamızı arttırmışlardır (Zhang ve diğ., 2017).

Bugüne kadar, *Cicer arietinum* (Varshney ve diğ., 2013) *Medicago truncatula* (Young ve diğ., 2011), *Cajanus cajan* (Varshney ve diğ., 2012) dahil olmak üzere, son 10 yılda bir çok baklagilin referans genomu yayınlanmıştır. Günümüzde 91 bitki türünün genomları dizilenmiş ve açıklanmıştır, ve daha pek çoğu, şu anda dizilenmektedir².

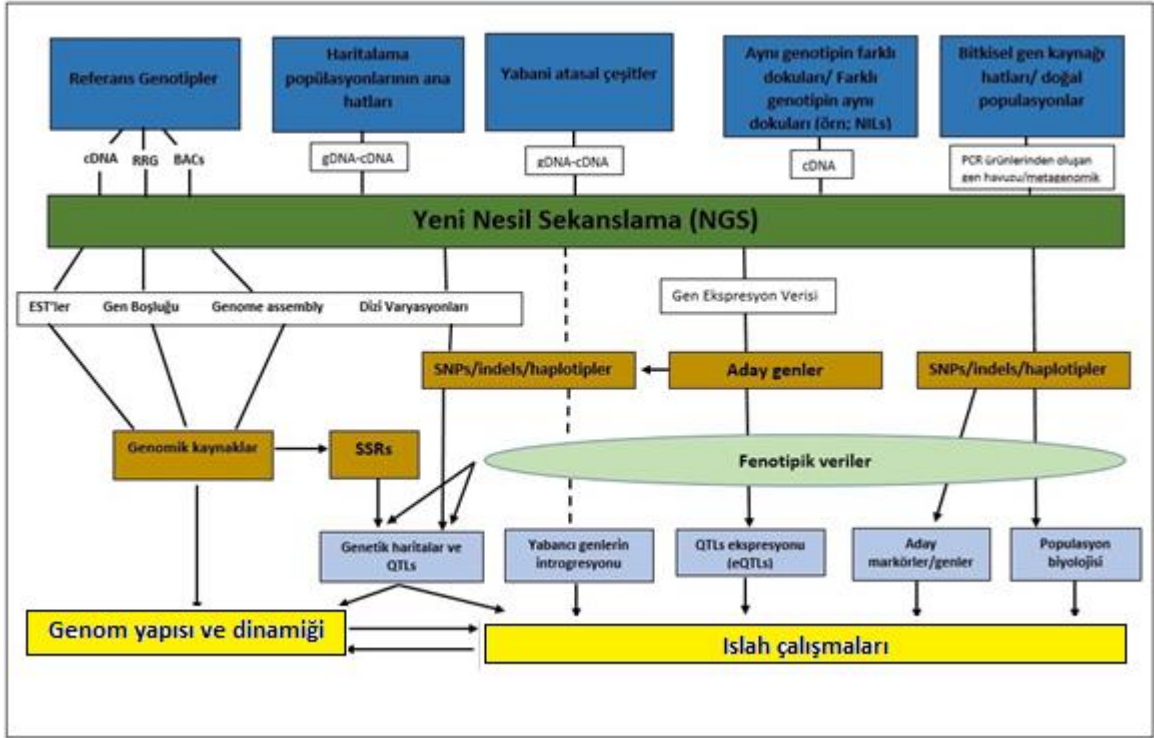
Tüm bu gelişmeler, genom verilerinin anlamlı olması için çevresel stres faktörlerine karşı bitki tepki mekanizmalarını anlamak, transkript ve proteinlerin ekspresyon düzeyini araştırmak açısından oldukça önemlidir. RNA sekansı gibi gelecek nesil sekanslama teknolojileri, tüm transkriptomun yüksek verimli analizini mümkün kılar ve önceki bir sekans bilgisine ihtiyaç duymadan bile, gen ekspresyon seviyelerini nicelleştirir ve dahası bu yaklaşım ile bitkilerin ekspresyon profili hakkında değerli bilgiler sağlanarak, bitki genomundaki tüm genleri karşılaştırmaya ve tespit etmeye izin verir (Deshmukh ve diğ., 2014). Yakın zamanda, RNA sekanslama çalışmalarının sonuçları diğer önceki yaklaşımlarla (Mikroarray) karşılaştırıldığında, gen ekspresyon düzeylerinin saptanmasında elde edilen sonuçların doğruluğunun daha yüksek olduğu kanıtlanmıştır (Fu ve diğ., 2009).

² <https://phytozome.jgi.doe.gov>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term>, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>

RNA sekanlamanın yaygınlaşmasından bu yana, özgün düzenleyici RNA'lar dahil olmak üzere, *Escherichia coli* (Raghavan ve diğ., 2011), *Saccharomyces cerevisiae* (Nagalakshmi ve diğ., 2008), *Arabidopsis thaliana* (Lister ve diğ., 2008), *Lotus japonicus* (Deguchi ve diğ., 2007) ve *Medicago truncatula* (Lelandais-Briere ve diğ., 2009) gibi birçok model organizmanın transkriptom analizi çalışılmıştır.

Son yıllarda, 1KP (1000 plants) projesini başlatan uluslararası bir konsorsiyum, binden fazla bitki için transkripsiyon profilleri ortaya çıkarmayı amaçlamıştır (Matashi ve diğ., 2014) ve tüm bu transkriptler ileri çalışmalar için çok önemli bilgi kaynağı olarak kullanılacaktır.

Mevcut teorilere göre, dünya tarihinin 4,6 milyarlık ömrü içerisinde, çok hücreli ökaryotlar, 650 milyon yıldan fazla bir süre önce evrimleşmeye ve 450 milyon yıl önce karasal yaşama adapte olmaya başladılar (Raven ve diğ., 2013). Günümüzde, bitkiler, özellikle de vasküler bitkiler, gezegenimizde gelişmekte ve yaşamımızın hemen hemen tüm yönlerini kapsayan oksijen, yiyecek ve çeşitli başka faydalar sağlamaktadır. Baklagil bitkilerinin ise en belirgin özelliği, insanoğlu için temel besi kaynağı olmasıdır. Dolayısıyla bu durum 12.000 yıl önce Ortadoğu'da ve Verimli Hilal'de başlayan evcilleştirme sürecini doğurmuş ve farklı bitki kültürlerinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Ancak doğa, yaşayan canlılar için stabil bir ortam yaratmaz, sürekli değişkenlikler ile canlı genomlarını dinamik olmaya zorlamaktadır. Tabi ki bu zorlama ile ortaya çıkan böyle mükemmel bir çeşitliliği ve tepkileri anlama Carl Linnaeus'nin belirttiği gibi "Doğa bilimlerinde hakikat ilkeleri gözlemle onaylanmalıdır." şeklinde olabilir ancak insanoğlunun NGS ve benzeri teknolojileri geliştirmeleri ile daha derinlemesine de olabilir. Ayrıca her canlının aslında birer RNA varlığı olduğu ve RNA olmadan bir hücrenin eylemsiz bir arşiv yığını olabileceği düşünülürse (Gasteland ve diğ., 2006) RNA-sek teknolojileri, NGS teknolojileri arasında en çarpıcı olanıdır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Yeni Nesil Sekanslama Teknolojisinin açılımları.

2.6. BAKLAGİL BİTKİLERİNDE TRANSKRİPTOM ÇALIŞMALARI

Birkaç baklagil bitkisinin genom sekansının yeni mevcudiyeti genomik araştırmaların artmasına yardımcı olmuştur. Transkriptomun global düzeyde incelenmesi, genom dizisinin yokluğunda bile, baklagillerdeki çeşitli hücrel süreçlerin moleküler temelleri hakkında bilgi sağlayabilir. Transkriptom analizi, herhangi bir organizmada temel araştırmalar için önemli bir adım olarak gerçekleştirilir. Transkriptom analizlerinin önemi göz önüne alındığında, çeşitli dokular / organlar ve gelişim aşamaları boyunca genlerin genel ve spesifik transkripsiyon aktivitesini ortaya çıkarmak için kullanılması önerilmektedir (Abdelrahman ve diğ., 2017).

Bakliyat ürünlerinin yetiştirilmesi, yabancı tip ile yerel çeşitler arasındaki kesişme noktalarından elde edilen üreme hatlarının sınırlı mevcudiyetine bağlı olarak zaman alıcıdır ve tahıl ürünlerine kıyasla nispeten daha az verim artışı sergiler. Örneğin, nohut yetiştiricileri için belli başlı bazı problemler evrimsel çıkmazlar bulunmaktadır. Bunlar nadir yabancı ataların

sınırlı ekolojik coğrafi dağılımı, evcilleştirme ile bağlantılı “kurucu etki”³ tohum ekiminin kıştan itibaren bahara doğru kayması ve yağmur mevcudiyetine bağlı sulamadan kaynaklanan gecikmeler olarak sayılabilir. Dolayısıyla bunların hepsi, nohut gen havuzunun çeşitliliğinde bir azalmaya neden olmuştur. Bu nedenle, yabancı tiplerde ve topraklarda bulunan genetik kaynaklardan primer gen havuzuna yapılan katkılar, gelecekteki baklagil iyileştirme programlarında önemli bir rol oynayacaktır. Ekolojik coğrafya prensiplerine dayalı yabancı baklagillerin seçimi, evcilleştirilmiş baklagiller ve yabancı akrabaları arasındaki genetik uçurumun kapatılmasına yardımcı olmak için kritik öneme sahiptir ve bu da yabancı baklagillerde mevcut olan stres adaptasyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlamaya yardımcı olacaktır.

Günümüze kadar, baklagillerde çok az genom çapında transkriptom analiz çalışması yapılmıştır. Bu çalışmaları gerçekleştirmek için mikroarray ve RNA-sek teknolojisinin her ikisi de kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda baklagiller için transkriptom ve gen ekspresyon verileri, aynı zamanda, fonksiyonel analiz için ilgilenilen hedef genlerin belirlenmesinde yardımcı olabilecek çeşitli veri tabanları (Tablo 2.1) vasıtasıyla kamuya açık hale getirilmiştir. Örneğin, SoyaSeq, soya fasülyesinde RNA sekans verilerine dayanan ve 14 farklı dokuda gen ekspresyonu bilgisi sağlayan bir veritabanıdır (Severin ve diğ., 2010). Bu verilerin analizine dayanarak, tohumda 2000'den fazla genin tercihli ifadesi olan ve 177'den fazla genin ise tohum su tutma işlemine katıldığı bildirilmiştir. Bu veri tabanı, doku-doku karşılaştırması ve farklı olarak ifade edilen genlerin listesi için veri sağlar. Buna ek olarak soya fasülyesi için başka bir veritabanı ise gen ekspresyon verilerini barındırır, öyle ki çeşitli doku / organ / hücre tiplerinin gelişim evrelerini (tohum gelişimi ve çiçeğe geçişi), tuzluluk, ısı, demir ve alüminyum gibi çeşitli streslerin etkisini temsil eden toplam 41 deneyden (1000'den fazla örnek) elde edilen dizi verilerini içerir (SoyaPLEX). Nohut bitkisinde ise altı farklı doku örneğinden transkriptom verisi de Chickpea Transcriptome Database (CTDB) veri tabanında bulunabilir. Bu veriler nohutta dokuya özgü genlerin tanımlanması için kullanılmıştır ve tek veya toplu bir gen için ifade verileri veri tabanından indirilebilir (Garg ve diğ., 2011). Bu veri tabanları, birlikte ve farklı ifade edilen gen ekspresyon analizlerine erişim sağlar. Gen ekspresyonu verileri için bu veri tabanlarının kullanılabilirliği, baklagillerde gen fonksiyonlarının keşfi ve moleküler üretim durumlarına destek sağlayacaktır.

³ Genetik sürüklenme sonucu küçük popülasyonların genetik çeşitliliklerini kaybetmeleri.

Tablo 2.1: Baklagil transkriptome çalışmalarında kullanılan veri tabanları.

VERİTABANI	İNTERNET ADRESİ
Consultative Group on International Agricultural Research	http://www.cgiar.org/
National Agricultural Research Systems	http://naro.go.ug/data/smenu/4/NARS.html
International Crops Research Institute for the Semi-AridTropics	http://www.icrisat.org/
International Center for Agricultural Research in the Dry Areas	http://www.icarda.org/
National bureau of Plant Genetic Resources	http://www.nbpg.ernet.in/About NBPGR/At a Glance.aspx
United States Department of Agriculture	https://www.usda.gov/
Australian Temperate and Field Crops Collection	http://agriculture.vic.gov.au
Centro Internacional de Agricultura Tropica	http://www.ciat.cgiar.org
Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural	http://www.cgris.net/cgris_english.html
Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research	http://www.ipk-gatersleben.de/
The National Institute of Agrobiological Sciences Genebank	https://www.gene.affrc.go.jp/databases_en.php
National Plant Germplasm System	https://www.ars-grin.gov/npgs/
Ustymivka Experimental Station of Plant Production	https://www.genesys-pgr.org
Asian Vegetable Research and Development Center	http://aciagr.gov.au/projects/multilateral/2007
International Institute of Tropical Agriculture	http://www.iita.org/
The Svalbard Global Seed Vault Project	http://www.nordgen.org/sgsv/
Soybean Transcriptome Database (Soybase)	https://soybase.org/soyseq/
Chickpea Transcriptome Database (CTDB)	https://www.nipgr.res.in/ctdb.html
LegumeIP	http://plantgm.noble.org/LegumeIP
Medicago truncatula Gene Expression Atlas (MtGEA)	https://mtgea.noble.org/v3/
Peanut DB	http://bioinfo.lam.umich.edu/txid3818v1/
Lotus DB	http://lotus-db.wbgcas.cn/
Legume Information System (LIS)	https://legumeinfo.org/
Kazusa DNA Research Institute for the L. japonicus Genome	http://www.kazusa.or.jp/lotus
European Medicago Consortium (chromosomes 3, 5)	http://medicago.toulouse.inra.fr/
Pisum sativum, Cool Season Food Legume Database	https://www.coolseasonfoodlegume.org/organism/Pisum/sativum
The Pea RNA-Seq Gene Atlas	http://bios.dijon.inra.fr/FATAL/cgi/pscam.cgi
National center for Biotechnology Information	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

NGS ile yapılan RNA dizileme tabanlı transkriptom analizi, mikroarray tabanlı analizle karşılaştırıldığında, abiyotik ve biyotik streslere maruz kalan bitkilerde birçok hücresel yanıtın gen fonksiyonunun ve moleküler temelini anlaşılması için üstün bir yaklaşım olarak kabul edilir. Örneğin, bazı bitki türleri benzer genomlara sahiptir, ancak çok çeşitli biyokimyasal, fiziksel ve gelişimsel farklılıkları yansıtan çok farklı gen ekspresyon profillerine sahiptirler. Böylelikle, farklı çevresel streslere maruz kalan farklı dokuların veya hücre tiplerinin karşılaştırmalı transkriptom analizleri kullanılarak genom ve gen fonksiyonu arasındaki ilişkiler araştırılabilmektedir (Garg ve diğ., 2011). Başlangıçta, soya fasulyesi de dahil olmak üzere baklagil transkriptom çalışmalarının çoğunda ifade edilen sekans etiketlerinin (ESTs) veya mikroarray temelli gen ekspresyon analizlerinin Sanger sekansı kullanılmıştır. Bu gen ifadesi veri kümelerini kullanarak, baklagil bitkilerinde kuraklık, tuzluluk, soğuk ve ağır metal stres

direnci için bir dizi aday gen tanımlanmıştır (Tripathi ve diğ., 2016). Bununla birlikte, EST ve mikroarray bazlı yöntemler çok maliyetlidir, zaman alıcıdır ve bir dizi üzerinde temsil edilen tanınmış gen kümesinin ifade kalıplarının sorgulanmasıyla sınırlıdır. Buna karşılık, NGS bazlı transkriptom analizi, derinlemesine sıralama kapsamı ve izoform ifadesi gibi ek nitel bilgiler sağlar.

Calzadilla ve diğ. (2016), soğuk stresine yanıt olarak *Lotus japonicus* bitkisindeki transkriptom değişikliklerini analiz etmişlerdir. Sonuçlarda hücre duvarı ve lipit metabolizması ile ilgili genlerde artan ekspresyon olmasına rağmen, kloroplast ve fotosentez ile ilgili genlerde azalan ekspresyon tespit edilmiştir. Ayrıca, kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında, dehidrasyon duyarlı bağlanma 1 ve C-tekrarlı bağlanma faktörleri (DREB1 / CBF'ler) soğuk strese maruz kalmadan 1 saat sonra yukarı doğru düzenlenmiştir. Bununla birlikte devam eden stresin 24. saati sonunda, aynı faktörlerin ekspresyonlarında bir farklılık gözlenmemiştir, bu da, *Lotus japonicus* bitkisinde, bu CBF transkripsiyon faktörleri, uzun süreli cevaplardan ziyade soğuk strese kısa süreli cevaplara katıldığını göstermiştir.

Guimaraes ve diğ. (2015), kuraklık stresine yanıt olarak iki yer fıstığı çeşidinin gen ekspresyon profilini analiz etmiştir. Transkriptom verisi, primer metabolizmanın (karbonik anhidraz ve nitrilaz - benzeri proteinler) adapte edilmesine dahil olan genler dahil olmak üzere, kuraklık stresi karşısında yabancı fıstık bitkilerinde benzer bir artan ekspresyon modelini paylaşan sekiz aday gen ortaya koymuştur. Bu genler, fıstık bitkilerinde, genetik manipülasyon veya moleküler ıslah teknikleri kullanılarak kuraklık direncini artırmak için kullanılacak ümit vaat eden adaylar olarak görülmektedir.

Garg ve diğ. (2016) kuraklık ve tuzluluğa karşı toleranslı / hassas nohut genotiplerinin farklı gelişim aşamalarında kuraklığa veya tuzluluğa karşı karşılaştırmalı bir transkriptom analizini gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada nohut genotiplerinin erken üreme evresinde kuraklığa karşı daha duyarlı olduğu, tersine geç üreme evresinde ise tuz stresinin daha az etkili olduğu görülmüştür. Buna ek olarak, şeker alkollerinin (inositol ve trehaloz), ksiloglukan, amino asitlerin (prolin ve sitrülün) biyosentezinde rol oynayan enzimleri kodlayan ve fotosentezde rol oynayan genler, kuraklığa ve tuzluluğa yanıt veren toleranslı nohut bitkilerinde düzenlenmiştir. Bu sonuçlar nohutta kuraklık ve / veya tuzluluk stresine katılan gen düzenleyici ağları incelemek için bir başlangıç noktasını temsil etmektedir. Başka bir çalışmada, tuz stresinde ve kontrol koşulları altında yetiştirilen tuza dayanıklı fasulye genotipinin transkriptomlarının

kapsamlı bir analizi, Na⁺ / H⁺ pompaları ve vakuol H⁺ ATPaz kodlayan genlerin regülasyonunu göstermiştir (Hiz ve diğ., 2014). Ek olarak, seçici olmayan siklik nükleotidle kaplanmış katyon 2 (CNGC2) kanalı ekspresyonunu düzenleyen gen, tuz koşulları altında, tuza karşı toleranslı genotipin kök dokularında, kontrol koşullarıyla karşılaştırıldığında kuvvetli bir şekilde yukarı doğru düzenlenmiştir. CNGC2 kanalı, kök hücrelere K⁺ akışında önemli bir rol oynar ve bu sayede yüksek bir K⁺ / Na⁺ oranı ve dolayısıyla tuz toleransı elde edilir (Hiz ve diğ., 2014). Çeşitli abiyotik stresler altında baklagil bitkilerinin NGS - bazlı transkriptom analizleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2: Çeşitli abiyotik stresler altında baklagil bitkilerinin NGS bazlı transkriptom analizleri (Kudapa ve diğ., 2013).

Baklagil Türleri	Abiyotik Stres	Yeni Nesil Sekanslama Temelli	Toplam farklı eksprese olan genler	Kaynaklar
<i>Lotus japonicas</i>	Soğuk	Ilmuna Hiseq 1500	1077	Calzadilla ve ark., 2016
<i>Medicago falcata</i>	Soğuk, Kuraklık, Tuzluluk	Ilmuna Hiseq 2000	2252,4442,2320	Miao ve ark., 2015
<i>Cicer arietinum</i>	Kuraklık, Tuzluluk	Ilmuna Hiseq 2000	5383,5036	Garg ve ark., 2016
Chickpea	Kuraklık, Tuzluluk, Soğuk	Ilmuna Genome Analyzer II	8574,8887,5630	Garg, Bhattacharjee, & Jain, 2015
Soybean (<i>Glycine max</i>)	Kuraklık	Ilmuna Hiseq 2000	4866	Rodrigues ve ark., 2015
Soybean	Kuraklık	Ilmuna Hiseq 2000	9713	Song ve ark., 2016
Soybean	Kuraklık, Su baskını	Ilmuna Genome Analyzer II	2724,3498	Chen ve ark., 2016
Soybean	Ozon	Ilmuna Hiseq 2000	535	Whaley ve ark., 2015
Common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Tuzluluk	Ilmuna Hiseq 2000	10977	Hiz ve ark., 2014
Common bean (<i>P. vulgaris</i>)	Kuraklık	Ilmuna Hiseq 2000	6989	Wu, Wang, Li, & Wang, 2014
Wild peanut (<i>Arachis duranensis</i>)	Kuraklık	454 GS FLX Titanium	1514	Brasileiro ve ark., 2015
Soybean	Sıcaklık	Ilmuna Hiseq 2000	2940	Valdés-López ve ark., 2016
Chickpea	Fosfat eksikliği	Ion proton sequencer	540,225	Nasr Esfahani ve ark., 2017
<i>M. truncatula</i>	Fosfat eksikliği	Ilmuna Hiseq 2000	1140	Cabeza ve ark., 2014
<i>M. truncatula</i>	Fosfat eksikliği, Fazla azot	Ilmuna Hiseq 2000	1738,2257	Liese, Schulze, & Cabeza, 2017
Red clover (<i>Trifolium pratense</i>)	Kuraklık	Ilmuna Hiseq 2000	8719	Yates ve ark., 2014

2.7. KURAKLIK STRESİNDE TRANSKRİPTOMİK YAKLAŞIMLAR

Bitkilerin maruz kaldığı streslerin gen düzeyinde transkriptomik yaklaşımla anlaşılması, araştırılan bitki çeşidinin kontrollü koşullarda strese maruz bırakılması ve aynı zamanda aynı koşullarda mevcut bir kontrol grubu ile karşılaştırılması temeline dayanır. Gen regülasyonundaki farklılıkların türleşme ve adaptasyonda önemli rol oynadığı hipotezi uzun yıllardır bilinen bilimsel bir gerçektir. Yeni nesil sekanslama teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla, çok sayıda birey ve türdeki gen ekspresyon seviyeleri ve ilişkili düzenleyici mekanizmaları karakterize edilebilmektedir. Böylece, gen ifadesi seviyelerini şekillendiren ve farklı düzenleyici genetik ve epigenetik mekanizmalardaki evrimsel değişimler belirlenebilmektedir (Romero ve diğ., 2012). Kapsamlı karşılaştırılmalı bir transkriptom analizi anahtar genlerin ifadesi için önemli bir doğrulama aracıdır. Farklı olarak ifade edilen transkriptlerin anlaşılması, bitkilerde abiyotik stres toleransını destekleyen moleküler mekanizmaları anlamamıza yardımcı olabilir. Hatta bu transkriptlerin protein-metabolit korelasyonlarını ve normal-stresli durum arasındaki ilişkileri inceleyerek, bitkilerde abiyotik streslerle düzenlenmiş biyolojik süreçleri tanımlayabiliriz (Soda ve diğ., 2015).

Kuraklık, ekin üretimini olumsuz etkileyen başlıca faktörlerden biridir. 1964-2007 yıllarındaki aşırı hava felaketleri ve tahıl üretimi üzerindeki etkileri, kuraklığın ulusal hububat üretimini ortalama %10,1 azalttığını göstermektedir (Lesk ve diğ., 2016). Daha fazla kuraklık toleransından sorumlu genlerin ve alellerin başarılı bir şekilde seçilmesindeki ana zorluk, bu tip strese karşı bitki yanıtının karmaşıklığıdır. Genel olarak, kuraklık altındaki bitkinin yaşam devamlılığını sağlama stratejileri, azaltılmış transpirasyon veya hidrotropizma gibi geçici cevaplarla veya daha derin kök sistemine yol açan gelişimsel değişikliklerle, yaprak alanının azaltılması ile su kaybının en aza indirilmesi ile açıklanabilir ve sonuçta uzun süreli kuraklıkların devam etmesinde su alınımlı sağlanıyor olabilir (Fang ve Xiong, 2015). Geçici cevap veya gelişimsel değişikliklerin her ikisinde de, bitki metabolizmasının önemli ölçüde yeniden inşası ve kuraklığın başlangıcı ve kalıcılığı üzerine çok sayıda genin ekspresyonundaki değişikliklerin varlığı gereklidir.

Transkripsiyon profillemesi, moleküler düzeyde kuraklık stresine karşı bitki cevabının karmaşıklığına daha derin bir bakış açısı kazandırır. Kuraklık stresine maruz kalan çeşitli bitki

türlerinin gen ekspresyonu çalışmaları, bu stres tarafından düzenlenen birkaç gen grubunun önemine işaret etmektedir. Birincil olarak işaret edilenler ise kuraklık sinyalizasyonunu ve transkripsiyonun düzenlenmesidir. Bunlar arasında çeşitli kalsiyum bağımlı protein kinazlar, kalmodulin ve kalmodulin ilişkili kalsiyum sensor proteinleri ve protein fosfataz sınıf 2C ile birlikte REB, AP2 / ERF, NAC, bZIP, MYB / MYC, CAMTA, Alfin benzeri, Q tipi ZFP veya HD-START gibi çeşitli ailelerden gelen bir dizi transkripsiyon faktörü tespit edilmiştir (Kumar ve diğ., 2014). Bu sinyal proteinleri ve onların aşağı akış hedefleri genellikle absisik asit-bağımlı ve absisik asit-bağımsız stres yanıtı olarak iki şekilde kategorize edilmektedir (Shinozaki ve diğ., 2007). ABA biyosentezindeki anahtar enzim olan 9-sis-epoksikrotenoid dioksijenaz (NCED) ve ABA'ya bağlı stoma kapanmasından sorumlu ABA'nın PYR / PYL / RCAR reseptörlerine kuraklık cevabında önemli bir rol verilmiştir. Oksin, etilen, jasmonik veya salisilik asit gibi diğer bitki hormonlarının biyosentez ve sinyal yollarında yer alan genler de, kuraklık altında farklı olarak ifade edildiği belirlenmiştir (Aimar ve diğ., 2011). Kuraklık tarafından farklı şekilde düzenlenmiş diğer gen grupları, antioksidasyon süreçleri, osmoprotektant sentezi ve LEA familyasından çeşitli faktörlerle ilgilidir (Talamo ve diğ., 2007).

Yabancıl ve kültüre alınmış arpa bitkisinde kuraklığa duyarlı transkriptom analizi ile ilgili veriler, mikroarraylere veya daha yakın zamanlarda RNA-sek analizine dayanan çeşitli deneylerde toplanmıştır. Bu çalışmaların çoğunda yaprak (Zeng ve diğ., 2016), çiçek (Svoboda ve diğ., 2016), başak, başakçık ve tohum (Hübner ve diğ., 2015) gibi temel organların transkriptomları üzerinde yoğunlaşmıştır. Çevresel stres algılamasında kökün rolü üzerine sadece bir transkriptom temelli çalışma arpa bitkisinde yapılmıştır (Chwialkowska ve diğ., 2016). Burada, bazı faktörlerin, arpa köklerinde kuraklık algılama ve stres cevabı için önemli olabileceği düşünülmüştür.

Tüm bunlara ek olarak kuraklık stresi altında yapılan RNA-sek çalışmaları ile, karbon metabolizması, sitrat siklusu ile birlikte stilbenoid, heptanoid, fenilpropanoid, diterpenoid vb. sekonder metabolitlerin biyosentezini içeren ve ayrıca endoplazmik retikulumda protein işleme, aminoasitlerin biyosentezi, galaktoz metabolizması, bitki hormonu sinyal iletimi, alanin, aspartat ve glutamat metabolizmasını içeren azot metabolizması, yağ asidi yıkımı, fenilpropanoidler ile antioksidan savunması, osmoprotektanlar olan, galaktinol ve rafinoz

seviyesinin artması gibi çok fazla önemli sayıda farklı eksprese olan gen belirlenmiştir (Gao ve diğ., 2015; Wehner ve diğ., 2016; Singh ve diğ., 2017, Janiak ve diğ., 2018).

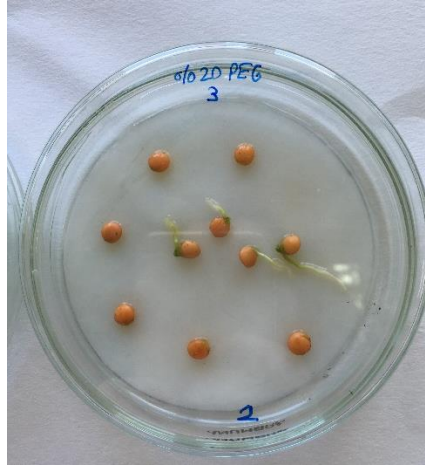
3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında deney materyali olarak, *Lens culinaris* Medik. türüne ait Sultan çeşidi tohumlar kullanılmıştır. Mercimek (Sultan) tohumları Güneydoğu Anadolu Tarımsal Araştırmalar Enstitüsünden temin edilmiştir. Mercimek, Leguminosae familyasında yer alan *Lens* cinsine dahil dört türden biridir. Aslında *Lens* cinsi içinde bulunan tüm türlerin az çok mercem şekilli ve yenilebilir tohumları topluca "mercimekler" olarak anılsa da *Lens culinaris*, "mercimek" denildiğinde en çok akla gelen ve en sık tüketilendir. *Lens culinaris* Medik. hipogeik çimlenme özelliğine sahip tek yıllık, otsu bir kültür bitkisidir.

3.1. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ VE OPTİMUM KURAKLIK KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Lens culinaris Medik. türüne ait Sultan çeşidi tohumları, boyut homojenliği dikkate alınarak seçildi, %1 sodyum hipoklorit içinde 2-3 dakika yüzey sterilizasyonu yapılarak, distile su ile durulandı. Kontrollü koşullarda kuraklık stresi ortamının sağlanması için, PEG 6000, penetrasyon eksikliği yaratması, toksik etkisinin olmaması ve kuraklık stresini taklit edebilme yeteneği nedeniyle ozmotik ajan olarak tercih edilmiştir.

Tohumlar deney boyunca 6 cm petri kabına konularak sırasıyla %0 (kontrol), %15, %20 ve %25 PEG 6000 içeren ve nihai osmotik potansiyelleri 0, -0.10, -0.14, and -0.19 MPa'ya karşılık gelen 5 ml dH₂O su ile sulandırılarak çimlendirildi. Petri kapları, buharlaşmayı önlemek için parafilm ile kapatıldı. Çimlenme boyunca petriler 25 °C derece sabit sıcaklıkta karanlık ortamda etüvde (Heraeus T6060) tutulmuştur. Radikula uzunluğu en az 3 mm olduğunda tohumlar "çimlenmiş" olarak kabul edilmiştir. 7 günlük uygulama sonrasında kontrol grubunda (%0 PEG) bulunan tohumlar tamamen çimlenmiş olduğunda diğer PEG konsantrasyonlarına sahip ortam için deney sonlandırılmış ve kuraklık dozu belirlenmiştir. Tohumların değişen PEG konsantrasyonlarında hayatta kalma yüzdesi aşağıdaki gibi hesaplandı: Tohum hayatta kalabilme oranı % = 100 x (kuraklık stresi altında hayatta kalan tohum sayısı) / (toplam tohum sayısı) (Idrissi ve diğ., 2016). Veriler 10 tohumdan üç biyolojik tekrar yapılarak elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Optimum kuraklık konsantrasyonlarını belirlemek amacı ile yapılan petri denemeleri.

3.2. BİTKİLERİN SU KÜLTÜRÜNE ALINMASI VE KURAKLIK STRESİ UYGULANMASI

Temin edilen tohumlar yüzey sterilizasyonları yapıldıktan sonra bir gece distile suda bekletilerek şişmeleri sağlanmış ve perlitli saksılara ekime hazır olmuştur. Bir gün sonra tohumlar perlit içeren saksılara ekilerek, büyüme kabininde uzun gün koşullarında (nem oranı %10, ışık şiddeti 16.000 lux) yetiştirilmiştir. 7 gün boyunca tüm deneme grupları her gün ½ Hoagland (5 mM KNO₃, 5 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 5 mM KH₂PO₄, 0.1 mM FeEDTA, 46 mM H₃BO₃, 4.5 mM MnCl₂, 3.8 mM ZnSO₄, 0.3 mM CuSO₄, 0.1 mM NH₄MoO₇) (Hoagland, 1938) besi solüsyonu ile sulanmıştır. 7. gün sonunda kontrol grubu ½ Hoagland besi solüsyonu içeren, deney grupları ise %15 PEG 6000 içeren ½ Hoagland besi solüsyonu bulunan su kültürü kaplarına alınmıştır. Su kültürü kapları deney boyunca hava pompası ile havalandırılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Su kültürüne alınmış kontrol grubu ve kuraklık stresi uygulanan bitkiler.

3.3. KURAKLIĞA BAĞLI FİZYOLOJİK TOLERANS MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ

Perlitli saksılarda 7 gün boyunca yetiştirildikten sonra su kültürüne alınan bitkiler, kültüre alındığı gün 0. gün olarak kabul edilerek, takibi 24. (1. gün) ve 96. (4. gün) saatlerin sonunda sürgün ve kök kısımlarından 3 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde hasat edilmiştir. Hasat edilen bitkilerden nispi su içeriği, total klorofil miktarı, lipid peroksidasyonuna bağlı malondialdehit birikimi, prolin miktarı ve klorofil floresansı belirlenerek kuraklık stresine karşı oluşan cevaplar incelenmiştir.

3.3.1. Nispi Su İçeriğinin Belirlenmesi

Nispi su içeriği Kabbadj (2017) metoduna göre tayin edildi. Bunun için belirtilen PEG konsantrasyonlarında yetiştirilen bitkilerin yaprak örneklerinden diskler çıkarılıp taze ağırlıkları alınarak (T.A.), distile su bulunan petri kaplarında 4 saat bekletildi. Distile su içinde turgorlu hale gelen örneklerin ağırlıkları (TR.A.) alındı. Daha sonra örneklerin kuru ağırlıkları (K.A.) sabit kalıncaya kadar, 5 gün boyunca 89 °C'lik etüvde bekletilerek tayin edildi. Elde edilen ağırlıklar aşağıdaki formülde yerine konularak nispi su içeriği yüzde cinsinden hesaplandı.

$$\text{Nispi Su İçeriği (\%)} = [(T.A. - K.A.) / (TR.A. - K.A.)] \times 100$$

3.3.2. Total Klorofil Miktarının Belirlenmesi

Klorofil içerikleri Kabbadj (2017) metoduna göre ekstre edildi. Bunun için taze ağırlıkları alınan örnekler bir miktar CaCO₃ tozu içeren havanda %90 aseton içinde homojenize edildi. Ekstreler 24 saat boyunca +4 °C' de bekletildikten sonra 3.000 g' de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üst sıvının (supernatant) absorpsiyon değerleri spektrofotometrede 480, 630, 645, 665 ve 750 nm dalga boylarında Lichtenthaler (1987) metoduna göre ölçülerek her bir örneğin klorofil a, b içerikleri (mg g⁻¹ T.A. cinsinden) tayin edildi (Parsons ve Strickland, 1963).

3.3.3. Lipid Peroksidasyonuna Bağlı Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi

Bitkilerde lipid peroksidasyonu malondialdehit (MDA) içeriği olarak ifade edilmektedir. 0.5 g yaprak örneği 10 ml %0.1' lik trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edildi. Homojenat 15.000 g' de 5 dakika santrifüj edilip, santrifüj edilen örneğin süpernatant kısmından 1 ml alınıp, üzerine 4 ml %20' lik TCA içerisinde çözülmüş %0.5'lik tiyobarbitürik asit (TBA) katıldı. Karışım 95 °C' de 30 dakika bekletilip ve hızla buz banyosunda soğutulduktan sonra, 10.000 g' de 10 dakika santrifüj yapıp, sonra süpernatant kısımda 532 nm dalga boyunda absorpsiyon belirlenerek aşağıdaki eşitlik ile malondialdehit (MDA) içeriği hesaplanmıştır (Kabbadj 2017).

$$\text{MDA içeriği (nmol ml}^{-1}\text{)} = [(A_{532}-A_{600})/155.000] \times 106$$

3.3.4. Prolin Miktarının Belirlenmesi

Prolin içeriği Kabbadj (2017) metoduna göre belirlendi. Toplanan 0.1-0.3 gr'lık bitki örnekleri sıvı nitrojen ile homojenize edilip 1 ml %3'lük sülfosalisilik asit ile ekstrakte edildi. Ekstraktlar 14.000 rpm 5 dakika 4 °C' de santrifüj edildi. 0.1 ml süpernatant yeni bir ependorfa alınıp her örneğe 0.2 ml asit ninhdriin, 0.2 ml %96 asetik asit, 0.1 ml %3 sülfosalisilik asit konularak 96 °C' de 1 saat inkübe edilip tüm protein hidrolizi gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında her ependorf tübüne 1 ml toluen eklenerek örnekler vortekslenip 14.000 rpm 5 dakika 4 °C' de santrifüj edildi. Üstte bulunacak olan kırmızı renkli faz alınarak toluen blank kullanılıp 520 nm absorpsiyonları ölçülmüştür. 5-500 µm aralığında prolin konsantrasyonunu belirlemek için, standart bir eğri oluşturulmuştur.

3.3.5. Klorofil Floresansının Belirlenmesi

Klorofil floresansının ölçümleri, daha önce Duan ve diğ., (2016) açıklandığı gibi Imaging-PAM Klorofil Fluorometre (Walz Effeltrich, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bitkiler 10 dakika boyunca karanlıkta tutulmasının ardından sonrasında floresans görüntüleme aletinin zayıf ölçüm ışınına maruz bırakıldılar ve burada fotosistem II merkezlerinin (PSII) açık hali nedeniyle minimum floresans seviyesi (F_o) elde edildi. Daha sonra numuneler, fotosentetik foton akı yoğunluğu (PPFD) ile 0.5 sn boyunca $960 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ olan doymuş bir ışık darbesine maruz bırakıldı. Bu şartlar altında PSII merkezleri, maksimum seviyedeki floresans (F_m) ile sonuçlanan kapalı duruma geçmiş olurlar. Yüksek ışık maruziyetinden sonra floresans seviyesinin stabil bir duruma düşmesi beklenir. Bu geçiş esnasında örnekler floresansın en yüksek değerine, F_p 'ye, ulaşmadan önce $260 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aktinik PPFD'ye maruz kalarak kısaca geçici bir floresans seviyesinde seyrederek, geçici floresans seviyesini, F_i 'yi, üretir. Tüm bu floresan değişimleri temel alınarak sırasıyla F_v/F_m , ϕ_{PSII} , ϕ_{NPQ} , ϕ_{NO} , qP ve ETR parametreleri hesaplanmıştır (Barbagallo ve diğ., 2003).

3.4. RNA İZOLASYONU

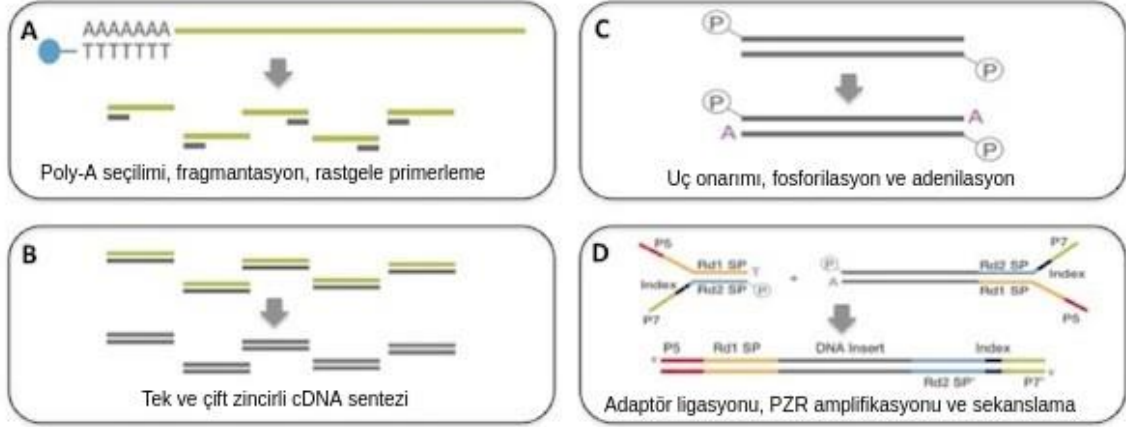
RNA izolasyonu bitkilerin su kültürüne alındığı gün 0. gün olarak kabul edilerek, takibi 24. (1. gün) ve 96. (4. gün) saatlerin sonunda kök, gövde ve yaprak kısımlarından 3 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde hasat edilerek yapılmıştır. RNA izolasyonları Rneasy Mini Kit (Qiagen, Almanya, Katalog No: 74106) kullanım talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Hasat edilen kontrol ve kuraklık stresi uygulanmış örneklerden yapraklar için 6 adet, kök ve gövde için 100 mg tartım alınarak sıvı azot yardımıyla havanda parçalanmıştır. Pudra haline getirilen bitki örnekleri ependorf tüplere alınarak üzerine %10 β - Merkaptotanol içeren 600 μl lizis solüsyonundan eklenmiştir. Pipet yardımıyla 10 dk. boyunca parçalanma sağlanmıştır. Daha sonra örnekler 3 dk. oda sıcaklığında 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Supernatant temiz bir ependorf tüpe aktarılarak üzerine eşit miktarda %70 EtOH eklenerek karışması sağlanmıştır. Örnekler kit içerisinde bulunan kolonlara aktarılarak 30 sn. 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra 350 μl RW1 solüsyonu kolona eklenerek tekrar 30 sn. 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Örnekler genomik DNA kontaminasyonunu minimize etmek için 80 μl RNaz-barındırmayan DNaz I (Qiagen, Almanya, Katalog No 79256) ile muamele edilerek 15 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme sonrası kolonlar tekrar 350 μl RW1 solüsyonu eklenerek 30 sn. 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra 500 μl RPE solüsyonu ile yıkama fazına

geçilerek sırasıyla 30 sn. ve 2 dk. 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında kolonlar temiz ependorf tüplere alınarak üzerlerine 30 µl DNaz ve RNaz'lardan arındırılmış sterilize distile su eklenip 1 dk. 13.000 rpm'de santrifüj edilip kütüphane hazırlanması aşaması için -80 °C dolapta bekletilmiştir. RNA örneklerinde herhangi bir bozunma ve genomik DNA kontaminasyonuna rastlamamak amacı ile %1'lik agaroz jelde yürütülerek kalite kontrolleri sağlanmıştır.

3.5. RNA-SEK İÇİN CDNA KÜTÜPHANELERİNİN HAZIRLANMASI VE SEKANSLANMASI

RNA-sek çalışmalarında kütüphane hazırlanması, hedeflenen çalışmaya göre şekillenmektedir. Öyle ki kütüphane hazırlığı, poly(A) seçilimi yardımıyla olabileceği gibi rRNA'nın ortadan kaldırılması tekniği ile de gerçekleşmektedir. Bu tez çalışmasında olgun mRNA'ların kuraklık stresi karşısında değişimleri hedeflendiğinden poly(A) seçilimini temel alan kütüphane hazırlığı gerçekleştirilmiştir. Temel olarak kütüphane hazırlanması sekiz aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; mRNA'nın saflaştırılması ve fragmentasyonu, Tek Zincirli cDNA Sentezi, Çift Zincirli cDNA Sentezi, Uç onarımı, 3' Adenilasyon, Adaptör Ligasyonu, PCR Amplifikasyonu ve Kütüphanelerin Kalite Kontrolü olarak sıralanabilir (Şekil 3.3).

RNA-sek Kütüphane Hazırlama Protokolü



Şekil 3.3: RNA-sek kütüphane hazırlama protokolü. Kütüphane hazırlığı, manyetik boncuklarla 100 ng-1ug total RNA'dan poli-A seçilimi (A) ile başlar. Çift zincirli cDNA (B) fosforilasyon ve A-uyruk eklenmesi ile adaptör ligasyonuna hazır hale gelir. PCR ile çoğaltılan kütüphane (D) kümeleme ve dizileme için hazır hale gelir (Illumina RNA-sek protokolü v2, 2015).

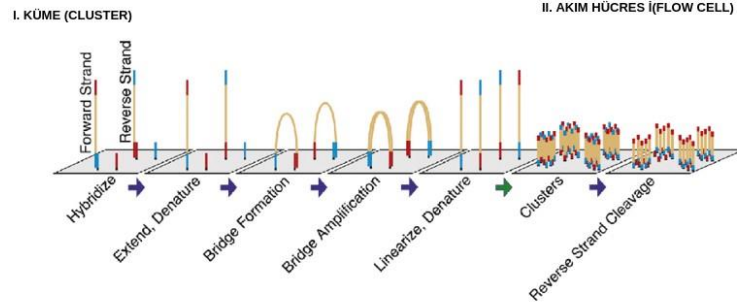
Total RNA, üreticinin talimatlarına göre RNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya, Katalog No: 74106) kullanılarak, su kültürüne alınması ile stres uygulanmasını takiben 24. (1. gün) ve 96. (4. gün) saatlerin sonunda kök, gövde ve yaprak örneklerinden ekstrakte edildi. RNA numunelerinin kalitesi ve miktarı Qubit® 2.0 spektrofotometresi (Invitrogen, ABD) ve 2100 BioAnalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Kütüphane yapımı için sadece OD 260/280 ile 1.8 ve 2.0, 28S: 18S ≥ 1 ve RNA bütünlük numarası (RIN) ≥ 8 olan RNA örnekleri kullanıldı çünkü bilindiği gibi RIN değeri RNA örneklerinin bütünlüğünü gösteren kantitatif değerdir. Kalite ve miktar ölçümlerinden sonra RNA, genomik DNA'yı elimine etmek için 1 U / μg konsantrasyonunda RNaz içermeyen DNaz I (Thermo Sci-entific, Waltham, MA, ABD) ile muamele edildi. Daha sonra mRNA'lar, oligo (dT) manyetik boncuklar kullanılarak 1 μg toplam RNA'dan saflaştırıldı ve TruSeq mRNA Numune Hazırlama Kiti (Illumina, ABD)⁴ ile fragmentasyon tamponu kullanılarak parçalara ayrıldı. Ayrılmış kısa RNA fragmanları, rasgele heksamer primerleri kullanılarak birinci iplik cDNA sentezine tabi tutuldu ve ikinci iplik, DNA polimeraz I ve RNaz H kullanılarak sentezlendi. Çift

⁴https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseqrna/truseq-rna-sample-prep-v2-guide-15026495-f.pdf

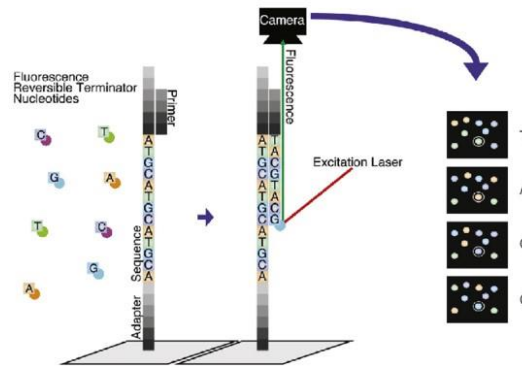
iplikli cDNA'lar, AMPure XP boncukları (Beckman Coulter, ABD) ile saflaştırıldı. Tekrar süspansiyon tamponu ile ayrıştırıldı ve daha sonra 3'-son adenin nükleotit ilavesine tabi tutuldu. Son olarak, dizileme adaptörleri fragmanlara bağlandı ve cDNA fragmanları PCR amplifikasyonu ile zenginleştirildi. Zenginleştirilmiş yaklaşık 260 bp büyüklüğündeki ampliconların sekanslama öncesi kalite kontrolü 2100 BioAnalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, ABD) kullanılarak değerlendirilmiş, elektroferogram ve jel görüntüleri değerlendirilmiştir. Elde edilen ampliconlar kümeleme ve dizileme için zenginleştirilmiş cDNA kütüphaneleri kullanıldı. Her bir örnek için Illumina TruSeq sekanslama platformu (Illumina, ABD) kullanılarak cDNA kütüphanesi (iki biyolojik replikat) için sekanslaması yapıldı (Tardu ve diğ., 2016).

Illumina sekanslama işlemi öncesinde bir takım basamaklar içeren çalışmaları gerektirmektedir. Öyle ki kümeleme (ing. cluster generation-bridge amplification) olarak adlandırılan bu işlemde ilk olarak denatüre edilmiş NGS kütüphane parçaları bir akış hücreesine (ing. flow cell) akıtılır ve tamamlayıcı Illumina adaptör oligo'larının üzerinde hibritlenir. Tamamlayıcı fragmanlar köprü amplifikasyonu PCR'ı ile amplifiye edilerek uzatılır ve aynı tek iplikçikli kütüphane fragmanlarının kümeleriyle sonuçlanır. Sonrasında fragmanlar, tersine çevrilebilir terminatör nükleotidleri kullanılarak hazırlanır ve sıralanır. Baz çiftleri, lazer uyarımı ve floresans tespiti sonrasında tanımlanır ve ham veriler elde edilir (Şekil 3.4).

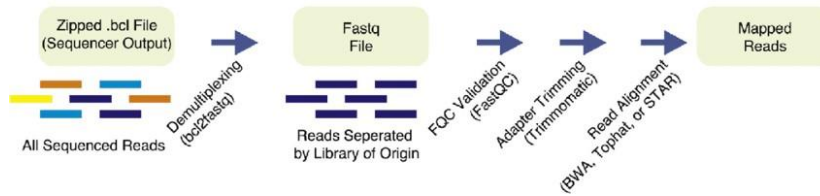
A. KÜMELEME



B. YÜKSEK VERİMLİ SEKANSLAMA



C. SİNYALLERİN BİRLEŞTİRİLMESİ (DEMULTIPLEXING) VE HARİTALARIN OKUNMASI



Şekil 3.4: Illumina dizileme reaksiyonu genel iş akışı (Illumina RNA-sek protokolü v2, 2015).

3.6. HAM VERİLERİN KONTROLÜ VE *DE NOVO* TRASKRİPTOM İNŞAASI

Yeni nesil sekanslama teknolojisi her ne kadar yüksek doğrulukta okumalar yapmasına rağmen okunmuş baz dizilerinin tamamı doğrudur olarak nitelendirilmez. Öyle ki dizileme cihazlarının nükleotid sırasını eksik, yanlış ve düşük kaliteli okuması, sonrasında yapılacak biyoinformatik analizler için temel sorun olarak görülmektedir. Bu nedenle, baz çağırma (base calling) analizi ile fastq formatında elde edilen ham dizilerin kalite kontrollerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Kalite kontrol uygulaması sırasıyla; adaptör dizilerin kaldırılması, düşük kaliteli dizilerin çıkarılması (phred skor < 20), rastgele primerler ile kütüphane hazırlama

temelli hatalı okunan ilk 10 bazın dizilerden çıkarılması, uzunluğu 50 bazdan kısa olan dizilerin elenmesi ve son olarak dizi içinde okunmayan veya tespit edilemeyen (N) bazların sayısı 5'ten fazla olan dizilerin çıkarılması gibi kalite kontrol adımlarını içermektedir.

Sekanslama sonrası elde edilen ham okumaların kalite kontrolü FastQC yazılım aracı⁵(v0.11.5) kullanılarak yapıldı. Sonrasında düşük kaliteli okumaların (phred skor < 20) ve adaptör kontaminasyonunun ortadan kaldırılması Trimmomatic (v0.35) (Bolger ve diğ., 2014) yazılım aracı kullanılarak gerçekleştirildi. Yüksek kaliteli okumaların fastq dosyaları kaydedilmiş ve GSE115199⁶ katılım numarası ile NCBI'daki GEO veri tabanına kaydedilmiştir. Tüm alt analizler yüksek kaliteli, temiz veriler kullanılarak yapılmıştır.

De novo birleştirme analizi *De Bruijn* grafik algoritma temelli Trinity yazılım aracı⁷ kullanılarak varsayılan parametrelerle gerçekleştirildi (Grabherr ve diğ., 2011). *De Bruijn* grafik algoritmasında kısa okumalar, birbirleriyle çakışan küçük küme dizilerine bölünür (*k-mers* olarak adlandırılır) ve bir yön grafiğinin oluşturulmasında kenarlar olarak kullanılır. Trinity yazılım aracı *k-mer* frekanslarına dayandığı için hata düzeltme, *k-mer* uzunluğunu 25 baz uzunluğunu kullanacak şekilde ayarlanmıştır.

Lens culinaris Medik. bitkisi *de novo* birleştirme inşasında (ing. assembly) tüm kuraklık stresi uygulanmış örnekler kontrolleri (stressiz) ile birlikte, kök ve yaprak örnekleri için (1. gün ve 4. gün) ve gövde dokuları için ise (1. gün) için belirtilen zaman noktalarında kullanılmıştır. Gövde örneklerinde mRNA seviyeleri düşük olduğu için herhangi bir alt analiz yapılmasa da, sadece daha eksiksiz *de novo* birleştirme elde etmek için kullanılmıştır.

De novo birleştirme inşasından sonra, birleştirme analizinin bütünlüğü CEGMA yazılım aracı ile değerlendirilmiştir (Parra ve ark. 2007). Daha sonra, tam uzunluktaki transkript sayımı, BLASTX homology search (BLAST+ v2.3.0) -evaluate $1e^{-20}$ -num_threads 6 -max_target_seqs 1 -outfmt 6 değerleri göz önünde bulundurularak UniProt veri tabanında Trinity analyze_blastPlus_topHit_coverage.pl uzantısının çalıştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamız kapsamında ileri düzey işlem gerektiren tüm analizler, Koç Üniversitesi Kimya ve

⁵ <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

⁶ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE115199>

⁷ <http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>

Biyoloji Mühendisliği Bölümü bünyesinde yer alan iş istasyonunda gerçekleştirilmiştir (144GB RAM, 48 Çekirdek İşlemci).

3.7. FARKLI EKSPRESE OLAN GENLERİN (DEGS) ANALİZİ

Okumalar, varsayılan parametrelerle Bowtie aligner (Langmead ve diğ., 2009) kullanılarak *de novo* transkriptom inşasına eşleştirildi. Daha sonra tüm örneklerde transkript bolluklarını ölçmek için RSEM yöntemi kullanıldı (Li ve Dewey, 2011). Her örneğin biyolojik kopyaları arasındaki tekrarlanabilirliği değerlendirmek için, Pearson korelasyon analizi RSEM hesaplanmış okumalar kullanılarak R^2 transkript seviyesinin elde edilmesi için uygulanmıştır. Farklı zaman noktalarında kök ve yaprak dokuları arasında farklı eksprese olan genlerin testi için, edgeR (Robinson ve diğ., 2010) veri tabanı hata bulma oranı q değeri < 0.01 (false discovery rate) ve $\log_2(\text{RPKM-tr} / \text{RPKM-cont}) \geq 1$ değeri dikkate alınarak gerçekleştirildi.

3.8. TRANSKRİPTLERİN GEN ONTOLOJİSİNİN (GO) VE KEGG METABOLİK YOLAKLARININ BELİRLENMESİ

Annokript yazılım aracı (Musacchia ve ark., 2015) trinity birleştirmesi yapılmış *de novo* transkriptlerinin gen ontolojisi (GO) açıklamaları için kullanılmıştır.⁸ Swiss-Prot (SP) ve UniRef90 (sürüm: Şubat 2017) kullanılarak blastp protein belirlenmesi $\text{word_size} = 4$; $\text{e-value} = 10^{-5}$; $\text{num_descriptions} = 5$; $\text{num_alignments} = 5$; $\text{threshold} = 18$ değerleri göz önüne alınarak gerçekleştirilmiş ve her sekans için en iyi uyum gösteren sonuç tercih edilmiştir. Korunan Etki Alanları Veritabanında (CDD) varsayılan proteinlerin alan bileşimini tanımlamak için Rpsblast parametreleri ($\text{e-value} = 10^{-5}$; $\text{num_descriptions} = 20$; $\text{num_alignments} = 20$) (Marchler-Bauer ve ark., 2015) kullanılmıştır. Tüm *de novo* birleştirilmiş transkriptler, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanına⁹ dayalı BLAST algoritması (Blastx / Blastp 2.2.29+) kullanılarak GENES¹⁰ yazılım aracı ile sıralanmıştır. GO terimi fonksiyonel zenginleştirme analizinden sonra, Cytoscape (v2.8.3)¹¹ yazılımında BiNGO eklentisi (v2.44)¹² kullanılarak terimler arası görünür bir ağ oluşturma amacı ile korelasyon analizi yapılmış ve grafik haline getirilmiştir (Tardu ve diğ., 2016). Aşırı temsil edilen kategoriler, Benjamini and

⁸ <https://github.com/frankMusacchia/Annocript/tree/master/GUIDE>

⁹ <http://www.genome.jp/kegg/>

¹⁰ <http://www.genome.jp/kegg/genes.html>

¹¹ <http://www.cytoscape.org/>

¹² <http://apps.cytoscape.org/apps/bingo>

Hochberg yanlış keşif oranı (FDR) düzeltmelerinden sonra anlamlı bir eşiği olan hipergeometrik bir test kullanılarak belirlendi ($p < 0.0001$).

3.9. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF PCR (RT-PCR) İLE RNA-SEK SONUÇLARININ DOĞRULANMASI

RNA sekansı sonuçlarını doğrulamak için temsili 12 farklı DEG seçilerek RT-PZR vasıtasıyla doğrulanması yapıldı. Seçilen DEG fastaq dosyaları Primer3Plus¹³ veri tabanı kullanılarak en iyi skoru veren diziden seçilerek, 200 bp uzunluğunu geçmeyecek şekilde belirlendi. Total RNA, TRIzol reaktifi (Invitrogen, ABD) ve ardından DNase I uygulanması yapılarak ekstre edildi. Daha sonra, rasgele hekzamer oligoları kullanılarak birinci-iplik cDNA sentezi için toplam 1 µg RNA kullanıldı. qRT-PZR, CFX Connect Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sistemi (Biorad, ABD) cihazında Luminaris HiGreen qRT-PCR Master Mix (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak, Tablo 3.1'de gösterilen gene özgü primerlerle gerçekleştirilmiştir. İfade seviyesi numuneler arasında değişmeyen β -tubulin geni bir iç referans geni olarak kullanıldı (Saha ve diğ., 2012). Amplifikasyon programları 4 dakika boyunca 95 °C; 8 saniye boyunca 95 °C, 10 saniye boyunca 60 °C ve 20 saniye boyunca 72 °C'den oluşan 35 döngü ve erime eğrilerini oluşturmak için bir termal denatüre adımını içeren (95 °C 10 saniye, 70 °C 5 saniye) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Tüm tepkimeler biyolojik üç kopya halinde (her biri iki teknik kopya içerecek şekilde) gerçekleştirildi ve sonuçlar her örnekte β -tubulin geninin transkripsiyon seviyesine göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak belirlendi (Livak ve Schmittgen, 2001). mRNA ifade verileri GraphPad Prism sürüm 7 (GraphPad yazılımı, ABD) kullanılarak analiz edildi. Tüm veriler, mRNA ekspresyonunun \pm S.D (n = 6) ortalaması olarak gösterilmiştir.

¹³ <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

Tablo 3.1: RT-PCR ileri ve geri primer dizileri (Morgil ve diğ., 2019).

Gen No	NCBI Gen No	İleri Primer (5' - 3')	Geri Primer (5' - 3')
β -tubulin	X75327.1	GGAAGGCTTCTTGCATTGG	GGCTTCGGTGAATTCCATCTC
DN737	816430	TTTGTTGTGCTGAGGCGAAG	TGTAACCAAAGGCCACCAAC
DN35830	4352852	AACCGGTTGCAACTTTGACG	TTCTGCAAGTGTGGTTGGAG
DN40733	826859	AAGCTGCTGCATGTCTTTGC	AGGGAACAAGTGTACCAGGAG
DN41444	828398	AGCTCGAGTTATTGCAGACG	TGCAACAGGTAGCAGCAATG
DN10418	107916455	ACGGCCAAAAAGGTGAAAGC	AACTTTGGCAGTGCAAACGG
DN47648	827863	TGCATCTAAGCGCGAACAAC	ACAAAATCACGCCCAAACCG
DN49793	793030	ACGTGGCAGTTGATGGTTTC	TTCCCAACCCAAATGTACGC
DN40029	836771	ATCCTTGCCAATGCTGTTGC	TCGAAGCATCACAACCCTTG
DN40968	825519	TGCGTTCAAAAGGTTGTGG	AGGGCCATTGCTTGTTTGTG
DN44077	8616576	GCGCGTAAGTTGGTTGAAGAC	TCCGACACAAACTCAAACGG
DN44615	821540	ACTGCTTGTGTTGGTTGCTC	ATTGAATGCACACGCGCTTC

4. BULGULAR

4.1. ÇİMLENMENİN KURAKLIK STRESİNE CEVABI VE FİZYOLOJİK ANALİZLER

Bu tez çalışmasında, kısa ve uzun süreli kuraklık koşullarında kök, gövde ve yaprak dokularının genom genişliğinde transkripsiyonel düzenlenmesi hakkında daha iyi bir fikir edinmek için kuraklığa duyarlı mercimek çeşidi (*Lens culinaris* Medik. cv. Sultan) kullanılmıştır (Morgil ve ark., 2017). Bu amaçla, ilk olarak mercimek tohumları, farklı PEG konsantrasyonlarına karşı canlılık oranı hesaplanarak optimum kuraklık konsantrasyonunu belirlemek için çimlendirilmiştir. %15 PEG varlığında yetişen tohumlar, kontrol grubuna göre %60 oranında yaşamsal devamlılık göstermiştir ($p < 0.0001$). Bunun aksine %15'e oranla %20 ve %25 PEG konsantrasyonunda yetiştirilen tohumların çimlenme oranları sırasıyla %10 ve %1 olduğundan bu tez çalışmasında kuraklık stres konsantrasyonu %15 olarak belirlenmiştir ($p < 0.0001$) (Şekil 4.1a).

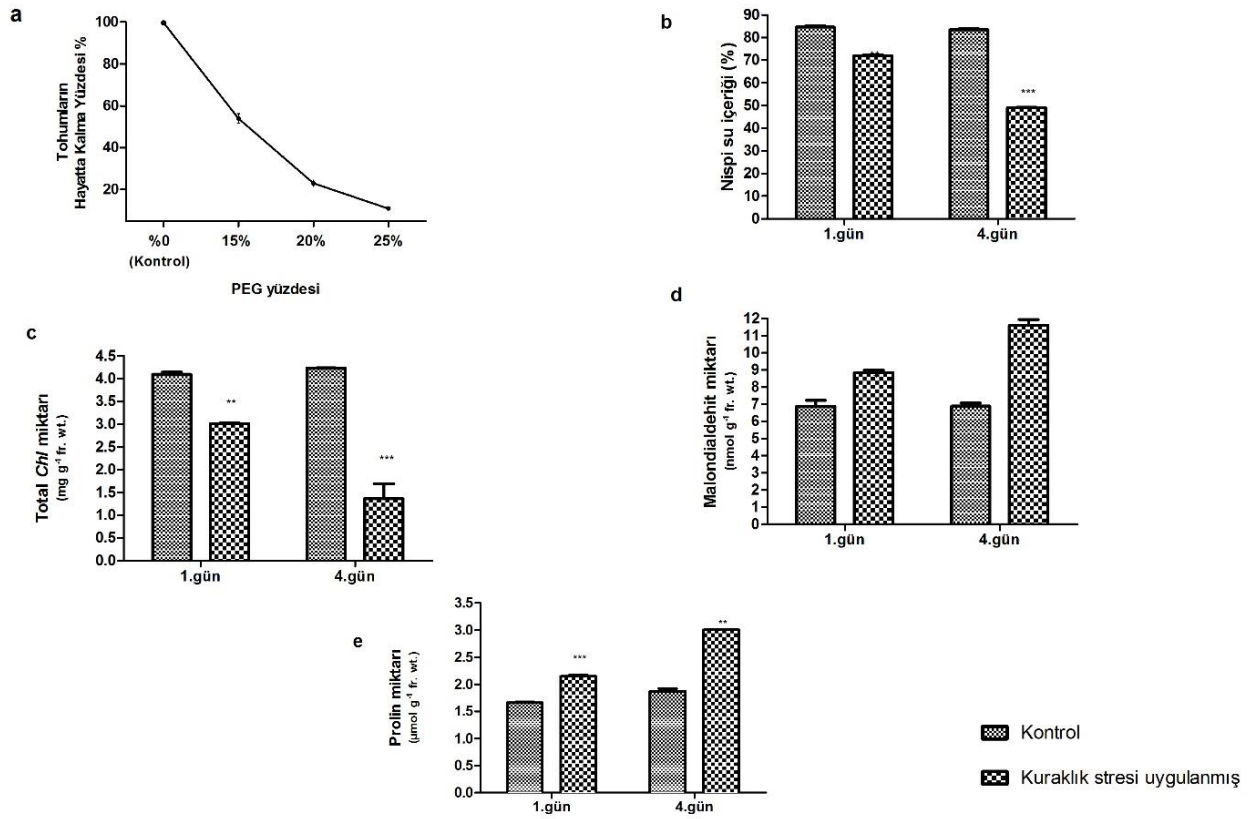
Biyokimyasal ve fizyolojik analizler için 7 gün perlit içeren saksılarda yetiştirilen bitkiler 7. günün sonunda %15 PEG içeren su kültürü ortamına alınmış ve örnekler 24 saat (1. gün; kısa süreli) ve 96 saat (4. gün; uzun süreli) sonunda hasat edilmiştir. RNA izolasyonları da aynı şekilde bu hasat edilen örneklerden yapılmıştır.

Nispi su içeriği (RWC), toplam klorofil miktarı (*Chl*), prolin ve malondialdehit (MDA) içerikleri kuraklık stres göstergeleri olarak ölçülmüştür. RWC değerleri kontrol grubuna oranla 1. gün %12,5 (kontrol grubuna göre $p < 0.01$), 4. gün ise %50 (kontrol grubuna göre $p < 0.005$) oranında anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.1b). Beklenen şekilde, uzun süreli kuraklığa maruz kalan bitkilerin RWC değeri, kısa süreli kuraklık stresine maruz kalan bitkilere göre %35 daha düşüktür.

Örneklerin *Chl* içeriğinin kuraklık stresine karşı verdiği cevaplar, hem kısa hem de uzun süreli kuraklık koşullarında anlamlı şekilde düşüş göstermiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde bu düşüş 1. günde %25 oranında olurken (kontrol grubuna göre $p < 0.01$), 4. günde %75 (kontrol grubuna göre $p < 0.005$) oranında belirlenmiştir (Şekil 4.1c). Dolayısıyla *Chl* içeriği uzun süreli kuraklıkta kısa süreli kuraklığa oranla %50 azalma ile sonuçlanmıştır.

Kuraklık stresinin bir başka göstergesi, MDA içeriğinin seviyesine göre lipid peroksidasyonun belirlenmesidir. Tüm örneklerde MDA miktarının, kuraklık stres uygulanmış örneklerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1d). Kuraklığa bağlı beklenen bu artış 1. günde %25 oranında olurken (kontrol grubuna göre $p < 0.01$), 4. günde %75 (kontrol grubuna göre $p < 0.005$) oranında belirlenmiştir. Sonuç olarak MDA içeriği uzun süreli kuraklıkta kısa süreli kuraklığa oranla %50 artış göstermiştir.

Son olarak, örneklerde kuraklık stresi altında artması beklenen prolin miktarı ölçülmüştür. Şekil 4.1e'de görüldüğü gibi, prolin içeriği kontrol grubuna oranla 1. gün %20 (kontrol grubuna göre $p < 0.005$) ve 4. günde ise %40 oranında (kontrol grubuna göre $p < 0.01$) anlamlı olarak artmıştır. Dolayısıyla prolin içeriği uzun süreli kuraklıkta kısa süreli kuraklığa oranla %60 artış ile sonuçlanmıştır.



Şekil 4.1: Farklı kuraklık stresi koşullarında *L. culinaris* fide dayanıklılığı yüzdesi (%0 (kontrol), %15, %20 ve %25 PEG) (a). Hata çubukları standart sapmayı (SD) (n = 30) temsil eder. *L. culinaris*'in fizyolojik analizi (b) nispi su içeriği, (c) toplam klorofil (Chl) içeriği, (d) malondialdehit içeriği ve (e) prolin içeriği kontrol (- stres) ve kuraklıktaki (+ stres) değişimleri göre ayrılır. Testler, stres uygulanmasının 24. (1. gün) ve 96. saati (4. gün) sonunda yapıldı. Üç biyolojik ve üç teknik replikanın standart hataları anlamına gelir. Veriler, iki yönlü ANOVA varyans analizi (Brown-Forsythe Test) kullanılarak analiz edildi. Yıldızlar, kontrol örneklerine karşı * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005 anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir (Morgil ve diğ., 2019).

Kuraklık stresi altındaki bitkilerde Fotosistem II verimliliği (F_v / F_m), Fotosistem II verimliliğinin faaliyeti ($\Phi PSII$), fotokimyasal söndürme (qP) ve fotosentetik elektron transportunun (ETR) çalışma verimliliğinin düşmesi beklenirken fotokimyasal olmayan söndürme verimliliğinde (ϕNPQ) ve düzenlenmemiş enerji yayılımının (ϕNO) artması beklenir (Yao ve ark. 2018). Bu nedenle, RNA sekanslama için kullandığımız bitkilerin kuraklık stresi durumunda olduğundan emin olmak için ayrıca tüm bu parametreler ölçülmüştür. Beklendiği gibi, F_v / F_m , $\phi PSII$ ve qP değerleri kuraklık koşullarında azalmıştır (Tablo 4.1). Kısa vadeli kuraklık koşullarında (1.gün) ϕNPQ değişmezken, uzun süreli kuraklık koşullarında (4. gün)

seviyesi önemli ölçüde artmıştır ($p < 0.05$). Açık PSII reaksiyon merkezlerinin fraksiyonunu değişen floresans qP ile ölçülerek tahmin edilmiştir. Sonuçlar, uzun süreli kuraklık stresinin (4.gün), kısa süreli kuraklık stresi (1.gün) ile karşılaştırıldığında açık PSII reaksiyon merkezlerinin sayısında önemli bir azalmaya ($\sim 40\%$, $p < 0.01$) neden olduğunu göstermiştir (Tablo 4.1). Diğer fotosentetik parametreler, ETR ve ϕNO , ayrıca belirlenmiştir. Devam eden kuraklık ile ETR düşüş göstermeye başlamış ve 4. günün sonunda önemli bir azalma göstermiştir ($p < 0.01$). Ayrıca, uzun süreli kuraklık stresinde (4. gün) artmış ϕNO seviyeleri belirlenmiştir ve bu durum bitkinin fotosentetik yayılımı ile başa çıkamamasını işaret etmektedir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Kuraklık stresinin (KS) klorofil flüoresans parametreleri (F_v / F_m) üzerindeki etkisi ve *L. culinaris* fidelerinde ışık tutma ve enerji kullanımı dengesi üzerine olan değişiklikler. Tüm ölçümler ortalama değerler için üç biyolojik replikanın standart sapması olarak temsil edilmektedir. Anlamlı farklılıkların test edilmesi için Tukey testi yapılmıştır. Yıldız işareti, kontrol ve kuraklık-stres örnekleri arasında aynı parametrenin önemli ölçüde farklı değerlerini temsil etmektedir (* $p < 0.05$), (** $p < 0.01$) (Morgil ve diğ., 2019).

Örnek	F_v/F_m	$\Phi PSII$	ΦNPQ	ΦNO	qP	ETR
1.gün	0,81±0,01	0,42±0,02	0,22±0,02	0,26±0,01	0,75±0,01	57,58±2,10
1.gün KS	0,79±0,01*	0,39±0,01	0,24±0,04	0,34±0,09	0,56±0,02	49,62±1,15
4.gün	0,82±0,00	0,41±0,01	0,23±0,04	0,27±0,00	0,79±0,05	51,37±2,35
4.gün KS	0,58±0,03**	0,19±0,02*	0,32±0,02*	0,57±0,04**	0,31±0,04**	25±1,85**

Bütün bu fizyolojik ve biyokimyasal sonuçlar mercimek fidelerinin su yetersizliği koşullarında olduğunu göstermektedir. Ayrıca devam eden kuraklıkta (4. günde 1. güne oranla) tüm parametrelerin artışının devam etmesi ile de desteklenmektedir.

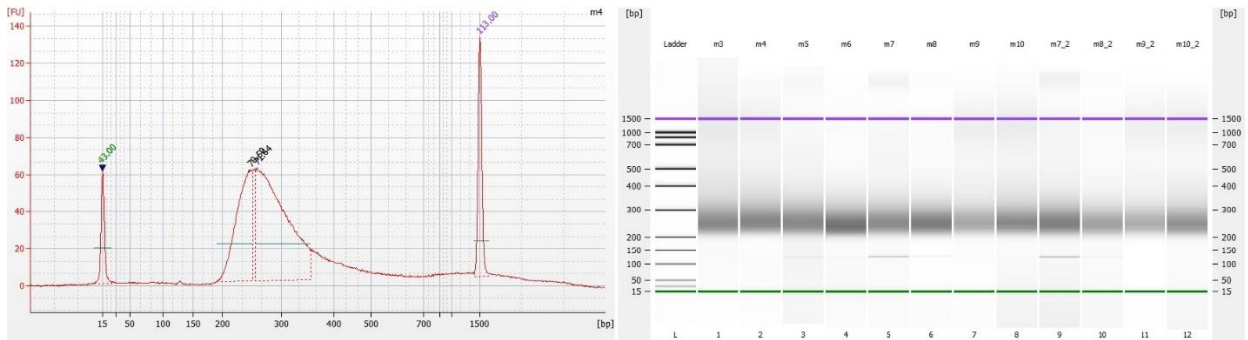
4.2. RNA İZOLASYONU VE KÜTÜPHANE HAZIRLIĞI

Mercimek bitkilerinin kök, gövde ve yaprak dokularının farklı kuraklık zaman noktalarında hasat edilmesini takiben total RNA izolasyonları yapıldı. RNA örneklerinde herhangi bir bozunma ve genomik DNA kontaminasyonuna rastlamamak amacı ile %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrolleri sağlandı. Transkriptom dizileme analizinin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi, büyük ölçüde total RNA'nın kalite ve miktarına bağlıdır. Dolayısıyla RNA numunelerinin miktarı ve kalitesi Qubit® 2.0 spektrofotometresi (Invitrogen, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlarda total RNA'ların ortalama miktarı 572,82 ng/μl olarak ve ayrıca RNA bütünlüğünü gösteren RIN değerinin ise ortalama 8,41 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Dokuya özgü gerçekleştirilen total RNA izolasyonlarının kalite ve miktar sonuçları

Örnek kodu	RIN Değeri	Saflık Oranı (260/280)	Miktar (ng/μl)
Yaprak_1	8,16	1,89	810,2
Yaprak_2	8,56	1,92	780,6
Yaprak_3	8,49	1,95	546,6
Gövde_1	8,55	1,86	688,2
Gövde_2	8,24	1,92	598,3
Gövde_3	8,27	1,88	778,2
Kök_1	8,33	1,95	336,7
Kök_2	8,66	1,96	369,4
Kök_3	8,45	1,86	247,2

Dolayısıyla, saflaştırılan total RNA değerlerinin transkriptom dizileme reaksiyonu için istenilen seviyede olduğu belirlenerek RNA-sek kütüphaneleri hazırlanma aşamasına geçilmiştir. Kütüphane hazırlığı sonrasında dizileme için örneklerin kalite ve miktar kontrolleri 2100 BioAnalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, ABD) kullanılarak değerlendirilmiş ve Tru-sek RNA örnek hazırlama protokolünde belirtilen şekilde örneklerin boyutlarının beklenen şekilde 200-400 bp arasında olduğu hem elektroferogram hem de jel görüntüsü ile doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Sonrasında örnekler Illumina Truseq platformu kullanılarak sekanslanmıştır.



Şekil 4.2: Elde edilen RNA kütüphanelerinin Bioanalyzer cihazı ile kalite ve miktar kontrollerini gösteren elektroferogram ve jel görüntüleri.

4.3. TRANSKRİPTOM DİZİLEME ANALİZLERİ

4.3.1. Sekanslama ve *De novo* birleştirme analizleri

Illumina Truseq platformu kullanılarak gerçekleştirilen dizileme sonucunda, 64 nt baz uzunluğunda çift yönlü (pair-end) ham okumalar ve yaklaşık 60 Gbp boyutunda çıktı elde

edilmiştir. Elde edilen ham okumalar kalite kontrolden geçirilmiş ve yüksek kaliteli okumalar olarak belirlenmiştir. Yüksek kaliteli okumalar Fred skoru (Q) ile değerlendirilen ve 20-60 arasında bir değer çıkaran bir sonuçtur ve Q20 değeri nükleotidin %99 oranında doğru okunduğunu göstermektedir. Trinity yazılım aracı¹⁴ (Zhao ve ark. 2011) ile örnekler ham verilerin düşük kaliteli okumalarını ortadan kaldırmak amacı ile analize tabi tutulmuş ve 20 nükleotitten kısa okumalar ortadan kaldırılmıştır (Q < 20). Düşük kaliteli okumaların ortadan kaldırılması sonucu okumalar yüksek kaliteli hale gelerek analizlere devam edilmiştir (Q > 40, ~%99.99).

Transkriptom dizileme analizi sonucunda, *Lens culinaris* Medik. bitkisinin Sultan çeşidinin tüm dokularından 64 nükleotid uzunluğunda yaklaşık 568 milyon (568.571.434) temiz ham okumalar elde edilmiştir. *De novo* transkriptom veri inşası sonucunda ise, ortalama 950 nt uzunluğunda 207.076 transkript elde edilmiştir. Ayrıca transkript uzunluğu ve *de novo* transkriptom analizinin başarısı arasındaki ilişkiyi gösteren N50 uzunluğu, 1.638 nt uzunluğu ile 124.151 gen tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Transkript uzunluk dağılımı analizleri 94.449 transkriptin uzunluğunun (% 45.61) 500 ila 2.500 nt arasında olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak, en kısa transkript 201 nt uzunluğunda iken, en uzun transkript 12.367 nt uzunluğundadır.

Tablo 4.3: *Lens culinaris* Medik. Sultan çeşidinin transkriptom dizilemesi ve birleştirme analizi istatistikleri (Morgil ve diğ., 2019).

Öge	Değer
Filtreleme sonrası toplam temiz okuma sayısı	568.571.434
Kesilmiş okuma çiftlerinin ortalama uzunluğu (nt)	64
Birleştirilmiş transkriptlerin toplam sayısı	207.076
Mbp cinsinden birleştirilmiş transkript boyutu	196.5
Ortalama transkript uzunluğu (nt)	950
Contig uzunluğunun ortalama değeri	550
Transkriptlerin N50 değeri (nt)	1638
En uzun transkript uzunluğu (nt)	12.367
Toplam gen sayısı	124.151

¹⁴ <http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>

RNA-sek verileri doğrultusunda elde edilen *de novo* transkriptom birleştirme analizi önceki çalışmalara göre (Singh ve diğ., 2017; Sudheesh ve diğ., 2016) transkript sayısı açısından, kısa ve uzun süreli kuraklık stres koşullarında farklı dokuların kullanılmasından dolayı, önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, hem kısa süreli hem de uzun süreli kuraklık stresi koşulları altında kök, gövde ve yaprak dahil üzere farklı mercimek dokularının kullanılmış olması ile açıklanabilir. Bu muhtemelen çok sayıda transkript ile daha eksiksiz bir *de novo* transkriptom inşası sonucunu vermiştir.

4.3.2. *L. culinaris* De novo Transkriptom Analizinin Kalite ve Doğruluğunun Değerlendirilmesi

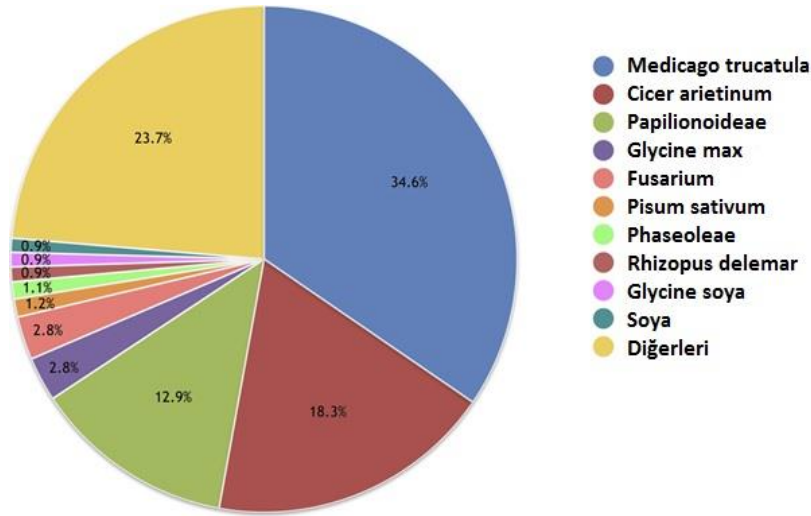
CEGMA yazılım aracı (Parra ve diğ., 2007) *de novo* transkriptom kalitesini ve doğruluğunu belirlemek için kullanıldı. Bu analiz sonucunda, 248 ana ökaryotik proteinin 246'sının (yaklaşık %99.2'e karşılık gelir), birleştirilmiş transkriptomda tamamen örtüştüğü belirlenmiştir. Daha sonra, tüm okumalar Bowtie yazılım aracı (Langmead ve diğ., 2009) kullanılarak her bir RNA-sek örneğinin haritalama yüzdesini elde etmek için birleştirilmiş transkriptom analizine Blastx yardımıyla eşlenmiştir. Sonuçlar tüm okumaların %92-96'sı başarıyla birleştirilmiş transkriptlerle eşleşmiştir ve dolayısıyla birleştirmenin doğruluğu belirlenmiş ve ileri analizlere geçilmiştir. Ek olarak transkriptom kalitesini değerlendirmek için tam uzunlukta transkript analizi yapılmıştır. Sonuçlarda, transkriptlerin %80'inin eşleşme gösteren proteinler olduğu ve tüm eşleşen proteinlerin %54'ünün (9.394 / 17.574) yüksek oranda eşleşmeye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Transkriptlerin, BlastX kullanılarak Uniprot protein veritabanında belirlenmesi (Morgil ve diğ., 2019).

Kapsama yüzdesi (%)	Protein Sayımı	Total Sayım
100	6.369	6.369
90	1.763	8.132
80	1.262	9.394
70	1.069	10.463
60	1.067	11.530
50	1.157	12.687
40	1.225	13.912
30	1.473	15.385
20	1.651	17.036
10	538	17.574

4.3.3. Transkript Annotasyon Sonuçları

De novo transkripsiyon veri analizi sonucunda elde edilen veriler protein kodlayan mRNA'ların yanı sıra protein kodlamayan transkriptleri de içerir. Bu durumda kodlanmayan transkriptlerin elenmesi için tüm açık okuma çerçevelerinin (ORF) belirlenmesi gerekmektedir. Dolayısıyla transkriptlerin olası açık okuma çerçevelerinin (ORF) sayısını hesaplamak için Trinity yazılım aracı kullanılmıştır (Grabherr ve diğ., 2011). Elde ettiğimiz sonuçlar, tüm doku ve saat aralıklarında birleştirme işlemi tamamlanmış transkriptlerin %72.8'inin (207.076 transkriptin 150.680'i) ORF'ye (ing. open reading frame, açık okuma çerçeveleri) sahip olduğunu ortaya koymuştur. Annokript yazılım aracı (Musacchia ve diğ., 2015), bu ORF'lere açıklama yapmak ve birleştirilmiş transkriptlerin varsayılan uzun kodlamayan RNA'larını (lncRNA) belirlemek için kullanılmıştır. Bu analiz için kullanılan Swiss-prot ve UniRef veritabanlarında sırasıyla 96.549 ve 138.111 lncRNA'nın varlığı tanımlamıştır. Ek olarak, 8730 olası lncRNA'lar ($p < 0.05$ ve maksimum ORF: 100 uzunluğu) belirlenmiştir. *L. culinaris*'in *de novo* transkriptom inşası ile tanımlanan transkriptler *Medicago truncatula* ile belirgin bir benzerlik (%34.6) göstermiştir, bunu *Cicer arietinum* (%18.3) ve Papilionoideae (%12.9) ile takip etmiştir (Şekil 4.3 ve EK 1). Sonuçlar, *C. arietinum* ve *M. truncatula* ile en fazla benzerlik gösteren mercimek çizgisinin literatürde önce yayınlanmış sonuçlarla tutarlı olması ile sonuçlanmıştır (Singh ve diğ., 2017; Sudheesh ve diğ., 2016). Sonuçlar incelendiğinde, mercimek çeşidinin (Sultan) Papilionoideae (%12.9) ile üçüncü en yüksek homolojiye sahip olduğu ise literatürdeki diğer bilgilerden farklıdır.



Şekil 4.3: Transkriptlerin UniProt Top-Hit tür dağılımı (Morgil ve diğ., 2019).

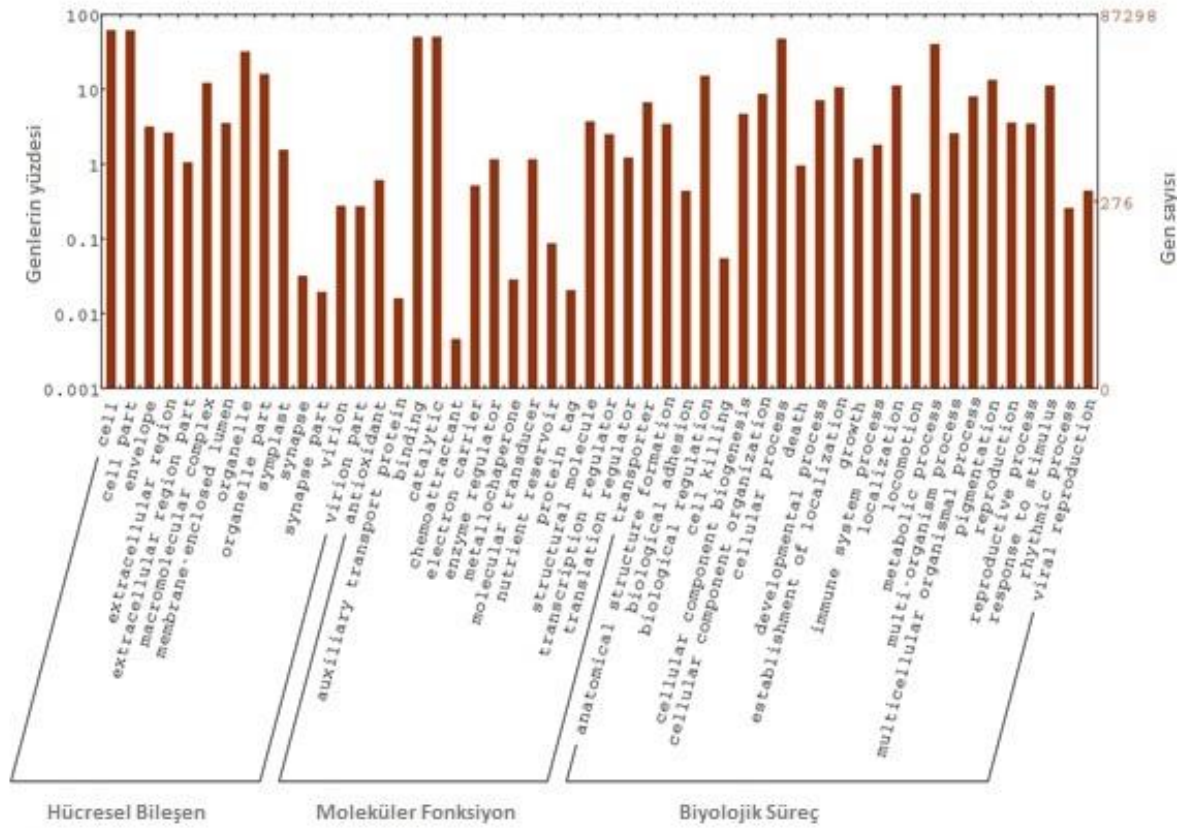
4.3.4. Gen Ontoloji (GO) ve Metabolik Yolak Analizi (KEGG)

Gen Ontolojisi (GO), bir gen ürününün biyolojisinin yönlerini tanımlamak için ortak bir dil sağlamak üzerine kuruludur. Biyolojik sürecin (biological process), moleküler fonksiyonun (molecular function) ve gen ürünlerinin hücresel bileşeninin (cellular component) tanımlanması için kullanılır. Bu terimler, organizma veri tabanları tarafından gen ürünlerinin nitelikleri olarak kullanılır ve GO terimleriyle ifade edilmesi ile benzer süreçlere, fonksiyonlara ve bileşenlere dahil olan gen ürünlerinin sorgulanmasına izin verir.

Transkripsiyon transkriptlerinin biyolojik önemini anlamak için, gen ontolojisi (GO) terim zenginleştirme analizi DAVID yazılım aracı ile gerçekleştirilmiştir (Dennis ve diğ., 2003). Gen Ontolojisi (GO) *de novo* birleştirilmiş transkriptleri üç kategoriye ayırmak için kullanılmıştır: Biyolojik süreç (BP), moleküler fonksiyon (MF) ve hücresel bileşen (CC). *L. culinaris* transkriptlerinin (%42.2) 87.298'i için GO analizi yapılmış ve GO kategori atamaları WEGO¹⁵ yazılım aracı tarafından çizilmiştir (Şekil 4.4). Hücresel bileşen (CC) kategorisi, sırasıyla 14.248 (%62.1) ve 53.935 (%61.8) transkript ile majör oran için hücre ve hücre kısımlarına dahil olan 14 fonksiyonel sınıf içermektedir. Moleküler fonksiyon (MF) kategorisinde ise, 44.114 transkript (%50.5) ile katalitik aktivite ve 44.003 transkript (%50.3) ile bağlanma (binding) ile ilgili sınıflar göze çarpmıştır. Biyolojik süreç (BP) kategorisinde ise, hücresel

¹⁵ <http://wego.genomics.org.cn/>

süreç ve metabolik süreç sınıfları en fazla transkriptlere sahiptir, sırasıyla hüresel süreçlerde 41.589 (%47.6) ve metabolik süreçlerde 35.237 (%40,4) transkript belirlenmiştir. Ek olarak, 11.692 (%13.4) transkript pigmentasyon grubu altında ve 9.824 (%11.3) transkript ise uyarılara yanıt olarak sınıflandırılmıştır.



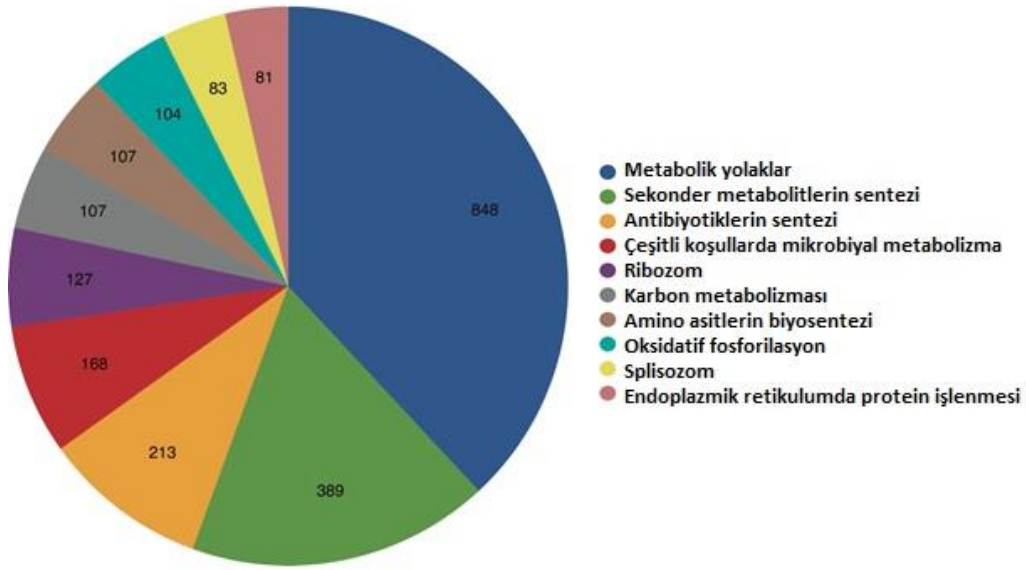
Şekil 4.4: *L. culinaris*'deki transkriptlerin gen ontolojisi (GO) fonksiyonel sınıflandırması. GO dağılımının görselleştirilmesi, WEGO yazılım aracıyla üç ana kategori (biyolojik süreç, moleküler fonksiyon, hüresel bileşen) için GO seviye tanımlamaları kullanılarak yapılmıştır (Morgil ve diğ., 2019).

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), genomik ve moleküler düzeydeki bilgiden hücre, organizma ve ekosistemde bu bilginin üst düzey işlevlerini ve biyolojik sisteme faydalarını anlamak için kullanılan bir veritabanı kaynağıdır. Buna ek olarak KEGG en

kapsamlı metabolik yolak veri tabanı olarak kullanılmaktadır. *L. culinaris*'in sahip olduğu biyolojik yolları tam olarak ortaya çıkarmak için, bütün birleştirilmiş diziler KAAS (KEGG Automatic Annotation Server)¹⁶ internet aracı kullanılarak ifade edilen her bir transkript BlastN (value < 1e-10) algoritması ile metabolik yolakta yer alan genlere haritalanmıştır ve her bir transkript için KO (ing. KEGG Orthology) numarası elde edilmiştir. Bu elde edilen numaralar transkriptlerin deneysel belirlenmiş genler ile örtüşüğünü göstererek hangi yolaklar üzerinde etkili olduğunun belirlenmesini sağlamıştır. Daha sonra KEGG API'si¹⁷ kullanılarak transkriptler yolaqlara eşlenmiştir. Burada KEGG API (uygulama programlama ara yüzü), hücrel süreçlerde biyokimyasal yolların araştırılması ve hesaplanması veya tamamen dizilen genomlardaki genlerin analiz edilmesi gibi KEGG tabanlı analizlerin özelleştirilmesini sağlayan bir programlama ara yüzü olarak tanımlanır. Sonuçlar incelendiğinde, 25.829 transkript 399 farklı KEGG yolağı ile örtüşmüştür (EK 2). En fazla sayıda benzersiz transkripsiyona sahip olan yolaklar, metabolik yolaklar (848 üye), sekonder metabolitlerin biyosentezi (389 üye), antibiyotiklerin biyosentezi (213 üye), çeşitli ortamlarda mikrobiyal metabolizma (168 üye), ribozom (127 üye), karbon metabolizması (107 üye), amino asitlerin biyosentezi (107 üye) ve oksidatif fosforilasyon (104 üye) olarak sıralanmıştır (Şekil 4.5).

¹⁶ <http://www.genome.jp/tools/kaas/>

¹⁷ <http://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html>

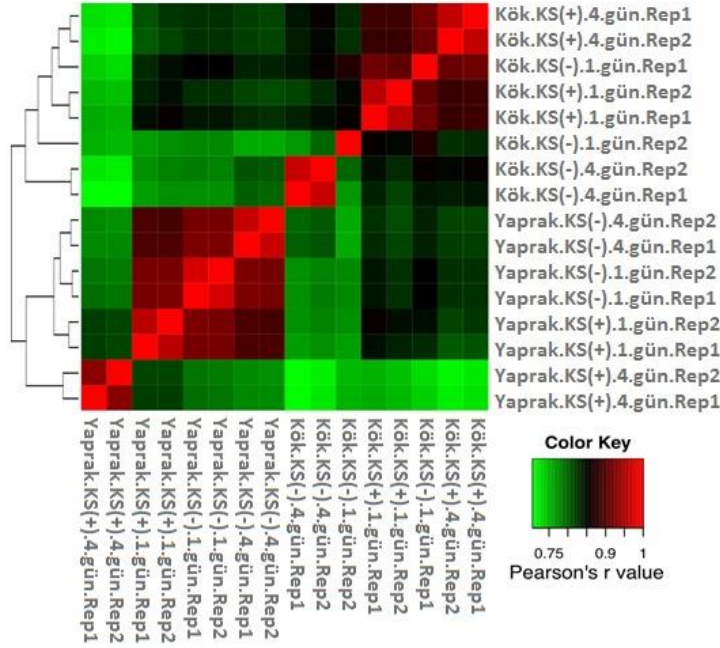


Şekil 4.5: İlk en yüksek transkript sayısına sahip olarak eşleşme gösteren 10 KEGG yoluğu. Pasta grafikteki sayılar, KEGG yolları ile eşleşme gösteren transkript sayısını temsil eder (Morgil ve diğ., 2019).

4.3.5. Kuraklık Stresi Altındaki Yaprak ve Kök Dokularında Farklı Eksprese Olan Genlerin (DEGs) Tanımlanması

Farklı ekspresyon analizi, normalleştirilmiş okuma sayısı verilerinin alınması ve deney grupları arasındaki ekspresyon seviyelerindeki kantitatif değişimlerin keşfedilmesi için istatistiksel analiz yapılması anlamına gelir. Örneğin, belirli bir gen için, okuma sayımlarında gözlemlenen bir farkın, yani doğal rastlantısal varyasyon nedeniyle beklenenden daha büyük olup olmadığına karar vermek için istatistiksel testler kullanılarak belirlenmesidir. Bu amaçla bu tez çalışmasında yaprak ve kök dokularında kısa (1. gün) ve uzun süreli kuraklık (4. gün) koşullarında genom düzeyinde transkripsiyonel değişiklikleri tanımlamak için, RNA-sek verilerinden DEG analizleri gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta, ifade değerlerini (milyonda sayım) kullanarak biyolojik replikatlar arasındaki tekrarlanabilirliği değerlendirmek için Pearson korelasyon testi gerçekleştirilmiştir. Her bir numunenin biyolojik replikatları arasında güçlü bir korelasyon ($R^2 > 0.95$) belirlendikten sonra (Şekil 4.6), her iki dokuda kuraklık

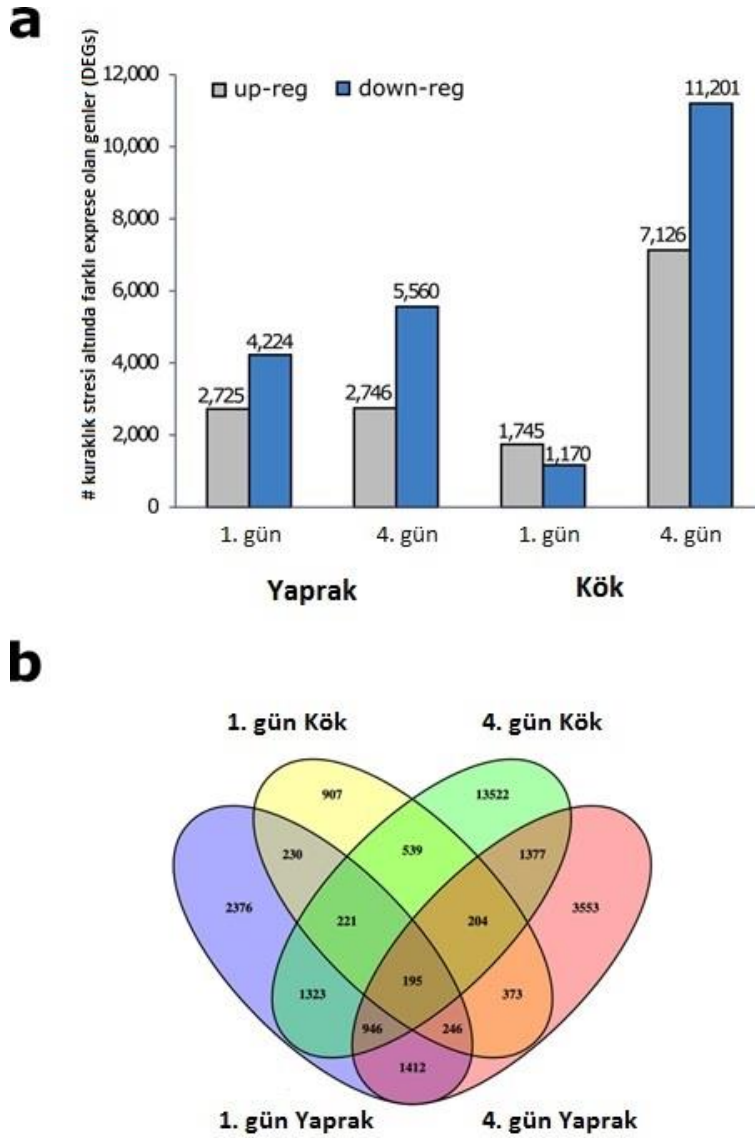
koşulları altında farklı şekilde eksprese olan genleri (DEG'ler) tanımlamak için edgeR yazılım aracı kullanılmıştır.



Şekil 4.6: Kuraklık stresi (KS (+)) ve stressiz koşullar (KS (-)) altındaki 1. gün ve 4. gün kök ve yaprak örneklerinin biyolojik replikatlar arasındaki transkriptlerin tekrarlanabilirliğinin karşılaştırılmasını gösteren korelasyon haritası. Her bir numunenin transkript (CPM, milyonda okuma sayısı) seviyesi için biyolojik replikatları arasında güçlü bir korelasyon ($R^2 > 0.95$) olduğu belirlenmiştir (Morgil ve diğ., 2019).

Tanımlanan tüm DEG'ler ek halinde Morgil ve diğ., (2019) yayınında verilmiştir. Kuraklık stresinin ilk gününde, transkripsiyonel düzenlemeler yaprak dokularında kök dokularına oranla önemli ölçüde değişmiştir öyle ki DEG'lerin sayısı yaprakta 6.949 iken, kökte 2.915 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7a). Bunlar arasında 2.725 gen yaprak dokusunda ve 1.745 gen kök dokusunda artan ekspresyon (upregulation) gösterirken, 4.224 gen yaprak dokusunda ve 1.170 gen kök dokusunda sırasıyla azalan ekspresyon göstermiştir (Şekil 4.7a). Benzer analiz, uzun süreli kuraklık koşullarına maruz kalan dokularda uygulanmış RNAseq verilerinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.7a'da görülebileceği gibi, köklerdeki DEG'lerin sayısında belirgin bir artış olmuş öyle ki 2.915'den 18.327'ye yükselmiştir. Bu durum kökte, mercimekte uzun

sürelî kuraklık stresinin, kök dokusunda gen regülasyonu üzerinde büyük bir etkisi olduğunu göstermiştir. Öte yandan, bitkilerin kuraklık stresine uzun süreli maruz kalması durumunda yapraktaki DEG'lerin sayısında (6.949'dan 8.306'ya) da değişiklik olmuştur. Kısa süreli kuraklık stresi altında yaprak ve kök örneklerinde DEG'lerin (6.949'a karşılık 2.915) sayılarının karşılaştırılması, *L. culinaris*'de yaprakların kök dokularına oranla daha hızlı bir şekilde adapte olduğunu ve su kaybına karşı transkripsiyon düzeyinde daha hızlı bir tepkiye yol açtığını göstermiştir. Büyük olasılıkla mercimek bitkisi köklerinde uzun vadeli kuraklık koşulları ile başa çıkması için gen regülasyonunun daha karmaşık düzenlenmeye sahip olduğunu düşündürmektedir.

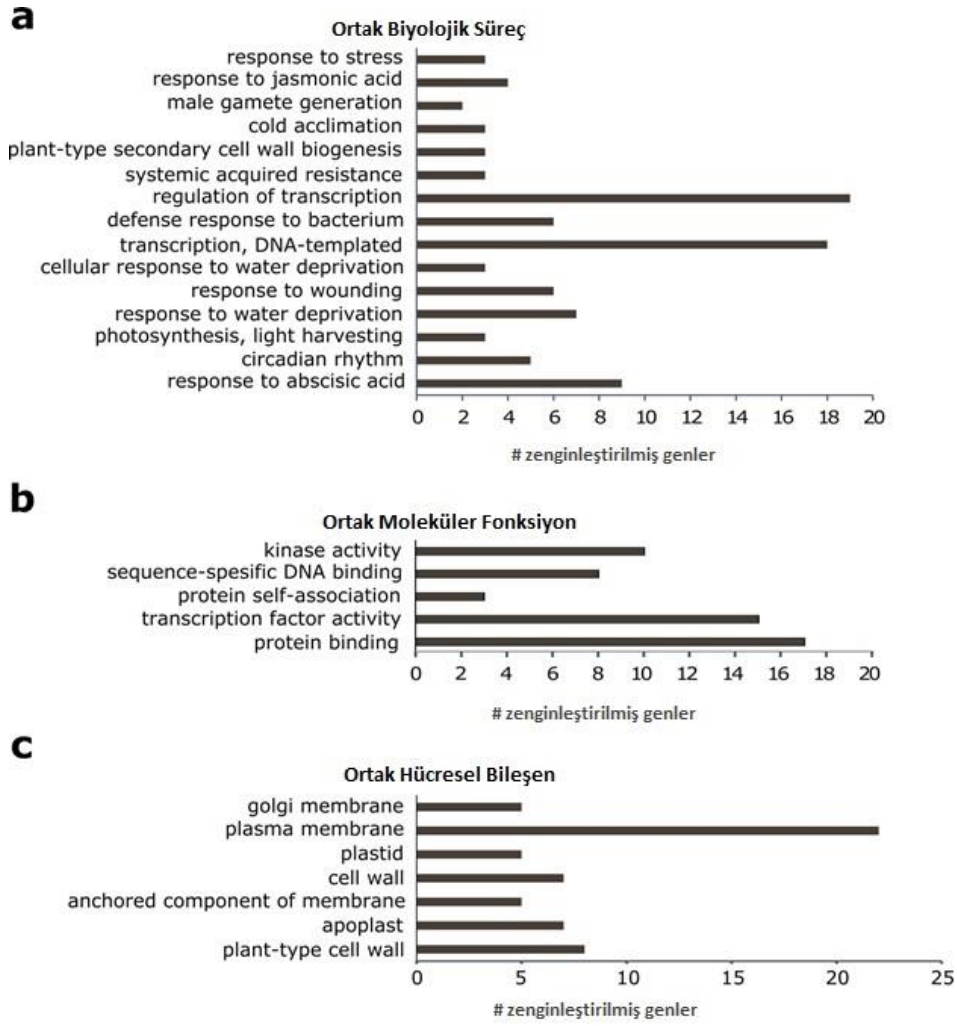


Şekil 4.7: 1. ve 4. günlerde yaprak ve kök örneklerinde kuraklık stresi altında (a) farklı olarak ifade edilen genlerin sayısı (DEG). (b) Venn diyagramı, kuraklık stresinin 1. ve 4. günlerinden sonra yaprak ve kök dokularındaki DEG'lerin sayısını ve her bir gen kümesi arasındaki örtüşmeyi gösterir (Morgil ve diğ., 2019).

4.3.6. Kısa ve Uzun Süreli Kuraklık Koşullarında Kök ve Yapraklar Arasındaki DEG'lerin Karşılaştırılması

Her bir örnek için DEG'lerin tanımlanmasından sonra, iki farklı zamandaki kuraklık koşullarında her iki dokudaki ortak ve örnek spesifik DEG'ler belirlenmiştir (Şekil 4.7b). Analiz sonucu 195 DEGs her koşulda ve dokuda ortak olarak düzenlendiğini göstermiştir (Şekil 4.8a-

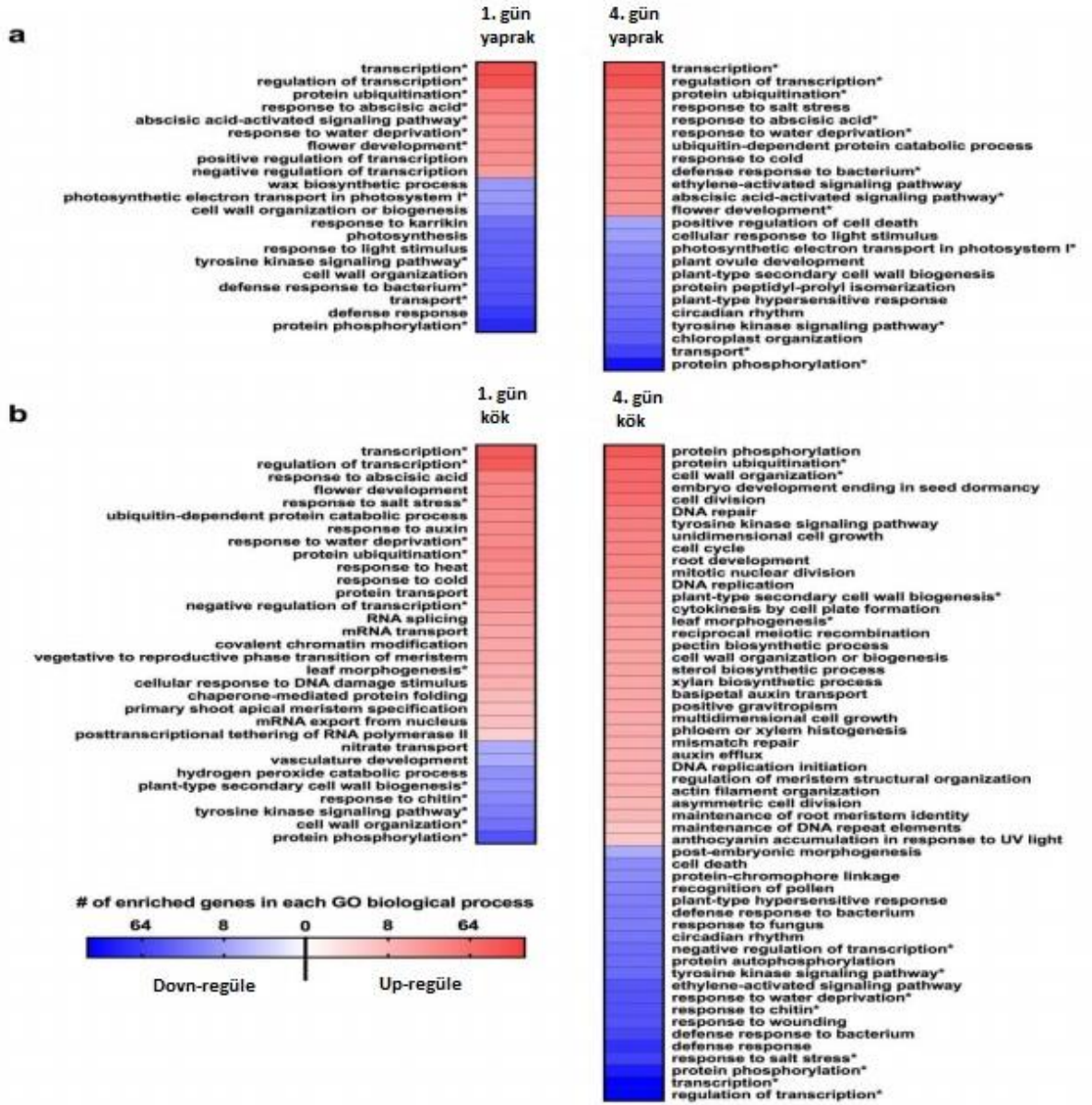
c, Ek 3). 195 DEG için GO terim zenginleştirme analizi (GO term enrichment analysis) gerçekleştirmiştir ve önemli ölçüde biyolojik süreç (BP), moleküler fonksiyon (MF) yollarında farklı ekspresyona olan genler belirlenmiştir (Şekil 4.8a-c, Ek 3). En etkili biyolojik süreçler, transkripsiyonun düzenlenmesi (regulation of transcription) (19 DEGs), DNA-kalıp transkripsiyon (DNA-templated transcription) (18 DEGs), absisik aside yanıt (response to abscisic acid) (9 DEGs) ve su eksikliğine yanıt (response to water deprivation) (7 DEGs) (Şekil 4.8a, Ek 3). Kısa ve uzun vadeli kuraklık koşullarında, kök ve yaprak dokularında belirlenen DEG'lerin spesifik biyolojik süreçlerdeki GO terim zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlarda kök dokusunda her iki kuraklık koşullarında 1.159 DEG saptanmıştır (Şekil 4.7b). Bu DEG'ler arasında önemli ölçüde ($p < 0.05$) artan ekspresyon göstermiş olan başlıca biyolojik süreçler; transkripsiyon, transkripsiyonun düzenlenmesi ve protein ubiquitinasyonu olarak belirlenmiş, azalan ekspresyon gösterenler ise önemli ölçüde ($p < 0.05$); protein fosforilasyonu (protein phosphorylation), transport sistemleri (transport) ve tirozin kinaz sinyal yolağı (tyrosine kinase signaling pathway) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9a, Ek 3). Öte yandan, 1.699 DEG, özellikle kısa süreli kuraklık koşullarında ifade edilirken, 17.148 DEG ise uzun vadeli kuraklık durumu altında farklılık göstermiştir (Şekil 4.7b). Kuraklık durumunun 4. gününde DEG'lerin çok yüksek olması şaşırtıcıdır. Tüm bu DEG'lerin biyolojik süreçler arasında nasıl dağıldığını görmek için yine GO zenginleştirme analizini gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.9a'da görülebileceği gibi, kuraklık durumunun 1. gününde, artan ve azalan ekspresyon gösteren yolların bazıları protein transportu (protein transport), ABA'ya yanıt (response to ABA), RNA ekleme (RNA splicing), çiçek gelişimi (flower development), nitrat taşınması (nitrate transport), sterol biyosentezi (sterol biosynthetic process) gibi ortadan kalkarak yerine 4. günde yeni biyolojik süreçlerin (protein fosforilasyonu (protein phosphorylation), mismatch onarımı (mismatch repair), tohum dormansininin sonlanması ile embriyo gelişimi (embryo development ending in seed dormancy), hücre bölünmesi (cell division) ve tekrar eden DNA birimlerinin DNA replikasyonu boyunca onarımı (DNA replication maintenance of the DNA repeat element) gibi artan veya azalan düzenlenmeleri görünmektedir.



Şekil 4.8: Her iki zaman ve dokuda belirlenmiş ortak 195 DEGs'in önemli ölçüde zenginleştirilmiş ($p < 0.05$) GO terimi analizi; (a) biyolojik süreçler, (b) moleküler fonksiyonlar ve (c) hücresel bileşenler (Morgil ve diğ., 2019).

1. gün ile 4. gün yaprak örnekleri arasında DEG'lerin karşılaştırılmasında çok benzer bir eğilim gözlenmiştir. DEG'lerin ve biyolojik süreçlerin çoğunluğu baskın olarak (transkripsiyon (transcription), transkripsiyonun düzenlenmesi (regulation of transcription), aktif sinyalleme yolu (activated signaling pathway) ve su yoksunluğuna tepki (response to water deprivation) gibi) hem kısa süreli hem de uzun süreli kuraklık koşullarında belirlenmiştir (Şekil 4.9a, Ek 3). Ek olarak, bazı yollar uzun süreli kuraklık koşulları altında spesifik bir farklılık göstererek düzenlenmiştir. Bunlar arasında artan ekspresyon şeklinde düzenlenenler; soğuğa karşı cevap (response to cold), tuz stresine cevap (response to salt stress) ve ubiquitin bağımlı protein katabolik süreç (ubiquitin-dependent protein catabolic process) iken, azalan ekspresyon

gösterenler; kloroplast organizasyonu (chloroplast organization), sirkadiyen ritim (circadian rhythm), hücre ölümünün pozitif düzenlenmesi (positive regulation of cell death) ve ışık uyarımına hücresel yanıt (cellular response to light stimulus) olarak sıralanabilir (Şekil 4.9a, Ek 3). Tüm bu sonuçlar farklı kuraklık koşullarında farklı gen kümelerinin düzenlendiğini ortaya koymuştur ayrıca devam eden kuraklık stresi gen transkripsiyonunu, yaprak ile karşılaştırıldığında köklerde yoğun bir şekilde düzenlendiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.9b, Ek 3).



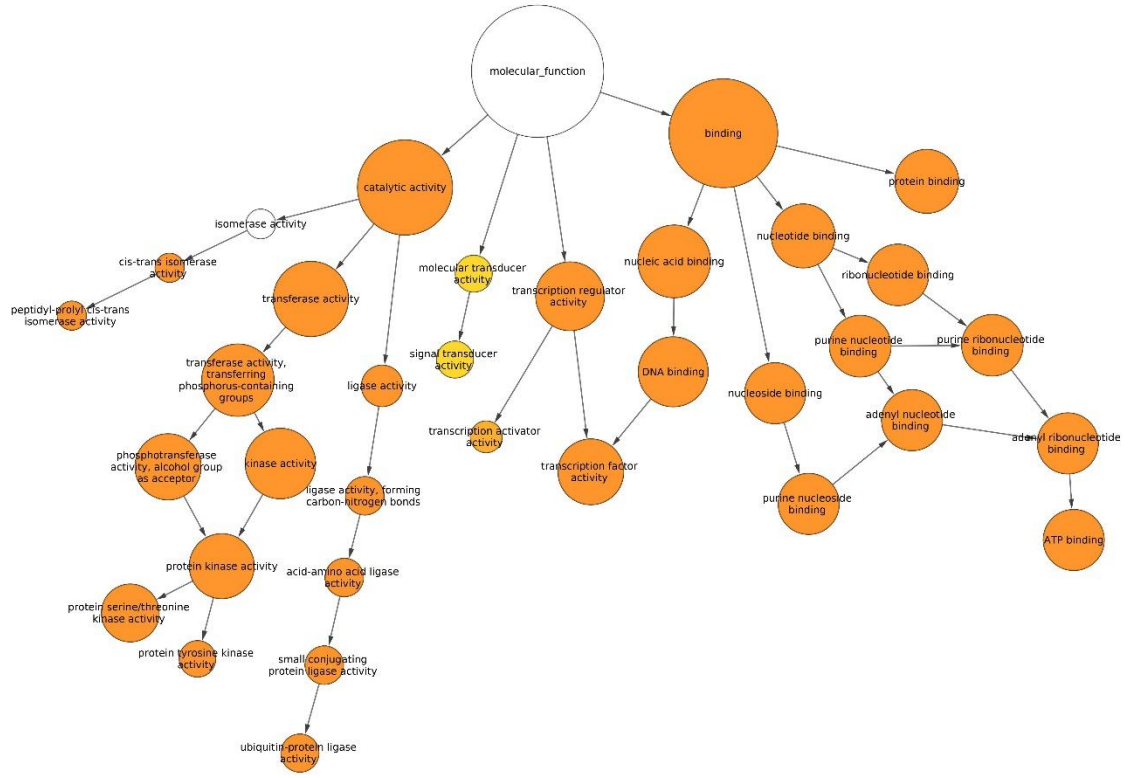
Şekil 4.9: *L. culinaris*'in yaprak ve kök dokularında önemli ölçüde zenginleştirilmiş gen ontolojisi (GO) biyolojik süreçleri (BP). Her bir panel, (a) yaprakta 1. gün ve 4. gün örneklerinde ve (b) 1. gün ve 4. gün örneklerinde önemli ölçüde zenginleştirilmiş GO biyolojik süreçlerini göstermektedir. Yıldızlar, 1. gün ve 4. gün örneklerinde önemli ölçüde düzenlenmiş BP terimlerini belirtir. Her bir BP terimi için zenginleştirilmiş genlerin sayısı hem mavi hem de kırmızı renklerle temsil edilir. Azalan ekspresyon gösteren genler mavi renkle temsil edilirken artan ekspresyon gösteren genler kırmızı renkle temsil edildi (Morgil ve diğ., 2019).

DEG'lerin kuraklık stresine maruz kalan kök ve yaprak hücrelerinde fonksiyonel olarak sınıflandırmak için yapılan GO terim zenginleştirme analizi sonrasında, Cytoscape'deki (v2.8.3)¹⁸ BiNGO eklentisi (v2.44)¹⁹ kullanılarak bir ağ oluşturmak için korelasyon analizi yapılmıştır (Tardu ve diğ., 2016). Atanmış GO terimlerinden biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşenler gruplandırılarak 4. gündeki yaprak (Şekil 4.10-12) ve köklerdeki (Şekil 4.13-15) DEG'lerin fonksiyonlarını sınıflandırmak için kullanılmıştır. Şekil 4.10-15 en anlamlı şekilde zenginleştirilmiş ($p < 0.0001$) GO terimleri gösterilmektedir.

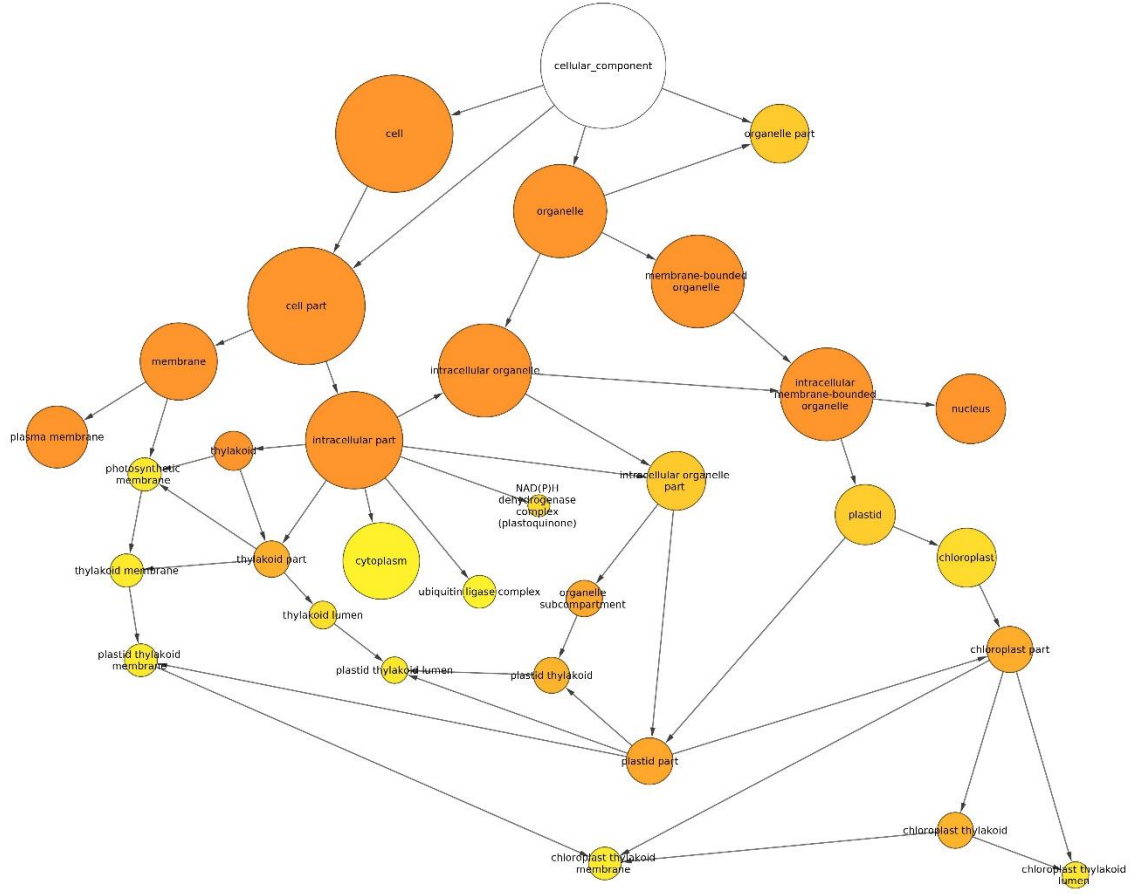
GO biyolojik süreç kategorisinde, 4. günde yapraklarda kuraklığa cevap olarak düzenlenen Şekil 4.10'daki GO terimi ağ analizi sonuçlarında gösterildiği gibi, metabolik işlemler, hücresel işlemler, uyarıya cevap işlemleri, biyolojik regülasyon işlemleri ve ritmik işlemler önemli ölçüde birbiri ile ilişkili durumdadır ($p < 0.0001$). Ek olarak, moleküler fonksiyon ağ analizi, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, protein ve nükleik asit bağlayıcı işlemler ve katalitik aktivite işlemleri ile ilgili genlerin önemli ölçüde ($p < 0.0001$) bağlantılı olduğunu göstermiştir (Şekil 4.11). Hücresel bileşenlere ilişkin analizler, hücre, hücreler arası kısımlar ile özellikle kloroplast membranlarını içeren komplekslerin, *L. culinaris*'in kuraklık cevabında önemli bir ($p < 0.0001$) rol oynadığını göstermiştir (Şekil 4.12).

¹⁸ <http://www.cytoscape.org/>

¹⁹ <http://apps.cytoscape.org/apps/bingo>



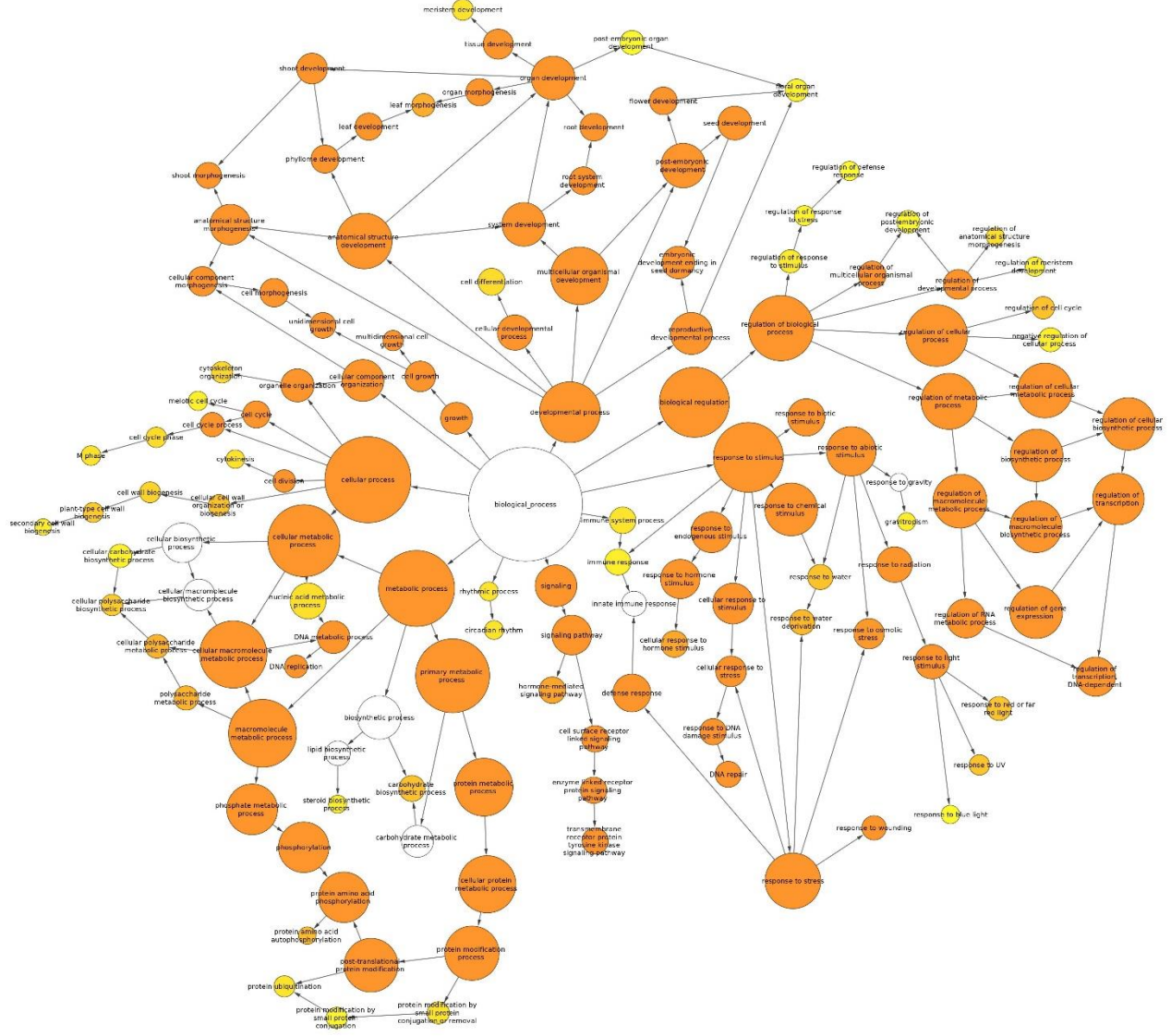
Şekil 4.11: Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün yaprak örneklerinin moleküler fonksiyon kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.



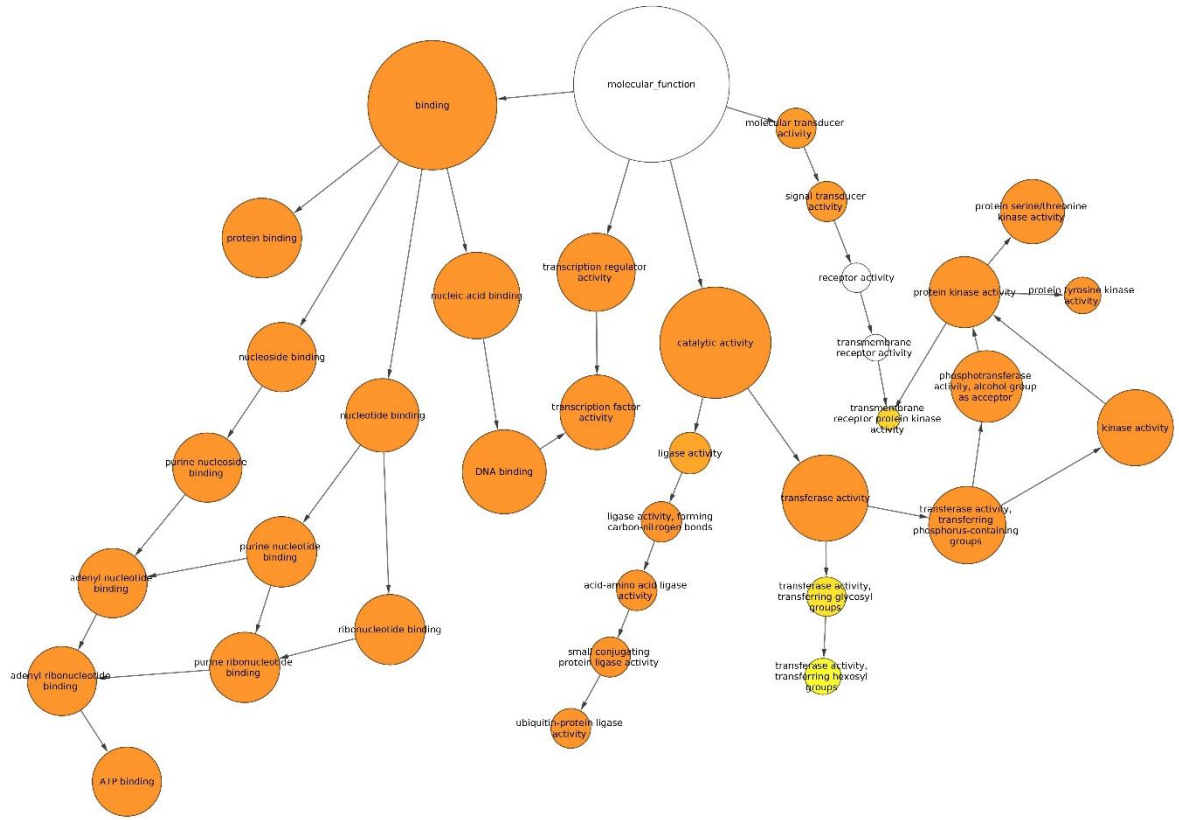
Şekil 4.12: Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün yaprak örneklerinin hücresel bileşen kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.

GO biyolojik süreç kategorisinde, 4. günde köklerde kuraklığa cevap olarak düzenlenen Şekil 4.13'deki GO terimi ağ analizi sonuçlarında yapraklara benzer şekilde, metabolik işlemler, hücresel işlemler, uyarıya cevap işlemleri, biyolojik regülasyon işlemleri ve ritmik işlemler önemli ölçüde birbiri ile ilişkili durumdadır ($p < 0.0001$). Ancak yapraklardan farklı olarak gelişimsel süreçleri içeren yollar köklerde önemli ölçüde ($p < 0.0001$) kuraklığa cevaba katkıda bulunmuşlardır. Moleküler fonksiyon ağı analizinde ise, DNA bağlayıcı proteinlerin aktivasyonu ve sinyal iletim işlemlerine ait genlerin önemli ölçüde ($p < 0.0001$) bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14). Hücresel bileşenlere ilişkin analizler, hücre ve organel

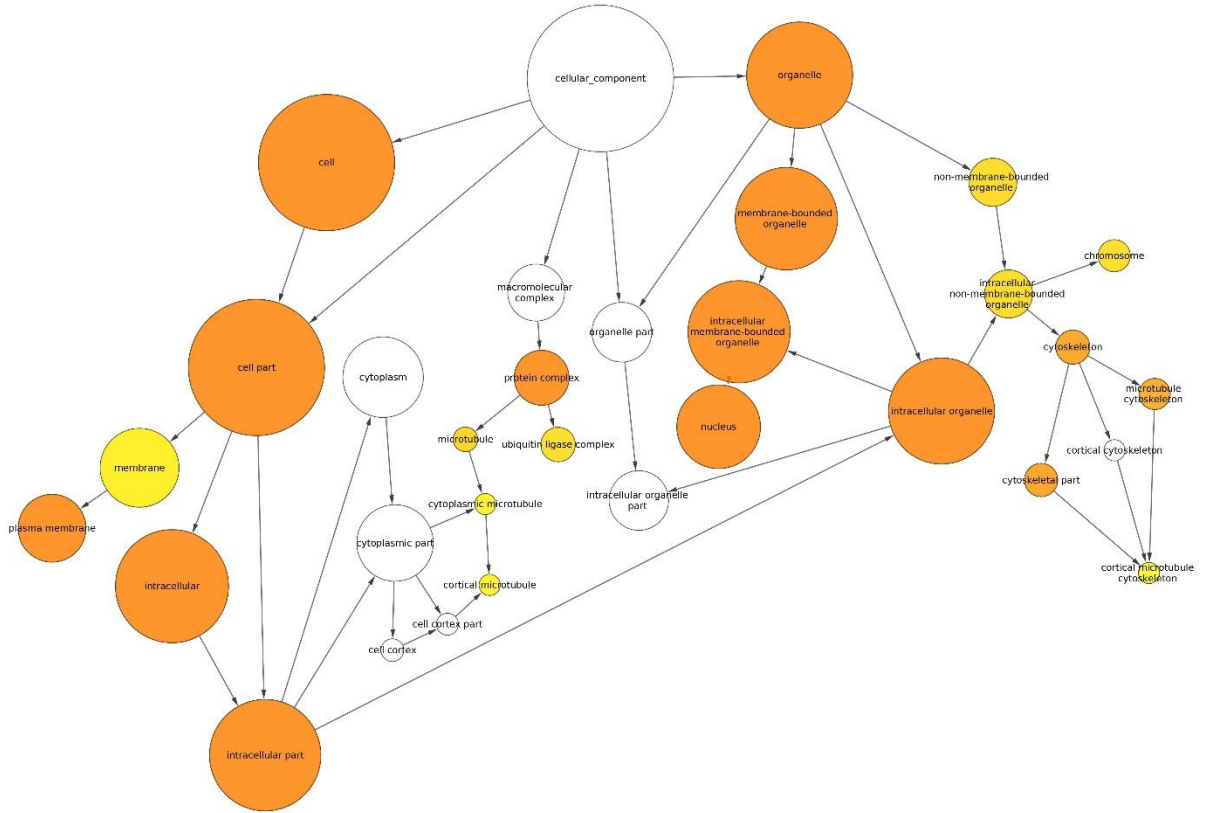
kısımları ile özellikle nukleusa ait hüresel komponentlerin, *L. culinaris*'in kuraklık cevabında önemli bir ($p < 0.0001$) rol oynadığını göstermiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.13: Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün kök örneklerinin biyolojik işlemler kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.



Şekil 4.14: Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün kök örneklerinin moleküler fonksiyon kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.

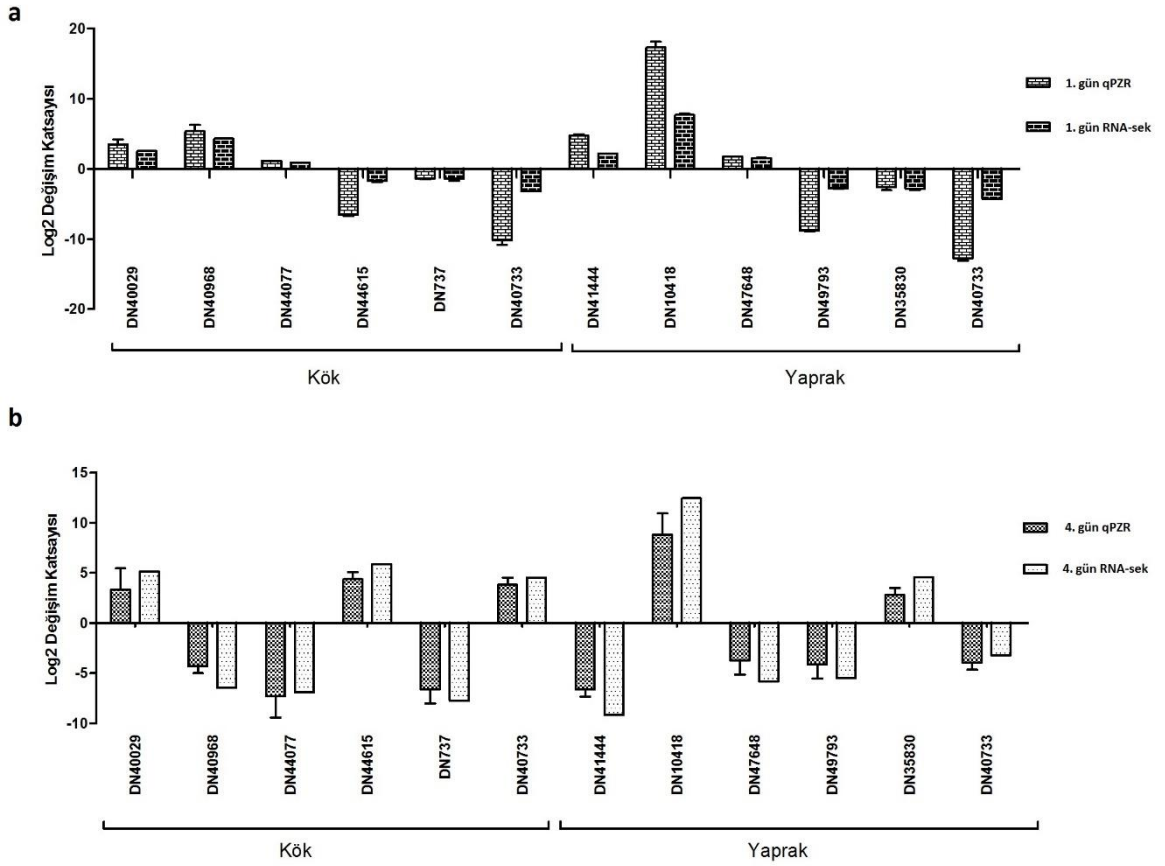


Şekil 4.15: Cytoscape BINGO eklentisi kullanılarak 4. gün kök örneklerinin hücresel bileşen kategorisine ait tüm DEG'leri için yapılmış fonksiyonel zenginleştirme analizi. Sarı ve turuncu daireler, anlamlı zenginleştirilmiş terimleri temsil eder ($p < 0.0001$). Beyaz daireler, anlamlı bir zenginleşmeye sahip olmayan terimlerdir, ancak anlamlı terimler ile bağlantılı oldukları için şekle dahil edilmiştir.

4.4. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF PCR (RT-PCR) İLE RNA-SEK SONUÇLARININ DOĞRULANMASI

Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi, RNA-dizileme sonucunda farklı eksprese olan genlerin doğrulanmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla, RNA-dizileme sonuçlarını doğrulamak için, yaprak ve kök örneklerinden 12 adet DEG seçilerek primer dizayn edilmiş (Tablo 3.1) ve transkripsiyon seviyeleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Ekspresyon seviyesi örnekler arasında değişmeyen β -tubulin bir iç referans geni olarak kullanılmıştır. İlk olarak her bir örnekten toplam RNA'lar izole edilmiş ve toplam RNA'nın cDNA'lara dönüştürülmesinden sonra, RT-PCR uygun primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RT-PCR ve RNA-sek verilerin karşılaştırılması sonucunda, hem RT-PCR (β -tubulin genine göre hesaplanan katlama değişimleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi) hem de RNA-dizileme verilerinde, her bir gen için benzer

transkripsiyonel seviye göstermiştir, bu da RNA-dizileme sonuçlarının güvenilir olduğunu ve her iki yöntem kullanılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir. Ayrıca her iki yöntem kullanılarak elde edilen verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Seçilen primerlerin RNA-sek sonuçları, üç bağımsız biyolojik kopya ile RT-PCR sonuçları ile doğrulandı (Hata çubuğu: SD; n = 6). Y eksenini, transkript değişikliklerini (log2 kat) ve x eksenini gen kimliklerini gösterir. (a) DEG'ler 1. gün kök ve yaprak örneklerine aittir. (b) DEG'ler 4. gün kök ve yaprak örneklerine aittir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Abiyotik stres, dünya genelinde, gıda üretimi ve güvenliğini kısıtlayan en büyük etmenlerden biridir. Küresel iklimdeki sert ve hızlı değişimler nedeniyle abiyotik streslerin etkisi artmaktadır. Azalan bitki verimi, son yıllarda bitki araştırmacılarını, çevresel strese karşı bitki tolerans mekanizmalarını aydınlatmaya yönlendirmiştir. Daha verimli bitki yetiştiriciliği için bu streslerle ilgili fizyolojik, biyokimyasal ve ekolojik müdahaleleri anlamak çok önemlidir. Literatürdeki her yeni bilgi, değişen çevre koşullarında, yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesini sağlayan ürün yetiştirme mekanizmalarının aydınlanmasını sağlar. Strese karşı bitkilerin verdiği tepkiler, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal şekilde çok çeşitli olabilmektedir. Bu tepkilerin moleküler düzeyde belirlenmesi verimli bitki seçiminde kullanılacak işaretleyicilerin belirlenmesine ve toleransının anlaşılmasına, dolayısı ile bitki ıslahında kullanılabilecek aday genlerin tanımlanmasına yardımcı olacaktır. Kuraklık, kuşkusuz, bitki büyümesi, verimi ve ürün eldesi üzerinde olumsuz etkiye sahip olan en önemli stres faktörüdür. 1964-2007 yıllarında yaşanan ekstrem hava koşulları tahıl üretimini olumsuz etkilemiş ve yaşanan kuraklıklar dünya genelinde hububat üretimini ortalama %10 azaltmıştır (Lesk ve diğ., 2016). Kuraklık toleransından sorumlu gen ve alellerin başarılı seçimindeki ana zorluk, strese karşı bitki yanıtının karmaşıklığıdır. Transkriptomik çalışmalar bu karmaşıklığın derinlemesine profillenmesine olanak sağlayan stratejilerdendir.

Genel olarak, kuraklık altındaki bitki sağkalım stratejileri, azaltılmış transpirasyon/hidrotropizm gibi geçici cevaplar olarak ortaya çıkabilir. Uzun süren kuraklıkların yaşanması sonucunda ise daha derin kök sistemi ile sonuçlanan gelişimsel değişiklikler, yaprak alanının azaltılması, su kaybının en aza indirilmesi ve su alımının iyileştirilmesine izin veren ozmotik durumun ayarlanması şeklinde gözlemlenebilir (Hu ve Xiong, 2014). Hem kısa hem de uzun süreli cevaplar, bitki metabolizmasının önemli ölçüde yeniden inşasına ve çok sayıda genin ekspresyonundaki daha fazla değişikliğe dayanır. Bitkilerin kuraklık stresine duyarlılığı, stres derecesine, farklı stres faktörlerine, bitki türlerine ve gelişim evrelerine bağlı olarak şekillenmektedir (Demirevska ve diğ., 2009). Bitkilerin kuraklığa karşı adaptasyonları, bitki büyümesi ve yapısındaki değişiklikler, büyüme hızı, doku ozmotik potansiyeli ve antioksidan savunma stratejileri gibi fizyo-biyokimyasal süreçlerde uyarlanabilir değişikliklere yol açan farklı olayların sonucudur (Duan ve diğ., 2013).

Kuraklığın ilk ve en önemli belirtisi zayıf morfolojik durumun oluşmasıdır (Mohammed ve diğ., 2002). 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 (Nonami, 1998). Çalışmamızın ilk deneysel sonucu olarak mercimek tohumlarının farklı PEG konsantrasyonlarında canlılık oranları hesaplanmış ve %15 PEG varlığında yetişen tohumlar, kontrol grubuna göre %60 oranında yaşamsal devamlılık göstermiştir. Bunun aksine %15'e oranla %20 ve %25 PEG konsantrasyonunda yetiştirilen tohumların çimlenme oranları sırasıyla %10 ve %1 olarak belirlenmiştir. Bu yaşamsal devamlılık oranları çalışmamızın devamı için kullanılacak optimum kuraklık dozunun %15 PEG konsantrasyonu olması sonucunu elde etmemizi sağlamıştır. Benzer şekilde Bradford ve diğ. (1990) artan PEG konsantrasyonuna karşın azalan yaşamsal devamlılığın, tohum çimlenmesi esnasında hücre su alınımındaki azalmanın embriyo büyümesindeki yavaşlamaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Schuppler ve diğerlerinin (1998) yaptığı çalışmada, kuraklık stresi altında yavaş hücre bölünmesi sonucu gözlemlenen düşük çimlenme oranının muhtemelen azalan CDK (siklin bağımlı kinazlar) aktivitesinin bir sonucu olduğu ileri sürülmüştür. Hücre siklusunun dolayısıyla hücre bölünmesinin, CYC (siklinler), CDK (siklin bağımlı kinazlar) ve CKI (siklin bağımlı kinaz inhibitörleri) tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (Schuppler ve diğ., 1998). Burada kuraklık sonucu azalan CDK aktivitesi, CYC ve CDK'ların transkripsiyonun baskılanmasının ve CKI'ların uyarılmasının kombine etkilerinin bir sonucu olabilir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan erken ve geç kuraklık evresinin transkripsiyon analizlerinde belirlenmiş GO terimleri arasında yer alan protein fosforilasyon sinyal yolunun azalan ekspresyonu bu sonucu destekleyebilir (temsil edilen gen sayısı: erken evrede 147, geç evrede 307'dir). Öyle ki hücre siklusundan sorumlu CDK'lar, hedef proteinlerin, serin, tirozin ve treonin aminoasitlerine fosfat grubu bağlayarak onları aktive etmektedir. Dolayısıyla kuraklığın sebep olduğu protein fosforilasyonunun azalan ekspresyonu sonucu CDK'ların baskılandığı ve hücre üremesinin yavaşladığı düşünülmektedir (Schuppler ve diğ., 1998).

Kuraklık gibi başlıca abiyotik stres faktörleri, önemli fizyolojik süreçleri ve biyokimyasal mekanizmaları olumsuz yönde etkiler ve dünya çapında mahsul verimliliğinde ciddi kayıplara neden olur. Bitkiler bu stres faktörlerine karşı sağlıklı durmak için çeşitli stratejiler geliştirir.

Bitkilerin kuraklık stresini hafifletmek için gösterdiği ortak tepkilerden biri, osmoprotektanlar olarak bilinen prolin, glisin betain, kolin, o-sülfat ve polioller gibi organik çözücülerin sentezi ve birikmesidir (Klepek ve diğ., 2005; Iqbal ve diğ., 2014; Farooq ve diğ., 2015). Prolin birikimi, bitkilerin kuraklık stresi başta olmak üzere çeşitli abiyotik streslere verdiği ilk metabolik tepkilerden biridir ve biyokimyasal belirteç olarak kabul edilir (Per ve diğ., 2017). Osmoprotektanlar arasında prolin, düşük moleküler ağırlıklı bir halkasal amino asittir ve stres koşullarında bitkilerde ozmotik ayarlamalar sağladığı bilinmektedir (Szabados ve Savoure, 2010). Çalışmamızda prolin miktarı kuraklığın erken (1. gün %10) ve geç evresinde (4. gün %40) koordineli olarak artış göstermiştir. Bu artış bitkilerde prolinin uyumlu bir osmolit olarak kabul edilmesine ek olarak, stres varlığını, adaptasyonunu ve sinyalleşmedeki çoklu fonksiyonlarını vurgulamaktadır (Chaves, 2009). Bitkilerde prolin, membran stabilizesini sağlayarak elektrolit sızıntısını önler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) konsantrasyonlarını normal aralıklara getirerek hücre turgorunu dolayısıyla hücrenin ozmotik dengesini korur ve oksidatif patlamayı önleyerek stres toleransı oluşturur. Ayrıca prolin, mitokondriyal fonksiyonları düzenlemek, hücre proliferasyonunu veya hücre ölümünü etkilemek ve stresten kurtulmak için gerekli olabilecek spesifik gen ekspresyonunu tetiklemek için bir sinyal molekülü olarak görev yapabilir (Szabados ve Savoure, 2010). Tüm bunlara ek olarak prolin çiçeklenme, polen, embriyo ve yaprak gelişimi de dahil olmak üzere bitki gelişiminin düzenlenmesi ve strese cevabın oluşmasında etkili olan transkripsiyon faktörlerini aktive eden bir tetikleyici rolü olduğu da bilinmektedir (Alkseza ve diğ., 2017). Prolin artışı ile ilişkili olduğu düşünülen bu gelişimsel ve düzenleyici cevaplardan, çiçek gelişimi yolağında 88 gen, embriyo gelişim yolağında ise 74 gen ile temsil edilerek transkripsiyon analizleri sonuçlarımızda farklı ekspresyon seviyeleri olarak gözlemlenmiştir.

Kuraklık stresi altındaki bir bitkide diğer bir önemli biyokimyasal belirteç lipit peroksidasyonuna bağlı malondialdehit (MDA) miktarındaki artıştır. Malondialdehit, çoklu doymamış yağ asidinin ayrışmasının bir ürünüdür ve tiyobarbitürik asit reaksiyonu ile lipid peroksidasyonunun temel ürünlerinden biridir. MDA içeriği, olumsuz koşullarda membranlardaki lipit peroksidasyonunun hasar derecesini yansıtan bir göstergedir (Weng ve diğ., 2015). Kuraklığa bağlı ROS'ların aşırı üretimi MDA'nın içeriğini artırır. Membran stabilitesindeki azalma, ROS'un neden olduğu lipit peroksidasyonunun derecesini yansıtır. Ayrıca, lipid peroksidasyonu dokulardaki serbest radikal reaksiyonun hakim olduğunu vurgularken protein, lipit ve DNA oksidasyonları şeklinde hücre hasarının meydana geldiğini

belirtir (Moller ve diğ., 2007). Bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde yapılan bir çalışmada, yapraklardaki lipid peroksidasyon seviyeleri, kuraklık stresine paralel olarak iki ila dört kat artmıştır ve bunun, protein peroksidasyonu ile büyük ölçüde korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Moran ve diğ., 1994). Bu tez çalışmasında devam eden kuraklık stresi artan MDA miktarı (~%75) ile sonuçlanmıştır. Vilenov ve diğ. (2010) yaptıkları çalışmada artan lipid peroksidasyonu ile protein fosforilasyonu arasındaki bağlantıyı incelemiş, oksidatif strese ve özellikle singlet oksijene maruz kalan hücrelerde lipid peroksidasyona bağlı fosforilasyon reaksiyonlarının teşvik edildiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda benzer durum transkripsiyon analizleri sonucunda belirlenen GO terimleri arasında yer alan protein fosforilasyon yollarının (126 gen) köklerde artan ekspresyonu ile desteklenebilir.

Kuraklık stresinin bir diğer fizyolojik etkisi azalan nispi su miktarıdır (RWC). RWC, yaprak dokusuna su temini ve terleme oranı arasındaki dengeyi yansıtan, bitki yapraklarındaki su durumunun önemli bir göstergesidir (Lugojan ve Ciulca 2011). Kuraklık stresinin RWC üzerindeki etkisi birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Siddique ve diğ. (2000), kuraklığın *Triticum aestivum* çeşitlerinde RWC'yi azalttığını belirlemişlerdir. Alexieva ve diğ. (2001) RWC'nin kuraklığa cevapta büyümenin indirgenmesine neden olan ana faktör olarak belirtmiştir. Bu tez çalışmasında diğer araştırmacıların bulgularına paralel olarak RWC değerleri kontrol grubuna oranla 1. gün %12,5, 4. gün ise %50 oranında anlamlı şekilde azalarak kuraklık varlığının bir diğer göstergesi olmuştur. Atteya (2003), kuraklık stresinin, farklı gelişim evrelerinde mısır genotiplerindeki içsel su durumu üzerindeki etkisini araştırmış ve kuraklık stresinin yaprak su potansiyeli, nispi su içeriği ve ozmotik potansiyeli azalttığını rapor etmişlerdir. Ek olarak aynı çalışmada stresli bitkilerde, hem yaprak su potansiyeli hem de nispi su içeriğindeki düşüşlerin, düşük stoma iletkenliği ve fotosentetik hız ile ilişkili olduğu da rapor edilmiştir. Bitki bünyesinde RWC'nin her hangi bir etki ile düşmesi, indirgenmiş plastokinon havuzundan, PSI reaksiyon merkezine elektron transferini baskıladığı bilinmektedir (Goltsev ve diğ., 2012). Literatürde bildirilen RWC ile PSI arasındaki bu ilişki, bu tez çalışmasında yapılan transkripsiyon analizleri arasında yer alan “fotosistem I fotosentetik elektron transportu” gen yolağında belirlenen azalan ekspresyon (20 gen) ile paralellik göstermiştir.

Klorofil a ve b, bitkilerde fotosentetik sistemlerde fotoreseptörler olarak çalışır (Khaleghi ve diğ., 2012). Fracheboud ve diğ. (2004), klorofil ve karotenoid içeriğinin, kuraklığın etkisi altında azalabileceğini, çünkü bu parametrelerin karbon değişimi oranıyla yakından

ilişkilendiğini bildirmiştir. Bussis ve diğ. (1998), tipik bir oksidatif stres semptomunun, klorofil sentezi eksikliğinden veya tilakoid membran yapısındaki değişikliklerden dolayı klorofilin parçalanması olduğunu belirtmiştir. Genel olarak, kuraklık fotosentetik aktivitenin engellenmesi ve ışık yakalama ile kullanımı arasındaki dengesizlik nedeniyle oksidatif strese neden olabilir (Smirnoff, 1993). Kuraklık stresi altında klorofil miktarının azalması, pigmentin çevresel gerilimlere, özellikle de su varlığına olan duyarlılığına bağlanabilir (Moran ve diğ., 1994). Çalışmamızda kısa ve uzun süreli kuraklık, yapraklarda, toplam klorofil miktarında azalmaya neden olmuştur. Ayrıca devam eden kuraklığın erken evreye oranla geç evrede klorofil miktarında yaklaşık yarı yarıya düşüşe (~% 49.8) sebep olduğu gözlemlenmiştir. Gitelson ve diğ. (2003) yaptıkları çalışmada, başka hiçbir faktörün sınırlandırmadığı ortam koşullarında, klorofil içeriği ile fotosentez hızı arasındaki ilişkiyi incelemiş ve eşit miktarda klorofilin eşit miktarda fotosenteze denk olduğu sonucunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında yapılan RNA sekanslama analizi doğrultusunda belirlenen ve 29 gen ile temsil edilen fotosentez yolağındaki azalan ekspresyon, düşük klorofil miktarı ile korelasyon göstererek literatürde belirtilen sonuçları desteklemiştir.

Bitkilerin çeşitli stresler ile inhibe edilmiş büyümesini tespit etmek için gözlemlenmesi gereken temel işlem fotosentezdir çünkü fotosentetik pigmentlerin yapısı, strese bağlı olarak değişmektedir. Bu değişim yaprakların optik frekans aralıklarını etkiler çünkü pigment, ışığı yakalayan ve fotosentezi başlatan ilk noktadır. Farklılık gösteren bu optik frekans, bitkinin işleyişi veya herhangi bir stres altında olup olmadığı hakkında bilgi veren bir göstergedir. Klorofil floresansı, fotosentezin etkinliğinin bir ölçüsüdür ve bu nedenle bitkinin sağlıklı bir fotosentez sürecinde olduğunun belirteci olarak kullanılabilir (Kancheva ve diğ., 2008).

Bir yaprak içinde klorofil molekülleri tarafından emilen ışık enerjisi fotosentezi uyarmak için kullanılabilir (fotokimya), fazla enerji ısı olarak dağılabilir veya ışık-klorofil floresansı olarak salınabilir. Bu üç durumdan birine maruz kalabilen enerjinin, durumlar arasındaki değişimleri vasıtasıyla klorofil floresans ölçümleri gerçekleştirilir. Bu üç süreç, rekabet içinde gerçekleşir, öyle ki, birinin verimliliğindeki herhangi bir artış, diğer ikisinin veriminin düşmesine neden olacaktır. Bu nedenle, klorofil floresansının fotokimya ve ısı dağılımı vasıtasıyla veriminin ölçülmesi, bitkinin bulunduğu koşul hakkında bilgi verebilir (Maxwell ve diğ., 2000). PSII'nin maksimum quantum verimi (F_v/F_m) değeri, tüm reaksiyon merkezleri açıldığında PSII'nin maksimum fotokimyasal etkinliğinin bir ölçüsüdür ve bitkiler ciddi kuraklık stresi yaşadığında

azalır (Woo ve diğ., 2008). Şeker pancarı fidelerinde (Li ve diğ., 2013), *Coronilla varia*'da (Yang ve diğ., 2013) ve daha önce yapılan birçok çalışmada (Batra ve diğ., 2014; Guo ve diğ., 2016; Zahoor ve diğ., 2017) benzer sonuçlar bildirilmiştir. Bu durum, PSII anten pigmentleri tarafından absorbe edilen enerjinin taşınmasının, floresans ve ısı dağılımı şeklinde kaybolurken, fotokimyasal reaksiyonların azalması ile açıklanabilir. Bu tez çalışmasında *L. culinaris* yapraklarında, F_v/F_m değerinin, devam eden kuraklık stresi boyunca azaldığı belirlenmiştir. Kuraklığın 4. günü sonunda, F_v/F_m değeri kontrol gruplarına göre yaklaşık %27 oranında düşüş göstermiştir. Bu düşüş, ışık enerjisi dönüşüm verimliliğinin azaldığını, yaprakların fotosentez yapmak için gerekli olan primer reaksiyonunun baskılandığını ve potansiyel aktif merkezin inhibe edildiğini gösterir (Woo ve diğ., 2008). PSII'nin quantum verimi (Φ_{PSII}), PSII aktiviteleri ile pozitif korelasyon gösterir ve PSII'nin PSI'e elektron transfer hızını belirtmek için kullanılır (Krall ve Edward, 1992; Martínez ve diğ., 2002). Bu çalışmada Φ_{PSII} 'nin devam eden kuraklık boyunca yaklaşık %50 azaldığı belirlenmiştir. Şeker pancarı fidelerinde benzer sonuçlar bildirilmiştir (Li ve diğ., 2013). Reaksiyon merkezlerinin açık olduğu ancak yeterli suyun bulunmadığı durumlarda, fotosentetik organlara verilen zararı etkin bir şekilde azaltmak ve fotokimyasal inhibisyondan kaçınmayı sağlamak için enerji ısı şeklinde yayılır (Li ve diğ., 2013). Fazla enerji, PSII reaksiyon merkezlerinde hasarı önlemek için artan fotokimyasal olmayan enerji kaybının quantum verimi (Φ_{NO}) ile yani kısaca ısı yayılımı şeklinde etkili bir biçimde dağıtılmaktadır (Golding ve Johnson, 2003). Bu çalışmada, Φ_{NO} 'nin devam eden kuraklık stresi altında arttığı (%67) belirlenmiştir, bu da yapraklarda fazlası ile ısı enerjisinin olduğunun göstergesidir. Floresans parametrelerinden bir diğeri olan açık PSII oranı (qP), PSII reaksiyon merkezlerinin açık olma durumunu yansıtır. Devam eden kuraklık stresi boyunca fidelerin qP 'si yavaş yavaş azalmıştır (1. günde %26, 4. günde %54). Sonuç olarak devam eden kuraklık stresi boyunca artan Φ_{NO} ve azalan qP değerleri, yapraklardaki fazla enerjinin ısı şeklinde dağıldığını ve reaksiyon merkezlerinin açıklığının azaldığını doğrulamaktadır. Azalan fotosentetik verimlilik, yalnızca PSII'den geçen enerji akışındaki değişiklikler nedeniyle değil, pigment içeriğinin azalmasından da dolaydır (Woo ve diğ., 2008). Bu tez çalışmasında literatürdeki diğ. çalışmalarda belirtildiği gibi, düşük fotosentetik performansın, kuraklık stresi altındaki fidelerde azalmış *Chl* miktarı (%50) ile ilişkili olabileceğini göstermiştir.

Global transkriptom profillerinin oluşturulması, bitkilerin çeşitli streslere karşı oluşturdukları tepkilerin karmaşıklığını moleküler düzeyde anlaşılmasını ve daha derinlemesine bilgi edinilmesini sağlar (Singh ve diğ., 2017). Son yıllarda literatürde bir çok baklagil türünde çeşitli

streslerle ile değişen transkriptom analizleri rapor edilmiştir (bkz. Tablo 2.2). Bu tez çalışmasında *L. culinaris* bitkisinin kısa ve uzun süreli kuraklık stresi altında kök ve yaprak dokularının transkriptom analizi yapılmıştır. Sekanslama sonrasında yaklaşık 60 Gbp ham veri ve filtreleme işleminden sonra ise ortalama 64 bp uzunluğunda toplam 568.571.434 çift uçlu yüksek kaliteli temiz okuma elde edilmiştir. *De novo* transkriptom inşaaında ise ortalama uzunluğu 950 nt olan 207.076 transkript belirlenmiştir. Literatürde yayınlanan diğer transkriptom verileri ile karşılaştırıldığında (Sudheesh ve diğ., 2016; Singh ve diğ., 2017), bu çalışmada transkript sayıları anlamlı olarak daha yüksektir. Ek olarak, hem kısa hem de uzun süreli kuraklık stresi koşulları altında kök, gövde ve yaprak dahil olmak üzere farklı mercimek dokularından RNA sekansı verilerinin kullanılması, çok sayıda transkript ile daha eksiksiz bir *de novo* transkriptom inşaaı elde etmemizi sağlamıştır. Genom çapında transkripsiyonel değişiklikleri tanımlamak adına çalışmamızda *de novo* inşaaından sonra farklı olarak eksprese edilmiş gen (DEG) analizleri yapılmıştır. Erken evrede DEG'lerin sayısı yaprakta 6.949 iken, kökte 2.915 olarak belirlenmiştir. Devam eden kuraklık sonucunda köklerdeki DEG'lerin sayısında belirgin bir artış olmuş ve 18.327'ye yükselmiştir. Yapraklarda bu durum çok az bir artış ile (6.949'dan 8.306'a) sonuçlanmıştır. Çalışmamızda RNA-dizileme sonucunda farklı eksprese olan genlerin doğrulanması için yaprak ve kök örneklerinden 12 adet DEG seçilerek RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. RT-PCR ve RNA-sek verilerinin karşılaştırılması sonucu, hem RT-PCR hem de RNA-dizileme verilerinde, her bir gen için benzer transkripsiyonel seviyeler belirlenmiş ve RNA-dizileme sonuçlarının güvenilir olduğu kanıtlanmıştır.

Kuraklıktan etkilenen bazı DEG'lerin yaprak bazılarının da kök dokusunda değişiklik göstermesine karşın, 195 DEG'in aynı anda her iki dokuda da bulunduğu tespit edilmiştir. Kuraklık stresine maruz kalan çeşitli bitki türlerinin gen ekspresyonu çalışmaları, bu stres tarafından düzenlenen çeşitli gen gruplarının önemine işaret etmektedir. Bunlar kuraklığın sinyallenmesi ve transkripsiyonun düzenlemesi olarak sıralanabilir. Sinyallenme mekanizmasında öne çıkan gen grubunun, transmembran reseptör proteini tirozin kinaz sinyal yolu kategorisine ait olduğu belirlenmiştir. Transmembran reseptör proteini tirozin kinaz sinyal yolu; hücre dışı bir ligandın, hedef hücrenin yüzeyindeki bir reseptöre bağlanmasıyla başlatılan ve reseptörün tirozin kinaz aktivitesine sahip olduğu ve örneğin transkripsiyon gibi, hücresel işlemin akış aşağı (downstream) düzenlenmesiyle sona eren sinyaller dizisini indükler. Bitki

hücreleri, sekonder metabolitler, bitki hormonları, sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyonel düzenleyicileri içeren sinyal yollarını aktive eden çeşitli reseptörler vasıtasıyla stres uyarıcılarını algılar (Cvikrová ve diğ., 2013; Danquah ve diğ., 2014). Bu nedenle çoklu sinyaller, doğrudan stres metabolizmasında yer alan proteinleri ve enzimleri kodlayan stresle indüklenebilir genleri düzenlemek için birleşerek belirli bir stres uyarıcısına yanıtta rol alır (Casaretto ve diğ., 2016). Transmembran reseptör proteini tirozin kinaz sinyal yoluna ek olarak absisik asit bağımlı sinyal yollarında da farklı ekspresyon seviyeleri GO zenginleştirme analizleri sonucunda belirlenmiştir. Bu yolak; fosfatidilinositol 4-kinaz gama 6, tip IV inositol polifosfat 5-fosfataz 11, tip I inositol polifosfat 5-fosfataz 11, tip I inositol 1,4,5-trisfosfat 5-fosfataz CVP2, diasilgliserin kinaz 6, lipid fosfat fosfataz proteini 3 ve diasilgliserin kinaz 6'yı kodlayan genleri içerir. Bütün bu genler, fosfatidilinositol fosfatlar yoluyla sinyalleşmede ve ABA aracılı sinyal iletiminde rol oynarlar (Paradis ve diğ., 2011).

Transkripsiyonun düzenlenmesinin belirgin şekilde öne çıkması yapılan birçok stres bağımlı çalışmada olduğu gibi transkripsiyon faktörlerine bağlanabilir (Zhou ve diğ., 2012). “Trans-acting” elementler olarak bilinen transkripsiyon faktörleri, stres ile indüklenebilir genlerin promotöründe bulunan cis etkili elementlere bağlanabilir ve ekspresyonlarını düzenleyebilir (Zhou ve diğ., 2012). Bitkilerde stres kaynaklı transkripsiyon düzenlenmesi, AREB (ABA’ya duyarlı bağlayıcı protein), ABF (AREB bağlayıcı faktör) DREB (dehidratasyona duyarlı element bağlayıcı protein), SNAC (stres sorumlu NAC), MYB protein ailesi, bZIP gibi tipik DNA bağlama motiflerini içeren çeşitli transkripsiyon faktörleri aracılı olabilir. Bu faktörlerden bazıları absisik aside bağımlı (AREB/ABF) iken, bazıları (DREB) absisik asitten bağımsızdır. Çalışmamızda absisik asit bağımlı sinyal iletiminden sorumlu genlerin 101 tanesinde farklı ekspresyon seviyeleri belirlenmiş ve bahsedilen transkripsiyon faktörü ailelerini içerdiği gözlemlenmiştir. Transkripsiyonun düzenlenmesinde ise 689 gende farklı ekspresyon seviyeleri tanımlanmıştır. Stres sinyali transkripsiyon faktörlerini bir araya getirir. Bu faktörler ise farklı gerilmelere cevap oluşturmak için gerekli transkriptleri düzenler ve bitki savunması, stres yanıtlarının düzenlenmesi ve sinyal iletiminde rol alırlar (Hu ve diğ., 2006). Dolayısıyla GO zenginleştirme analizlerinde kuraklığın sinyallenmesi ve transkripsiyonun düzenlenmesine ait gen gruplarının belirgin şekilde öne çıkması beklenen bir durum olarak yorumlanabilir. Ayrıca belirgin şekilde farklı ekspresyon gösteren sinyal iletiminden sorumlu genler arasında en çok göze çarpan gruplardan biri GTP bağlayıcı proteinlerle ilgili olanlardır. Bu proteinler esas olarak G proteinine bağlanmış reseptörler tarafından düzenlenir. Kimyasal sinyallerin hücreye

iletmesinde rol alan bir protein ailesidir ve tetikleyiciye bir geçit görevi görür ki, strese karşı hücrel tepkinin oluşmasını sağlayan tüm sinyal yollarının arasındadır (Singh ve diğ., 2017). Örneğin hormonların (ABA, etilen, jasmonik asit), iyonların (Ca_2^+) veya serbest radikallerin varlığından kaynaklanan uyaranlardan gelen sinyalleri iletirler (Janiak ve diğ., 2017).

Literatürde mevcut olan stres bağlantılı transkriptom çalışmasında olduğu gibi, bu tez çalışmasında da, her iki organda farklı ekspresyon seviyesi gösteren genlerin çoğunun, biyolojik süreçlerde ve protein fosforilasyonu (580 gen ile temsil edilmiş) kategorisine ait olduğu belirlenmiştir. Protein fosforilasyonu, en önemli protein post-translasyonel modifikasyonlarından biri olarak, genellikle geri dönüşümlü ve geçicidir. Serin, treonin ve tirozin (Ser/Thr/Tyr) aminoasitleri proteinlerdeki anahtar fosforlu modifikasyon bölgeleridir (Aivaliotis ve diğ., 2009). Birçok enzim, protein fosforilasyonu yoluyla sinyal yollarında fonksiyonlarını yerine getirir (Engelsberger ve Schulze, 2012). Protein fosforilasyonu DNA transkripsiyonu, protein translasyonu ve enerji metabolizması gibi birçok temel biyokimyasal işlemi düzenler (Kersten ve diğ., 2009). Bu tez çalışmasında protein fosforilasyonuna ait yollarda belirlenen 580 gen arasında yer alan STN7 (serin/treonin kinaz domain protein), PDK1 (fosfoinositide bağımlı protein kinaz 1) genlerinin ifadelerindeki değişim bu durumu açıklayabilir. Çünkü bu kinazlar protein kinaz ailesinin alt gruplarını fosforile ve aktive eden ana kinazlar olarak görev yapmaktadır (Luo ve diğ., 2018).

Elde edilen veriler dokuya bağlı olarak incelenirse kuraklığın erken ve geç evresinde yapraklarda beklenen şekilde fotosentez (29 gen) ve fotosentetik elektron taşınımı (20 gen) yollarına ait gen gruplarında azalan, çiçek gelişimine (27 gen) ait gen gruplarında ise artan gen ekspresyonu belirlenmiştir. Fotosenteze ait farklı ekspresyon gösteren genler genellikle tilokaid membranlarda lokalize olmuş ve fotosistemin bütünlüğünü oluşturan protein gruplarına ait olduğu belirlenmiştir. Fotosistem I altünite I, fotosistem I altünite F, fotosistem I ışık yakalama kompleks proteini, tilakoid lümen proteini gibi proteinleri içeren bu yaklaşık yirmi dokuz gende gözlenen azalan ekspresyon, anten proteinleri ile etkileşimin engellenmesine ve periferik antenin düzgün çalışmasının engellenmesine sebep olduğu düşünülmektedir (Scheller ve diğ., 2001). Fotosentetik elektron taşınımı gen yollarında ise çoğunlukta olan NDH-bağımlı siklik elektron akışı vb. genlerin ekspresyonlarındaki düşüş ATP'yi üretmek için fotosistem I etrafındaki siklik elektron akışında sınırlamalar oluşturduğundan fotokimyasal dönüşüm sekteye uğramıştır. Fotosentez sürecini düzenleyen genler arasında, bu tez

çalışmasında kuraklık toleransı için aday olarak ondan fazla gen ortaya çıkmıştır. Bunlardan birçoğu kloroplast redoks yolağına aittir ve yapraklarda beklenen şekilde yüksek ekspresyon göstermiştir. Bunlardan biri tioredoksin redüktazı kodlar ve diğerlerden iki tanesi ise ferredoksin ailesine aittir. İndirgeyici bir güç olarak ferredoksin veya NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) kullanılarak oksitlenmiş tioredoksinlerin indirgenmesi için tioredoksin redüktazlar gerekir (Nikkanen ve diğ., 2014). Bu kloroplast bileşenlerinin fotosentez sırasında redoks homeostazından sorumlu olduğu, ancak nişasta, azot ve kükürt metabolizmasını da düzenlediği gösterilmiştir (Nikkanen ve diğ., 2014). Ayrıca bu genlerin kuraklık stresi altında birincil rolleri, fotosentez sırasında elektron transferinin sürdürülmesi, stroma proteinlerinin indirgenmesini önleme ve okside klorofilin detoksifikasyonuna yöneliktir (Hanke ve diğ., 2013).

Bitkilerin kuraklık stresiyle başa çıkmak için oluşturdukları olası mekanizmalardan biri, çiçeklenmenin, kurak ortamda belirginleşmesidir. Bu tez çalışmasında, çiçeklenmenin kontrolünde rol oynayan yirmi yedi genin hem erken hem de geç evredeki yapraklarda yüksek düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, köklerde 4. günde benzer gen yolaklarında ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu genlerden bazıları *Arabidopsis* GIGANTEA geni ile benzerlik göstermiştir. Diğer transkriptler arasında *Arabidopsis* homologları olan MFT (anne çiçeklenme zamanı), BFT (kardeş çiçeklenme zamanı) ve PRR95 (pseudo-yanıt regülatörü 95) bulunmaktadır. GIGANTEA geni ile birlikte MFT geni, FT (çiçeklenme zamanı) geninin indüksiyonu yoluyla *Arabidopsis*'te çiçeklenmeyi teşvik eder ve kuraklık stresine cevap olarak çiçeklenmeye geçişi açıklayabilir (Riboni ve diğ., 2013). Öte yandan BFT çiçeklenme zamanının negatif bir düzenleyicisidir ve tuz stresine yanıt olarak çiçeklenmeyi geciktirdiği gösterilmiştir (Ryu ve diğ., 2011). Ayrıca uyarılan ancak 4. günde geciken çiçeklenme yanıtı sirkadiyen saat kontrolü altında olan ve çiçeklenmeye geçişi düzenleyen FAD (Flavin-bağlama), KR (Kelch tekrarı), FBX1 (f kutu 1) genleri ile bağlantılı olabilir, öyle ki yapraklarda 4. günde azalan sirkadiyen ritim yolakları bu durumu destekler niteliktedir.

Kuraklık stresi altında aktin filamentlerin, hücre duvarlarını, plazma membranlarını ve hücre bölümlerini birbirine bağlayan bir ağ oluşturdukları öne sürülmüştür (Huang ve diğ., 2012). Bu fiziksel bağlantılar ozmotik sensörler gibi davranabilirler. Çünkü turgor azalması aktin filamentlerin konformasyonlarını değiştirir ve bunun sonucunda hücre, bu durumu, kuraklığa

duyarlı genleri aktive edecek bir sinyal olarak algılayabilir (Huang ve diğ., 2012). Bu tez çalışmasında 4. günde kök dokusunda dikkat çeken bir diğer durum ise aktif filament organizasyonundan sorumlu genlerin (9 gen) ekspresyonundaki artıştır. Sniegowska ve diğ. (2016) yaptığı çalışmada aktin filament kompozisyonundan sorumlu CPB (Heterodimerik aktin filament başlık proteini alt birimi 1), VLN4 (villin 4), ARPC1 (Aktin ile ilgili protein C1) genlerinin ekspresyonunda kuraklık stresi ile gözlemlenen artışın bitki hücrelerinde kuraklık sinyalinin algılanmasında rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Transkriptom analizimiz, kuraklık stresi altındaki kök dokularında benzer genlerin ekspresyonunda artış olduğunu gösteren önceki verilerle tutarlıdır. Ek olarak, aktin kodlayan genlerin değişen ifadesinin sadece köklerde gözlemlenmesi azalan su seviyesini algılayan ilk organın kökler olduğunu ve aktin filamentlerin ozmotik sensörler olarak rol oynadığı hipotezini desteklemektedir (Sniegowska ve diğ., 2016).

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, kuraklık stresine karşı oluşturulan cevaplarda sadece yapraklardaki genlerin düzenlenmesinin önemli olmadığını, aynı zamanda köklerde düzenlenen genlerin de önemli olduğunu göstermiştir. Erken evreye oranla geç evrede köklerde yapraklara kıyasla yaklaşık üç kat artan DEG belirlenmiş ayrıca köklerde kendi içinde bu durum geç evrede erken evreye oranla neredeyse on kat artmıştır. Kökler, kuraklık sinyalinin algılandığı ilk bitki kısmıdır. Bu çevresel değişiklikleri algılama rolü, sinyal iletim yollarına dahil olan genlerde gözlemlenen farklı ekspresyon seviyeleri ile belirlenmiştir. Bitkilerde sinyal iletim reaksiyonlarından ilki, bir düzenleyici ağ oluşturan MAPK kinazlar ile fosfolipaz C ve D'yi içeren yolların aktivasyonudur (Mane ve diğ., 2007). Örneğin, MAPK genlerinin ekspresyonunun, stres uygulamasından sonraki 1. günde köklerde indüklendiği ve daha sonra aynı hızla azaldığı belirlenmiştir. Bu azalan düzenleme, küçük GTPaz üyelerini kodlayan genleri aşağı doğru düzenleyen fosfolipaz D'nin etkisi ile gerçekleşmiş olabilir (Peng ve diğ., 2006; Mane ve diğ., 2007). Literatürde mevcut olan diğer çalışmalara (Janiak ve diğ., 2017) benzer şekilde, bu tez çalışmasında da fosfolipaz D'ye bağlı yolağın, uzun süreli kuraklık stresi sonrasında köklerde aktif olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde *Arabidopsis* yaprakları ile yapılan önceki bir çalışmada, fosfolipaz D'nin artan ekspresyonunun kuraklığa tepkinin sürdürülmesi için gerekli olduğu belirtilmiştir (Hong ve diğ., 2008).

Bitki kökleri kuraklık stresi altında daha fazla su kaynağına ulaşmak için daha derin bir kök sistemi geliştirerek stresten kaçma eğilimindedir. Neredeyse tüm bitkilerde kuraklık stresi

algıladıgında, kökler büyüme devam eder ve daha derin toprak katmanlarına nüfuz eder (Ye ve diğ., 2018). Bu sonuç, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen transkripsiyon analizi ile belirlenen GO terimleri arasında yer alan ve özellikle 4. günde artan ekspresyon seviyesi gösteren; hücre bölünmesi, hücre duvarı organizasyonu, bitki tipi sekonder hücre duvarı biyosentezi, tek boyutlu hücre büyümesi, çok boyutlu hücre büyümesi, oksin akışı, kök gelişimi, pozitif yerçekimi gen yolaklarına ait yaklaşık 500 gen ile ilişkilendirilebilir. Bu yolaklar içerisinde öne çıkan LOB (Lateral organ sınırları) genleridir. Bu genler transkripsiyon faktörleri vasıtasıyla kök mimarisini geliştirme yeteneğine sahiptir (Li ve diğ., 2016). Ek olarak daha derin kök sistemi oluşumunu tetikleyerek nem alımını artırır (Uga ve diğ., 2013). Oksin taşınmasının, kök dokusunda, akropetal ve bazipetal olarak iki ayrı polaritede gerçekleştiği bilinmektedir. *Arabidopsis* bitkisinde yapılan bir çalışmada, bu iki polariteden hangisinin oksin taşınmasını ve dolayısıyla kök oluşumunda yerçekimi tepkisini kontrol ettiği araştırılmış ve bazipetal olarak taşınan oksinin kök geotropizmasını kontrol ettiği belirtilmiştir (Rashotte ve diğ., 2000). Literatüre benzer olarak çalışmamız transkripsiyon analizleri sonucunda 4. gün kök dokusunda belirlenen bazipetal oksin taşınım yolağındaki artış, kök sisteminin geliştirilmesi ile ilişkilendirilebilir.

Kuraklığa cevap ayrıca, salgı yolları ve protein dönüşümleri de dahil olmak üzere etkili bir vesiküler taşımaya dayanır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, CHMP1 (Multivesiküler vücut proteini 1)'in homologlarını kodlayan genlerin artan ekspresyonu köklerde kuraklığa cevap oluşumu için önemli olabileceğine dikkat çekmektedir. Bu genlerin kodladığı proteinlerin, bitkilerde, Endoplazmik retikulum ile Golgi Aygıtı arasında geçiş yaptığı ve ayrıca salgılama yolunda, taşınacak molekülün adaptörü/reseptörü olarak da işlev gördüğü bilinmektedir (Langhans ve diğ., 2008). Ayrıca *Arabidopsis* bitkisinde yapılan çalışmalarda CHMP1 proteinlerinin, oksin sinyalleşmesinden sorumlu olan PIN1 (Oksin akışı taşıyıcı aile proteini 1), PIN2 (Oksin akışı taşıyıcı bileşen 2) ve AUX1 (Oksin duyarlı 1)'in (Spitzer ve diğ., 2009) taşınmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Kuraklık stresi, absisik asit bağımlı bir şekilde, PIN1 seviyesini, oksin taşıyıcılarının seviyesini ve bunların lokalizasyonunu etkiler (Rowe ve diğ., 2016). Bu nedenle, daha yüksek bir CHMP1 gen ekspresyonu seviyesi, köklerde kuraklık stresi sırasında oksin sinyalleşmesinin bir başka önemli faktörü olarak yorumlanabilir.

Bu çalışmada literatürden farklı olarak yorumlanabilecek bir sonuç ise kuraklığın birinci gününde, yaprak morfogenezi ve çiçek gelişimi ile ilgili genlerin, kuraklıktan etkilenen

ifadesinin köklerde gözlemlenmesi olmuştur. Bitkilerde çiçeklenme genleri, yapraklarda bulunur, çoğunlukla ışık yani dolaylı olarak gün uzunluğu ve ayrıca ısıya bağlı olarak aktive olurlar. Bu durum çiçeklenmenin gelişimi yolağında yer alan HSP81-2 (Isı şoku proteini 81-2) proteini ile ilişkilendirilebilir, öyle ki kuraklığın birinci gününde köklerde ısıya cevap gen yolaklarındaki artan ekspresyonunun varlığı bu ilişkiyi kanıtlar niteliktedir. Ancak ilginç bir veri ise aynı yolak genleri arasında yer alan PRR95 (Pseudo cevap düzenleyici 95) geninin varlığıdır. PRR95 sirkadiyen saat bileşenlerinden yanıt düzenleyici protein ailesinin bir üyesidir. *Arabidopsis* bitkisi ile yapılan deneylerde, PRR genlerinin gün boyunca eksprese edildiği ve endojen sirkadiyen saat salınımlarını düzenlediği gösterilmiştir (Makino ve diğ., 2002). Arpada, bazı PRR genleri artan sıcaklıkta artan ekspresyon göstermiş, ancak uzun gün koşulları altında salınımlar sadece PRR95 tarafından uyarılmıştır (Ford ve diğ., 2016). Tüm bu veriler doğrultusunda çiçeklenme yolağında PRR95 geninin varlığı, bu genin çevresel streslere cevap olarak çiçeklenme zamanının düzenlenmesinde rol oynayabileceği anlamına gelebilir, ancak bu genin köklerdeki varlığı araştırılmaya açık bir soru olarak durmaktadır.

Yaprak morfogenez yolaklarının köklerde artan ekspresyonu, morfogenezin kök ve yapraklarda benzer şekilde düzenlendiği fikrini beraberinde getirmektedir. GO zenginleştirme analizlerinde bu yolakta yer alan 10 adet gen tespit edilmiş ve içerisinde mevcut olan MYB'nin (Myb-benzeri HTH transkripsiyon düzenleyici aile proteinleri) kök gelişimi ve farklılaşmasında etkili olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Feng ve diğ., 2004; Shin ve diğ., 2007; Mu ve diğ., 2009). MYB59'un, kök uçlarında, hücre döngüsünü kontrol ederek kök gelişimini düzenlediği (Mu ve diğ., 2009) ve MYB77'nin ise oksinle indüklenebilir genlerin ifadesini ve lateral kök oluşumunu düzenlediği gözlemlenmiştir (Shin ve diğ., 2007). Feng ve diğ., (2004), MYB68'in özellikle kök periskl hücrelerinde eksprese edildiğini ve kök gelişiminde rol oynadığını bildirmiştir. Önceki çalışmalarda kısmen açıklanmaya çalışılan bu durum, kök gelişimine dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen GO zenginleştirme analizlerinde yaprak morfogenezi yolaklarının 1. ve 4. gün yaprak sonuçları yerine sadece ve her iki zaman diliminde köklerde gözlemlenmesi literatürde cevap bekleyen bir diğer araştırma konusu olarak gözükmektedir.

Bu tez çalışmasında tespit edilen bir diğer ilginç bulgu ise, sirkadiyen ritme ait gen gruplarının stres altında 4. günde hem yaprak hem de kök dokusunda azalan ekspresyonu ile karakterize edilmesidir. Sirkadiyen ritimler bitkilerin günlük çevresel değişimleri önceden tahmin

etmelerini sağlayan ve ışık altında büyüme metabolizmalarına neden olan salınımlardır (Sanchez ve diğ., 2011). GO zenginleştirme analizine dahil olan ve bu yolaktaki farklılığı belirleyen genler yapraklarda 24, köklerde ise 20 adet olarak belirlenmiştir. Burada dikkat çeken en önemli nokta her iki dokuda da bu genlerin kriptokrom ve fototropinleri işaret etmesidir. McElwain ve diğ. (1992) yaptıkları çalışmada, tuz stresi altındaki bitkilerin Red/FarRed ışık oranında değişkenliklere maruz kaldıklarında, biyokimyasal değişikliklerin fitokrom aracılı olduğunu göstermişlerdir. Transkriptomik analizlerde, strese cevap veren birçok genin sirkadiyen saatin kontrolünde olduğu ve bitki zararlıları, tuzluluk, kuraklık, sıcak veya soğuk, UV-B radyasyonu dahil olmak üzere abiyotik ve biyotik streslere verilen tepkilerin kontrolünün belirgin şekilde fitokromlar tarafında modüle edildiği bulunmuştur (Covington ve diğ., 2008; Marcolino ve diğ., 2014; D'Amico-Damião ve diğ., 2015; Gavassi ve diğ., 2017). Bunun aksine bu tez çalışmasında kuraklık stresinde kriptokrom ve fototropin aracılı cevabın oluşması, farklı stres durumlarında farklı sirkadiyen ritimlere bağlı cevapların oluştuğu sonucunu doğurabilir.

Saatin bitki fizyolojisi ve gelişimi üzerindeki etkileri büyük ölçüde gen ekspresyonunun düzenlenmesi aracılıdır. *Arabidopsis* bitkilerinde transkriptlerin yaklaşık %80'i, günlük ışık-karanlık veya sıcaklık döngüleri altında oluşurlar ve bu salınımların %30-40'ı sabit koşullara devinim ile devam eder (Damiao ve diğ., 2018). Yüksek bitkilerde beş fotoreseptör sistemi tanımlanmıştır, bunlar; kırmızı (600-700 nm) ve uzak kırmızı ışık (700-750 nm) dalga boylarını emen fitokromlar (phys); mavi ışık (BL)/ultraviyole (UV) (315-500 nm) ışığa bağımlı kriptokromlar (crys) (Kavakli ve diğ., 2019); fototropinler (phots) ve zeitlupes (ZTL, FKF1 ve LKP2); ve UV-B ışığı (280–315 nm) ile çalışan UV Resistance Locus 8 (UVR8) fotoreseptörü olarak sıralanabilir (Mishra ve Khurana, 2017). Model organizma *Arabidopsis thaliana*'da kriptokromlardan üç tanesi tanımlanmıştır (cry1, cry2 ve cry3). Cry1 ve cry2 ağırlıklı olarak nukleusta bulunur (Kleiner ve diğ., 1999) ve bitki büyümesi, gelişmesi gibi çok yönlü görevleri vardır. Örneğin, cry1 öncelikle hipokotil uzaması, antosiyanin birikimi ve kotiledon genişlemesinin inhibisyonu ile ilgili fotomorfogenik tepkileri düzenlerken, cry2 hipokotil inhibisyonunda, sirkadiyen saat ve fotoperiyod bağımlı çiçeklenmede rol alır (Yu ve diğ., 2010). Kuraklık stresine karşı bitki tepkilerini kontrol eden mekanizmalara ilişkin kanıtlar göz önüne alındığında (Bechtold, 2018; Hussain ve diğ., 2018), daha önce yapılan araştırmalar, kriptokromların *Arabidopsis*'de kuraklık stres toleransında belirgin bir rol oynadığını göstermiştir (Mao ve diğ., 2015). Öyle ki sulamadan sonra 1 hafta bekletilen *Arabidopsis* çift

mutant (*cry1cry2*) bitkilerinin, yabani tipe oranla (WT) açıkça kuraklığa dayanıklı olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda kuraklığın 4. gününde mavi ışık bağımlı kriptokromlardan *cry1* genlerinin yapraklarda, *cry2* genlerinin ise köklerde azalan ekspresyonu belirlenmiştir. Bu durum mutant çalışmalarında belirlenen dayanıklılık tezi ile bağdaştırılırsa stres altındaki mercimek bitkilerinin aslında strese karşı bir dayanma mekanizması oluşturduğu söylenebilir. Bununla birlikte, *cry* genlerinin kuraklık stresi altında su kaybını modüle ettiği mekanizmalar hala belirsizdir, çünkü bu olay absisik asit gibi hormonlar ve fototropinler gibi mavi ışığa bağımlı fotoreseptörlerle etkileşimler de dahil olmak üzere birçok faktöre bağlı olabilir (Saradadevi ve diğ., 2017). Ancak bitki kriptokrom genleri veya sinyal bileşenlerinin, fotoreseptör mühendisliği yoluyla moleküler manipülasyonu, kuraklık tolerans özelliklerinin geliştirilmesinde potansiyel olarak kilit bir rol oynayabilir.

Fototropin gen ailesinin iki üyesi vardır, *phot1* (Fototropin 1) ve *phot2* (Fototropin 2). Olgun *Arabidopsis* kök sisteminde, *phot1*'in, kuraklık stresi altında, mavi ışığın ulaştığı (toprak yüzeyine yakın) kök kısımlarında yüksek ekspresyon seviyesi gösterdiği bildirilmiştir (Galen ve diğ., 2007). Ayrıca, *phot1*'den yoksun mutant bitkilerde kökler rastgele büyüme gösterirken, aktif *phot1*'e sahip bitki kökleri yönlü bir büyüme göstermişlerdir (Galen ve diğ., 2007). *Arabidopsis* kök uçlarında, *phot1* primer ve lateral köklerin apikal bölgesinde birikir, primer köklerde mavi ışığın neden olduğu negatif bükülmelere aracılık eder ve lateral kök uzamasını baskılayabilir (Sakamoto ve Briggs, 2002; Wan ve diğ., 2012; Moni ve diğ., 2015). *Phot1*'in köklerdeki önemli rolleri karşılaştırıldığında, *phot2* kök dokularında çok zayıf bir dağılıma sahiptir (Kong ve diğ., 2006; Wan ve diğ., 2008). Çalışmamızda *phot1* ve *phot2* genleri yaprak ve kök dokularında 4. günde azalan ekspresyon göstermiştir. Literatürde savunulan *phot1* geninin mavi ışığın ulaştığı bölgelerde fazlaca ifade edilmesi ve mutant bitkilerde köklerin rastgele büyüme göstermesi bilgileri göz önüne alınırsa, çalışmamızda mercimek bitkisi kök dokularında belirlenen azalan ekspresyon seviyesinin, kök hacminin artırılması yönünde bir stratejiye sahip olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda azalan ekspresyon seviyesi gösteren diğer sirkadiyen ritim yolağına dahil genler arasında PRR7 (Pseudo cevap düzenleyici 7), ELF3 (Hidroksiprolince zengin glikoprotein ailesi proteini), LHY (“homeodomain benzeri süper aile proteini”), LKP (“LOV Kelch protein”), GI (Gigantea protein) yer almaktadır. Sirkadiyen ritmin bileşenlerindeki mutasyonlar, yalnızca merkezi osilatörün işlevini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda bitkilerin

hem çevresel stres koşullarını tolere etme kabiliyetini değiştirir hem de bu değişen duruma uyum sağlamalarını sağlar. Örneğin, CCA1 (Sirkadiyen saat ilişkili 1) LHY (Homeodomain benzeri süper aile proteini), ELF3 (Hidroksiprolince zengin glikoprotein ailesi proteini 3), ELF4 (Hidroksiprolince zengin glikoprotein ailesi proteini 4), PRR5 (Pseudo cevap düzenleyici 5), PRR7 (Pseudo cevap düzenleyici 7) ve PRR9 (Pseudo cevap düzenleyici 9) genlerinde mutasyonlara sahip bitkiler, ROS üreten ajanlara karşı aşırı duyarlı iken, CCA1 fazla eksprese eden bitkiler (CCA1-oks) yabancı tip bitkilere oranla ROS'lara karşı daha toleranslıdır (Liu ve diğ., 2012). Yapılan bir çalışmada LKP'nin fazla ekspresyon göstermesi, kuraklık toleransını arttırmıştır (Miyazaki ve diğ., 2015). Ayrıca PRR5, 7, 9 üçlü mutanı, yüksek tuzluluk ve kuraklık streslerine karşı daha toleranslıdır (Nakamichi ve diğ., 2009). GI-OX bitkiler ise, artan tuz duyarlılığı gösterirken, GI mutantları, kuraklık stresi ve oksidatif stres altında sağkalım artışı göstermiştir (Fornara ve diğ., 2015).

Sirkadiyen ritim mutantları ile yapılan abiyotik stres çalışmaları göz önüne alındığında, ritim ve abiyotik stres tepkilerinin birbirine sıkı bir şekilde bağlı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, ritim bileşenleri ve bitki fenotipleri arasındaki ilişki hala açık değildir. Sirkadiyen mutantlarda görülen çeşitli abiyotik/metabolik fenotiplerin sadece diğer ritim genlerinin transkript seviyelerindeki değişikliklerle açıklanamaz. Örneğin CCA1 / LHY mutantlarında gözlemlenen TOC1 (CAB ekspresyonun zamanlaması 1) ekspresyonundaki artışın, kuraklık stres fenotiplerini açıklamayacağı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Sanchez ve diğ., 2011). Saat bileşenlerinin transkript seviyelerinin değişmesi, hem metabolik dengesizliğin hem de aynı zamanda abiyotik stres fenotiplerinin tek nedeni değildir. Özet olarak sirkadiyen saatin bozulmasının bitki homeostazını ve gelişimini etkilediği görülmektedir.

Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde bitkilerin sirkadiyen ritmi ve abiyotik stres toleransı sıkıca birbirine bağlı süreçler gibi görünmektedir. Ancak bitkilerin kuraklık stres tepkisinin kriptokrom ve fototropin aracılı olması konusunun genişletilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Abiyotik stres sinyallerinin ritim ile entegrasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini ve bitkinin hayatta kalmasını veya verimliliğini en üst düzeye çıkarmada rol oynayıp oynamadığını test etmek için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. Özet olarak, sonuçlarımız, sirkadiyen düzenlenme ile bitki büyümesi ve abiyotik stres toleransı arasında bağlantıyı sağlamak için yararlanılabilir bir kaynak olabilir. Ortamdaki değişikliklere yanıt olarak ritmin işlevindeki ayarlamalar, bitkilerin normal şartlarda yaşadığı dengeye ulaşmalarına ve

gerektiğinde abiyotik stres toleransı oluşturmalarını sağlayabilir. Bu hipotezler gerçekleşirse, gelecekte bu tür mekanizmalar, verimi azaltmadan mahsullerdeki abiyotik stres toleransını geliştirmek için kullanılabilir.

Sonuç olarak, global transkriptomik çalışmamız, kuraklık cevabının, stres faktörü ortaya çıktığı andan itibaren çalışan ve bitkiyi olumsuz çevresel koşullara cevap vermeye hazır hale getiren birçok kuraklık yanıt geninin strese bağlı ifade profilinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada global transkriptom verilerini, bitkilerde olası kuraklık tolerans mekanizmalarının farklı doku ve zaman aralıklarındaki cevabını anlamak amacıyla elde ettik. Amacımız, seçilen değişkenler içinde birkaç yolak bağlantısının varlığı ile birlikte, azalan ve artan ekspresyonlar arasındaki etkileşimi dikkate alarak, farklı genler arasındaki bağlantıları vurgulamak olmuştur. Tartışılan genlerin bir kısmının strese cevabın oluşmasındaki rolü ve fonksiyonlarının analizi yapraklarla sınırlı olmasına rağmen, kuraklığın algılanması ve strese karşı belirgin cevabın oluşturulması gibi faktörlerin ise köklerde öne çıktığı gözlemlenmiştir. Bir genotipte yapraklarda normal olan kuraklık algılama mekanizmaları, stresin ortaya çıkmasından sonra köklerde çok daha hızlı ve etkili bir tepki oluşturmuştur. Bu durum Darwin'in 140 yıl önce, "köklerin beyin gibi davrandığını söylemek çok abartı olmaz, duyu organlarından izlenimleri alıp cevapları yönetir" diye belirttiği "root-brain" hipotezini hatırlatmaktadır (Darwin, 1880).

Bu tez çalışmasında kısa ve uzun süreli kuraklık koşullarında yetiştirilen mercimek fidelerinin kök ve yapraklarındaki tüm transkriptlerin belirlenmesi yapılmıştır. Literatürde mevcut olan kuraklık stresi çalışmalarından farklı olduğundan öncü bir niteliğe sahiptir. Tüm transkriptlerin belirlenmesi ve sonuçlarının derinlemesine analiziyle birlikte bu tez çalışması, bitki metabolizmasının kuraklığa karşı verimini ve çevresel baskılara karşı toleransını artıracak moleküler mekanizmaların daha fazla araştırılması için iyi bir kaynak olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abate, T., Alene, A. D., Bergvinson, D., Shiferaw, B., Silim, S., Orr, A., & Asfaw, S. (2012). *Tropical grain legumes in Africa and south Asia: knowledge and opportunities*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.

Abdelrahman, H., ElHady, M., Alcivar-Warren, A., Allen, S., Al-Tobasei, R., Bao, L., ... & Chappell, J. (2017). Aquaculture genomics, genetics and breeding in the United States: current status, challenges, and priorities for future research. *BMC genomics*, 18(1), 191.

Abdelrahman, M., Jogaiah, S., Burritt, D. J., & Tran, L. S. P. (2018). Legume genetic resources and transcriptome dynamics under abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment*, 41(9), 1972-1983.

Ahmadi, A., & Baker, D. A. (1998). Stomatal and non stomatal photosynthesis limitation factors on wheat under drought condition. *Iranian Journal of Agriculture Science*, 31, 813-825.

Aimar, D., Calafat, M., Andrade, A. M., Carassay, L., Abdala, G. I., & Molas, M. L. (2011). Drought tolerance and stress hormones: From model organisms to forage crops. *In Plants and environment*. IntechOpen.

Allen, D. J., & Ort, D. R. (2001). Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in plant science*, 6(1), 36-42.

Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032.

Añón, R., Boscá, M. M., Sanchiz, V., Tosca, J., Almela, P., Amorós, C., & Benages, A. (2006). Factors predicting poor prognosis in ischemic colitis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(30), 4875.

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.

Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M., & Ben Embarek, P. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada.*

Ashraf, M. F. M. R., & Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59(2), 206-216.

Barbagallo, R. P., Oxborough, K., Pallett, K. E., & Baker, N. R. (2003). Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology*, 132(2), 485-493.

Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58.

Barulina, E. I. (1930). Lentils of the USSR and of other countries.

Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., ... & Boutell, J. M. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53.

Bhargava, A. (1991). *Resources and Planning for Economic Development: A Case Study of Sagar Division, MP*. Northern Book Centre.

Blum, A. (1996). Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In *Drought tolerance in higher plants: Genetical, physiological and molecular biological analysis* (pp. 57-70). Springer, Dordrecht.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Bradford, K. J. (1990). A water relations analysis of seed germination rates. *Plant Physiology*, 94(2), 840-849.

Branca, A., Paape, T. D., Zhou, P., Briskine, R., Farmer, A. D., Mudge, J., ... & Ben, C. (2011). Whole-genome nucleotide diversity, recombination, and linkage disequilibrium in the model

legume *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(42), E864-E870.

Breaker, R. R., Gesteland, R. F., Cech, T. R., & Atkins, J. F. (2006). The RNA world.

Buchanan, K. L. (2000). Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(4), 156-160.

Calzadilla, P. I., Maiale, S. J., Ruiz, O. A., & Escaray, F. J. (2016). Transcriptome response mediated by cold stress in *Lotus japonicus*. *Frontiers in plant science*, 7, 374.

Chandra, A., & Dubey, A. (2009). Assessment of ploidy level on stress tolerance of *Cenchrus* species based on leaf photosynthetic characteristics. *Acta physiologiae plantarum*, 31(5), 1003-1013.

Chaves, M.M. et al. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560

Chwialkowska, K., Nowakowska, U., Mroziewicz, A., Szarejko, I., & Kwasniewski, M. (2016). Water-deficiency conditions differently modulate the methylome of roots and leaves in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of experimental botany*, 67(4), 1109-1121.

Cubero, J. I. (1981). Origin, taxonomy and domestication [lentils].

D'Amico-Damião, V., Cruz, F. J. R., Gavassi, M. A., Santos, D. M. M., Melo, H. C., & Carvalho, R. F. (2015). Photomorphogenic modulation of water stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): the role of phytochromes A, B1, and B2. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(1), 25-30.

Deguchi, Y., Banba, M., Shimoda, Y., Chechetka, S. A., Suzuri, R., Okusako, Y., ... & Higashi, S. (2007). Transcriptome profiling of *Lotus japonicus* roots during arbuscular mycorrhiza development and comparison with that of nodulation. *DNA research*, 14(3), 117-133.

Del Blanco, I. A., Rajaram, S., Kronstad, W. E., & Reynolds, M. P. (2000). Physiological performance of synthetic hexaploid wheat-derived populations. *Crop Science*, 40(5), 1257-1263.

Demiral, T., & Türkan, I. (2004). Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment?. *Journal of Plant Physiology*, 161(10), 1089-1100.

Demirevska K, Zasheva D, Dimitrov R, Simova-Stoilova L, Stamenova M, Feller U (2009). Drought stress effects on Rubisco in wheat: changes in the Rubisco large subunit. *Acta Physiol. Plant.*, 31: 1129- 1138.

Deshmukh, R., Sonah, H., Patil, G., Chen, W., Prince, S., Mutava, R., ... & Nguyen, H. T. (2014). Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean. *Frontiers in Plant science*, 5, 244.

Duan B, Yang Y, Lu Y, Korpelainen H, Berninger F, Li C (2007). Interactions between drought stress, ABA and genotypes in *Picea asperata*. *J. Exp. Bot.*, 58: 3025-3036.

Duan, Z., Kong, F., Zhang, L., Li, W., Zhang, J., & Peng, L. (2016). A bestrophinlike protein modulates the proton motive force across the thylakoid membrane in *Arabidopsis*. *Journal of integrative plant biology*, 58(10), 848-858.

Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67-82.

Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2013). *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press.

Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and molecular life sciences*, 72(4), 673-689.

FAOSTAT, F. (2015). FAO Statistics Division. Available: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. [Ziyaret Tarihi: 30 Nisan 2019].

FAOSTAT, F. (2018). FAO Statistics Division/ Legumes. Available: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. [Ziyaret Tarihi: 30 Nisan April 2019].

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable agriculture* (pp. 153-188). Springer, Dordrecht.

- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., & Sharkey, T. D. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant biology*, 6(03), 269-279.
- Flight, I., & Clifton, P. (2006). Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *European journal of clinical nutrition*, 60(10), 1145.
- Fu, X., Fu, N., Guo, S., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., ... & Khaitovich, P. (2009). Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC genomics*, 10(1), 161.
- Gao F, Wang J, Wei S, Li Z, Wang N, Li H, Feng J, Li H, Zhou Y, Zhang F. (2015). Transcriptomic analysis of drought stress responses in *Ammopiptanthus mongolicus* leaves using the RNA-Seq technique. *Plos One*. 2015.
- Gao, Z., Li, Y., Wu, G., Li, G., Sun, H., Deng, S., ... & Zhang, X. (2015). Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin induction by salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA). *PloS one*, 10(10), e0140609.
- Garg, R., Patel, R. K., Tyagi, A. K., & Jain, M. (2011). De novo assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification. *DNA research*, 18(1), 53-63.
- Garg, R., Shankar, R., Thakkar, B., Kudapa, H., Krishnamurthy, L., Mantri, N., ... & Jain, M. (2016). Transcriptome analyses reveal genotype- and developmental stage-specific molecular responses to drought and salinity stresses in chickpea. *Scientific reports*, 6, 19228.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J. F., & Dommes, J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37(3), 263-285.
- Gavassi, M. A., Monteiro, C. C., Campos, M. L., Melo, H. C., & Carvalho, R. F. (2017). Phytochromes are key regulators of abiotic stress responses in tomato. *Scientia horticultrae*, 222, 126-135.

Ghanem, M. E., Martínez-Andújar, C., Albacete, A., Pospíšilová, H., Dodd, I. C., Pérez-Alfocea, F., & Lutts, S. (2011). Nitrogen form alters hormonal balance in salt-treated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(2), 144-157.

Gholizadeh A. Anti-oxidation profile in the leaves of maize inbreds: elevation in the activity of phenylalanine ammonia lyase under drought stress. *J Plant Sci*. 2010;5(2):137–45.

Gowda, C. L. L., Rao, P. P., & Bhagavatula, S. (2009). Global trends in production and trade of major grain legumes.

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., ... & Chen, Z. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29(7), 644.

Grill, E., & Ziegler, H. (1998). A plant's dilemma. *Science*, 282(5387), 252-253.

Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., Chaïbi, W., & Zarrouk, M. (2009). Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119(3), 257-263.

Guerrero, F., & Mullet, J. E. (1986). Increased abscisic acid biosynthesis during plant dehydration requires transcription. *Plant Physiology*, 80(2), 588-591.

Guimaraes, P. M., Guimaraes, L. A., Morgante, C. V., Silva Jr, O. B., Araujo, A. C. G., Martins, A. C., ... & Bertioli, D. J. (2015). Root transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. *PLoS One*, 10(10), e0140937.

Hansen, J., & Renfrew, J. M. (1978). Palaeolithic–neolithic seed remains at Franchthi Cave, Greece. *Nature*, 271(5643), 349.

Harris, K., Subudhi, P. K., Borrell, A., Jordan, D., Rosenow, D., Nguyen, H., ... & Mullet, J. (2006). Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence. *Journal of experimental botany*, 58(2), 327-338.

Hiz, M. C., Canher, B., Niron, H., & Turet, M. (2014). Transcriptome analysis of salt tolerant common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under saline conditions. *PloS one*, 9(3), e92598.

Hoagland, D. R., ve Arnon, D. I. (1938). The water culture method for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agr. Exp. Sta.*, 347, 461.

Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., & 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. A., Farooq, M., Ashraf, M. Y., & Cheema, M. A. (2008). Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(3), 193-199.

Hübner, S., Korol, A. B., & Schmid, K. J. (2015). RNA-Seq analysis identifies genes associated with differential reproductive success under drought-stress in accessions of wild barley *Hordeum spontaneum*. *BMC plant biology*, 15(1), 134.

Idrissi O, Udupa SM, De Keyser E, McGee RJ, Coyne CJ, Saha GC, Muehlbauer FJ, Van Damme P, De Riek J (2016) Identification of Quantitative Trait Loci Controlling Root and Shoot Traits Associated with Drought Tolerance in a Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Recombinant Inbred Line Population. *Front Plant Sci* 7:1174.

IPCC. 2007. Climate change 2007: synthesis report, contribution of working groups I, II and III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. In: Pachauri RK, Reisinger A, editors. Core writing team. *Geneva: IPCC*; 104 p.

Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., & Khan, M. S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food chemistry*, 97(2), 331-335.

Iqbal, N., Umar, S., Khan, N.A., Khan, M.I.R. (2014). A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. *Environ. Exp. Bot.* 100, 34e42.

Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., & Zhu, J. K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell*, 9(11), 1935-1949.

Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P., & Panneerselvam, R. (2007). Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to paclobutrazol treatment under salinity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3), 205-209.

Jaleel, C. A., Gopi, R., Sankar, B., Gomathinayagam, M., & Panneerselvam, R. (2008). Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 42-47.

Janiak, A., Kwasniewski, M., Sowa, M., Gajek, K., Żmuda, K., Kościelniak, J., & Szarejko, I. (2018). No time to waste: transcriptome study reveals that drought tolerance in barley may be attributed to stressed-like expression patterns that exist before the occurrence of stress. *Frontiers in plant science*, 8, 2212.

Johansen, C., Baldev, B., Brouwer, J. B., Erskine, W., Jermyn, W. A., Li-Juan, L., ... & Silim, S. N. (1994). Biotic and abiotic stresses constraining productivity of cool season food legumes in Asia, Africa and Oceania. In *Expanding the production and use of cool season food legumes* (pp. 175-194). Springer, Dordrecht.

Kabbadj, A., Makoudi, B., Mouradi, M., Pauly, N., Frendo, P., & Ghoulam, C. (2017). Physiological and biochemical responses involved in water deficit tolerance of nitrogen-fixing *Vicia faba*. *PloS one*, 12(12), e0190284.

Kahraman, A. (2016). Nutritional components and amino acids in lentil varieties. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 30(1), 34-38.

Kaiser, W. M., Kaiser, G., Schöner, S., & Neimanis, S. (1981). Photosynthesis under osmotic stress: differential recovery of photosynthetic activities of stroma enzymes, intact chloroplasts, protoplasts, and leaf slices after exposure to high solute concentrations. *Planta*, 430-435.

Kamara, A. Y., Menkir, A., Badu-Apraku, B., & Ibikunle, O. (2003). The influence of drought stress on growth, yield and yield components of selected maize genotypes. *The journal of agricultural science*, 141(1), 43-50.

Karrou, M., & Oweis, T. (2012). Water and land productivities of wheat and food legumes with deficit supplemental irrigation in a Mediterranean environment. *Agricultural Water Management*, 107, 94-103.

- Khan, M. B., Hussain, N., & Iqbal, M. (2001). Effect of water stress on growth and yield components of maize variety YHS 202. *Journal of Research Science*, 12(1), 15-18.
- Khan, M.I.R., Asgher, M., Khan, N.A. (2014). Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol. biochem.* 80, 67e74.
- Klepek, Y., Geiger, D., Stadler, R., Klebl, F., Landouar-Arsivaud, L., Lemoine, R., Hedrich, R., Sauer, N. (2005). Arabidopsis polyol transporter 5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H₂O-symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *Plant Cell* 17, 204e218.
- Kudapa, H., Ramalingam, A., Nayakoti, S., Chen, X., Zhuang, W. J., Liang, X., ... & Varshney, R. K. (2013). Functional genomics to study stress responses in crop legumes: progress and prospects. *Functional Plant Biology*, 40(12), 1221-1233.
- Kulkarni, M., Soolanayakanahally, R., Ogawa, S., Uga, Y., Selvaraj, M. G., & Kagale, S. (2017). Drought response in wheat: key genes and regulatory mechanisms controlling root system architecture and transpiration efficiency. *Frontiers in chemistry*, 5, 106.
- Kumar, R., & Tamuli, R. (2014). Calcium/calmodulin-dependent kinases are involved in growth, thermotolerance, oxidative stress survival, and fertility in *Neurospora crassa*. *Archives of microbiology*, 196(4), 295-305.
- Kumar, S., Barpete, S., Kumar, J., Gupta, P., & Sarker, A. (2013). Global lentil production: constraints and strategies. *SATSA Mukhapatra—Annu. Tech. Issue*, 17, 1-13.
- Kypris, A., Petropoulou, Y., & Manetas, Y. (1995). Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L., Labiatae) under Mediterranean field conditions: avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. *Journal of Experimental Botany*, 46(12), 1825-1831.
- Ladizinsky, G. (1979). Species relationships in the genus *Lens* as indicated by seed-protein electrophoresis. *Botanical gazette*, 140(4), 449-451.

- Ladizinsky, G., Cohen, D., & Muehlbauer, F. J. (1985). Hybridization in the genus *Lens* by means of embryo culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 70(1), 97-101.
- Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., & Bekkaoui, F. (2018). Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6, 26.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:R25.
- Lardy, G., & Anderson, V. (2009). Alternative feeds for ruminants.
- Lee, S. B., & Suh, M. C. (2013). Recent advances in cuticular wax biosynthesis and its regulation in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 6(2), 246-249.
- Lelandais-Brière, C., Naya, L., Sallet, E., Calenge, F., Frugier, F., Hartmann, C., ... & Crespi, M. (2009). Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *The Plant Cell*, 21(9), 2780-2796.
- Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 529(7584), 84.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., & Abbo, S. (2000). The cradle of agriculture. *Science*, 288(5471), 1602-1603.
- Li B, Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *Bmc Bioinformatics* 12.
- Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., & Ecker, J. R. (2008). Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, 133(3), 523-536.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25:402-408.
- Lugojan, C., & Ciulca, S. (2011). Evaluation of relative water content in winter wheat. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 15(2), 173-7.

- Manivannan, P., Jaleel, C. A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G. A., & Panneerselvam, R. (2007). Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(2), 141-149.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43:D222-226.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembgen, L. A., ... & Dewell, S. B. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376.
- Menconi, M. C. L. M., Sgherri, C. L. M., Pinzino, C., & Navari-Lizzo, F. (1995). Activated oxygen production and detoxification in wheat plants subjected to a water deficit programme. *Journal of Experimental Botany*, 46(9), 1123-1130.
- Micheletto, S., Rodriguez-Urbe, L., Hernandez, R., Richins, R. D., Curry, J., & O'Connell, M. A. (2007). Comparative transcript profiling in roots of *Phaseolus acutifolius* and *P. vulgaris* under water deficit stress. *Plant Science*, 173(5), 510-520.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11(1), 15-19.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 459-481.
- Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V., & Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194(3), 346-352.

Morgil, H., Tardu, M., Cevahir, G., & Kavakli, İ. H. (2019). Comparative RNA-seq analysis of the drought-sensitive lentil (*Lens culinaris*) root and leaf under short-and long-term water deficits. *Functional & integrative genomics*, 1-13.

Muehlbauer, F. J., Kaiser, W. J., Clement, S. L., & Summerfield, R. J. (1995). Production and breeding of lentil. *Advances in Agronomy*.

Musacchia F, Basu S, Petrosino G, Salvemini M, Sanges R (2015) Annocript: a flexible pipeline for the annotation of transcriptomes able to identify putative long noncoding RNAs. *Bioinformatics* 31:2199-2201.

Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., & Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, 320(5881), 1344-1349.

Nakayama, N. O. B. U. H. I. R. O., Saneoka, H. I. R. O. F. U. M. I., Moghaieb, R. E., Premachandra, G. S., & Fujita, K. O. U. N. O. S. U. K. E. (2007). Response of growth, photosynthetic gas exchange, translocation of ¹³C-labelled photosynthate and N accumulation in two soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars to drought stress. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9(5), 669-674.

Nam, N. H., Chauhan, Y. S., & Johansen, C. (2001). Effect of timing of drought stress on growth and grain yield of extra-short-duration pigeonpea lines. *The Journal of Agricultural Science*, 136(2), 179-189.

Nayyar, H., & Gupta, D. (2006). Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 58(1-3), 106-113.

Nayyar, H., & Walia, D. P. (2003). Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum*, 46(2), 275-279.

Okçu, G., Kaya, M. D., & Atak, M. (2005). Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish journal of agriculture and forestry*, 29(4), 237-242.

- Olensen, J. E., Trnka, M., Kersebaum, K. C., Skjelvåg, A. O., Seguin, B., Peltonen-Sainio, P., ... & Micale, F. (2011). Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. *European Journal of Agronomy*, *34*(2), 96-112.
- Oweis, T., Hachum, A., & Pala, M. (2004). Lentil production under supplemental irrigation in a Mediterranean environment. *Agricultural water management*, *68*(3), 251-265.
- Ozsolak, F., & Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews genetics*, *12*(2), 87..
- Parra, G., Bradnam, K., & Korf, I. (2007). CEGMA: a pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes. *Bioinformatics*, *23*(9), 1061-1067.
- Pavlovich, M. (2017). Computing in biotechnology: omics and beyond. *Trends in biotechnology*, *35*(6), 479-480.
- Per, T. S., Khan, N. A., Reddy, P. S., Masood, A., Hasanuzzaman, M., Khan, M. I. R., & 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.
- Postel, S. L. (2000). Water and world population growth. *Journal-American Water Works Association*, *92*(4), 131-138.
- Price GD, Howitt SM. Plant science: Towards turbocharged photosynthesis. *Nature*. 2014. 10.1038/nature13749.
- Price, J. C., & Leviston, Z. (2014). Predicting pro-environmental agricultural practices: the social, psychological and contextual influences on land management. *Journal of Rural Studies*, *34*, 65-78.
- Raghavan, R., Groisman, E. A., & Ochman, H. (2011). Genome-wide detection of novel regulatory RNAs in *E. coli*. *Genome research*, *21*(9), 1487-1497.
- Razmjoo, K. H. O. R. S. H. I. D., Heydarizadeh, P. A. R. I. S. A., & Sabzalian, M. R. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *Int. J. Agric. Biol*, *10*(4), 451-454.

- Reddy, C. R., & Reddy, S. R. (1993). Scheduling irrigation for peanuts with variable amounts of available water. *Agricultural water management*, 23(1), 1-9.
- Rhodes, D., & Samaras, Y. (1994). Genetic control of osmoregulation in plants. *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*, 416.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26:139-140.
- Rockström J, Falkenmark M, Karlberg L, Hoff H, Rost S, Gerten D. Future water availability for global food production: The potential of green water for increasing resilience to global change. *Water Resources Research*. 2009; 45:W00A12.
- Romero, A., Novoa, B., & Figueras, A. (2012). Genomics, immune studies and diseases in bivalve aquaculture. *Invertebrate Survival Journal*, 9(1), 110-121.
- Romero, I. G., Ruvinsky, I., & Gilad, Y. (2012). Comparative studies of gene expression and the evolution of gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 505.
- Rucker, K. S., Kvien, C. K., Holbrook, C. C., & Hook, J. E. (1995). Identification of peanut genotypes with improved drought avoidance traits. *Peanut Science*, 22(1), 14-18.
- Sacks, M. M., Silk, W. K., & Burman, P. (1997). Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize. *Plant physiology*, 114(2), 519-527.
- Saha, G. C., & Vandemark, G. J. (2012). Evaluation of expression stability of candidate references genes among green and yellow pea cultivars (*Pisum sativum* L.) subjected to abiotic and biotic stress. *American Journal of Plant Sciences*, 3(02), 235.
- Sainju UM, Whitehead WF, Singh BP. Biculture Legume–Cereal Cover Crops for Enhanced Biomass Yield and Carbon and Nitrogen. *Agronomy Journal*. 2005; 97:1403–12.
- Sainju, U. M., Whitehead, W. F., & Singh, B. P. (2005). Carbon accumulation in cotton, sorghum, and underlying soil as influenced by tillage, cover crops, and nitrogen fertilization. *Plant and Soil*, 273(1-2), 219-234.

- Salehi-Lisar, S. Y., & Bakhshayeshan-Agdam, H. (2016). Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1* (pp. 1-16). Springer, Cham.
- Samarah, N. H., Alqudah, A. M., Amayreh, J. A., & McAndrews, G. M. (2009). The effect of late-terminal drought stress on yield components of four barley cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(6), 427-441.
- Sarker, A. (2011). Lentils in production and food systems in West Asia and Africa.
- Schachtman, D. P., & Shin, R. (2007). Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 47-69.
- Schmutz, J., P. E. McClean, S. Mamidi, G. A. Wu, S. B. Cannon, J. Grimwood, J. Jenkins, S. Shu, Q. Song, C. Chavarro, M. Torres-Torres, ... & S. A. Jackson. (2014) "A Reference Genome for Common Bean and Genome-Wide Analysis of Dual Domestications", *Nature Genetics*, Vol. 46, No. 7, pp. 707- 713.
- Schmutz, J., S. Cannon, J. Schlueter, J. Ma, T. Mitros, W. Nelson, D. Hyten, Q. Song, J. Thelen, J. Cheng, D. Xu, U. Hellsten, G. May, Y. Yu, ... & S. Jackson. (2010) "Genome Sequence of the Palaeopolyploid Soybean", *Nature*, Vol. 463, No. 7278, pp. 178-183.
- Schuppler U, He PH, John PCL, Munns R. (1998). Effects of water stress on cell division and cell-division-cycle-2-like cell- cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol.* 117:667–78
- Sehgal, A., Sita, K., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K. H., & Nayyar, H. (2017). Effects of drought, heat and their interaction on the growth, yield and photosynthetic function of lentil (*Lens culinaris Medikus*) genotypes varying in heat and drought sensitivity. *Frontiers in plant science*, 8, 1776.
- Severin, A. J., Woody, J. L., Bolon, Y. T., Joseph, B., Diers, B. W., Farmer, A. D., ... & Graham, M. A. (2010). RNA-Seq Atlas of Glycine max: a guide to the soybean transcriptome. *BMC plant biology*, 10(1), 160.

- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
- Sicher, R. C., & Barnaby, J. Y. (2012). Impact of carbon dioxide enrichment on the responses of maize leaf transcripts and metabolites to water stress. *Physiologia plantarum*, 144(3), 238-253.
- Siddique, K. H. M., Regan, K. L., Tennant, D., & Thomson, B. D. (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, D., Singh, C. K., Taunk, J., Tomar, R. S. S., Chaturvedi, A. K., Gaikwad, K., & Pal, M. (2017). Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. *BMC genomics*, 18(1), 206.
- Singh, D., Singh, C. K., Tomar, R. S. S., Taunk, J., Singh, R., Maurya, S., ... & Dubey, S. K. (2016). Molecular assortment of *Lens* species with different adaptations to drought conditions using SSR markers. *PLoS One*, 11(1), e0147213.
- Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New phytologist*, 125(1), 27-58.
- Stoddard, F. L., Balko, C., Erskine, W., Khan, H. R., Link, W., & Sarker, A. (2006). Screening techniques and sources of resistance to abiotic stresses in cool-season food legumes. *Euphytica*, 147(1-2), 167-186.
- Sudheesh, S., Verma, P., Forster, J., Cogan, N., & Kaur, S. (2016). Generation and characterisation of a reference transcriptome for lentil (*Lens culinaris* Medik.). *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1887.
- Sultani MI, Gill MA, Anwar MM, Athar M. Evaluation of soil physical properties as influenced by various
- Svoboda, P., Janská, A., Spiwok, V., Prášil, I. T., Kosová, K., Vítámvás, P., & Ovesná, J. (2016). Global scale transcriptional profiling of two contrasting barley genotypes exposed to

moderate drought conditions: contribution of leaves and crowns to water shortage coping strategies. *Frontiers in plant science*, 7, 1958.

Szabados, L., & Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.

Talamè, V., Ozturk, N. Z., Bohnert, H. J., & Tuberosa, R. (2006). Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of experimental botany*, 58(2), 229-240.

Tardu, M., Dikbas, U. M., Baris, I., & Kavakli, I. H. (2016). RNA-seq analysis of the transcriptional response to blue and red light in the extremophilic red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *Functional & integrative genomics*, 16(6), 657-669.

Tripathi, A., Tripathi, D. K., Chauhan, D. K., Kumar, N., & Singh, G. S. (2016). Paradigms of climate change impacts on some major food sources of the world: a review on current knowledge and future prospects. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 216, 356-373.

Tullu, A., Diederichsen, A., Suvorova, G., & Vandenberg, A. (2011). Genetic and genomic resources of lentil: status, use and prospects. *Plant Genetic Resources*, 9(1), 19-29.

Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., ... & Sidow, A. (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome research*, 18(7), 1051-1063.

Van Dijk, D., Sharma, R., Nainys, J., Yim, K., Kathail, P., Carr, A. J., ... & Brierie, B. (2018). Recovering gene interactions from single-cell data using data diffusion. *Cell*, 174(3), 716-729.

Van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*.

Van Zeist, W., & Bottema, S. (1971). Plant husbandry in early neolithic Nea Nikomedeia, Greece. *Acta botanica neerlandica*, 20(5), 524-538.

Varshney, R. K., Song, C., Saxena, R. K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A. G., ... & Millan, T. (2013). Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature biotechnology*, 31(3), 240.

Varshney, R., W. Chen, Y. Li, A. Bharti, R. Saxena, J. Schlueter, M. Donoghue, S. Azam, G. Fan, A. Whaley, ... & S. Jackson (2013). "Draft Genome Sequence of Pigeonpea (*Cajanus Cajan*), an Orphan Legume Crop of Resource-Poor Farmers", *Nature Biotechnology*, Vol. 30, No. 1, pp. 83-89.

Vermeirssen V., De Clercq I., Van Parys T., Van Breusegem F., Van de Peer Y. (2014). Arabidopsis ensemble reverse-engineered gene regulatory network discloses interconnected transcription factors in oxidative stress. *Plant Cell* 26, 4656–4679. 10.1105/tpc.114.131417.

Viadel, B., Barberá, R., & Farré, R. (2006). Uptake and retention of calcium, iron, and zinc from raw legumes and the effect of cooking on lentils in Caco-2 cells. *Nutrition research*, 26(11), 591-596.

Vijayan, K. (2009). Approaches for enhancing salt tolerance in mulberry (*Morus L*)-A review. *Plant Omics*, 2(1), 41.

Wehner, G., Balko, C., Humbeck, K., Zyprian, E., & Ordon, F. (2016). Expression profiling of genes involved in drought stress and leaf senescence in juvenile barley. *BMC plant biology*, 16(1), 3.

Wu C, Wang Q, Xie B, Wang Z, Cui J, Hu T. (2011). Effects of drought and salt stress on seed germination of three leguminous species. *Afr J Biotechnol*. 10:1795417961.

Wu, Y., & Cosgrove, D. J. (2000). Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of experimental botany*, 51(350), 1543-1553.

Yadav, S. S., McNeil, D., & Stevenson, P. C. (Eds.). (2007). *Lentil: An ancient crop for modern times*. Springer Science & Business Media.

Yang, F., & Miao, L. F. (2010). Adaptive responses to progressive drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Silva Fennica*, 44(1), 23-37.

Yang, S., Vanderbeld, B., Wan, J., & Huang, Y. (2010). Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Molecular plant*, 3(3), 469-490.

- Young, N., F. Debellé, G. Oldroyd, R. Geurts, S. Cannon, M. Udvardi, V. Benedito, K. Mayer, J. Gouzy, H. Schoof, Y. Van de Peer, S. Proost, D. Cook, B. ... & B. Wang (2011). "The Medicago Genome Provides Insight into the Evolution of Rhizobial Symbioses", *Nature*, Vol. 480, No. 7378, pp. 520-524.
- Zandalinas, S. I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2018). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia plantarum*, 162(1), 2-12.
- Zeng, X., Bai, L., Wei, Z., Yuan, H., Wang, Y., Xu, Q., ... & Nyima, T. (2016). Transcriptome analysis revealed the drought-responsive genes in Tibetan hulless barley. *BMC genomics*, 17(1), 386.
- Zhang, J., & Kirkham, M. B. (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, 132(3), 361-373.
- Zhao, T. J., Sun, S., Liu, Y., Liu, J. M., Liu, Q., Yan, Y. B., & Zhou, H. M. (2006). Regulating the drought-responsive element (DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 10752-10759.
- Zhou, J., Wang, X., Jiao, Y., Qin, Y., Liu, X., He, K., ... & Zhang, Q. (2007). Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant molecular biology*, 63(5), 591-608.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53(1), 247-273.
- Zohary, D. (1972). The wild progenitor and the place of origin of the cultivated lentil: *Lens culinaris*. *Economic Botany*, 26(4), 326-332.
- Zohary, D. (1999). Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46(2), 133-142.

EKLER

EK 1: UniProt Top-Hit tür dağılım oranları ve sıklıkları.

Organizma	Tekrar sıklığı	Oran (%)
<i>Medicago truncatula</i>	47736	34,6
<i>Cicer arietinum</i>	25257	18,3
<i>Papilionoideae</i>	17775	12,9
<i>Glycine max</i>	3911	2,8
<i>Fusarium</i>	3823	2,8
<i>Pisum sativum</i>	1590	1,2
<i>Phaseoleae</i>	1503	1,1
<i>Rhizopus delemar (strain RA 99-</i>	1304	0,9
<i>Glycine soja</i>	1278	0,9
<i>Soja</i>	1239	0,9
<i>Tetrahymena thermophila (strain</i>	1111	0,8
<i>Vitis vinifera</i>	980	0,7
<i>Paramecium tetraurelia</i>	911	0,7
<i>Acanthamoeba castellanii str. Neff</i>	743	0,5
<i>Coccomyxa subellipsoidea C-169</i>	727	0,5
<i>Lotus japonicus</i>	717	0,5
<i>Phaseolus vulgaris</i>	671	0,5
<i>Daphnia magna</i>	643	0,5
<i>Phaseolus angularis</i>	605	0,4
<i>Gibberella fujikuroi</i>	541	0,4
<i>Homo sapiens</i>	528	0,4
<i>Ichthyophthirius multifiliis (strain</i>	508	0,4
<i>Rosids</i>	479	0,3
<i>Vigna radiata var. radiata</i>	412	0,3
<i>Mesangiospermae</i>	405	0,3
<i>Pentapetalae</i>	373	0,3
<i>Pseudozyma</i>	344	0,2
<i>Fusarium oxysporum</i>	343	0,2
<i>Medicago</i>	342	0,2
<i>Rhizopus</i>	308	0,2
<i>Vigna angularis var. angularis</i>	305	0,2
<i>Morus notabilis</i>	282	0,2
<i>fabids</i>	269	0,2
<i>Catarrhini</i>	267	0,2
<i>Ustilaginaceae</i>	262	0,2
<i>Gossypium raimondii</i>	244	0,2
<i>Rhizopus microsporus</i>	242	0,2
<i>Eukaryota</i>	229	0,2
<i>Fusarium oxysporum f. sp.</i>	223	0,2
<i>Hypocreales</i>	211	0,2
<i>Bilateria</i>	205	0,1
<i>Vigna</i>	204	0,1

<i>Bodo saltans</i>	198	0,1
<i>Eucalyptus grandis</i>	192	0,1
<i>Mucorineae</i>	188	0,1
<i>Citrus sinensis</i>	178	0,1
<i>Boreoeutheria</i>	177	0,1
<i>Vicia faba</i>	168	0,1
<i>Simiiformes</i>	166	0,1
<i>Oxytricha trifallax</i>	166	0,1
<i>Gibberella moniliformis</i> (strain	162	0,1
<i>Theobroma cacao</i>	161	0,1
<i>Eutheria</i>	160	0,1
<i>Fabeae</i>	153	0,1
<i>Malus domestica</i>	152	0,1
<i>Solanum tuberosum</i>	138	0,1
<i>Stylonychia lemnae</i>	138	0,1
<i>eudicotyledons</i>	138	0,1
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	138	0,1
<i>Lens culinaris</i>	128	0,1
<i>Nectriaceae</i>	127	0,1
<i>Nelumbo nucifera</i>	126	0,1
<i>cellular organisms</i>	125	0,1
<i>Plasmodiophora brassicae</i>	124	0,1
<i>Hordeum vulgare var. distichum</i>	123	0,1
<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	120	0,1
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	117	0,1
<i>Jatropha curcas</i>	114	0,1
<i>Brassica napus</i>	112	0,1
<i>Candida antarctica</i>	109	0,1
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	108	0,1
<i>Erythranthe guttata</i>	107	0,1
<i>Spermatophyta</i>	105	0,1
<i>Fusarium oxysporum</i> (strain	103	0,1
<i>Musa acuminata subsp.</i>	103	0,1
<i>Macaca mulatta</i>	102	0,1
<i>Trifolium pratense</i>	102	0,1
<i>Populus</i>	99	0,1
<i>Tetrahymena thermophila</i>	97	0,1
<i>Ricinus communis</i>	95	0,1
<i>Citrus</i>	94	0,1
<i>Amniota</i>	92	0,1
<i>Tarenaya hassleriana</i>	90	0,1
<i>Hominoidea</i>	89	0,1
<i>Homininae</i>	87	0,1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	85	0,1
<i>Coffea canephora</i>	84	0,1
<i>Nectria haematococca</i> (strain 77-	83	0,1
<i>Genlisea aurea</i>	82	0,1

<i>Fusarium sambucinum</i> species	81	0,1
<i>Populus trichocarpa</i>	79	0,1
<i>Sordariomycetes</i>	79	0,1
<i>Euarchontoglires</i>	76	0,1
<i>Pseudozyma antarctica</i> (strain T-	74	0,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	74	0,1
<i>Fusarium fujikuroi</i> species	74	0,1
<i>Arundo donax</i>	72	0,1
<i>Triticum aestivum</i>	71	0,1
<i>Magnoliophyta</i>	70	0,1

Ek 2: KEGG KAAS sunucusu kullanılarak birleştirilmiş *L. culinaris* transkriptomunda tanımlanan yollar.

KEGG yolağı numarası	KEGG yolağı açıklaması	Transkript sayısı
map01100	Metabolic pathways	848
map01110	Biosynthesis of secondary metabolites	389
map01130	Biosynthesis of antibiotics	213
map01120	Microbial metabolism in diverse	168
map03010	Ribosome	127
map01200	Carbon metabolism	107
map01230	Biosynthesis of amino acids	107
map00190	Oxidative phosphorylation	104
map03040	Spliceosome	83
map04141	Protein processing in endoplasmic	81
map05016	Huntington's disease	80
map00230	Purine metabolism	78
map03013	RNA transport	76
map05169	Epstein-Barr virus infection	75
map05012	Parkinson's disease	73
map04144	Endocytosis	70
map05010	Alzheimer's disease	69
map05166	HTLV-I infection	68
map00240	Pyrimidine metabolism	63
map04120	Ubiquitin mediated proteolysis	63
map04932	Non-alcoholic fatty liver disease	60
map04110	Cell cycle	58
map05200	Pathways in cancer	56
map05165	Human papillomavirus infection	55
map05203	Viral carcinogenesis	53
map04111	Cell cycle - yeast	49
map05168	Herpes simplex infection	49
map03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	47
map04142	Lysosome	45
map05152	Tuberculosis	44
map03015	mRNA surveillance pathway	43

map04016	MAPK signaling pathway - plant	42
map04151	PI3K-Akt signaling pathway	42
map04723	Retrograde endocannabinoid signaling	41
map04114	Oocyte meiosis	40
map04145	Phagosome	40
map04810	Regulation of actin cytoskeleton	40
map00500	Starch and sucrose metabolism	39
map03018	RNA degradation	39
map03050	Proteasome	39
map04075	Plant hormone signal transduction	39
map04138	Autophagy – yeast	39
map00270	Cysteine and methionine metabolism	38
map00620	Pyruvate metabolism	38
map04113	Meiosis – yeast	38
map04140	Autophagy – animal	38
map04146	Peroxisome	38
map05167	Kaposi's sarcoma-associated	38
map04010	MAPK signaling pathway	37
map05164	Influenza A	37
map05205	Proteoglycans in cancer	37
map00520	Amino sugar and nucleotide sugar	36
map04217	Necroptosis	36
map00260	Glycine, serine and threonine	35
map00564	Glycerophospholipid metabolism	35
map04150	mTOR signaling pathway	35
map04914	Progesterone-mediated oocyte	35
map00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	34
map01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	34
map04062	Chemokine signaling pathway	34
map04626	Plant-pathogen interaction	34
map00195	Photosynthesis	33
map00250	Alanine, aspartate and glutamate	33
map04621	NOD-like receptor signaling pathway	33
map01212	Fatty acid metabolism	32
map04152	AMPK signaling pathway	32
map04380	Osteoclast differentiation	32
map04530	Tight junction	32
map00330	Arginine and proline metabolism	31
map00630	Glyoxylate and dicarboxylate	31
map03420	Nucleotide excision repair	31
map04210	Apoptosis	31
map04218	Cellular senescence	31
map05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	31
map04014	Ras signaling pathway	30
map04071	Sphingolipid signaling pathway	30
map04510	Focal adhesion	30
map04015	Rap1 signaling pathway	29

map00860	Porphyrin and chlorophyll metabolism	28
map04024	cAMP signaling pathway	28
map04068	FoxO signaling pathway	28
map04666	Fc gamma R-mediated phagocytosis	28
map04910	Insulin signaling pathway	28
map04919	Thyroid hormone signaling pathway	28
map00710	Carbon fixation in photosynthetic	27
map04212	Longevity regulating pathway - worm	27
map05161	Hepatitis B	27
map05162	Measles	27
map05206	MicroRNAs in cancer	27
map00020	Citrate cycle	26
map00051	Fructose and mannose metabolism	26
map00562	Inositol phosphate metabolism	26
map03030	DNA replication	26
map04066	HIF-1 signaling pathway	26
map04371	Apelin signaling pathway	26
map04650	Natural killer cell mediated	26
map04921	Oxytocin signaling pathway	26
map05160	Hepatitis C	26
map00640	Propanoate metabolism	25
map05120	Epithelial cell signaling in	25
map00510	N-Glycan biosynthesis	24
map00561	Glycerolipid metabolism	24
map03440	Homologous recombination	24
map04070	Phosphatidylinositol signaling system	24
map04310	Wnt signaling pathway	24
map04611	Platelet activation	24
map04660	T cell receptor signaling pathway	24
map04670	Leukocyte transendothelial migration	24
map04922	Glucagon signaling pathway	24
map00280	Valine, leucine and isoleucine	23
map00400	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan	23
map00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	23
map03020	RNA polymerase	23
map04022	cGMP-PKG signaling pathway	23
map04721	Synaptic vesicle cycle	23
map04728	Dopaminergic synapse	23
map05202	Transcriptional misregulation in cancer	23
map00100	Steroid biosynthesis	22
map00220	Arginine biosynthesis	22
map00380	Tryptophan metabolism	22
map03060	Protein export	22
map03410	Base excision repair	22
map04260	Cardiac muscle contraction	22
map04931	Insulin resistance	22
map05100	Bacterial invasion of epithelial cells	22

map00030	Pentose phosphate pathway	21
map00052	Galactose metabolism	21
map00480	Glutathione metabolism	21
map00900	Terpenoid backbone biosynthesis	21
map03430	Mismatch repair	21
map03460	Fanconi anemia pathway	21
map04261	Adrenergic signaling in	21
map04612	Antigen processing and presentation	21
map04926	Relaxin signaling pathway	21
map05034	Alcoholism	21
map05132	Salmonella infection	21
map05323	Rheumatoid arthritis	21
map00410	beta-Alanine metabolism	20
map00940	Phenylpropanoid biosynthesis	20
map04072	Phospholipase D signaling pathway	20
map04360	Axon guidance	20
map04659	Th17 cell differentiation	20
map04712	Circadian rhythm - plant	20
map04722	Neurotrophin signaling pathway	20
map04915	Estrogen signaling pathway	20
map05110	Vibrio cholerae infection	20
map05142	Chagas disease	20
map00350	Tyrosine metabolism	19
map00650	Butanoate metabolism	19
map00680	Methane metabolism	19
map00720	Carbon fixation pathways in	19
map04011	MAPK signaling pathway - yeast	19
map05131	Shigellosis	19
map05211	Renal cell carcinoma	19
map00310	Lysine degradation	18
map00920	Sulfur metabolism	18
map03022	Basal transcription factors	18
map04013	MAPK signaling pathway - fly	18
map04213	Longevity regulating pathway -	18
map04520	Adherens junction	18
map04623	Cytosolic DNA-sensing pathway	18
map04662	B cell receptor signaling pathway	18
map05210	Colorectal cancer	18
map05231	Choline metabolism in cancer	18
map00071	Fatty acid degradation	17
map00770	Pantothenate and CoA biosynthesis	17
map01522	Endocrine resistance	17
map01524	Platinum drug resistance	17
map02010	ABC transporters	17
map04390	Hippo signaling pathway	17
map05134	Legionellosis	17
map05215	Prostate cancer	17

map05224	Breast cancer	17
map00360	Phenylalanine metabolism	16
map00513	Various types of N-glycan biosynthesis	16
map04020	Calcium signaling pathway	16
map04211	Longevity regulating pathway	16
map04270	Vascular smooth muscle contraction	16
map04657	IL-17 signaling pathway	16
map04658	Th1 and Th2 cell differentiation	16
map04668	TNF signaling pathway	16
map04725	Cholinergic synapse	16
map04727	GABAergic synapse	16
map05145	Toxoplasmosis	16
map05230	Central carbon metabolism in cancer	16
map00130	Ubiquinone and other terpenoid-	15
map00563	Glycosylphosphatidylinositol	15
map00600	Sphingolipid metabolism	15
map02024	Quorum sensing	15
map04012	ErbB signaling pathway	15
map04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	15
map04115	p53 signaling pathway	15
map04724	Glutamatergic synapse	15
map04912	GnRH signaling pathway	15
map05130	Pathogenic Escherichia coli infection	15
map05212	Pancreatic cancer	15
map00061	Fatty acid biosynthesis	14
map00592	alpha-Linolenic acid metabolism	14
map00760	Nicotinate and nicotinamide	14
map00790	Folate biosynthesis	14
map01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor	14
map02020	Two-component system	14
map04064	NF-kappa B signaling pathway	14
map04130	SNARE interactions in vesicular	14
map04136	Autophagy - other	14
map04137	Mitophagy - animal	14
map04214	Apoptosis - fly	14
map04540	Gap junction	14
map04620	Toll-like receptor signaling pathway	14
map04630	Jak-STAT signaling pathway	14
map04664	Fc epsilon RI signaling pathway	14
map04933	AGE-RAGE signaling pathway in	14
map04972	Pancreatic secretion	14
map05133	Pertussis	14
map05140	Leishmaniasis	14
map05146	Amoebiasis	14
map05214	Glioma	14
map05221	Acute myeloid leukemia	14
map00040	Pentose and glucuronate	13

map00300	Lysine biosynthesis	13
map00906	Carotenoid biosynthesis	13
map00983	Drug metabolism - other enzymes	13
map01523	Antifolate resistance	13
map04139	Mitophagy – yeast	13
map04370	VEGF signaling pathway	13
map04713	Circadian entrainment	13
map04720	Long-term potentiation	13
map04726	Serotonergic synapse	13
map04916	Melanogenesis	13
map04917	Prolactin signaling pathway	13
map04976	Bile secretion	13
map05213	Endometrial cancer	13
map05220	Chronic myeloid leukemia	13
map05222	Small cell lung cancer	13
map00460	Cyanoamino acid metabolism	12
map01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	12
map03320	PPAR signaling pathway	12
map04391	Hippo signaling pathway - fly	12
map04640	Hematopoietic cell lineage	12
map04962	Vasopressin-regulated water	12
map05223	Non-small cell lung cancer	12
map00053	Ascorbate and aldarate metabolism	11
map00196	Photosynthesis - antenna proteins	11
map00340	Histidine metabolism	11
map00910	Nitrogen metabolism	11
map04730	Long-term depression	11
map04750	Inflammatory mediator regulation of	11
map04918	Thyroid hormone synthesis	11
map04925	Aldosterone synthesis and secretion	11
map04966	Collecting duct acid secretion	11
map05014	Amyotrophic lateral sclerosis	11
map05032	Morphine addiction	11
map05340	Primary immunodeficiency	11
map00062	Fatty acid elongation	10
map00073	Cutin, suberine and wax biosynthesis	10
map00590	Arachidonic acid metabolism	10
map00670	One carbon pool by folate	10
map00730	Thiamine metabolism	10
map00740	Riboflavin metabolism	10
map00960	Tropane, piperidine and pyridine	10
map04216	Ferroptosis	10
map04340	Hedgehog signaling pathway	10
map04350	TGF-beta signaling pathway	10
map04550	Signaling pathways regulating	10
map04740	Olfactory transduction	10
map04920	Adipocytokine signaling pathway	10

map04961	Endocrine and other factor-regulated	10
map04970	Salivary secretion	10
map05031	Amphetamine addiction	10
map05322	Systemic lupus erythematosus	10
map05416	Viral myocarditis	10
map00290	Valine, leucine and isoleucine	9
map00450	Selenocompound metabolism	9
map00565	Ether lipid metabolism	9
map00941	Flavonoid biosynthesis	9
map04341	Hedgehog signaling pathway - fly	9
map04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	9
map04911	Insulin secretion	9
map04923	Regulation of lipolysis in adipocytes	9
map04924	Renin secretion	9
map04971	Gastric acid secretion	9
map04978	Mineral absorption	9
map05218	Melanoma	9
map00511	Other glycan degradation	8
map00514	Other types of O-glycan biosynthesis	8
map00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	8
map04122	Sulfur relay system	8
map04514	Cell adhesion molecules	8
map04973	Carbohydrate digestion and absorption	8
map04974	Protein digestion and absorption	8
map05144	Malaria	8
map05216	Thyroid cancer	8
map00540	Lipopolysaccharide biosynthesis	7
map00660	C5-Branched dibasic acid metabolism	7
map00780	Biotin metabolism	7
map00904	Diterpenoid biosynthesis	7
map00905	Brassinosteroid biosynthesis	7
map00909	Sesquiterpenoid and triterpenoid	7
map00980	Metabolism of xenobiotics by	7
map00982	Drug metabolism - cytochrome P450	7
map03070	Bacterial secretion system	7
map04330	Notch signaling pathway	7
map04930	Type II diabetes mellitus	7
map05020	Prion diseases	7
map05204	Chemical carcinogenesis	7
map05219	Bladder cancer	7
map00261	Monobactam biosynthesis	6
map00430	Taurine and hypotaurine metabolism	6
map00627	Aminobenzoate degradation	6
map00750	Vitamin B6 metabolism	6
map01220	Degradation of aromatic compounds	6
map04624	Toll and Imd signaling pathway	6
map04710	Circadian rhythm	6

map04940	Type I diabetes mellitus	6
map04960	Aldosterone-regulated sodium	6
map04964	Proximal tubule bicarbonate	6
map05410	Hypertrophic cardiomyopathy	6
map05414	Dilated cardiomyopathy	6
map00072	Synthesis and degradation of ketone	5
map00440	Phosphonate and phosphinate	5
map00625	Chloroalkane and chloroalkene	5
map00966	Glucosinolate biosynthesis	5
map02026	Biofilm formation - Escherichia coli	5
map04320	Dorso-ventral axis formation	5
map04392	Hippo signaling pathway - multiple	5
map04610	Complement and coagulation cascades	5
map04614	Renin-angiotensin system	5
map04975	Fat digestion and absorption	5
map05030	Cocaine addiction	5
map05143	African trypanosomiasis	5
map05150	Staphylococcus aureus infection	5
map05321	Inflammatory bowel disease	5
map00362	Benzoate degradation	4
map00521	Streptomycin biosynthesis	4
map00591	Linoleic acid metabolism	4
map00643	Styrene degradation	4
map00830	Retinol metabolism	4
map00902	Monoterpenoid biosynthesis	4
map00908	Zeatin biosynthesis	4
map00930	Caprolactam degradation	4
map04112	Cell cycle - Caulobacter	4
map04672	Intestinal immune network for IgA	4
map04745	Phototransduction – fly	4
map05217	Basal cell carcinoma	4
map05320	Autoimmune thyroid disease	4
map05330	Allograft rejection	4
map05332	Graft-versus-host disease	4
map05412	Arrhythmogenic right ventricular	4
map00333	Prodigiosin biosynthesis	3
map00401	Novobiocin biosynthesis	3
map00531	Glycosaminoglycan degradation	3
map00604	Glycosphingolipid biosynthesis -	3
map00626	Naphthalene degradation	3
map02025	Biofilm formation - Pseudomonas	3
map03450	Non-homologous end-joining	3
map04080	Neuroactive ligand-receptor	3
map04215	Apoptosis - multiple species	3
map04512	ECM-receptor interaction	3
map04711	Circadian rhythm – fly	3
map04742	Taste transduction	3

map04913	Ovarian steroidogenesis	3
map04950	Maturity onset diabetes of the young	3
map00120	Primary bile acid biosynthesis	2
map00140	Steroid hormone biosynthesis	2
map00232	Caffeine metabolism	2
map00281	Geraniol degradation	2
map00332	Carbapenem biosynthesis	2
map00405	Phenazine biosynthesis	2
map00603	Glycosphingolipid biosynthesis - globo	2
map00785	Lipoic acid metabolism	2
map00901	Indole alkaloid biosynthesis	2
map00903	Limonene and pinene degradation	2
map00942	Anthocyanin biosynthesis	2
map00944	Flavone and flavonol biosynthesis	2
map00945	Stilbenoid, diarylheptanoid and	2
map00981	Insect hormone biosynthesis	2
map01503	Cationic antimicrobial peptide	2
map04744	Phototransduction	2
map04977	Vitamin digestion and absorption	2
map05111	Biofilm formation - Vibrio cholerae	2
map05310	Asthma	2
map00254	Aflatoxin biosynthesis	1
map00311	Penicillin and cephalosporin	1
map00361	Chlorocyclohexane and chlorobenzene	1
map00364	Fluorobenzoate degradation	1
map00471	D-Glutamine and D-glutamate	1
map00512	Mucin type O-glycan biosynthesis	1
map00523	Polyketide sugar unit biosynthesis	1
map00524	Neomycin, kanamycin and gentamicin	1
map00525	Acarbose and validamycin	1
map00533	Glycosaminoglycan biosynthesis -	1
map00623	Toluene degradation	1
map00633	Nitrotoluene degradation	1
map00965	Betalain biosynthesis	1
map01051	Biosynthesis of ansamycins	1
map01055	Biosynthesis of vancomycin group	1
map01062	Biosynthesis of terpenoids and steroids	1
map01501	beta-Lactam resistance	1
map05033	Nicotine addiction	1

Ek 3: *L. culinaris*'in yaprak ve kök dokularında önemli ölçüde zenginleştirilmiş (Benjamin correction, $p < 0.05$) gen ontolojisi (GO) biyolojik süreçleri. Farklı olarak ifade edilen düzenlenmiş GO terimleri tabloda artan (upregulation) veya azalan (downregulation) ekspresyon seviyesi olarak gösterilmiştir.

GO ID	GO Terimi	Sayım	Yüzdesi (%)	Fold Enrichment	Benjamin correction (p value)	Örnek ID	Regulasyon
GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	32	1,6913319	3,388095238	3,23E-06	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0006468	protein phosphorylation	105	5,5496829	1,661188937	1,66E-04	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0015979	photosynthesis	29	1,5327696	2,892463552	2,37E-04	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0009773	photosynthetic electron transport in photosystem I	9	0,4756871	7,742327009	0,001788958	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0042742	defense response to bacterium	42	2,2198732	2,094542572	0,002304031	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0006810	transport	49	2,589852	1,932500597	0,002926119	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0009416	response to light stimulus	31	1,6384778	2,269618319	0,006507121	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0006952	defense response	75	3,9640592	1,568860589	0,016480994	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	11	0,5813953	4,325871599	0,018485758	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0010025	wax biosynthetic process	9	0,4756871	5,385966615	0,017083229	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0071555	cell wall organization	42	2,2198732	1,841062898	0,020598901	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:0080167	response to karrikin	22	1,1627907	2,365711031	0,035715394	1. gün yaprak	Down-regulated
GO:00063GO:0000051	transcription, DNA-templated	159	13,613014	2,062917656	2,14E-16	1. gün yaprak	Up-regulated

GO:0006355	regulation of transcription	153	13,099315	1,76679813	6,74E-10	1. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009738	abscisic acid-activated signaling pathway	28	2,3972603	3,513580247	9,25E-06	1. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009737	response to abscisic acid	42	3,5958904	2,608432036	1,02E-05	1. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009908	flower development	27	2,3116438	3,270685997	4,41E-05	1. gün yaprak	Up-regulated
GO:0016567	protein ubiquitination	44	3,7671233	2,361099508	5,15E-05	1. gün yaprak	Up-regulated
GO:0045893	positive regulation of transcription	25	2,140411	2,819075659	0,001348736	1. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009414	response to water deprivation	28	2,3972603	2,45572813	0,003863703	1. gün yaprak	Up-regulated
GO:0045892	negative regulation of transcription	17	1,4554795	3,104349285	0,012683629	1. gün yaprak	Up-regulated
GO:0006468	protein phosphorylation	171	5,6791764	1,809860799	1,27E-11	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0009658	chloroplast organization	35	1,1624045	2,57825784	2,51E-04	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0009773	photosynthetic electron transport in photosystem I	11	0,3653271	6,330543803	5,63E-04	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0042742	defense response to bacterium	55	1,8266357	1,834940233	0,005423629	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0000413	protein peptidyl-prolyl isomerization	17	0,5645965	3,330576237	0,006880467	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0009834	plant-type secondary cell wall biogenesis	16	0,5313849	3,348386805	0,010168792	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0010942	positive regulation of cell death	7	0,2324809	8,057055749	0,009372206	4. gün yaprak	Down-regulated

GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	31	1,0295583	2,195769039	0,010358489	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0048481	plant ovule development	15	0,4981734	3,069354571	0,037115199	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0007623	circadian rhythm	24	0,7970774	2,278283805	0,039191142	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0009626	plant-type hypersensitive response	20	0,6642312	2,488665868	0,041182901	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0071482	cellular response to light stimulus	8	0,2656925	5,261750693	0,043331711	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0006810	transport	60	1,9926935	1,583048203	0,049782035	4. gün yaprak	Down-regulated
GO:0016567	protein ubiquitination	60	4,2342978	2,67481203	1,06E-08	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009414	response to water deprivation	38	2,6817219	2,768766001	2,16E-05	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009737	response to abscisic acid	45	3,1757234	2,321791153	1,25E-04	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0006351	transcription, DNA-templated	141	9,9505999	1,519792456	9,75E-05	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009873	ethylene-activated signaling pathway	26	1,8348624	2,952753392	5,31E-04	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	30	2,1171489	2,520070838	0,001616438	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009651	response to salt stress	47	3,3168666	1,97405549	0,00239953	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	144	10,162315	1,381460258	0,006026474	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009738	abscisic acid-activated signaling pathway	24	1,6937191	2,501978022	0,011352461	4. gün yaprak	Up-regulated

GO:0042742	defense response to bacterium	30	2,1171489	2,209627329	0,011180144	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009409	response to cold	30	2,1171489	2,039655996	0,039158404	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009908	flower development	23	1,6231475	2,314639321	0,037018435	4. gün yaprak	Up-regulated
GO:0009834	plant-type secondary cell wall biogenesis	11	1,7432647	10,95912322	2,44E-05	1. gün kök	Down-regulated
GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	16	2,5356577	5,395260664	8,09E-05	1. gün kök	Down-regulated
GO:0006468	protein phosphorylation	42	6,6561014	2,116244484	0,001724466	1. gün kök	Down-regulated
GO:0042744	hydrogen peroxide catabolic process	11	1,7432647	5,417993503	0,005011957	1. gün kök	Down-regulated
GO:0071555	cell wall organization	21	3,3280507	2,93173997	0,004331699	1. gün kök	Down-regulated
GO:0010200	response to chitin	13	2,0602219	4,284769982	0,005158745	1. gün kök	Down-regulated
GO:0015706	nitrate transport	6	0,9508716	13,15094787	0,005817234	1. gün kök	Down-regulated
GO:0001944	vasculature development	6	0,9508716	10,11611374	0,01917035	1. gün kök	Down-regulated
GO:0009908	flower development	33	3,0754893	4,613914292	1,01E-09	1. gün kök	Up-regulated
GO:0009408	response to heat	27	2,5163094	4,76596374	3,87E-08	1. gün kök	Up-regulated
GO:0006351	transcription, DNA-templated	113	10,531221	1,692168894	7,95E-06	1. gün kök	Up-regulated
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	29	2,7027027	3,384461548	9,59E-06	1. gün kök	Up-regulated

GO:0051028	mRNA transport	12	1,11835 97	8,6900763 36	1,38E-05	1. gün kök	Up- regulated
GO:0009737	response to abscisic acid	36	3,35507 92	2,5805556 63	1,01E-04	1. gün kök	Up- regulated
GO:0009733	response to auxin	29	2,70270 27	2,8242748 09	2,32E-04	1. gün kök	Up- regulated
GO:0009414	response to water deprivation	28	2,60950 61	2,8343976 58	2,96E-04	1. gün kök	Up- regulated
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	114	10,6244 18	1,5194305 25	5,15E-04	1. gün kök	Up- regulated
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated	18	1,67753 96	3,7938019 82	5,24E-04	1. gün kök	Up- regulated
GO:0009409	response to cold	27	2,51630 94	2,5503484 9	0,00223226 2	1. gün kök	Up- regulated
GO:0016567	protein ubiquitination	35	3,26188 26	2,1677547 88	0,00312544 1	1. gün kök	Up- regulated
GO:0006974	cellular response to DNA damage stimulus	9	0,83876 98	5,9112728 56	0,00886338 5	1. gün kök	Up- regulated
GO:0010072	primary shoot apical meristem specification	6	0,55917 99	11,297099 24	0,00882819 4	1. gün kök	Up- regulated
GO:0009965	leaf morphogenesis	10	0,93196 64	4,8694393 26	0,01248818 9	1. gün kök	Up- regulated
GO:0016569	covalent chromatin modification	12	1,11835 97	3,8512838 31	0,01694562 3	1. gün kök	Up- regulated
GO:0008380	RNA splicing	15	1,39794 97	3,0922716 89	0,02125858 9	1. gün kök	Up- regulated
GO:0000973	posttranscriptional tethering of RNA polymerase II gene DNA at nuclear	4	0,37278 66	22,594198 47	0,02338109	1. gün kök	Up- regulated
GO:0009651	response to salt stress	33	3,07548 93	1,9256419 15	0,02809124 2	1. gün kök	Up- regulated

GO:0061077	chaperone-mediated protein folding	7	0,6523765	6,178101145	0,039448621	1. gün kök	Up-regulated
GO:0010228	vegetative to reproductive phase transition of meristem	12	1,1183597	3,322676246	0,045412921	1. gün kök	Up-regulated
GO:0015031	protein transport	25	2,3299161	2,082798532	0,047042717	1. gün kök	Up-regulated
GO:0006406	mRNA export from nucleus	6	0,5591799	7,367673415	0,046725433	1. gün kök	Up-regulated
GO:0006351	transcription, DNA-templated	242	7,4096754	1,623583232	8,89E-12	4. gün kök	Down-regulated
GO:0010200	response to chitin	42	1,2859767	3,995752034	6,74E-12	4. gün kök	Down-regulated
GO:0006468	protein phosphorylation	136	4,1641151	1,977973804	4,99E-12	4. gün kök	Down-regulated
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	253	7,7464789	1,510742491	1,56E-09	4. gün kök	Down-regulated
GO:0042742	defense response to bacterium	54	1,6533987	2,475628978	2,96E-07	4. gün kök	Down-regulated
GO:0009611	response to wounding	43	1,3165952	2,734111735	7,27E-07	4. gün kök	Down-regulated
GO:0009873	ethylene-activated signaling pathway	40	1,2247397	2,827534028	8,78E-07	4. gün kök	Down-regulated
GO:0009816	defense response to bacterium, incompatible interaction	17	0,5205144	4,888742072	1,75E-05	4. gün kök	Down-regulated
GO:0006952	defense response	90	2,7556644	1,730682872	5,25E-05	4. gün kök	Down-regulated
GO:0048544	recognition of pollen	15	0,4592774	4,866621067	1,06E-04	4. gün kök	Down-regulated
GO:0016567	protein ubiquitination	63	1,9289651	1,748141515	0,002171615	4. gün kök	Down-regulated

GO:0009651	response to salt stress	64	1,9595836	1,673152367	0,006382121	4. gün kök	Down-regulated
GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	25	0,7654623	2,433310534	0,007616818	4. gün kök	Down-regulated
GO:0009620	response to fungus	17	0,5205144	2,987564599	0,011856932	4. gün kök	Down-regulated
GO:0009414	response to water deprivation	41	1,2553582	1,859432996	0,015169299	4. gün kök	Down-regulated
GO:0007623	circadian rhythm	20	0,6123699	2,608910263	0,015092582	4. gün kök	Down-regulated
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated	24	0,7348438	2,266247422	0,024776485	4. gün kök	Down-regulated
GO:0046777	protein autophosphorylation	24	0,7348438	2,249460404	0,026120435	4. gün kök	Down-regulated
GO:0008219	cell death	12	0,3674219	3,450876757	0,033286662	4. gün kök	Down-regulated
GO:0009886	post-embryonic morphogenesis	6	0,183711	7,591928865	0,03598005	4. gün kök	Down-regulated
GO:0009626	plant-type hypersensitive response	16	0,4898959	2,735830221	0,036068811	4. gün kök	Down-regulated
GO:0018298	protein-chromophore linkage	12	0,3674219	3,374190606	0,035331163	4. gün kök	Down-regulated
GO:0051301	cell division	67	2,0891799	2,908170065	1,53E-12	4. gün kök	Up-regulated
GO:0071555	cell wall organization	77	2,4009978	2,320398456	2,27E-09	4. gün kök	Up-regulated
GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	42	1,3096352	3,057084399	3,31E-08	4. gün kök	Up-regulated
GO:0007067	mitotic nuclear division	32	0,9978173	3,604725368	6,47E-08	4. gün kök	Up-regulated

GO:0009834	plant-type secondary cell wall biogenesis	22	0,68599 94	4,7312020 46	1,78E-07	4. gün kök	Up-regulated
GO:0009826	unidimensional cell growth	34	1,06018 09	2,8221205 19	1,28E-05	4. gün kök	Up-regulated
GO:0007049	cell cycle	34	1,06018 09	2,6370634 35	6,42E-05	4. gün kök	Up-regulated
GO:0000911	cytokinesis by cell plate formation	17	0,53009 04	4,1246376 81	1,71E-04	4. gün kök	Up-regulated
GO:0016567	protein ubiquitination	82	2,55690 68	1,7015726 66	3,51E-04	4. gün kök	Up-regulated
GO:0006281	DNA repair	43	1,34081 7	2,0973369 89	7,86E-04	4. gün kök	Up-regulated
GO:0006260	DNA replication	25	0,77954 47	2,7830600 27	7,53E-04	4. gün kök	Up-regulated
GO:0007131	reciprocal meiotic recombination	16	0,49890 86	3,7849616 37	9,54E-04	4. gün kök	Up-regulated
GO:0009825	multidimensional cell growth	11	0,34299 97	5,2043222 51	0,00152540 5	4. gün kök	Up-regulated
GO:0045492	xylan biosynthetic process	12	0,37418 15	4,2055129 3	0,00569477 5	4. gün kök	Up-regulated
GO:0006298	mismatch repair	10	0,31181 79	4,9802126 8	0,00633759 3	4. gün kök	Up-regulated
GO:0045489	pectin biosynthetic process	13	0,40536 33	3,8441016 62	0,00598465 4	4. gün kök	Up-regulated
GO:0010315	auxin efflux	10	0,31181 79	4,7312020 46	0,00920203 5	4. gün kök	Up-regulated
GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	13	0,40536 33	3,5146072 34	0,01448293 9	4. gün kök	Up-regulated
GO:0006468	protein phosphorylation	126	3,92890 55	1,3704171 44	0,01753134 8	4. gün kök	Up-regulated

GO:0048364	root development	33	1,02899 91	1,9763249 05	0,01898074 4	4. gün kök	Up- regulated
GO:0009793	embryo development ending in seed dormancy	74	2,30745 24	1,5255292	0,01955208 5	4. gün kök	Up- regulated
GO:0008356	asymmetric cell division	8	0,24945 43	5,4070880 53	0,01974980 5	4. gün kök	Up- regulated
GO:0010078	maintenance of root meristem identity	8	0,24945 43	5,4070880 53	0,01974980 5	4. gün kök	Up- regulated
GO:0010540	basipetal auxin transport	12	0,37418 15	3,5484015 35	0,02067472 5	4. gün kök	Up- regulated
GO:0010087	phloem or xylem histogenesis	11	0,34299 97	3,7173730 36	0,02622486 7	4. gün kök	Up- regulated
GO:0009958	positive gravitropism	12	0,37418 15	3,4408742 15	0,02576373 7	4. gün kök	Up- regulated
GO:0043570	maintenance of DNA repeat elements	5	0,15590 89	9,4624040 92	0,0370158	4. gün kök	Up- regulated
GO:0043481	anthocyanin accumulation in tissues in response to UV light	5	0,15590 89	9,4624040 92	0,0370158	4. gün kök	Up- regulated
GO:0009934	regulation of meristem structural organization	9	0,28063 61	4,2580818 41	0,03751587 3	4. gün kök	Up- regulated
GO:0007015	actin filament organization	9	0,28063 61	4,2580818 41	0,03751587 3	4. gün kök	Up- regulated
GO:0006270	DNA replication initiation	10	0,31181 79	3,7849616 37	0,04098500 7	4. gün kök	Up- regulated
GO:0009965	leaf morphogenesis	16	0,49890 86	2,6103183 7	0,04569794 6	4. gün kök	Up- regulated
GO:0016126	Sterol biosynthetic process	13	0,40536 33	3,0002744 68	0,04445294 1	4. gün kök	Up- regulated