



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**AHP GENLERİNİN CRISPR-CAS9 SİSTEMİ
KULLANILARAK DOMATES BİTKİSİNDE SUSTURULMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Abdullah AYDIN

Danışman
Doç. Dr. Musa KAVAS

SAMSUN
2023

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**AHP GENLERİNİN CRISPR-CAS9 SİSTEMİ
KULLANILARAK DOMATES BİTKİSİNDE SUSTURULMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Abdullah AYDIN

Danışman

Doç. Dr. Musa KAVAS

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.ZRT.1904.22.006 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

04/01/2023
Abdullah AYDIN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : AHP GENLERİNİN CRISPR-CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK SUSTURULMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 05/01/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 9

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

04/01/2023
Doç. Dr. Musa KAVAS

ÖZET

AHP GENLERİNİN CRISPR-CAS9 SİSTEMİ KULLANILARAK DOMATES BİTKİSİNDE SUSTURULMASI

Abdullah AYDIN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Ocak/2023

Danışman: Doç. Dr. Musa KAVAS

Domates (*Solanum lycopersicum*) insan sağlığı için önemli bir besleyicidir. Dünya genelinde yaygın olarak üretimi olan Domates için önemli biyotik ve abiyotik stres faktörleri bulunmaktadır. Bu stres faktörleri verimi etkilemekte, hatta bazı durumlarda bitkinin ölümüne yol açmaktadır. Artan küresel ısınma ve iklim değişikliğiyle beraber, bu stres faktörlerinden biri olan kuraklık şartları da tarımsal üretim açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu çalışmada, iklim değişikliği sonucu artması beklenen kuraklık koşullarına dayanıklı domates bitkisi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Abiyotik stres koşullarına karşı yanıt mekanizmasının önemli bir düzenleyici olan ABA, bitkilerin bu koşullara adaptasyonunda pozitif düzenleyicidir. Bu amaçla, daha önce *Arabidopsis thaliana*'da susturulması sonucu kuraklığa tolerans sağladığı bilinen AHP genlerinin domatesteki homoloğu olan *Solc01g080540* (AHP1) ve *Solyc06g084410* (AHP2) genleri seçilmiş olup, bu genler domates bitkisinde, CRISPR/Cas9 genom düzenleme tekniği kullanılarak susturulmuştur. AHP genleri sitokinin sinyalizasyonunun pozitif düzenleyicileri olarak rol almaktadır. Bu genlerin susturulması, stres koşullarına yanıtta önemli rol alan ABA ile sitokinin arasındaki ters ilişki sonucu ABA sinyalizasyonunu artıracığından kuraklığa direnç beklenmektedir. Genom düzenleme işleminin ardından elde edilen tohumlar kullanılarak, kuraklık ve çimlendirme uygulaması yapılmış ve sonuçlar genom düzenlenmemiş bitkiler ile kıyaslanmıştır. Bunun sonucunda ise, *ahp* bitkilerin genom düzenlenmemiş bitkilere kıyasla kuraklık koşullarında gelişimini daha iyi sürdürebildiği, hatta genomu düzenlenmemiş bitkileri yaşamını devam ettiremediği koşullarda yaşadığı görülmüştür. Ancak, kuraklık bulunmayan koşullarda ise genomu düzenlenmemiş bitkilere kıyasla gelişimsel olarak geride kalmışlardır. Kuraklık oluşturulmamış koşullar altında genomu düzenlenmemiş tohumlardan geç çimlenen *ahp* tohumları, kuraklık koşullarında, genomu düzenlenmemiş tohumlar çimlenemezken, *ahp* tohumları çimlenebilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma ile AHP genlerinin domates bitkisindeki fonksiyonları görülmüş olup, kuraklığa dirençli çeşit ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Sözcükler: AHP, CRISPR/Cas9, Abiyotik Stres, Kuraklık, Genom Düzenleme

ABSTRACT

SILENCING AHP GENES IN TOMATO (*Solanum lycopersicum*) USING CRISPR-CAS9

Abdullah AYDIN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Agricultural Biotechnology

Master, January/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Musa KAVAS

Tomato is an important nutrient for human health. There are many abiotic and biotic stress factors for tomato which has massive production all over the world. These stress factors effect yield, even in some cases cause death of plant. Drought stress which is one of these stress factors is becoming more important problem for agricultural production with rising global warming and climate change. The aim of this study to develop tolerant tomato against climate change which end up with drought conditions. The ABA which is an important member of abiotic stress response mechanisms, is an positive regulator for plant to adaptation these conditions. With this purpose, the genes, *Solyc01g080540* (*AHP1*) and *Solyc06g084410* (*AHP2*), are chosen whichs positive effects of repression of homologs are already proven in *Arabidopsis thaliana*. These genes knocked-out by using CRISPR/Cas9 genome editing technology in tomato. *AHP* genes act as positive regulator of sitokinin signaling. Because of the antagonistic relationship between cytokinin and ABA which is the important member of response to stress conditions, silencing these genes end up with increased ABA signaling and drought tolerance. Germination and drought stress assays have done after seed harvesting from genome edited plants. The results are compared with Crocker variety. The results demonstrated that *ahp* plants showed enhanced drought tolerance compared to Crocker. Moreover, it has seen that while Crocker plants are dying, *ahp* plants kept living. However, development of *ahp* plants decreased under no stress conditions. The *ahp* seeds which showed late germination under normal conditions, are germinated under stress conditions while Crocker seeds could not germinated. As a result, the funtions of *AHP* genes in tomato have described, and drought tolerant variety is developed.

Keywords: AHP, CRISPR/Cas9, Abiotic Stress, Drought, Genome Editing

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans boyunca, bilgi birikimini ve vaktini benden esirgemeyip, her daim güvenen hocam Doç. Dr. Musa KAVAS’a, gelişimin önünü kapatmadığı ve ödenmesi çok zor emekleri için, ayrıca eğitim hayatım boyunca üzerimde emeği geçen bütün hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte tanıştığım ve yardım isteklerini asla geri çevirmeyen Araştırma Görevlisi Bayram Ali Yerlikaya’ya ve yine tezimde bana yardımcı olan Seher YERLİKAYA, Nisanur YILMAZ, Sibel BAHADIR ve diğer ekip arkadaşlarıma, bir diğer arkadaşım Mehmet Han BAŞTÜRK’e teşekkür ederim.

Son olarak, benden ümitlerini kesmeyen ve her zaman destek olan, babam Bedri AYDIN, annem Emine AYDIN ve kardeşim Kübra AYDIN’a, son olarak ise, beni asla yalnız bırakmayan ve motive eden Elif MAHMUTOĞLU’na teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

Abdullah AYDIN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Domates	1
1.2. Abiyotik Stres	3
1.2.1. Stres Durumunun Algılanması	4
1.3. ABA Rolü ve Kuraklık Stresi Üzerine Etkileri	5
1.3.1. Fiziko-Kimyasal Değişiklikler Yoluyla ABA Aracılı Kuraklık Yanıtı	7
1.3.2. Kök Mimarisi	8
1.3.3. Kök Salgıları	8
1.3.4. ABA Aracılı Kuraklık Yanıtının Moleküler Düzenlenmesi	9
1.3.5. ABA Bağımlı Translasyonel ve Post-Translasyonel Modifikasyonlar	11
1.3.6. Hormonlar Arası İlişki	11
1.4. Sitokinin	12
1.4.1. Sürgün Oluşumu	13
1.4.2. Çiçek Gelişimi	14
1.4.3. Kök Gelişimi	15
1.4.4. Sitokinin ve Abiyotik stres ilişkisi	16
1.5. Genom Düzenleme	20
1.5.1. CRISPR/Cas9'un Mekanizması	21
1.5.2. CRISPR/Cas9 Sisteminin Bitki Genom Düzenlenmesinde Kullanımı	23
1.6. Çalışmanın Amacı	23
2. MATERYAL VE METOT	25
2.1. Biyoinformatik Analizler	25
2.2. gRNA'ların Dizayn Edilmesi	25
2.3. Golden Gate Klonlama	26
2.4. Kompetan <i>E. coli dh5a</i> 'nın Hazırlanması ve Plazmitin Transformasyonu	30
2.5. Vektörün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101'e Transformasyonu	33
2.6. <i>Agrobacterium</i> Aracılı Bitki Transformasyonu ve Doku Kültürü	35
2.7. Mutasyon Kontrolü	37
2.8. Çimlendirme Testi	38
2.9. Stres Uygulaması	38
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
3.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları	39
3.2. Transgenik Bitkilerin Elde Edilmesi	39
3.3. Mutasyon Kontrolü	42
3.4. Çimlendirme Testi	45
3.5. Kuraklık Stresi Testi	47
4. SONUÇ	54
KAYNAKLAR	55
ÖZ GEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

AHP	: Histidine-containing phosphotransfer protein
ABA	: Absisik Asit
BOİ	: Biyolojik Oksijen İhtiyacı
SAR	: Sodyum Absorpsiyon Oranı
RNP	: Ribonükleoprotein
SAM	: Sürgün apikal meristem
PPI	: Protein-protein interaksiyon
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Domates bitkisinde ABA sinyalizasyonu	6
Şekil 1.2 Domates bitkisinde sitokinin sinyalizasyonundan sorumlu genler	13
Şekil 1.3 Yüksek ışık stresi, sitokinin sinyalizasyonu ve fotosistem II arasındaki etkileşim	17
Şekil 1.4 ABA ve Sitokinin ilişkisinin kuraklık stresi üzerine etkileri	19
Şekil 1.5 CRISPR sisteminin bakterilerde savunma mekanizması olarak işleyişi	22
Şekil 2.1 <i>AHP</i> genlerini hedef alan gRNA'ların, gRNA scaffold ile oluşturması muhtemel ikincil yapıları; A) gRNA 1, B) gRNA 2, C) gRNA 3, D) gRNA 4.....	26
Şekil 2.2 DT Polimeraz zincir reaksiyonları sonucu oluşan DNA fragmentleri.....	29
Şekil 2.3 A) <i>BsaI</i> kesimi sonucu oluşan uçlar, B) Kesim sonucunda birbiri ile uyumlu uçların bağlanması.....	30
Şekil 2.4 <i>AHP</i> genlerini hedef alan gRNA'ların klonlandığı pHSE401 bitki ifade vektörü ..	33
Şekil 3.1 Domateste, sitokinin ve ABA sinyalizasyon yollarında bulunan proteinlerin PPI analizi	39
Şekil 3.2 Transgenik bitkilerin elde edilme aşamaları	40
Şekil 3.3 Transgenik bitki elde etme aşamalarında yapılan PCR işlemlerinin agaroz jel görüntüleri	41
Şekil 3.4 Sera koşullarında yetiştirilen <i>ahp</i> T ₀ bitkileri	42
Şekil 3.5 <i>Solyc06g084410</i> geninin ICE-Synthego aracı kullanılarak yapılan mutasyon kontrolü sonuçları.....	Error! Bookmark not defined.
Şekil 3.6 Çimlendirme testi sonuçları	46
Şekil 3.7 150mM mannitol içeren 1/2 MS ortamında çimlenme testi	47
Şekil 3.8 Mannitol ortamındaki Crocker ve <i>ahp-4</i> bitkileri	48
Şekil 3.9 <i>ahp</i> ve Crocker bitkilerinin, farklı oranlarda mannitol içeren ortamlarda, kök ve gövdelerdeki su tutma yüzdeleri.....	49
Şekil 3.10 <i>ahp-4</i> ve Crocker bitkilerinin 0mM, 100mM ve 200mM mannitol içeren ortamlarda 1 hafta kaldıktan sonraki görüntüleri.....	51
Şekil 3.11 Kuraklık deneyi ardından alınan örneklerden yapılan yaş ve kuru ağırlık ölçüm analizleri	52
Şekil 3.12 Hasattan sonra görüntülenen bitki kökleri	52
Şekil 3.13 T ₀ bitkilerinden alınan kök örneklerinin ağırlıklarının kıyaslanması	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1 ABA sinyal yolağını etkileyerek kuraklığa toleransı artıran bazı genler veya taşıyıcı proteinler	10
Tablo 2.1 Golden Gate Klonlamaya Uygun Şekilde İçerisinde gRNA'ları Bulunduran Oligolar.....	26
Tablo 2.2 DT1 PCR Bileşenleri	27
Tablo 2.3 DT2 PCR bileşenleri.....	27
Tablo 2.4 DT3T4 PCR Bileşenleri.....	27
Tablo 2.5 D1, DT2 ve DT3T4 PCR reaksiyonlarının koşulları	27
Tablo 2.6 Golden Gate Klonlama Bileşenleri	29
Tablo 2.7 Golden Gate Klonlama Reaksiyonu Koşulları.....	29
Tablo 2.8 <i>E.coli</i> bakterilerinden koloni PCR.....	31
Tablo 2.9 <i>E.coli</i> bakterilerine yapılan koloni PCR koşulları	31
Tablo 2.10 Koloni PCR için kullanılan primer isimleri ve dizileri.....	31
Tablo 2.11 pHSE401 plazmitini doğrulamak için kullanılan primerler.....	32
Tablo 2.12 Higromisin PCR için kullanılan primerler ve dizileri.....	37
Tablo 2.13 Higromisin PCR Bileşenleri	37
Tablo 2.14 Higromisin PCR Koşulları.....	37
Tablo 2.15 AHP genlerinin PCR ile çoğaltılması	37
Tablo 3.1 DSDecode M aracı kullanılarak yapılan mutasyon analizi.....	43

1. GİRİŞ

1.1. Domates

Domates (*Solanum lycopersicum*) angiosperm cinslerinin en büyüklerinden olan Solanaceae familyası içerisinde yer alan ve 500'den daha fazla yıl önce And Dağlarından Avrupa'ya yayılmış olan bir mahsüldür (Bergougnoux, 2014). Domates iyi verim verebilmesi ve hızlı büyüyebilmesi için yüksek sıcaklık ve ışık ihtiyacı olan bir bitkidir (Kinet & Peet, 1997), C vitamini, folik asit ve likopen gibi karoteneoidler açısından önemli bir kaynaktır (Perveen et al., 2015; Rao, 2002). FAO verilerine göre, ülkemiz 2021 yılı itibariyle Dünya'da domates üretimi açısından %5,01'lik bir paya sahiptir. Bu gibi faydalarının yanı sıra, iyi bilinen genomu ile biyoteknoloji çalışmaları için önemli bir model organizmadır (Wang et al., 2019).

Domatesin yüksek oranda barındırdığı karotenoidler, bitki, bakteri, fungus ve bazı algeler tarafından sentezlenen doğal pigmentlerdir (Baiano & Del Nobile, 2016). Karotenoidler, insanlar tarafından sentezlenemediği için, beslenme yoluyla alınması gerekmektedir. Domates ve domates ürünleri, bilinen en iyi karotenoid kaynaklarıdır (Przybylska, 2020).

Likopen (C₄₀H₅₆), ilk olarak domateste keşfedilmiş olan, kırmızı lipofilik karotenoid hidrokarbon pigmentidir (Monselise & Halevy, 1961). Likopen genellikle karaciğer ve yağ dokularında, buna ek olarak, testisler, adrenal bezler ve prostatta depolanmaktadır (Bohn et al., 2017; Zaripheh et al., 2003). Likopenin, plazma içerisindeki miktarı 0.22-1.06 nmol/ml ve yarı ömrü 2-3 gün kadardır (Stahl & Sies, 1996). Likopenin bütün trans-izomerik formları meyve ve sebzelerde mevcuttur. Ancak, cis-izomerik formlar doku ve serum örneklerinde yoğunluktadır. Likopenin cis-izomerik formlarından en stabil ve yüksek antioksidan olanı, 5-cis likopendir (Chasse et al., 2001). Likopen, in vitro olarak etkili serbest radikal temizleyicisidir. Glutatyon seviyelerini ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı gözlemlenmiştir. Antioksidan özelliği sayesinde DNA, lipidler ve diğer makromolekülleri koruyabilmektedir (Anlar & Bacanlı, 2020).

β -karoten, domates'te ikinci olarak en çok bulunan karotenoid'tir ve meyveye sarı ve yeşil renkleri vermektedir. Domates çeşitlerinde, 100 gram meyve'de 0.23-2.83 mg aralığında β -karoten bulunmaktadır (Baranska et al., 2006). B-karoten, A vitamininin ana öncüsü olan, iki adet retinil grubu içermektedir. B-karoten, bağırsak

epitelyumunda 15,15'-oksijenaz enzimi tarafından retinole dönüştürülür (Gong et al., 2017). Bu faydasının yanı sıra, bazı çalışmalar β -karoten'in antioksidan özellik, immünolojik fonksiyonun artması, çeşitli kanser ve kalp rahatsızlıklarının önlenmesi gibi faydalarını kanıtlamışlardır (Szabo et al., 2018). Bu olumlu etkilerin yanında, yüksek dozlarda β -karoten takviyesi, akciğer kanserine yakalanma oranını artırabilmektedir (Szabo et al., 2018).

Fenolik bileşikler, meyve ve sebzelerde bulunan, ana fitokimyasallardır. Fenolik bileşikler, çiğ domates, domates ürünleri ve işlenmiş domates yan ürünleri arasında flavonoidler (rutin, naringenin, naringenin kalkonu, kempferol ve kuersetin) fenolik asitler (hidroksisinamik, klorojenik, p-kumarik, ferulik ve kafeik asit) şeklinde bulunur (Ćetković et al., 2012). Bu fenolik bileşiklerin profilleri, domates çeşitlerinden etkilenmektedir (Ćetković et al., 2012). Bir araştırmada, kuru çeri domatesteki fenolik bileşik miktarlarının 64.6-440 mg/100g aralığında değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Choi et al., 2014). Ancak, bazı ticari ve vahşi çeşitlerde polifenol miktarları 26.34-66.08 mg/100g taze ağırlık şeklinde değişiklik göstermektedir (Kaur et al., 2013).

Domates, çok önemli bir vitamin C kaynağıdır ve yine önemli düzeylerde vitamin A, B ve E içermektedir. Akdeniz diyetinin önemli bir parçası olan vitamin C (Askorbik asit)'nin önemli kaynaklarından birisidir. Askorbik asit, ısıdan ve ışıktan kolayca etkilenerek bozulabilmektedir (Jayathunge et al., 2019). Pastörizasyon sonucu domates püresindeki C vitamini miktarının önemli düzeyde azaldığı gözlemlenmiştir (Georgé et al., 2011; Pérez-Conesa et al., 2009). Domatesin 100g taze meyvesindeki vitamin C miktarı, çeşit, çevresel koşullar ve meyve gelişimine bağlı olarak, 8 mg ile 16.3 mg aralığında değişkenlik göstermektedir (Martí et al., 2018). Su ile çözülebilir olduğundan, vücut tarafından kolayca emilir ve birçok fonksiyon için gereklidir. Ancak, vücut tarafından depo edilememektedir (Pehlivan, 2017). Elektron verici olmasından dolayı, antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu sayede, hücre membranı ile proteinleri oksidatif stres kaynaklı hasarlardan korumaktadır (Pehlivan, 2017). Kollajen sentezinden sorumlu iki enzimin kofaktörü olmasından dolayı, deri için de faydalıdır. Nöro dejeneratif hastalıkların iyileşmesinde de rolü olduğu belirlenmiştir (Kocot et al., 2017).

Domates'te önemli miktarlarda bulunan vitamin E, yağda çözünebilen ve antioksidan aktiviteye sahip bir vitamindir. Vitamin E'nin 8 farklı yapısı

bulunmaktadır. Bunlardan 4'ü; tokoferoller (alfa, beta, gama, sigma) diğer dördü ise, tokotrienollerdir (alfa, beta, gama, sigma) (Azzi & Stocker, 2000). En iyi bilinen faydası, yağ molekülleri oksidasyona uğradığı sırada, antioksidan etkisiyle serbest radikalleri inhibe etmesidir (Raiola et al., 2014). E vitamini iskelet kas homeostasisinde ve plazma membranının tamirinin düzenlenmesinde anahtar role sahiptir (Howard et al., 2011). Diğer çalışmalar, tip-2 diabetes ve prostat kanseri risklerini azalttığını ve kardiovasküler fonksiyonları artırdığını göstermiştir (Kirsh et al., 2006; Raiola et al., 2014).

Glikoalkaloidler, *Solanaceae* familyasında bulunan ikincil metabolitlerdir. Fitopatogenlere karşı korumada önemli role sahiptirler. İnsanlar ve hayvanlarda ise biyolojik fonksiyonlar sergileyebilmektedirler. Domateste, tomatın ve eskülozit A formlarında bulunmaktadır (Fujiwara et al., 2012; Pinela et al., 2016). Bazı çalışmalar, glikoalkaloidlerin sağlık üzerine faydalı etkileri olduğunu göstermiştir. Bu etkilerden bazıları, anti-kanser aktivite ve bakteri ve protozoalara karşı immün sistem korumasının uyarılmasıdır (Fujiwara et al., 2012). Anti-kanser aktivitesine örnek olarak, α -tomatin'in prostat kanserine karşı yüksek biyoaktiviteye sahip olması veya insan kolon (HT29) ve karaciğer (HepG2) kanserlerine karşı potansiyel büyüme inhibitörü olması verilebilir (Fujiwara et al., 2003).

1.2. Abiyotik Stres

Kuraklık, önemli bir büyüme önleyicisidir. Fotosentetik süreci sekteye uğratarak, bitkinin gelişimini ve verimini geriletmektedir (Chaudhry & Sidhu, 2022). Ayrıca, ROS ve ABA arasındaki etkileşimlere dahil olmaktadır (Jones, 2016). Kuraklık, ABA birikimine neden olmaktadır ve ekstrasellüler ABA birikimi H_2O_2 oluşumuna sebebiyet vermektedir. Bitkinin toprak üstü aksanlarındaki su kullanılabilirliğinin düzenlenebilmesi için, köklerden sürgün uçlarına bir dizi sinyal iletilmesi gerekmektedir (Jones, 2016). Kökler, stres koşullarında, bu durumu ilk algılayan bitki organıdır ve su kaybını azaltmak için, stomal kapanmayı uyarmak ve turgoru düşürmek amacıyla toprak üstü aksanlara, kök-sürgün ksilem kanalları aracılığıyla sinyal iletmektedir (Carmody et al., 2016).

Bitkiler güneş enerjisini kullanarak karbondioksiti emerler ve açığa kuru madde ile oksijen çıkarırlar. Abiyotik faktörler, bitki gelişimi ve ürün verimi açısından çok önemlidirler. Bitkiler, doğada bulunan kuraklık, tuzluluk, toksik maddeler, ağır metaller gibi stres faktörlerine maruz kalmaktadırlar. Bu durum, stres faktörlerini

tolere edemeyen bitkilerde verim kaybıyla hatta bitkinin ölümüyle sonuçlanabilir (Bailey-Serres et al., 2019).

1.2.1. Stres Durumunun Algılanması

Hücrel stres yanıtını tetikleyen çevresel stres faktörleri, hücrede bulunan biyomoleküllerin fiziksel ve kimyasal yapılarında değişikliğe yol açarak hasarlara yol açabilir (Zhang et al., 2022). Stres durumunun, biyomoleküller tarafından, doğrudan algılandığını söylemek zordur. Bu nedenle, şu an stres sensörü olarak sayılan moleküller, dolaylı yollar ile bulunmuştur. Örneğin, bazı moleküllerin fonksiyonları bozularak, Ca^{2+} reaktif oksijen türleri, nitrik oksit ve fosfolipid miktarlarında artışa yol açması tespit edilerek bu moleküller stres sensörü olarak adlandırılır (Zhang et al., 2022).

Bitki hücrelerinde kuraklık ve tuzluluk durumları hiperozmotik stres olarak adlandırılır. *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki *OSCA1* hiperozmotik stres sensörü olarak tanımlanmıştır. *OSCA1*, plazma membranında bulunur ve bu proteinin fonksiyonunun bozulması, hiperozmotik stres altındaki bitkilerde, koruyucu ve kök hücrelerindeki Ca^{2+} akışını azaltır, etkisiz yaprak transpirasyonuna ve yetersiz kök gelişimine sebebiyet verir (Yuan et al., 2014). *Oryza sativa* ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde bulunan *OSCA1* gen ailesi proteinlerinin yapısal analizi, hiperozmotik stres altında oluşan düşük turgor basıncı ile lipid çift tabakadaki basıncın azalması ve *OSCA* iyon kanallarının açılması ile Ca^{2+} 'un hücre içerisine girmesine izin verdiğini göstermiştir (Jojoa-Cruz et al., 2018; Liu et al., 2018; Maity et al., 2019). *Arabidopsis thaliana*'da yapılan bir çalışmada, membran gerilimi yoluyla iyon kanalı olarak görevi bulunan *MSL8* geninde oluşturulan mutasyon sonucu, bitkilere verile hiperozmotik stres ardından tekrar sulama yapıldığında, polen tanelerinin hayatta kalma yüzdesinin azaldığı gözlemlenmiştir (Hamilton et al., 2015). Kısacası ozmolaritedeki değişiklikler, hücre içerisine iyon girişi ile algılanarak yanıt başlatılır.

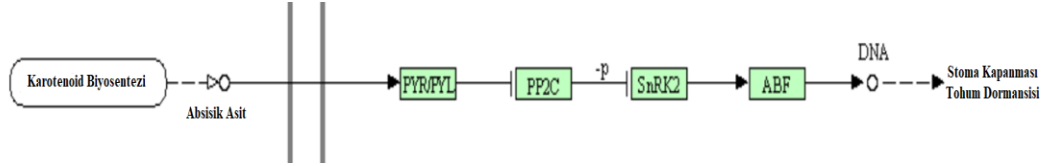
Doğal sistemler, insan sağlığı ve tarımsal üretim, çevresel değişikliklerden yüksek oranda etkilenmektedir (Arunanondchai et al., 2018). Dünya nüfusunun hızla artması ve bununla aynı doğrultuda artan gıda gereksinimi tarımsal üretime zarar veren hava kirliliği, toprak verimsizliği ve su kıtlığı gibi etmenlerin daha büyük bir sorun olmasına neden olmaktadır (Noya et al., 2018). İklim koşullarındaki ani değişimler biyotik ve abiyotik strese neden olarak tarımsal üretime darbe vurmaktadır (Raza et al., 2019). Bu gibi sorunların üstesinden gelebilmek için özellikle tarımsal öneme sahip

organizmaların mekanizmalarını anlamak ve elde edilen bu bilgiler ışığında, değişen çevre koşullarına adaptasyon yeteneği ve verim özelliği iyi bitkiler yetiştirmek, endişe uyandıran bu sorunların üstesinden gelmek için önemlidir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin, çevre koşullarına karşı bitkisel yanıtlar üzerine olan etkisinden dolayı bu mekanizmaların anlaşılması çok önem arz etmektedir (Peleg & Blumwald, 2011). ABA, abiyotik ve biyotik streslere yanıtta, diğer bitki büyüme düzenleyicileri ile de etkileşime girerek çok önemli bir role sahiptir (Ku et al., 2018). Bitki büyüme düzenleyicilerinin stres koşullarına yanıtlar da önemini vurgulamak adına çokça örnek mevcuttur. Örneğin, domateste bulunan *SlCaM1*, *SlCaM2*, *SlCaM3*, *SlCaM4*, *SlCaM5*, ve *SlCaM6* gibi kalsiyum reseptörlerinin kodlandığı genlerinin yaralanma veya bitkinin *Botrytis cinerea* tarafından enfekte olmasıyla uyarıldığı ve bu genlerden *SlCaM2*'nin aşırı düzeyde ifadesinin artırılmasının *Botrytis cinerea*'ya karşı direnci arttığı görülmüştür (Peng et al., 2014). Ancak, bu genlerin ifadesi bitki büyüme düzenleyicileri olan salisilik asit ve jasmonik asit tarafından da indüklenebilmektedir (Peng et al., 2014). Ya da, Kalmodulin benzeri proteinler (CML)'in kodlandığı genlerin soğuk, sıcak, tuz ve kuraklık stresıyla indüklenebilirken, aynı zamanda bu genlerin ABA ile de indüklenebildiği ve çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine yanıtta rol aldıkları *Arabidopsis thaliana* bitkisinde gösterilmiştir (Magnan et al., 2008; Munir et al., 2016). Bu gibi örneklerle bakarak bitki hormonlarının, stres koşullarına yanıtta önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

1.3. ABA Rolü ve Kuraklık Stresi Üzerine Etkileri

Absisik asit (ABA), plastitlerde bulunan metiletiltritol yolağı sayesinde, karotenoid türevi olan izopentil difosfat (IPP)'tan sentezlenen bir izoprenoid molekülüdür (Dejonghe et al., 2018). ABA sentezi bir dizi basamak sonucu oluşmaktadır ve her basamak özel bir enzim tarafından gerçekleştirilir. ABA biyosentezi ilk olarak, zeaksantin'in, trans-violaksantin'e dönüşmesi ile başlar. Bu reaksiyon, zeaksantin epoksidaz (ZEP) enzimi tarafından epoksikarotenid'in ksantin'e dönüştürülmesidir. Ardından, bilinmeyen bir enzim tarafından trans-violaksantin'in cis-izomerizasyon yoluyla violaksantin ya da cisneoksantin'e dönüştürülür. 9-cis-epoksikarotenoid deoksijenaz (NCED), ksantoksin adı verilen ürünün üretileceği reaksiyonu gerçekleştirir ve ksantoksin, sitozole gider. Ksantoksin, kısa zincir alkol dehidrogenaz (SDR) tarafından absisik aldehit'e dönüştürülür. Son olarak, absisik aldehit'in aldehit oksidaz (AAO) tarafından oksidasyonu sonrası ABA oluşur

(Vishwakarma et al., 2017). Oluşan ABA'nın hücrede algılanarak yanıtın başlatılması için bir dizi genlerin ürünlerinin sinyalizasyonu gereklidir. Bu sinyalizasyondan sorumlu genler şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1 Domates bitkisinde ABA sinyalizasyonu

ABA bitki büyümesinde, gelişmesinde ve çeşitli çevresel streslere yanıtta çok önemli rol oynamaktadır (Zhu, 2002). Kuraklık koşulları altında, ABA dolayısıyla, stoma iletkenliğinin düzenlenmesi terleme yolunun neden olduğu su kaybını azaltır (Kim et al., 2010). Kuraklık stresi altındaki bitkilerde, ABA biyosentez genlerinin indüklenmesi ile ABA miktarları önemli düzeyde artmaktadır (Kim et al., 2010). *ZEP/ABA1*, *AAO3*, *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED3)* ve *co-factor sulfurase (MCSU/LOS5/ABA3)* gibi ABA biyosentezinden sorumlu genlerin aktivasyonu bir takım transkripsiyon faktörleri (ABF, MYC, MYB, NAC, ERF, bZIP ve DREB/CBF) tarafından ABA bağımlı veya ABA bağımsız şeklinde gerçekleşir (Dar et al., 2017; Verma et al., 2016).

ABA aracılı stres yanıt düzenlemesine örnek olarak verilecek birçok çalışma mevcuttur. *Arabidopsis thaliana*'da, pirabaktin direnç (PYR) ya da ABA reseptör düzenleyici bileşen (RCAR) gibi ABA reseptörlerinin artışı, kuraklık toleransını artırmaktadır (Saavedra et al., 2010). Ya da, ABA-responsiveness element binding proteini (ABP9), bZIP ailesi üyesidir ve kuraklık altında, fotosentetik aktiviteyi artırmaktadır (X. Zhang et al., 2008). Histon asetilasyonu, ABA aracılı gen düzenlemesiyle kuraklığa adaptasyonda kritiktir (Sridha & Wu, 2006). *Mithogen-activated protein kinase* (MAPK) sinyal yolağının, ABA aracılı kuraklık düzenlemesinde kritik role sahip olduğu *Arabidopsis thaliana*, mısır ve çeltik gibi bitki türlerinde gösterilmiştir (Hamel et al., 2012; Muchhal & Raghothama, 1999).

Kuraklık koşullarında ABA rolü, stomaların kapanmasını sağlayarak su kaybını yavaşlatma, kök hücrelerinin uzamasını hızlandırma, su kıtlığına maruz kalmış bitkinin iyileşmesi şeklindedir (Daszkowska-Golec, 2016). ABA'nın kuraklık stresi altında, *Calcium-dependent protein kinase (CPK6)* genini indükleyerek, kalsiyum bağımlı protein kinazların sinyalizasyonunda da rol aldığı rapor edilmiştir. CPK'lar,

bazı önemli ABA ilişkili transkripsiyon faktörleriyle ve ABF/AREB'ler ile etkileşim girerek, fosforilasyon yoluyla sinyal iletmektedirler (Zhang et al., 2020).

Örneklerde anlaşılabacağı gibi, ABA, bitkilerde kuraklık ile ilişkilendirilmektedir. ABA, gen ifadelerini, proteinleri ve enzimatik aktiviteleri düzenleyerek, bitki hücrelerinde dehidrasyona karşı toleransa katkı sağlamaktadır (Chen et al., 2020). Kuraklık altındaki ABA miktarlarının önemli düzeyde arttığı *Arabidopsis*, buğday, çeltik, domates, soya fasulyesi, mısır ve susam bitkilerinde gösterilmiştir (Dossa et al., 2020; Zhang et al., 2006). Bitkilerin kuraklık koşullarına tamamen adapte olabilmesi için ABA'nın kesinlikle gerekli olduğu kanıtlanmıştır (Baek et al., 2016).

1.3.1. Fiziko-Kimyasal Değişiklikler Yoluyla ABA Aracılı Kuraklık Yanıtı

Bitkiler, kuraklık stresinin olumsuz etkilerini en aza indirmek için karakteristik mekanizmalara sahiptirler (Seleiman et al., 2021). Reaktif oksijen türleri (ROS), bitkilerin streslere yanıtlarında sinyal rolü üstlenen moleküllerdir. Kuraklık stresi altındaki bitkiler, hayatta kalma oranlarını arttıracak bir dizi ikincil metabolit üretir (Sreenivasulu et al., 2012). Örneğin, antioksidan enzimler (SOD, POD, CAT, APX ve GR) ABA yoluyla aktive edilerek, stres sonucu oluşan reaktif oksijen türevleri zararsız moleküllere dönüştürülür (Zhou et al., 2019). Bir çalışmada, ABA'nın hidrojen peroksit sentezini, stoma koruma hücrelerinde, membran bağlanma NADP oksidaz'ı aracılığıyla aktive ettiğini göstermiştir. Bunun sonucunda ise, plazma membranındaki kalsiyum kanalları aktive olarak, stoma kapanması gerçekleşir (Gilroy et al., 1990).

Bitkiler, tıbbi ve besinsel olarak esansiyel bazı birincil metabolitler üretmektedirler (Aharoni & Galili, 2011). Çeşitli çevresel faktörlerle sarı olan bitkiler, değişen çevre koşullarına yanıt vermek için bazı metabolitler üretirler (Cramer et al., 2011). Bitkilerdeki bu metabolitlerin fonksiyonlarının tahmin edilebilmesi için, bu metabolitlerin profilleri çıkarılmıştır (Fiers et al., 2005; Sweetlove et al., 2008). Bitkiler iki adet karakteristik adaptasyon stratejisine sahiptirler. Bunlardan biri, ozmolaritenin ayarlanması, diğeri ise özel ikincil metabolitlerin biriktirilmesidir (Dixon & Paiva, 1995; Krasensky & Jonak, 2012). Kuraklık stresi altındaki bitkilerde, prolin, glisin-betain, fenolik bileşikler, emilebilir şeker gibi metabolitlerin biriktirildiği gösterilmiştir. Bu metabolitler, kuraklık stresi altındaki bitkinin gerekli olan süreçlerini ilerletebilmesi için su potansiyelinin ve hücre turgorunun düzenlenmesi,

ozmolaritenin ayarlanması ve dayanıklılığın artırılması gibi süreçlerde görev alırlar (Krasensky & Jonak, 2012).

1.3.2. Kök Mimarisi

Kökler, bitkilerin toprağa tutunmasını sağlamasıyla birlikte toprakta bulunan mineral ve suyu alarak bitki gelişimini ve farklılaşmayı sağlar (Hong et al., 2013). ABA'nın kök üzerine etkileri doğrudan çevresel olumsuzluklar ile ilişkilidir ve bu etkiler, kök mimarisinin düzenlenmesi, kök büyüme modeli, kök büyümesinin sınırlandırılması ve lateral kök gelişiminin düzenlenmesi şeklindedir (Benderradji et al., 2021; De Smet et al., 2003; Hong et al., 2013; Liang et al., 2007). ABA sentezi açısından mutant (*aba2-1* ve *aba3-1*) bitkilerde yapılan bir çalışmada, bu bitkilerin lateral kök sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir (Deak & Malamy, 2005). Daha sonra, yer fıstığında yapılan bir çalışmada, ABA biyosentezi için, lateral kök inhibisyonunun gerekli olduğu ortaya çıkarılmıştır (Guo et al., 2012). Ancak, buna ters gelecek şekilde, ABA duyarlı (*abi4*) bitkilerinde lateral kök sayısının arttığı gözlemlenmiştir (Quiroz-Figueroa et al., 2010). Buradan anlaşılabileceği üzere, ABA biyosentezinden ziyade, ABA sinyalizasyonunun lateral kök gelişimini düzenlediğidir.

1.3.3. Kök Salgıları

Kök salgıları, olumsuz çevre koşullarına yanıtta önemli rol oynamaktadırlar (Williams & de Vries, 2020). Bu salgılar, besleyiciler ya da %11-40 oranında fotosentezden türetilmiş kimyasal çekiciler olarak rol almaktadırlar (Lynch & Whipps, 1990). Kök salgıları, organik asit, şeker, yağ asitleri, amino asitler ve ikincil metabolitler açısından zenginleştirilmişlerdir (Baetz & Martinoia, 2014). Ancak bu salgıların içerikleri ve içerdikleri maddelerin miktarları türler arasında değişiklik gösterebilmektedir (Dennis et al., 2010; Iannucci et al., 2013; Rudrappa et al., 2008; Zhelnina et al., 2018). Bitkilerde sızan bileşikler, çeşitli bitki-mikrop ilişkilerinin kurulmasına aracılık eder (Naylor & Coleman-Derr, 2018). Böylece, bitkilerin çeşitli çevresel stres koşulları ile mücadele etmesine yardımcı olurlar (Bulgarelli et al., 2013). ABA, prolin, organik asit ve koruyucu proteinler gibi ozmolitlerin biyosentezini sağlayarak, kuraklığa yanıtı düzenlemektedir (de Ollas et al., 2015). ABA konsantrasyonunun, artmış fosfat sentaz aktivitesi ve karbon remobilizasyonu ile birlikte ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Yang et al., 2002). Bitki metabolitlerinin ve özellikle ABA'nın, kuraklık stresi altında, köklerde arttığı gözlemlenmiştir (Gargallo-Garriga et al., 2018).

Kök salgıları çeşitli, kuraklığa dirençli bakterileri çekebilmektedir. Bitki büyüme teşvik edici *Rhizobacteria*, yabancı tip domates bitkilerinin büyümesini artırmış ve ABA açısından mutant domates bitkisinde ise durum tam tersi olmuştur (Porcel et al., 2014). *Bacillus* (Karadeniz et al., 2006) ve *B.megaterium* (Porcel et al., 2014) gibi bakteri türleri, endojen ABA sayesinde, bitki kökleri ile etkileşim kurmakta ve bitki büyüme düzenlemesine etki etmektedir (Kai et al., 2008; Nakayama et al., 1999). *B.subtilis*, kuraklık toleransını artırdığı bilinen faydalı bir bakteridir. Bu bakteriyi çeken, mısır organik salgılarının, kuraklık stresi altında arttığı bildirilmiştir (Gagné-Bourque et al., 2016). Yani ABA, köklerde farklı organizmalarla mutualist ilişkiler kurulması üzerinde de etkilidir.

Kısacası, ABA'nın kuraklık stresinde bitki üzerine olumlu etkileri mevcuttur. Ancak, kısa vadede veya ABA miktarının az bir oranda artması sonucunda lateral kök miktarında artış beklenmesine rağmen, ABA miktarının yüksek oranda artması veya kuraklık koşullarının uzun sürmesinde, lateral kök miktarında azalma beklenmektedir.

1.3.4. ABA Aracılı Kuraklık Yanıtının Moleküler Düzenlenmesi

ABA, kuraklık stresi altındaki bitkilerde, fizyolojik ve moleküler mekanizmaları düzenlemektedir. Örneğin, protein kinazlar, kuraklık stresi altında, ABA sinyalizasyonunun, metabolizmasının ve taşınmasının pozitif düzenleyicileridir (Fujita et al., 2009). Ayrıca, ABA responsive G receptor protein (GCR2), bitkiyi çimlenmeye karşı duyarsızlaştırmış ve ABA ile uyarılabilen genlerin ifadelerini etkilemiştir (Liu et al., 2007). Üstelik, ABA'nın flowering time control protein (FCA) ve magnesium chelatase'ın alt ünitesi ile etkileşime girdiği kanıtlanmıştır (Hirayama & Shinozaki, 2007). Bitkiler, membran üzerinde bulunan sensörler sayesinde kuraklığı algırlar. Örneğin, ABA biyosentezinden sorumlu NCED1, NCED3, ABA2, AAO3 ve taşıyıcı AtABCG25 ve AtABCG40 proteinleri plazma membranında lokalize olmaktadır. Bu durum, bitkilerin, değişen çevre koşullarını algılamada ve bu koşullara yanıt oluşturmada karmaşık mekanizmalara sahip olduklarını göstermektedir (Kuromori et al., 2018). Nitrate carrier proteininde, ABA'nın hücre içerisine alınmasında düzenleyici olduğu bilinmektedir. Yani, bu proteinin de ABA'nın taşınmasında rolü olabileceği düşünülmektedir (Merilo et al., 2015). Kök sistemlerinde bulunan genlerin, kuraklık stresi altında, 3 farklı zaman (1 saat, 3 saat ve 7 saat) aralığındaki yanıtlarını inceleyen bir çalışmada, 12 genin ifadelerinin tüm zaman aralıklarında arttığını ve bu genlerin MAPK sinyal yolağında, metabolik süreçlerde ve

ABA gibi hormonların sinyal iletiminde rol aldıkları görülmüştür (A. Zhang et al., 2021). ABA kontrolü altındaki bazı transkripsiyon aktivatörlerinin, kuraklığa tolerans sağlayan genleri aktive ettiği gözlemlenmiştir. Örneğin, ABA responsive transcription factor (OsBZIP72)'nin, promotörlerine bağlanarak aktive ettiği *OsSWEET13* ve *OsSWEET15* genlerine ait ürünlerinin, kuraklık stresi altındaki çeltik bitkisinde, sükröz taşınması ve parçalanmasını düzenlediği gözlemlenmiştir (Mathan et al., 2021).

Tablo 1.1 ABA sinyal yolağını etkileyerek kuraklığa toleransı artıran bazı genler veya taşıyıcı proteinler

Tür	Gen/Taşıyıcı	Fonksiyon	Kaynak
<i>Agrostis grass</i>	<i>VuNCED1</i>	Biyokütle'nin 3-4 kat artması	(Aswath et al., 2005)
	<i>AtABCG17-18</i>	Stoma kapanması ve su kullanımı etkinliğinin artırılması	(Y. Zhang et al., 2021)
	<i>AtPDR12/ABCG40</i>	ABA alım taşıyıcısı	(Kang et al., 2010)
	<i>AIT1/NRT1.2</i>	ABA alıcısı, stoma açıklığı için önemli	(Kanno et al., 2012)
	<i>AtBBD1</i>	ABA ve kuraklık yanıt genlerinin ifadesinin artması	(Huque et al., 2021)
	<i>AtSAUR32</i>	Kuraklık ve ABA altında ifadesi arttı	(He et al., 2021)
	<i>AtbHLH68</i>	Kuraklık altında lateral kök uzaması	(Le Hir et al., 2017)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHDA9 ve ABI4</i>	CYP707A1 ve CYP707A2'nin kuraklık altındaki ifadesinin düzenlenmesi	(Baek et al., 2020)
	<i>AtDTX/MATE</i>	Kuraklığa tolerans ve ABA akışını kolaylaştırmak	(Zhang et al., 2014)
	<i>BdABCG25</i>	Hücre içinde ABA taşınması	(Kuromori et al., 2021)
<i>Brassica napus</i>	<i>BnFTA</i>	Kuraklık koşullarında ifadesi arttı	(Wang et al., 2009)
<i>Glycine max</i>	<i>GmCIPK2</i>	ABA sinyalizasyonu ve kuraklık toleransı	(Xu et al., 2021)
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>SgNCED1</i>	ABA birikiminin artması	(Y. Zhang et al., 2008)
	<i>Oshox22</i>	ABA içeriğinin ve kuraklık toleransının artması	(Zhang et al., 2012)
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsZIP46CA1</i>	Kuraklık direncinin artması	(Tang et al., 2012)
	<i>OsPM1</i>	ABA akış taşıyıcısı, kuraklığa yanıt için önemli	(Yao et al., 2018)
<i>Petunia</i>	<i>LeNCED1</i>	ABA ve prolin miktarlarında artış, kuraklık direnci için önemli	(Estrada-Melo et al., 2015)
<i>Setaria italica</i>	<i>SiAREB</i> 'in hedefi olan	ABA bağımlı sinyal yolağı	(Li et al., 2014)
	<i>SiARDP</i>		
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>SIGRAS42s</i>	ABA sinyalizasyonu	(Liu et al., 2021)
	<i>PYR/PYL/RCAR</i>	Tohum çimlenmesi ve temel ABA sinyalizasyonu	(Gonzalez-Guzman et al., 2012)
<i>Triticum aestivum</i>	<i>HVA1</i>	Su eksikliğinde büyüme karakteristiğinin artması	(Sivamani et al., 2000)

<i>Vigna unguiculata</i>	<i>VuABCG25</i>	Kuraklık stresi altında ABA sinyalizasyonuna katılır	(YUASA et al., 2021)
<i>Vitis vinifera</i>	<i>VviNCED1, VviNCED2</i>	Bitki içerisinde bulunan su durumuna bağlı olarak ABA sentezi	(Soar et al., 2006; Speirs et al., 2013)
<i>Xanthoceras sorbifolium</i>	<i>XsWRKY20</i>	ABA sinyalizasyon yolağı üzerinden kuraklığa yanıt	(Xiong et al., 2020)
<i>Zea mays</i>	<i>ZmXerico1-2</i>	Su kullanım etkinliğinin artması ve kuraklık koşullarında verimlilik	(Brugière et al., 2017)

1.3.5. ABA Bağımlı Translasyonel ve Post-Translasyonel Modifikasyonlar

Kuraklık stresi altındaki bitkinin, alternatif kesim ya da RNA aracılı gen ifadesi baskılama gibi post-transkripsiyonel ve protein aktivitesinin düzenlenmesi, hücrel lokalizasyon ve protein yarı ömrü gibi post-translasyonel modifikasyonlar önemli ölçüde ABA'ya bağımlıdır (Muhammad Aslam et al., 2022). Örneğin, ABA-responsive basic leucine zipper (*bZIP*) transkripsiyon faktörü ABI5 özellikle kuraklık olmak üzere çeşitli stres koşullarında çalışılmıştır. ABI5, bazı ABA bağımlı reseptör ve kinazları aktive ederek veya baskılayarak, bitkinin kuraklık koşullarına adaptasyonunu stimüle etmektedir (Qian et al., 2019). Ancak, *bZIP* ailesinin bazı üyelerinin kuraklık koşulları altındaki bitkinin bu koşullara uyumunda gerekli olmadığı çeşitli organizmalarda gösterilmiştir (Casaretto & Ho, 2003; Casaretto & Ho, 2005; T. C. C. Kerr et al., 2018; Wang et al., 2021; Zou et al., 2008).

1.3.6. Hormonlar Arası İlişki

Bitkilerdeki hormonlar çoğunlukla vasküler ve koruyucu hücreler tarafından salgılanarak, belli mesafedeki hedef bölgelere gönderilirler. Bitki stres koşullarına maruz kaldığı zaman ABA sinyalizasyon yolağı hızlı şekilde aktive olmaktadır. Buna karşılık olarak, ABA yanıtından sorumlu transkripsiyon faktörleri ve ABA yanıt genleri aktive olur (Sirko et al., 2021). ABA, bitki'nin kuraklık gibi abiyotik stres faktörleri altında dayanabilmesini sağlayabilmek adına, diğer bitki büyüme düzenleyicileri (oksin, sitokinin, jasmonik asit, giberellik asit, etilen, salisilik asit) ile etkileşime girmektedir. ABA birikimi hücrel turgorun düşmesiyle olur (de Ollas & Dodd, 2016). ABA birikimi bitki dokularında bulunan su miktarına bağlı olmasına rağmen, bu birikimin altındaki moleküler mekanizma hala çok net değildir.

Absisik asit, ABA ile ilişkili transkripsiyon faktörleri aracılığıyla diğer bitki hormonlarının üretimini ve sinyalizasyonunu düzenleyerek, bitki'nin kuraklık ile başa çıkabilmesini sağlamaktadır. Örneğin, ABA ile ilişkili bazı transkripsiyon

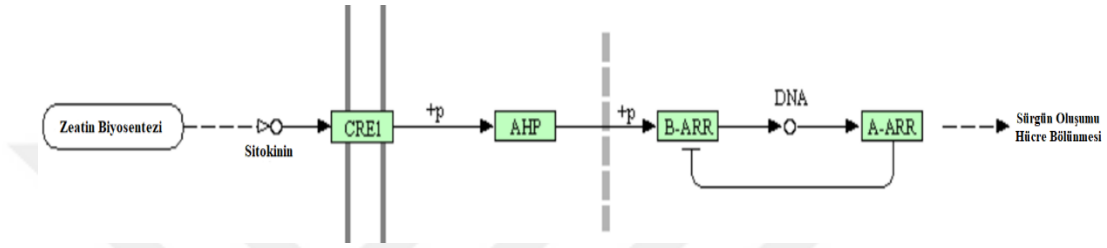
faktörlerinin (NCED, MYB, DREB) sitokinin homeostazisi yolağına dahil olduğu bilinmektedir (Liao et al., 2017). Örneğin, *MsDREB6.2*'nin yüksek düzeyde ifadesinin artırılması, *MdCKX4a*'nın ifadesinin de artmasına neden olmuş ve böylece endojen sitokinin miktarı azalmıştır ve sonuç olarak kuraklık toleransı artmıştır (Guo & Gan, 2011). Bir başka örnekte ise, *SnRK2* geninin, sitokinin sinyalizasyonunda negatif regülatör olan *type-A ARR5* geni ile etkileşime girerek, ABA aracılı kuraklık toleransını düzenlediği *Arabidopsis thaliana* bitkisinde gösterilmiştir (Huang et al., 2018). ABA ile etilen arasındaki ilişkiye bakacak olursak, *ERF1*'in (*ethylene response factor 1*) yüksek düzeyde ifadesinin artırılması ABA birikimini artırmış ve kuraklık toleransı sağlamıştır (Sharma et al., 2011). *ERF1*, *LEA4-5*'in ifadesini artırarak kuraklık toleransını sağlamaktadır (Müller & Munné-Bosch, 2015). Oksin ile ABA ilişkisine bakacak olursak, ABA'nın oksin biyosentezini inhibe ettiği bilinmektedir. Ancak, kuraklık stresi altındaki ABA birikiminin, oksinin kök uçlarına taşınmasını düzenlediği bilinmektedir (Lu et al., 2019). Bazı araştırmacılar, köklerde ABA yanıtı için oksin ve etilenin gerekli olduğunu savunmaktadır (Thole et al., 2014). Eksojen jasmonik asit uygulamasının, yapraklarda bulunan ABA miktarlarını artırdığı ve jasmonik asit eksikliğinin ise ABA seviyelerinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (Bandurska et al., 2003; de Ollas et al., 2013). Bir çalışmada ise, stresin ilk aşamalarında, bitkide azalan su miktarı ile ABA seviyelerinin arttığı ve aynı zamanda jasmonik asit birikiminin olduğu gözlemlenmiştir (Puertolas et al., 2013). ABA ile salisilik asit arasındaki ilişkiye bakacak olursak, abiyotik stres altında, ROS ve inotisol fosfatın arttığı ve aynı zamanda ABA seviyelerinin de arttığı gözlemlenmiştir (Leshem et al., 2007). ABA ve salisilik asit arasındaki ilişki ise, stoma açıklığını, ozmolaritenin ayarlanmasını ve yaprak yaşlanmasını düzenlemektedir (Gazzarrini & McCourt, 2003).

Yani, abiyotik stres faktörleriyle mücadele edebilmek için bitki büyüme düzenleyicilerinin birbirleri ile ilişkilerinin iyi araştırılması ve bu ilişkilerin anahtar düzenleyicilerinin aydınlatılması gerekmektedir.

1.4. Sitokinin

Sitokininler, çeşitli moleküler yapılarıdaki fitohormonlardır (Kieber & Schaller, 2014). 1950'li yıllarda, otoklavlanmış ringa sperm DNA'sının büyüme düzenleyici etkisini araştırırken keşfedilmiştir (Miller et al., 1955). Sitokinin, isopentil transferaz ve LOG enzimleri tarafından sentezlenmektedir. Ancak, oluşan ürünlerin

birleştirilmesi sitokinin oksidaz (CKX) enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Sentezin ardından sitokinin sinyalizasyonu başlamaktadır. AHK2-4 (Arabidopsis Histidine Kinase 2-4) reseptörleri tarafından algılanır ve fosforilasyon ile sinyal iletimi başlar. Bu reseptörler, AHP'lere sinyali iletir. AHP'lerin aldıkları sinyali, type B-ARR transkripsiyon faktörlerine iletmesi ve bu transkripsiyon faktörlerinin type A-ARR transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sağlamasının ardından, bitkide, sitokinin yanıtı başlar (Kang et al., 2017; Kieber & Schaller, 2014, 2018; Romanov et al., 2018; Wybouw & De Rybel, 2019).



Şekil 1.2 Domates bitkisinde sitokinin sinyalizasyonundan sorumlu genler

Şekil 1.2’de görüldüğü üzere, domates hücresinde sitokinin biyosentezi tamamlandığı zaman, hücre membranında bulunan CRE1 proteini tarafından algılanarak, fosforilasyon yoluyla AHP proteinlerine sinyal iletilir. AHP proteinleri çekirdek içerisine girerek, yine fosforilasyon yoluyla sinyali type B-ARR’lere iletir. Type B-ARR’ler ise, type A-ARR’lerin aktivasyonunu sağlar. Bu ARR’ler, sitokinin yanıt genlerinin aktivasyonunu sağlar ve bunun sonucunda hücre bölünmesi ve sürgün oluşumu uyarılır.

1.4.1. Sürgün Oluşumu

Sitokinin ve oksin birliğinin bitki büyümesi üzerine çok önemli etkileri olmaktadır (Schaller et al., 2015; Skoog, 1957). Yüksek seviyelerdeki oksin ve sitokinin oralarında büyütülen bitki dokuları, geriye doğru farklılaşarak, organize olmamış kallus formuna geri dönmektedirler. Bu farklılaşmamış kallus hücrelerinin, yüksek oranda sitokinin içeren ortamlara koyulması, sürgün oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Skoog, 1957). Sitokininin, apikal meristem gelişimi için hayati öneme sahip olduğu ve kallus hücrelerinden sürgün oluşumunu başlatabildiği bilinmektedir (Patton & Meinke, 1988; Skoog, 1957). Hatta belirli koşullarda, lateral kökleri bile sürgün apikal meristemlerine (SAM) farklılaştırabilmektedir (Chatfield et al., 2013; Rossopoff et al., 2017). Hatta, doğrudan organogenesis metodunda

kullanılan sitokinin miktarının azlığının, küçük SAM oluşumuyla sonuçlanması da bu bilgiyi desteklemektedir (Ishida et al., 2008; Tokunaga et al., 2012; Werner et al., 2003). Sitokininin, *Wushal* (*WUS*) geni için de pozitif bir düzenleyici olduğu gösterilmiştir (Gordon et al., 2007). Son gözlemler, sitokinin sinyalizasyonunda sorumlu *type-B ARR*'lerin, *WUS* geninin promotörüne bağlandığını ve ifadesini düzenlediğini göstermektedir (Meng et al., 2017; Wang et al., 2017; Xie et al., 2018; Zhang et al., 2017; Zubo et al., 2017). *WUS*, SAM'lerin merkezindeki organizasyonda ifade olmaktadır ve stem hücre nişlerinin bakımı için önemlidir (Wang et al., 2017). *WUS* ve sitokinin sinyalizasyonu sürgün oluşumu için gereklidir. *wus* ve *arr1/10/12* mutant bitkilerinde sürgün oluşmadığı gözlemlenmiş olması bu bilgiyi desteklemektedir (Meng et al., 2017; Zhang et al., 2017). Ayrıca, *WUS* geninin yanlış dokularda ifadesi de, köklerde SAM oluşumuna neden olmuştur (Gallois et al., 2004; Negin et al., 2017). Yani, sitokinin ve sinyalizasyonu sürgün oluşumu açısından çok önemlidir.

1.4.2. Çiçek Gelişimi

Sitokininin çiçek oluşumu aşamalarında da rol oynamaktadır. Örneğin, *ARR1* ve *ARR10* genlerinin fonksiyonlarının bozulması, kallus formasyonundaki hücrelerden karpel oluşumunu azaltmıştır (Rong et al., 2018). Karpel tanımlama geni olarak bilinen *AGAMOUS* (*AG*) geninin promotör bölgesinde, *type-B ARR*'lerin bağlanabileceği bölgeler yer almaktadır (Rong et al., 2018). *arr1-10-12* mutant bitkilerde az sayıda ovül oluşması da sitokininin çiçek oluşumu üzerine etkisini göstermektedir (Reyes-Alalde et al., 2017). Sitokininin jinekyum gelişimi üzerine olan etkileri daha önceden *Actinidia*'da gösterilmiştir. Bu türde, *SHY GIRL* olarak adlandırılan ve sitokinin sinyalizasyonunda negatif rol oynayan *type-C ARR*'yi geni bulunmaktadır ve bu genin varlığı, erkek organlara zarar vermeden dişi organları öldürmektedir. Bunun sonucunda ise, dikotil bitki oluşur (Akagi et al., 2018).

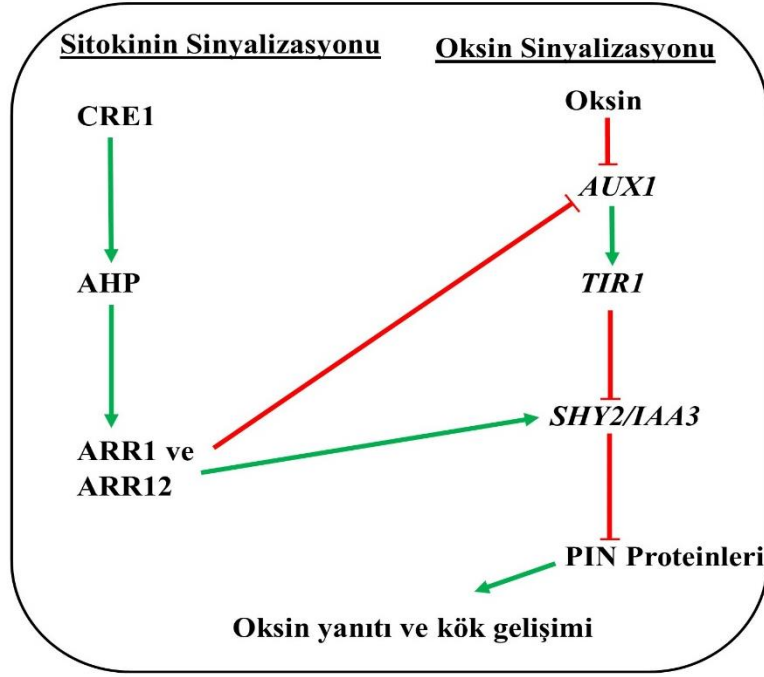
Sitokinin ile ilişkili genler (*ARR* ve *AHP* gibi) açısından mutant bitkilerde genel olarak dişi gametofitler ölmektedirler (Leibfried et al., 2005; Liu et al., 2017; Yuan et al., 2016). *CKI* geni, sitokinin yokluğundaki sitokinin yanıtını düzenleyen bir histidin kinaz'ı kodlamaktadır (Hwang & Sheen, 2001). Bu gen açısından mutant bitkilerde hücre özelleşme sorunları oluşmuştur (Yuan et al., 2016). *Arabidopsis thaliana*'nın *AHP2-3* ve *5* genleri, *CKI*'nin ürününün sinyal ilettiği proteinleri kodlamaktadırlar ve bu yolak hücre özelleşmesini kontrol etmektedir (Liu et al., 2017). *CKI1* geninin

yüksek düzeyde ifade ettirilmesi ise, iki bileşenli sistem’de yer alan genlerin anormal bölgelerde ifade olmasına sebebiyet vermiştir. Bu durum ise, yumurta hücrelerinin, merkezi hücrel şeklinde özelleşmesine sebebiyet vermiştir. Bunun sonucunda, fertilizasyon sırasında, spermiler ile yanlış farklılaşmış yumurta hücrelerinin kaynaşması nedeniyle embriyo oluşamamıştır (Yuan et al., 2016). Buradan anlaşılacağı gibi, sitokinin ile ilişkili genler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, dişi gametofit gelişimi etkilenmiştir. Yani, sitokininin bu gelişim sırasında da etkisi olduğu söylenebilir.

1.4.3. Kök Gelişimi

Arabidopsis thaliana’nın kökleri, vasküler dokularda, iki tane floem ile sarılmış ksilem ve arada prokambiyum hücreler ile bilateral simetri göstermektedir. Bu düzenlenmiş yapılarda, ksilem içerisinden oksin akışı olurken floem’lee içerisinden ise sitokinin akışı olmaktadır. Damarlarda oluşan bu bilateral karakterin nedeni ise, oksin ve sitokinin etkileşimidir (Mähönen et al.). Ek olarak, prokambiyal hücrelerdeki sitokinin sinyalizasyonu, PIN proteininin ifadesini ve lokalizasyonunu düzenleyerek, oksin yolağını etkilemektedir (Bishopp et al., 2011). Matematiksel modelleme ile bu etkileşimin bilateral simetri elde etmek için yeterli olduğu gösterilmiştir (De Rybel et al., 2014; el-Showk et al., 2015; Mellor et al., 2017; Muraro et al., 2013). Sitokinin’in, PIN proteinin lokalizasyonunu değiştirerek ve böylece oksin birikimini kısıtlayarak, lateral kök gelişiminin başlamasına olumsuz etkisi olduğu bilinmektedir (Laplaze et al., 2007; Moreira et al., 2013).

Sitokinin, köklerin boyuna uzamasını da kontrol etmektedir (Wybouw & De Rybel, 2019). Sitokinin, kök meristemlerine taşınan oksin miktarını negatif yönde etkileyerek, kök meristem ucu boyutunu düzenleyebilmektedir. Sitokinin, *ARR1* ve *ARR12* üzerinden, *SHY2/IAA3* genlerini indükleyerek, oksin aktivitesini baskılayabilmektedir. *SHY2/IAA3*, PIN proteinlerini negatif şekilde regüle ederek, oksinin yeniden dağılımına neden olmaktadır (Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010; Tian et al., 2002). Oksin, *SHY2/IAA3*’ün degradasyonuna neden olarak, oksin sinyalizasyonunu başlatmaktadır (Ioio et al., 2008). Buradan, sitokininin oksin ile etkileşiminin sonucu olarak, kök meristemi boyutlarına da etkisi olduğu anlaşılmaktadır.



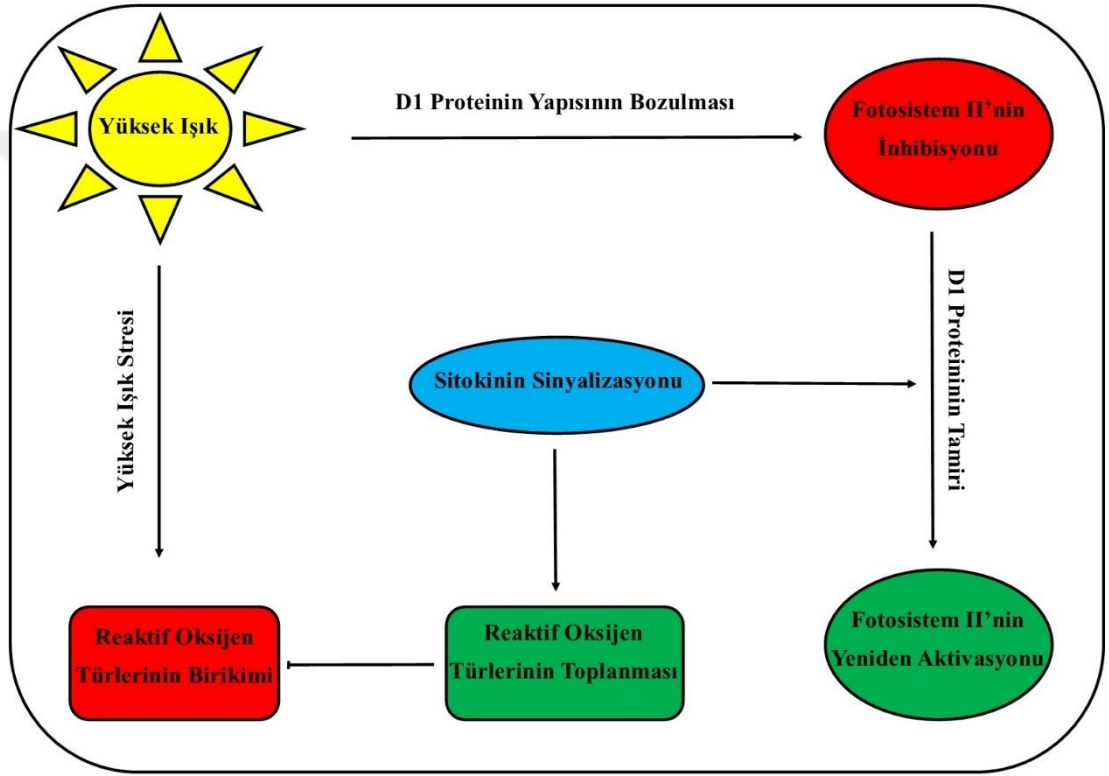
Şekil 1.3 Sitokinin-oksın etkileşiminin kök gelişimi üzerine etkisi

Bitkiler ve topraktan azotu fikse eden bakterilerin mutual ilişkisi sonucu, köklerde oluşan yapıya kök nodülleri adı verilmektedir. Bu birlikteliğin kurulmasıyla sitokinin arasında önemli bir bağ bulunmaktadır (Wybouw & De Rybel, 2019). *Medicago truncatula* ve *Lotus japonica* bitkilerinin, azotu fikse eden bakterilerle inokülasyonu sonucu, bakteriyle etkileşime girmiş köklerde, sitokinin biyosentezi ve sinyalizasyonunun arttığı görülmüştür (Chen et al., 2014; Lohar et al., 2004; van Zeijl et al., 2015). *Lotus japonica*'nın, sitokinin sinyalizasyonu ile ilişkili (*histidine kinase*) genlerinin susturulmasının ardından, bitkiler *Mesorhizobium loti* ile inoküle edilmiş ve inokülasyon başarılı olmuş ancak nodül oluşumu görülmemiştir (Held et al., 2014). Burdan anlaşılması gereken, sitokininin bakterinin bitkiyle temasını artırmada değil, nodül oluşumu üzerinde etkisi olduğudur. Hatta, bazı nodülasyon faktörleri, sitokinin yolağının ilerisinde yer almaktadır (Ariel et al., 2012).

1.4.4. Sitokinin ve Abiyotik stres ilişkisi

Abiyotik stres koşullarına yanıtta bitki büyüme düzenleyicilerinin birbirleri arasındaki ilişki önemlidir. Çünkü, bu büyüme düzenleyicileri birbirleri ile aynı yönlü veya ters yönlü ilişkiler göstererek, bazı stres koşullarına karşı bitki yanıtını düzenlemektedirler. Bir bitki büyüme düzenleyicisi olan sitokinin de bu noktada diğer büyüme düzenleyicileri ile etkileşim göstererek, stres koşullarına yanıtta önemli role

sahiptir. Örneğin protein D1, foto sistem II'nin merkezinde bulunan bir reaksiyonun parçasıdır ve ışık stresi doğrudan bu proteine hasar vermektedir (Edelman & Mattoo, 2008). Sitokinin seviyeleri azalmış bitkilerde ışık hasarına karşı korumada azalma ve azalan D1 proteini nedeniyle ışık kaynaklı inhibisyonun arttığı görülmüştür (Cortleven et al., 2014). Ayrıca, sitokinin açısından mutant bitkilerde, ışık stresi kaynaklı inhibisyonun düzelmesinin azaldığı görülmüştür. Dahası, sitokinin eksikliği bazı bitkilerde antioksidan kapasitenin azalmasına da neden olmuştur. Kısacası, ışık stresi altında, sitokinin varlığı önemlidir (Cortleven et al., 2014).

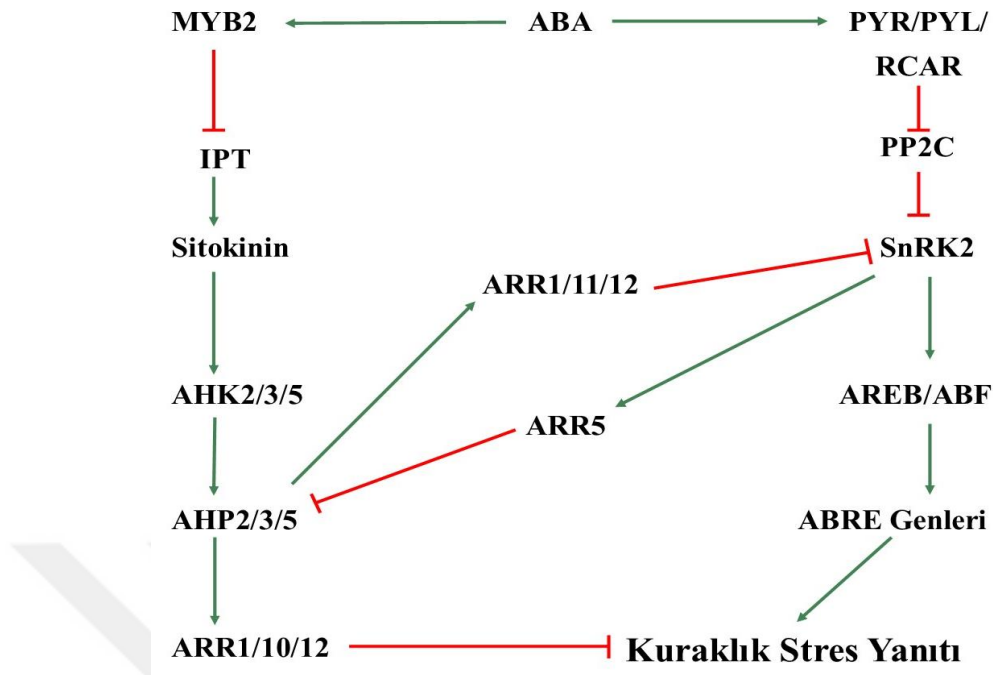


Şekil 1.4 Yüksek ışık stresi, sitokinin sinyalizasyonu ve fotosistem II arasındaki etkileşim

Sitokinin ile soğuk stresi arasındaki ilişki tam net olmamakla beraber, soğuk stresi altında bitkilerde sitokinin sinyalizasyonu ve sitokinin miktarının azaldığı bilinmektedir. Bu durum ise, soğuk stresi altındaki bitkilerin gelişiminin yavaşlamasını açıklamaktadır (Maruyama et al., 2014). Ancak, *Arabidopsis thaliana*'da yapılan bir çalışmada, dışarıdan sitokinin uygulaması donmayan karşı toleransı arttırmıştır (Jeon et al., 2010). Bir diğer taraftan ise, *Arabidopsis* CK reseptörleri (*ahk2*, *ahk3*, *cre1*) bakımından mutant bitkiler donmaya karşı tolerans göstermiştir. Buradan yola çıkarak anlaşılan, soğuk stresinin bu reseptörleri, sitokinininden bağımsız olarak aktive ettiğidir (Jeon et al., 2010).

Sıcaklık stresi ile sitokinin ilişkisinde ise, sıcaklık stresi reaktif oksijen türlerinin üretilmesine neden olarak, hücre içerisindeki proteinlerin yapısını bozmakta ve negatif olarak fotosentetik kapasiteyi etkilemektedir. Sıcaklık şoku proteinleri, sıcaklık stresi altındaki bitkilerde, proteinlerin yapısının korunmasını sağlayan şaperonlardır (Mittler et al., 2012). Sıcaklık stresi, bitkilerde sitokinin miktarının azalmasına neden olmaktadır (Hare et al., 1997). Sitokinin uygulanması ise, sıcaklık toleransını arttırmaktadır. Örneğin, sitokinin miktarı artırılmış bitkilerde, sıcaklık stresinin, kloroplast gelişimi ve fotosentez üzerine olan inhibe edici etkisinde azalma görülmüştür (Caers et al., 1985; Liu & Huang, 2002). Ayrıca, sitokinin miktarının artırılması, daha yüksek antioksidan aktivitenin oluşmasıyla da sonuçlanmıştır (Harding & Smigocki, 1994; Veerasamy et al., 2007; Xu et al., 2010; Xu et al., 2009).

Su kıtlığı ile mücadele etmek ve bu gibi koşullara dayanıklı bitki geliştirmek, bitkiler için hayati öneme sahiptir. Su kullanımının optimize edilmesi için kök gelişiminin veya terlemeyi önlemek için stoma açıklığının ve hücre membranının düzenlenmesi gibi çeşitli mekanizmalar mevcuttur (Feng et al., 2016; Zhu, 2016). Kuraklık stresine yanıt çoğunlukla ABA ile ilişkilidir. ABA, kuraklık altında birikerek, PYR1, PYL ve RCAR gibi reseptörlere bağlanır. ABA-PYR/PYL kompleksi, protein fosfataz 2C'yi (PP2C) inhibe etmektedir. PPC iki ise aktif halde olması durumunda, SnRK2'den fosfat grubu kopararak, inaktif hale getirmektedir. SnRK2'nin aktif olması durumunda, bu protein AREB ya da ABD gibi ABA yanıt elementlerini fosforilasyon yoluyla uyarmaktadır. Bunun sonucunda da, kuraklık yanıt genleri uyarılmaktadır (Joshi et al., 2016; Miyakawa et al., 2013). Kuraklığa bir diğer yanıt ise, ABA'dan bağımsız şekilde gerçekleşir ve büyüme düzenleyicisi faktör 7'yi (GRF7) barındırmaktadır (Kim et al., 2012; Liu et al., 1998). Kuraklık, genellikle, sitokinin miktarının azalmasına neden olmaktadır (Ghanem et al., 2008; Nishiyama et al., 2011; Todaka et al., 2017). Sitokinin yanıt genlerinin ifadelerinin artırılması, kuraklığa karşı toleransın azalması ile sonuçlanmıştır (Nguyen et al., 2016; Nishiyama et al., 2011; Nishiyama et al., 2013; Tran et al., 2007). Sitokinin miktarlarının azalması genelde iki sonucu doğurmaktadır. Bunlardan biri, ABA'ya karşı hassasiyetin artması diğeri ise, sürgün oluşumunun azalmasıdır (Riefler et al., 2006; Tran et al., 2007; Werner et al., 2003).



Şekil 1.5 ABA ve Sitokinin ilişkisinin kuraklık stresi üzerine etkileri (Kırmızı renkli ok negatif regülasyon, yeşil renkli ok pozitif regülasyonu temsil etmektedir)

Bitkilerde tuz stresine maruz kaldıklarında su kaybı yaşamaktadırlar. Bunun nedeni, tuzlu topraklarda ozmolaritenin yüksek olması sonucu, köklerin toprakta bulunan suyu alamaması ve reaktif oksijen türlerinin çokça üretilmesidir (Mahajan & Tuteja, 2005; Munns, 2002). Bitkiler, kuraklık stresinde olduğu gibi, tuz stresine de benzer yanıt mekanizmaları ile yanıt vermektedir. Bunlara örnek verilecek olursa, su kaybını azaltmak amacıyla, stomaların kapanması, büyümenin yavaşlatılması veya iyon stresine karşı korumanın geliştirilmesi söylenebilir (Munns & Tester, 2008). Tuz stresine yanıt, özellikle ABA olacak şekilde bitki büyüme düzenleyicileri tarafından düzenlenmektedir ve ABA'nın bu strese karşı rolü pozitifdir (Zhu, 2002). Genelde sitokinin, tuz stresine karşı negatif etki göstermektedir. Örneğin, sitokinin açısından mutant bitkiler, mutant olmayan bitkilere kıyasla tuz stresini daha fazla tolere edebilmişlerdir (Nishiyama et al., 2011). Ayrıca, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, *IPT8* geninin ifadesinin artırılması, bu bitkilerin tuzlu koşullara adaptasyon yeteneğini azaltmış ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırmıştır (Wang et al., 2015). Buna karşın, domates bitkisinde, kuraklık stresi altında, sitokinin degradasyon inhibitörü (INCYDE) uygulanmış, bunun sonucunda fotosentetik kısım korunmuş ve çiçek oluşumu artmıştır (Aremu et al., 2014). Sitokininin, tuz stresi altındaki olumsuz

etkisi, tuza karşı hassas çeltik çeşidinde de gösterilmiştir. *OsCKX2* geninin ifadesi baskılanmış ve sonuç olarak sitokinin seviyeleri artmıştır. Bunun sonucunda ise, tohum verimi artmış ve tuz stresi altındaki verim düşüşü azalmıştır (Ashikari et al., 2005; Joshi et al., 2018).

Toprakta besin eksikliği strese yol açmakta ve bu durum, Sitokininin de dahil olduğu çeşitli yanıt mekanizmalarını uyarmaktadır (Pavlú et al., 2018). Toprakta besin bulunması kök sistem mimarisini etkilemekte ve sitokinin, kök sistem mimarisinin, toprakta bulunan besinlere yanıtını düzenlemektedir (Koevoets et al., 2016). Hem sitokinin hem de sinyalizasyonu kök sistem mimarisini düzenlenmesine dahil olmaktadır (Bielach et al., 2012; Chang et al., 2013, 2015). Sitokinin, çeşitli taşıyıcı genlerin ifadesini (Brenner et al., 2005; Werner et al., 2010) ve hücreler arası geçişi düzenler (Andersen et al., 2018). Bu sayede, besinlerin alınmasını sağlar. *Arabidopsis* bitkisinin fosfat eksikliğinde ki yanıtının incelendiği bir çalışmada, bu eksikliğin durumunda sitokinin sinyalizasyonunun çok gerekli olduğu ortaya koyulmuştur (Franco-Zorrilla et al., 2002). Sitokininin kükürt alımını, kükürt taşıyıcı genlerinin ifadesini düşürerek negatif regüle ettiği gösterilmiştir (Maruyama-Nakashita et al., 2004). Benzer şekilde, demir alımını sağlayan genleri de baskılayarak, demir dengesini de bozmaktadır (Séguéla et al., 2008). Ayrıca, sodyum taşıyıcı gen olan *HKT1*'in ifadesini düzenleyerek, sodyum birikiminde rol oynamaktadır (Mason et al., 2010). Sitokinin, arsenik stresine adaptasyonda da önemli bir düzenleyicidir (Mohan et al., 2016). Sitokinin miktarı azaltmış *Arabidopsis* bitkileri, mutant olmayan bitkilere kıyasla, arsenik stresini daha fazla tolere edebilmişlerdir (Mohan et al., 2016). Buna karşın, bir diğer toprak kontaminasyon kaynağı olan selenyuma karşı ise, yüksek sitokinin seviyelerinin tolerans sağladığı gösterilmiştir (Lehotai et al., 2012).

Sonuç olarak, sitokinin biyosentez ve sinyalizasyonu çeşitli abiyotik stres durumları altında, bitkinin yanıt mekanizmalarını düzenlemektedir.

1.5. Genom Düzenleme

Son 30 yılda, genom düzenleme açısından önemli yaklaşımlar geliştirilmiştir (Bortesi & Fischer, 2015; Puchta & Fauser, 2014). CRISPR/Cas9 teknolojisi geliştirilmeden önce, genom düzenleme çalışmaları, çinko parmak nükleazları (ZEN) ya da transkripsiyon aktivatörü benzeri etkileyici nükleazlar (TALEN) gibi, bölgeye uygun nükleazlar aracılığıyla gerçekleştiriliyordu (B. Zhang et al., 2016). Çift zincir kırıklarını oluşturmak için kullanılan iki tip sistem vardır. Bunlardan birincisi, özel bir

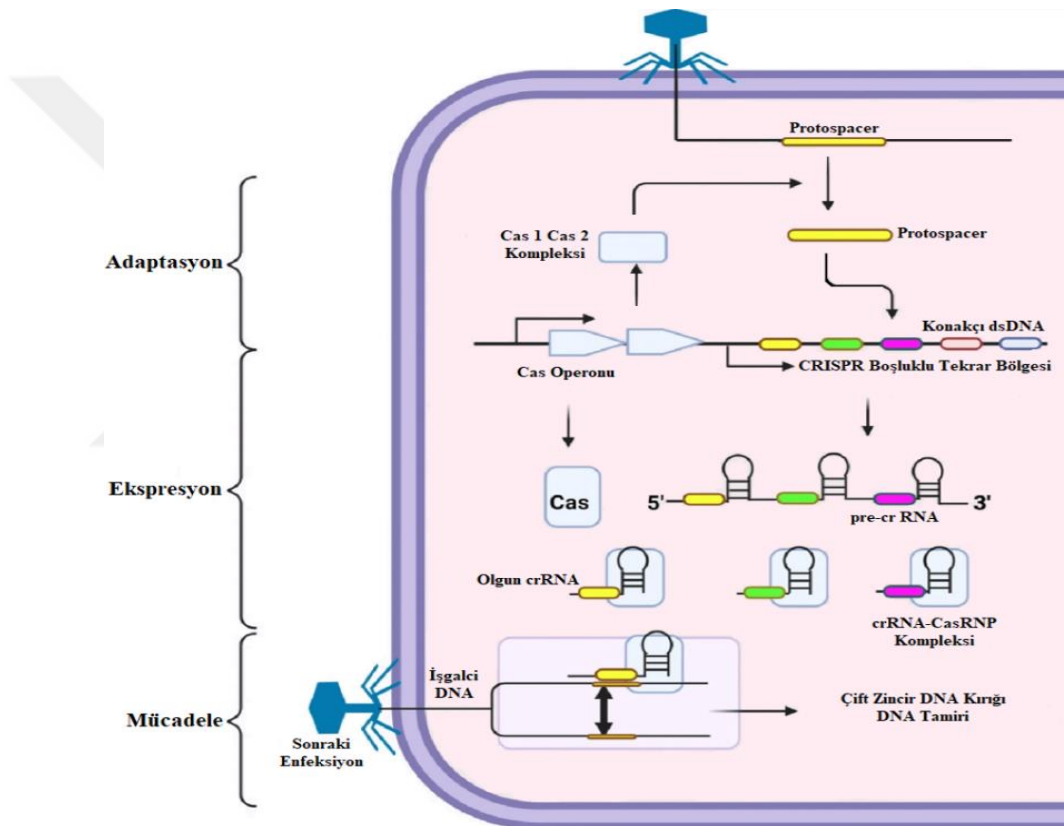
bölgeyi hedefleyebilmek için DNA-protein etkileşiminin yaralanılınan meganükleazları (ZFN ve TALEN) kullanmaktadır (Normile, 2017; Wolfs et al., 2016). İkincisi ise kendi içinde ikiye bölünen sistemdir. Bu iki alt gruptan biri, RNA rehberliğini kullanan CRISPR/Cas9 sistemi (Blasco et al., 2014; Jiang et al., 2016), diğeri ise, peptid nükleik asitleri (PNA), DNA temelli rehber sistemi (SGN) ve üçlü yapı oluşturan oligonükleotidleri (TFO) kullanan diğeri gruptur (Delacôte et al., 2013; Guha & Edgell, 2017; Qiu et al., 2004).

Önceden yapılandırılmış CRISPR/Cas9 ribonükleoprotein (RNP), konakçı hücrelerde yüksek gen ifadesine ihtiyaç duyulmadan veya kodon optimizasyonuna gerek olmadan genom düzenlemeyi sağlamaktadır. RNP'lerin, protoplast hücrelerine doğrudan transferi, yabancı DNA olmaksızın genom düzenlemeye olanak sağlamaktadır (Malnoy et al., 2016). Cas9 RNP'leri, transfeksiyonun ardından, kısa bir sürede DNA'da kırık oluşmasına neden olur ve hücre tarafından degrid edilir (Kim et al., 2014; Yu et al., 2021). Bu sayede, CRISPR/Cas9 sisteminin olumsuz sayılan yönlerinden biri olan, hedef olmayan bölgelerde de kırık oluşturma ihtimalini azaltmış olur. Hedef olmayan bölgelerde kırık oluşmasının nedeni, bu bölgelerin hedef alınan bölge ile olan benzerliğidir. Bazen, Cas9-gRNA kompleksi, gRNA ile tam eşleşmemesine rağmen, DNA üzerinde bulunan bu bölgelere bağlanabilmektedir. Bu olumsuz durumun gerçekleşme ihtimalini azaltmak için çevrimiçi tahmin araçlar mevcuttur. Bunlara örnek verecek olursak, Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA), Bowtie (Langmead et al., 2009), CCTop (Stemmer et al., 2015) ve Cas-OFFinder (Bae et al., 2014). CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak yapılan gen manipölasyonlarına örnek verecek olursak, domates'in *Solyc04g008420* erişim numaralı genini, CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak susturan Gökdemir ve arkadaşları (Gökdemir et al., 2022), erkek kısır bitki elde etmişlerdir.

1.5.1. CRISPR/Cas9'un Mekanizması

Geçtiğimiz yirmi yılda, prokaryotların kalıtsal bir bağışıklık sistemi olduğunun bulunması, mikrobiyoloji açısından çok önemli bir buluş olmuştur (Hille et al., 2018). CRISPR/Cas9 sistemi, bakteri ve arkelerde, bu organizmaları fajlara karşı koruyan, immün sistemi bileşeni olarak tanımlanmıştır (Barrangou et al., 2007). CRISPR sistemi, viral genomik parçalarının tandem tekrarları, bakteri hücrelerinde belirli aralıklarla dizildiği fark edilerek keşfedilmiş ve bir fenomen haline gelmiştir (Jansen et al., 2002). Bu diziler ilk olarak *E.coli* bakterisinde, 29 nükleotidlik dizilerin 32

nükleotidlik boşluklarla ayrı olduğunun fark edilmesi üzerine keşfedilmiştir (Ishino et al., 1987). Daha sonra, benzer diziler çeşitli bakteri ve arkelerde de keşfedilmiştir (Mojica & Rodriguez-Valera, 2016). Bakteri hücresi, kendisini enfekte eden faj DNA'sını, kendi genomunda bulunan CRISPR bölgesine ekleyerek, bir daha ki enfeksiyon sırasında fajı tanıyabilmektedir (Corte et al., 2019; Hille et al., 2018). Cas9 proteini, genoma eklenen crRNA ve trRNA birleşerek, faj bakteriyi tekrar enfekte ettiği zaman bu faj'ın DNA'sını tanıyabilir ve o bölgeye bağlanarak, faj DNA'sında çift zincir kırıklarına neden olur (Shivram et al., 2021).



Şekil 1.6 CRISPR sisteminin bakterilerde savunma mekanizması olarak işleyişi

Bakteri hücresi, bakteriyo faj tarafından enfekte edildiği zaman, bu bakteriyo faj'ın DNA'sı Cas1 Cas2 kompleksi tarafından tanınarak, bakteri genomu içerisinde bulunan CRISPR bölgesine eklenir. Bu bölgeye eklenen ve faj'a ait DNA buradan transkripsiyona uğrayarak öncül crRNA'ya dönüşür ve ardından Cas proteini ile birleşerek, bakteri hücresinin aynı faj tarafından tekrar enfekte edilmesi durumunda, Cas proteinine öncülük ederek ve Cas proteininin oraya bağlanmasını ve faj DNA'sında çift zincir kırıkları oluşturmasını sağlar. Bu zincir kırıkları üç şekilde tamir

edilmektedir. Bunlar; homoloji temelli DNA tamiri (HDR), homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve mikrohomojoloji temelli uç birleştirme (MEEJ) şeklindedir (Shan et al., 2013; D. Zhang et al., 2016). Bunlardan NHEJ ve MEEJ, DNA tamir şablonu olmadığı durumlarda DNA'yı hızlıca birleştirerek mutasyona neden olmaktadır. Ancak, HDR ise şablon bir DNA bulunması durumunda hasarlı bölgenin o şablon DNA'ya bakılarak tamir edilmesi şeklindedir.

Sonuç olarak CRISPR/Cas sistemi bakteri genomları için koruyucu özelliktedir. Bu özelliği genom düzenleme çalışmaları için düzenlenerek, bu sistemlere uygun hale getirilmiştir.

1.5.2. CRISPR/Cas9 Sisteminin Bitki Genom Düzenlenmesinde Kullanımı

CRISPR/Cas9 sisteminin, bitki genomuna entegrasyonu için çoğunlukla *Agrabacterium* aracılı transformasyon sistemi kullanılmaktadır. Bunun nedeni, ilgili DNA kasetinin az sayıda kopyasının gönderilmek istenmesi ve gen tabancası gibi metotlardan daha az maliyetli olmasıdır. Çünkü bu kasetin içinde bulunan CRISPR/Cas9 sisteminin hedeflenen bölgede mutasyon oluşturduktan sonra, gereksiz olacağı varsayılırsa, gönderilecek gen kasetinin bitki genomuna çok sayıda girmesi durumunda, kaset içerisinde bulunan genlerin ifadesi bitki hücrelerine ekstra yük olacaktır. Yapılan bir gözlemden, CRISPR/Cas9 sistemi ile elde edilen transgenik bitkilerde, bu sisteminin %75 (24/32) oranında, hedeflenen genler'in her iki allelinde de mutasyon oluşturduğu tespit edilmiştir (Watanabe et al., 2017).

1.6. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, hem domates bitkisinde Histidine-containing phosphotransfer proteinini (AHP) kodlayan *Solyc01g080540* (AHP1) ve *Solyc06g084410* (AHP2) genlerinin fonksiyonlarının araştırılması, hem de sitokinin ile ABA arasındaki ters ilişkiden faydalanılarak, kuraklık koşullarına tolerans gösterebilen bitki geliştirmektir. AHP genlerinde oluşan mutasyon sonucu, kuraklık koşullarına toleransın arttığı, farklı organizmalarda gösterilmiştir. Örneğin, *Arabidopsis thaliana* bitkisinin, AHP2, AHP3 ve AHP5 proteinlerinin, kuraklığa tolerans'ta negatif düzenleyici olduğu (Nishiyama et al., 2013). Başka bir çalışmada ise, çeltik bitkisinde, AHP genleri RNAi teknoloji kullanılarak baskılanmış ve bunun sonucunda lateral kök oluşumu artmış, kuraklık toleransı artmış ve tuzluluk hassasiyeti oluşmuştur (Sun et al., 2014). Domates bitkisinde AHP genleri dair çalışmaların yetersizliği, bu tezin özgün değerini

oluşturmaktadır. Bu çalışmanın sonunda elde edilecek olan, *AHP* genleri açısında mutant bitkilerde kuraklık toleransı beklenirken aynı zamanda, normal koşullar altında gelişiminin yavaşlaması, çimlenme süresinin uzamasıdır. Bu tezin ıktıları literatürde ilk olup, bilimsel gelişmelere katkı sağlayacaktır.



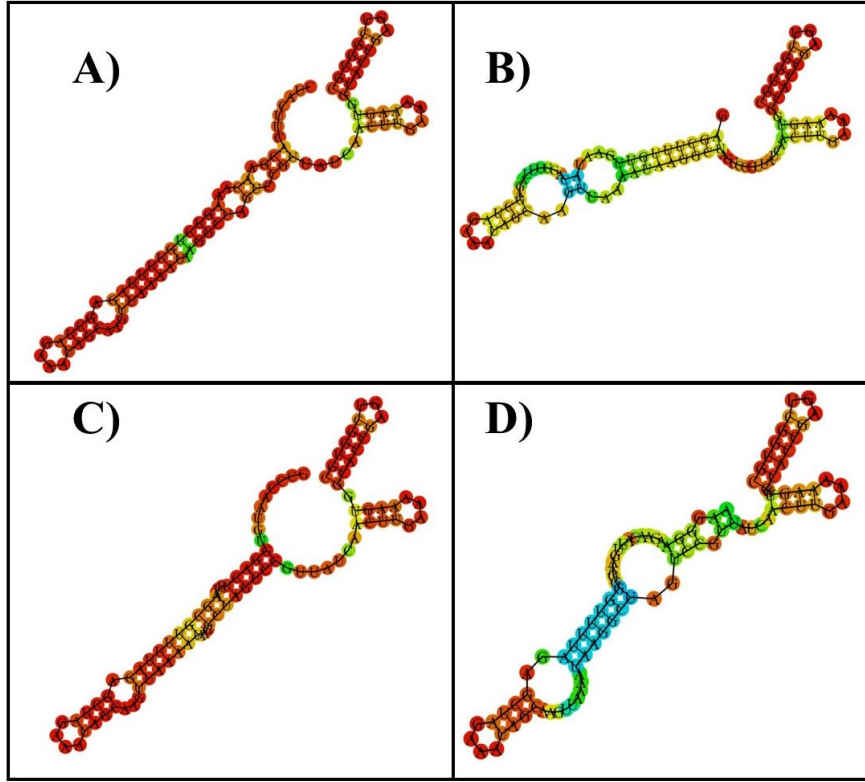
2. MATERYAL VE METOT

2.1. Biyoinformatik Analizler

İlgili *AHP* genlerinin absisik asit yolağı ile ilişkisini inceleme için protein-protein interaksyonu (PPI) analizi yapılmıştır. Bu analiz için STRING PPI aracı kullanılmıştır. Sitokinin ve absisik asit sinyalizasyonundan sorumlu genlerin protein dizilerine “Phytozome” veri tabanı kullanılarak ulaşılmış ve bu diziler STRING PPI aracına yüklenip, güvenilirlik skoru 0,4’e ayarlanarak sonuçlar analiz edilmiştir.

2.2. gRNA’ların Dizayn Edilmesi

Phytozome veri tabanından alınan *AHP* genlerinin (*Solyc01g080540* ve *Solyc06g084410*) dizi bilgileri alınıp, CRISPR P2 ve chopchop gRNA dizayn etme araçları kullanılarak, etkinlikleri yüksek (chochop etkinliği: 50<, CRISPR P2 on-score: 0.4<) ve hedef dışı bölgelere bağlanma riski az olan gRNA’lar araştırıldı. Bu amaçla *Solyc01g080540* geni için, “GCCCAATGTGGACTTTAAGC” (gRNA 1) ve “GAGCTTTGTTGAATACA” (gRNA 2), *Solyc06g084410* geni için ise, “CTACTTCACGAACAAAGTCT” (gRNA 3) ve “AAGGGAAGAACATTGAAGGG” (gRNA 4) gRNA’ları seçildi. Seçilen gRNA’lar için CRISPR P2 on-score dereceleri 0,5’in üzerinde olanlar alınmaya çalışıldı. Ayrıca gRNA’ların, gRNA scaffold ile oluşturacağı ikincil yapılar, bazı RNA ikincil yapı tahmin etme araçları kullanılarak önceden tahmin edilmeye çalışıldı. Burda amaç, gRNA ve scaffold yapısının, etkin bir genom düzenleme işlemi için uygun yapıda olup olmadıklarını önceden tahmin etmektir. Seçilen gRNA’ların etkinlikleri sırasıyla, 0,6183, 0,5284, 0,4709 ve 0,2404 şeklindedir.



Şekil 2.1 AHP genlerini hedef alan gRNA'ların, gRNA scaffold ile oluşturması muhtemel ikincil yapıları; A) gRNA 1, B) gRNA 2, C) gRNA 3, D) gRNA 4

2.3. Golden Gate Klonlama

Seçilen gRNA'lar, golden gate klonlama metoduna göre, 5' ve 3' uçlarına bu metoda uygun olacak şekilde bir dizi nükleotid eklenerek sentezlenmeye gönderildi.

Tablo 2.1 Golden Gate Klonlamaya Uygun Şekilde İçerisinde gRNA'ları Bulunduran Oligolar

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
DT1-BsF	AATAATGGTCTCTATTGGCCCAATGTGGACTTTAAGCGTT
DT1-F0	TGGCCCAATGTGGACTTTAAGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
DT2-BsF2	AATAATGGTCTCTAGATTGGAGCTTTGTTGAATACAGTT
DT2-F0	TGGAGCTTTGTTGAATACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
DT3-BsF3	AATAATGGTCTCTGTGATTGCTACTTCACGAACAAAGTCTGTT
DT3-F0	TGCTACTTCACGAACAAAGTCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
DT4-R0	AACAAGGGAAGAACATTGAAGGGCAATCACTACTTCGACTCTAGCTGTAT

DT4- BsR	ATTATTGGTCTCTAAACCCCTTCAATGTTCTTCCCTT
-------------	---------------------------------------

Sentezlenen primerler, molaritesi 100 μ M olacak şekilde, nükleaz içermeyen steril su kullanılarak çözündürüldü ve stok olarak alındı. Ardından, stok primerlerden 10 μ l alınıp, üzerine 90 μ l nükleaz içermeyen su eklenerek, 10 μ M'a seyreltilti. Daha sonra, uygun DNA parçalarını elde etmek için DT1T2 (addgene: 50590), DT2T3 (addgene: 50591) ve DT3T4 (addgene: 50592) vektörleri ve uygun oligolar kullanılarak PCR yapıldı. PCR bileşenleri ve reaksiyon koşulları aşağıda verilmiştir.

Tablo 2.2 DT1 PCR Bileşenleri

Bileşen	Son Konsantrasyon
5x Phusion HF Buffer	1x
10mM dNTP	0.2 mM
DT1-BsF	0.5 μ M
BsR2	0.5 μ M
DT1-F0	0.025 μ M
Phusion Polimeraz	0.5 μ l
DT1 Plazmit	10 ng
Nükleaz içermeyen distile su	50 μ l'ye tamamlandı

Tablo 2.3 DT2 PCR bileşenleri

Bileşen	Son Konsantrasyon
5x Phusion HF Buffer	1x
10mM dNTP	0.2 mM
DT2-BsF	0.5 μ M
BsR2	0.5 μ M
DT2-F0	0.025 μ M
Phusion Polimeraz	0.5 μ l
DT2 Plazmit	10 ng
Nükleaz içermeyen distile su	50 μ l'ye tamamlandı

Tablo 2.4 DT3T4 PCR Bileşenleri

Bileşen	Son Konsantrasyon
5x Phusion Buffer	1x
10mM dNTP	0.2 mM
DT3-BsF	0.5 μ M
DT3-F0	0.025 μ M
DT4-R0	0.025 μ M
DT4-BsR	0.5 μ M
Phusion Polimeraz	0.5 μ l
DT3T4 Plazmit	10 ng
Nükleaz içermeyen distile su	50 μ l'ye tamamlandı

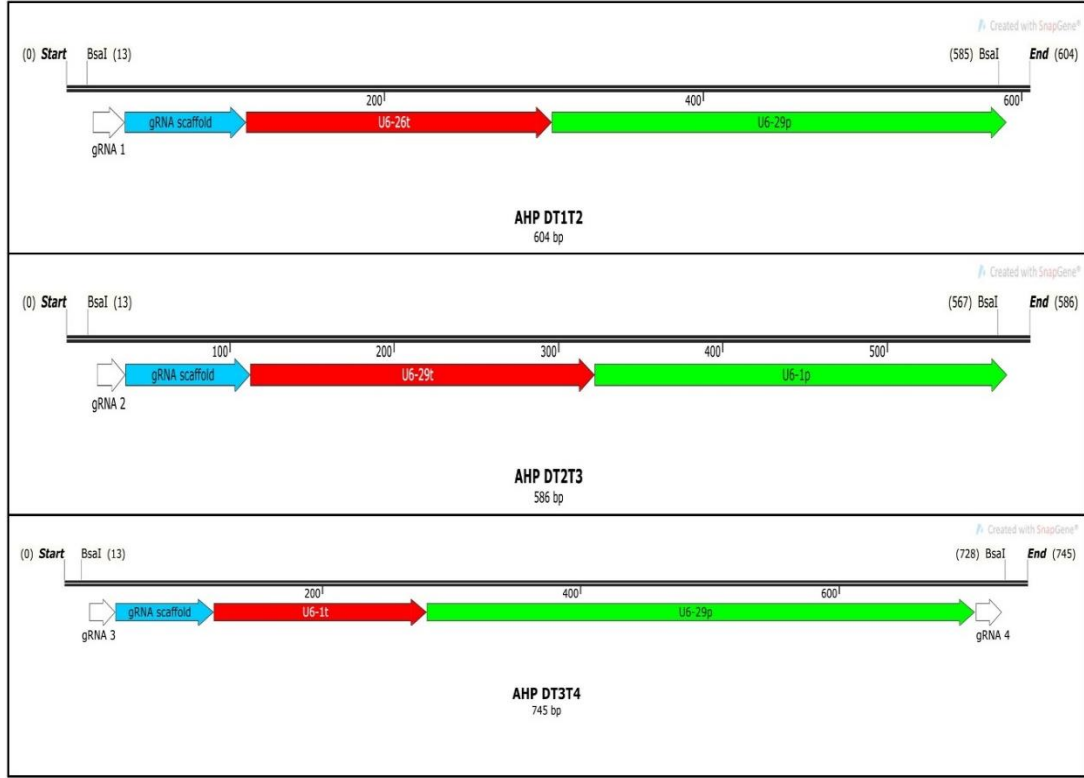
Tablo 2.5 D1, DT2 ve DT3T4 PCR reaksiyonlarının koşulları

Aşama	Sıcaklık ve Süre
İlk Denatürasyon	98 °C'de 30 saniye

Denatürasyon	34x	98 °C'de 10 saniye
Bağlanma		68 °C'de 30 saniye
Uzama		72 °C'de 17 saniye
Son uzama		72 °C'de 8 dakika
Tutma		4 °C'de ∞

Polimeraz zincir reaksiyonunun ardından elde edilen fragmentler, agaroz jel elektroforezi (0,8%) işlemiyle büyüklüklerine göre ayrılarak jelden kesim işlemi yapıp izole edilmişlerdir. İzolasyon işlemi için, ‘‘Favorgen gel extraction kit’’ kullanılmıştır ve kit’e ait protokol izlenmiştir. Protokol’e göre, öncelikle istediğimiz fragmenti içeren jel bölgesi en çok 300 mg olacak şekilde kesilerek mikrosantrifüj tüpü içerisine alınmıştır. Ardından, üzerine 500 µl FADF tamponu eklenerek, 55 °C’de 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu süre boyunca her 2-3 dakikada bir, tüpler vorteks işlemi ile karıştırılarak, jel iyice çözündürülmüştür. Daha sonra tampon ve jel karışımının sıcaklığı, oda sıcaklığına düşene kadar bekletilmiştir. Karışım soğuduktan sonra, en çok 800 µl olacak şekilde FADF kolonu üzerine eklenmiş 11000 x g’de 30 saniye santrifüj ile çöktürüldükten sonra altta kalan kısım dökülmüştür. FADF kolonunun üzerine 750 µl yıkama tamponu eklenerek, 11000 x g’de 30 saniye santrifüj ile çöktürülmüş ve yine kolonun altında kalan kısım dökülmüştür. Kalan sıvının da uzaklaştırılması adına, 18000 x g’de 3 dakika daha santrifüj işlemi ile çöktürme yapılmış ve son aşama olarak, kolon üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su eklenerek, saflaştırılmış DNA, 18000 x g’de 1 dakika santrifüj yapılarak çöktürülerek kolondan alınmıştır.

Ardından izole edilen DNA fragmentleri, ‘‘Golden Gate Cloning Method’’ reaksiyonu ile pHSE401 (addgene ID: 62201) bitki ifade vektörüne klonlanmıştır. Klonlama işlemi için kurulan reaksiyon aşağıdaki tabloda verilmiştir.



Şekil 2.2 DT Polimeraz zincir reaksiyonları sonucu oluşan DNA fragmentleri

DT polimeraz zincir reaksiyonları ile oluşan fragmentlerin uçlarına BsaI kesim enziminin tanıyabileceği ve birbirlerine bağlanabilecek uçlar eklenmiştir.

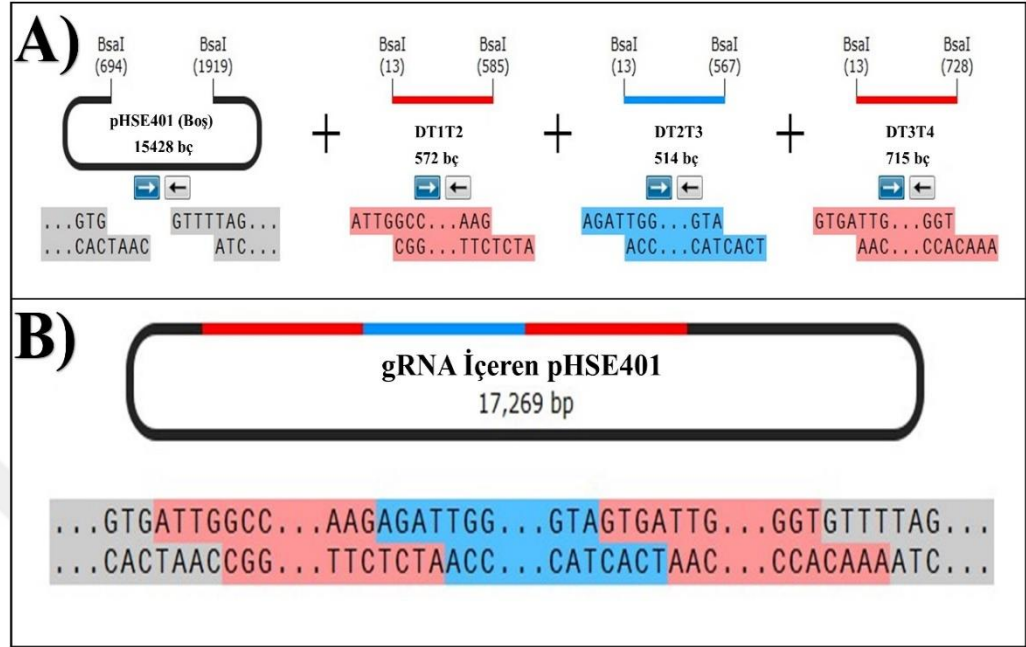
Tablo 2.6 Golden Gate Klonlama Bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyon
DT1T2 Fragment	60 ng
DT2T3 Fragment	60 ng
DT3T4 Fragment	60 ng
pHSE401 Plazmit	100 ng
10x Bsa1 Buffer	1.5 µl
10x T4 DNA Ligaz Buffer	1.5 µl
BsaI	1 µl
T4 DNA Ligaz	2.5 µl
Nükleaz içermeyen distile su	20'ye tamamlandı

Tablo 2.7 Golden Gate Klonlama Reaksiyonu Koşulları

Sıcaklık	Süre
37 °C	5 dakika
16 °C	5 dakika
60 °C	5 dakika
80 °C	20 dakika
4 °C	∞

Klonlama işleminde, BsaI enziminin tanıyıp kestiği bölgeler sonucu birbirleri ile uyumlu uçlar oluşmuştur. Bu uçlar T4 DNA ligaz aracılığıyla birleşmiştir. Daha sonra elde edilen plazmit, kompetan *E. coli dh5α*'ya ısı şoku yöntemiyle klonlanmıştır.



Şekil 2.3 A) BsaI kesimi sonucu oluşan uçlar, B) Kesim sonucunda birbiri ile uyumlu uçların bağlanması

2.4. Kompetan *E. coli dh5α*'nın Hazırlanması ve Plazmitin Transformasyonu

E. coli dh5α bakterisi stoktan alınarak, katı LB ortamına çizgi ekim tekniğiyle ekilmiştir. Bir gece sonra, büyüyen bakterilerden tek koloni seçilerek, 10 ml LB içeren sıvı besiyerinde büyütülmüştür. Daha sonra, sıvı kültürden 1 ml alınıp erlen içerisine eklenmiş ve OD600 değeri 0,6 olana kadar inkübe edilmiştir. Bu sırada, hücreleri kompetan hale getirmek için gerekli olan 50 ml tampon 1 (potasyum asetat 30mM, rubidyum klorür 100mM, kalsiyum klorür 10mM, gliserol 8.6 ml) ve 50 ml tampon 2 (MOPS 10 mM, rubidyum klorür 10 mM, kalsiyum klorür 75 mM, 8.6 ml) çözeltiler hazırlanmış ve filtre sterilizasyon yoluyla filtre edilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşan bakteri kültürü inkübasyondan alınarak, 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından, bakteriler 50 ml'lik falkon tüplere bölünerek, 4°C'de 3500 rpm'de çöktürülmüştür ve süpernatant kısmı dökülmüştür. Daha sonra, her bir falkon içerisine 5 ml olacak şekilde, bakteriler hafif pipetleme yapılarak çözdürüldü. Ardından, çözdürülen bakteriler 4°C'de ve 5 dakika boyunca çöktürülür ve süpernatant kısmı

dökülmüştür. Çökelek kısmında bulunan bakteri, her bir falkon içerisine 2 ml olacak şekilde yeniden çözündürülmüştür. Çözündürülen bakteriler, önceden buz üzerinde bekletilen, 1.5 ml'lik tüplere, her bir tüpe 100 µl olacak şekilde bölünmüştür. Son olarak, bakteriler sıvı nitrojen yardımıyla dondurulup -80 °C'de saklanmıştır.

-80 °C'den çıkartılan bakteriler, 5 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra, 5µl klonlama ürünü, bakterilerin üzerine yavaşça eklenmiş ve 20 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. 20 dakikanın ardından, önceden 42 °C'ye ayarlanmış olan su banyosu içerisinde 45 saniye kadar bekletilen bakteriler, hızlıca tekrar buz içerisine alınarak, 5 dakika burada bekletilmiştir. 5 dakikanın ardında, bakteri üzerine SOC yenilenme besiyeri (2% tripton, 5% yeast ekstraktı, sodyum klorür 10mM, potasyum klorür 25 mM, magnezyum klorür 10mM, glukoz 20mM, pH: 7) eklenerek 2 saat ve 37 °C'de 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Ardından, bakteriler, 50mg/L kanamisin içeren katı LB besiyerine yayılmıştır ve 37 °C'de 12 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, oluşan kolonilerden 5 tanesi seçilerek, 10 µl nükleaz içermeyen distile su içerisinde çözündürülmüştür ve koloni polimeraz zincir reaksiyonu yapılmıştır.

Tablo 2.8 *E.coli* bakterilerinden koloni PCR

Bileşen	Miktar
U6-1T-R	1.25 µl
U6-29P-F	1.25 µl
Koloni	2 µl
Taq2x Master Mix	12.5 µl
Nükleaz içermeyen distile su	8 µl

Tablo 2.9 *E.coli* bakterilerine yapılan koloni PCR koşulları

Aşama	Süre ve sıcaklık
İlk Denatürasyon	1 dakika ve 95 °C
Denatürasyon	30 saniye ve 95 °C
Bağlanma	45 saniye ve 54 °C
Uzama	65 saniye ve 68 °C
Son Uzama	5 dakika ve 68 °C
Tutma	4 °C ve ∞

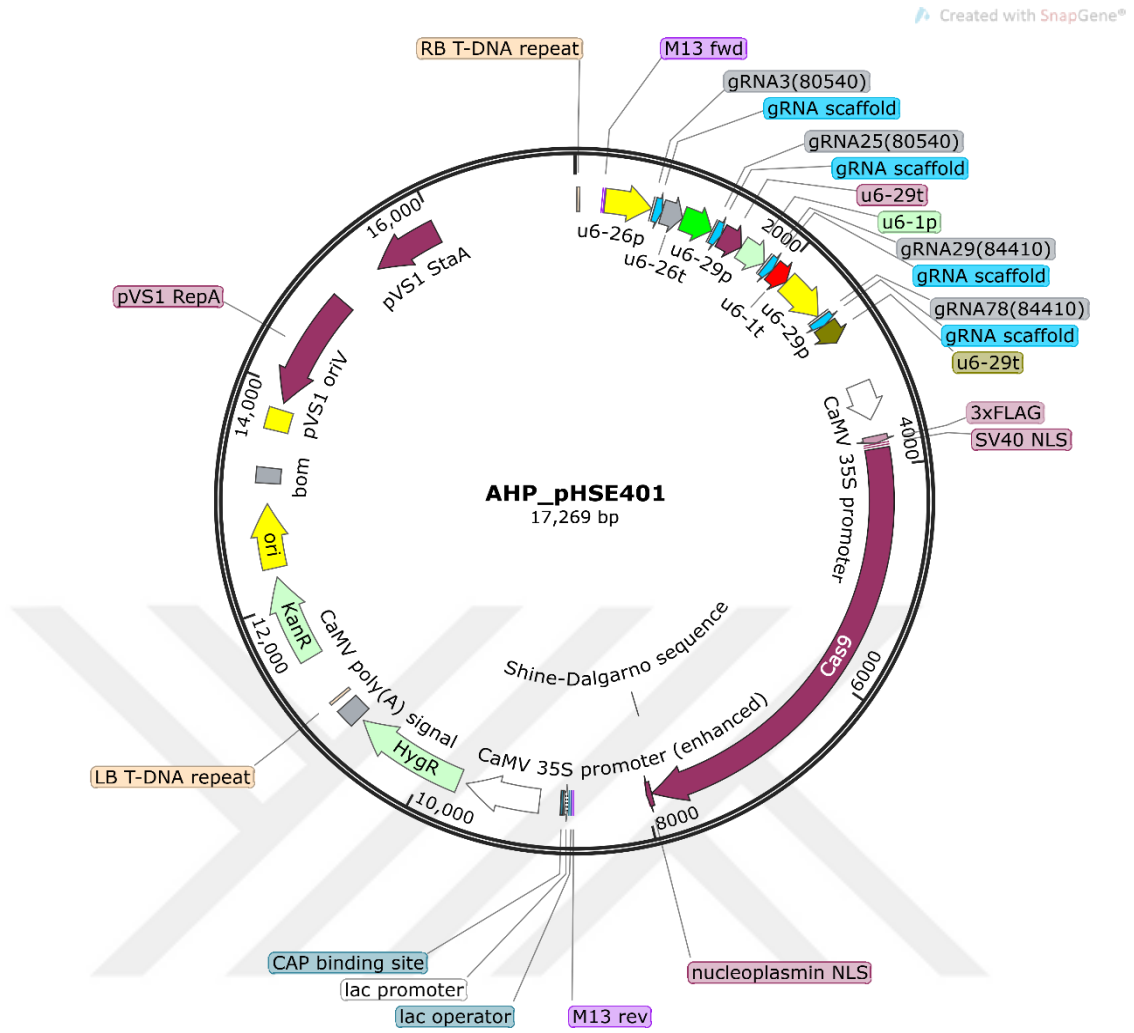
Tablo 2.10 Koloni PCR için kullanılan primer isimleri ve dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
U6-1T-R	AACGGACCAATCACTTTGTCTTAGC
U6-29P-F	TTAATCCAACTACTGCAGCCTGAC

Koloni PCR işleminin ardından, elde edilen örnekler %0,8 agaroz jel'de yürütülmüştür. Koloni PCR pozitif çıkan koloniler, 50 mg/L kanamisin içeren sıvı LB besiyerinde, 12 saat boyunca 200 rpm ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. 12 saatin ardından, büyüyen bakterilerden Favorgen miniprep plazmit izolasyon kiti kullanılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemi için kit'in protokolü takip edilmiştir. Protokol'e göre, bir gece inkübe edilmiş bakteri kültüründen 1-3 ml alınarak mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. Tüpler içerisindeki bakteri kültürü 11000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj ile çöktürüldükten sonra süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve kalıntı üzerine 200 µl FAPD1 tamponu eklenerek, bakteri çözdürülmüştür. Ardından üzerine 200 µl FAPD2 tamponu eklenerek, nazikçe, 5-10 kere karıştırılmış ve 2-5 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında, üzerine 300 µl FAPD3 tamponu eklenen karışım, hızlı şekilde 5-10 defa karıştırılmış ve 18000 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi ile çöktürülmüştür. Santrifüjün ardından, süpernatant kısım FAPD kolonuna aktarılmış ve 11000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüj ile çöktürülmüştür. Kolonun altında kalan kısım döküldükten sonra, kolon üzerine 400 µl WP tamponu eklenmiş ve 11000 x g'de 30 saniye boyunca çöktürülmüştür. Kolon altında kalan kısım yine uzaklaştırıldıktan sonra, kolon üzerine 700 µl yıkama tamponu eklenmiş ve 11000 x g'de 30 saniye boyunca çöktürülmüştür. Kolon altındaki kısım yine dökülerek, kolondaki kalan son sıvıyı da uzaklaştırmak için, ek olarak 18000 x g'de 3 dakika santrifüj ile çöktürme yapılmış ve kolon yeni tüp üzerine alınmıştır. Kolon üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su eklenerek, 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 18000 x g'de 1 dakika boyunca çöktürme yapılarak, plazmit tüp içerisine alınmış ve -20 °C'de saklanmıştır. İzole edilen plazmitler, HindIII kesim enzimi kullanılarak kesilmiş ve kesim sonucu doğru çıkan plazmitler, sanger dizileme ile U6-29p-F, U6-29P-R, U6-1T-F ve U6-1T-R primerleri ile yeniden doğrulanmıştır.

Tablo 2.11 pHSE401 plazmitini doğrulamak için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
U6-29P-F	TTAATCCAACTACTGCAGCCTGAC
U6-29P-R	AGCCCTCTTCTTTTCGATCCATCAAC
U6-1T-F	GCTAAGACAAAGTGATTGGTCCGTT
U6-1T-R	AACGGACCAATCACTTTGTCTTAGC



Şekil 2.4 AHP genlerini hedef alan gRNA'ların klonlandığı pHSE401 bitki ifade vektörü

Bitki ifade vektörü, *Agrobacterium* aracılı transformasyon için gerekli olan sağ sınır ve sol sınır dizileri, transforme olmuş bitki hücrelerini seçmek için gerekli olan *HptII* genini, DNA'da çift zincir kırıklarını oluşturmak için gerekli olan *Cas9* geni ve *Cas9* proteinini hedeflenen bölgeye gönderecek olan gRNA'ların sentezleneceği bölgeleri içermektedir.

2.5. Vektörün *Agrobacterium tumefaciens* GV3101'e Transformasyonu

Transformasyon ve domates doku kültürü işlemleri için (Gökdemir et al., 2022; Secgin et al., 2022) verilen kaynaklardaki protokoller takip edilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* GV3101'e transformasyon işlemi için, bakteri elektro kompetan hale getirilmiştir. 30 mg/L gentamisin ve 10 mg/L rifamisin içeren katı LB besiyerine ekilen *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, 36 saat boyunca 28 °C'de inkübe edilmiştir. Oluşan bakteri kolonilerinden, tek koloni seçilerek, 30 mg/L Gentamisin ve

10 mg/L rifamisin içeren 20 ml sıvı LB içerisinde bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, bakteri kültüründen, 500 µl alınarak, 200 ml sıvı LB içerisinde, 28 °C’de 200 rpm’de, OD600 0.6 olana kadar tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından bakteri 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra 200 ml bakteri, 4 adet, 50 ml’lik falkon tüplere bölünerek, 3500 g’de, 4 °C’de ve 5 dakika boyunca santrifüj aracılığıyla çöktürülmüştür. Süpernatant kısım dökülmüş ve kalan bakteri çökeleği, 10 ml soğuk steril su içerisinde tekrar çözündürülerek, yeniden aynı koşullarda çöktürülmüş ve bu işlem bir kere daha tekrarlanmıştır. Ardından, bakteri çökeleğine, her bir falkona 2 ml olacak şekilde, soğuk 10%’luk gliserol eklenmiş ve yine aynı koşullarda santrifüj ile çöktürülmüştür. Bu işlem, 4 kere daha tekrar edilmiştir. Son bakteri çökeleği üzerine, 2 ml 10%’luk gliserol eklenmiş ve her birine 100’er µl olacak şekilde, 1.5 ml’lik tüplere bölünüp, sıvı nitrojen yardımıyla dondurulan bakteriler -80 °C’de saklanmıştır.

-80 °C’den çıkartılan bakteriler, 10 dakika boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. 10 dakikanın ardından, kompetan bakterilerin üzerine, 600 ng olacak şekilde plazmit eklenmiştir. Daha sonra, bakteri ve plazmit, 10 dakika daha buz içerisinde bekletilmiş ve bu arada, Bio-Rad firmasının ürünü olan MicroPulser elektroporator cihazı ayarlanmış ve öncesinde -20 °C’de bekletilen 0,1 cm boşluklu küvetler çıkarılmıştır. Bakteri ve plazmit bu küvet içerisine aktararak, elektroporasyon için cihaza koyulup, *Agrobacterium* bakterisine uygun akım verilmiştir. Akımın verilmesinin hemen ardından, üzerine 900 µl soğuk LB besiyeri eklenmiş ve 2 saat boyunca, 200 rpm’de, 28 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, bakterinin seçimini sağlayan, 30 mg/L Gentamisin, 10 mg/L rifamisin ve plazmitin seçimini sağlayan 50 mg/L kanamisin içeren katı LB besiyeri ortamına yayılmıştır. Sonrasında, petriler, 28 °C’de 36 saat inkübe edilmiştir. 36 saat sonra, uygun kolonilerden 5 tanesi seçilerek, 10 µl steril su içerisinde çözündürülmüş ve koloni PCR yapılmıştır. Koloni PZR için, Tablo 9 ve Tablo 10’daki aşamalar aynen uygulanmış ve pozitif koloniler, 30mg/L Gentamisin, 10 mg/L rifamisin ve 50 mg/L kanamisin içeren sıvı LB ortamında 200 rpm’de, 28 °C’de, 36 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonrasında, bakteri kültürü 3500g’de 5 dakika boyunca santrifüj aracılığıyla çöktürülmüş ve sıvı kısım dökülmüştür. Çökelek kısmı, 1 ml LB ile tekrar çözündürülmüş ve içerisinde 400 µl alınıp, üzerine 800 µl 100%’lük gliserol eklenerek, -80 °C’de stoklanmıştır.

2.6. *Agrobacterium* Aracılı Bitki Transformasyonu ve Doku Kültürü

Transformasyon ve doku kültürü işlemleri için uygun protokoller takip edilmiştir (Gökdemir et al., 2022; Secgin et al., 2022). Öncelikle, Crocker tohumları steril edilmiştir. Sterilizasyon işlemi, 30 saniye %70'lik etanol ardından 20 dakika boyunca %5'lik çamaşır suyunda çalkalama ile gerçekleştirilmiştir. Son olarak, 6 defa steril su ile durulama yapılmıştır. Tohumlar kuruduktan sonra, 2.2 g/L MS, 2% sükroz ve 2.8 g/L fitajel (Çimlendirme ortamı) içeren ortama ekilmiştir. Ekimden sonra 8. günde bitki kotiledonları kesilerek 3 mg/L benzil adenin, 0,5 mg/L indol asetik asit, 100 mg/L askorbik asit, 3% sükroz, 4.4 g/L MS ve 2.8 g/L fitajel içeren ön kültür ortamına alınmıştır. Aynı gün pHSE401 plazmitini içeren *Agrobacterium*, 10 mg/L rifamisin, 30 mg/L Gentamisin ve 50 mg/L kanamisin içeren sıvı LB ortamına eklenerek, 28 °C'de ve 200 rpm'de, OD600 1 olana kadar inkübe edilmiştir. OD600 değeri 1 olan bakteri kültüründen 10 ml alınıp, üzerine 10 mg/L rifamisin, 30 mg/L Gentamisin, 50 mg/L kanamisin ve 100 mM asetoşiringon içeren 90 ml LB eklendikten sonra, 28 °C'de ve 200 rpm'de, OD600 değeri 0.7 olana kadar inkübe edilmiştir. Bakteri kültürünün yoğunluğu istenilen değere geldiği zaman, bakteriler 4 ayrı falkon tüpe bölünerek, santrifüj aracılığıyla 3500g'de 5 dakika boyunca çöktürülmüştür. Sıvı kısım dökülerek, çökelek kısmı 1'er ml LB içerisinde çözülmüştür. Ardından, 100 ml'lik beher içerisine alınmıştır ve üzerine 100 ml sıvı MS eklenmiştir. Daha sonra, ön kültür ortamında olan kotiledon yapraklar da aynı beherin içerisine alınarak, 10 dakika boyunca 130 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, kotiledon yapraklar alınarak, 3 mg/L benziladenin, 0,5 mg/L indol asetik asit, 100 mg/L askorbik asit ve 100 mM aseto şiringon içeren, pH değeri 5.8 olan katı MS ortamına alınmıştır. Aynı besiyerinde bulunan kotiledon yapraklar ve *Agrobacterium*, 48 saat boyunca, 27 °C'de ve karanlıkta inkübe edilmiştir. 48 saatin ardından, kotiledon yapraklar 320 mg/L timentin içeren 100 ml sıvı MS besiyeri içerisinde 10 dakika, daha sonra ise, 500 mg/L sefotaksin içeren 100 ml sıvı MS besiyeri ortamında 10 dakika, 120 rpm'de çalkalanmıştır. Ardından, kotiledon yapraklar, steril kurutma kâğıdı üzerinde 5 dakika kadar bekletilir. Seçici katı MS (3 mg/L benziladenin, 0,5 mg/L indol asetik asit, 100 mg/L askorbik asit, 15 mg/L higromisin, 80 mg/L timentin, 250 mg/L sefotaksim, pH 5.8) ortamına alınmıştır. Her 10 günde bir alt kültürleme işlemi yapılarak, bitki eksplantları yeni ortama alınmıştır. İlk iki alt kültürlemenin ardında, MS içeriğindeki benziladenin oranı 2 mg/L'ye düşürülürken, sefotaksim ortamdan çıkartılmış ve

timentin oranı 160 mg/L'ye çıkartılmıştır. Kallus oluşumu yeterli boyuta geldikten sonra, alt kültürlenme için kullanılan katı MS içeriği (2 mg/L benziladenin, 0,1 mg/L indol asetik asit, 100 mg/L askorbik asit, 15 mg/L higromisin ve 160 mg/L timentin) değiştirilmiştir. Burda amaç sürgün oluşumunu indüklemektir. Sürgün oluşumu gözlemlendikten sonra, bitkiler kalluslardan kurtarılarak, 0,5 mg/L indol asetik asit, 20 mg/L higromisin, 160 mg/L timentin içeren katı MS ortamına alınmıştır. Burda amaç, kök oluşumunu uyarmaktır. Kök oluşturma işlemi, ortalama olarak 30 ile 45 gün arasında değişmektedir. Bu sürecin ardından, bitkiler MS ortamından çıkarılarak, torf içerisine alınmış ve nem oranının yüksek tutulması adına etrafı poşet ile kapatılmıştır. Bir hafta boyunca günde 15 dakika dış ortamda tutularak dış ortama alıştıran bitkiler, bir haftanın ardından seraya alınmıştır. Sera da üç ay gibi bir süre kalan bitkilere, bu süreç boyunca haftada iki defa hoagland çözeltisi ile besin takviyesi yapılmıştır. Bu süreçte bitkilerde alınan yaprak örneklerinden, “Favorprep plant genomic DNA extraction kit” kullanılarak, genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemi için kit'e ait protokol takip edilmiştir. Protokole göre, 50-100 mg kadar, taze bitki dokusu alınmış ve sıvı nitrojen aracılığıyla ezilip, mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüp içerisine 400 µl FAPG1 tamponu ve 8 µl RNase A stok çözeltisinden eklenmesinin ardından, 2 dakika oda sıcaklığında (25 °C) ve 10 dakika 65 °C'de inkübasyon işlemleri yapılmıştır. İkinci inkübasyon sırasında, her 2-3 dakikada bir tüpler vortex ile iyice karıştırılmıştır. Sonrasında, üzerine 130 µl FAPG2 tamponu eklenip iyice karıştırılan tüpler, 5 dakika boyunca buz içerisinde inkübe edilmiştir. Buz üzerinde bekletilme işlemi bittikten sonra, tüplerdeki karışım toplama tüpü üzerine koyulmuş filtre kolonuna aktarılmış ve 18000 x g'de 3 dakika boyunca santrifüj ile çöktürülmüştür. Çöktürmenin ardından, filtre üzerinde kalan süpernatant kısım yeni mikrosantrifüj tüpe miktarları ölçülerek alınmıştır. Alınan sıvının 1,5 katı kadar FAPG3 tamponu üzerine eklenmiş ve pipetleme işlemi ile iyice karıştırılmıştır. Oluşan karışımdan maksimum 750 µl alınarak, yeni bir toplama tüpü üzerine yerleştirilen FAPG kolonunun üzerine aktarılmış ve 18000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj aracılığıyla çöktürülmüş ve toplama tüpü içerisinde kalan kısım dökülmüştür. Son işlem tekrarlanmıştır. Sonrasında, FAPG kolonu üzerine 400 µl W1 tamponu eklenmiş ve 18000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüj ile çöktürülmüş ve toplama tüpünde kalan kısım dökülmüştür. FAPG kolonuna 650 µl yıkama tamponu eklenerek 18000 x g'de 30 saniye çöktürülmüş ve toplama tüpünde kalan kısım yine dökülmüştür. FAPG kolonunu tamamıyla kurutmak için, 18000 x g'de 3 dakika boyunca bir santrifüj işlemi

daha yapılmış ve FAPG kolonu yeni mikrosantrifüj tüpü üzerine alınmıştır. FAPG kolonu üzerine 100 µl nükleaz içermeyen su eklenip, 18000 x g’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen genomik DNA -20 °C’de saklanmıştır. Bitkilerin transgenik olup olmadığı higromisin spesifik primerler ile PCR yapılarak kontrol edilmiştir.

Tablo 2.12 Higromisin PCR için kullanılan primerler ve dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi (5’-3’)
Higromisin Forward	CTATTCCTTTGCCCTCGGAC
Higromisin Reverse	CCTGACCTATTGCATCTCCC

Tablo 2.13 Higromisin PCR Bileşenleri

Bileşen	Miktar
Higromisin Forward	1.25 µl
Higromisin Reverse	1.25 µl
Kalıp DNA	2 µl
Taq2x Master Mix	12.5 µl
Nükleaz içermeyen distile su	8 µl

Tablo 2.14 Higromisin PCR Koşulları

Aşama	Süre ve sıcaklık
İlk Denatürasyon	1 dakika ve 95 °C
Denatürasyon	30 saniye ve 95 °C
Bağlanma	45 saniye ve 52 °C
Uzama	46 saniye ve 68 °C
Son Uzama	5 dakika ve 68 °C
Tutma	4 °C ve ∞

2.7. Mutasyon Kontrolü

Transgenik olduğu doğrulanan bitkilere, CRISPR/Cas9 sistemi ile hedef aldığımız gen bölgelerine uygun primerler ile PCR yapıldı. PCR ürünleri sanger dizileme ile dizilettiirildi. Sonuçlar, ICE-synthego ve DSDecode M programlarına yüklenerek kontrol ettirildi.

Tablo 2.15 AHP genlerinin PCR ile çoğaltılması

Primer Adı	Hedef Alınan Gen	Primer Dizisi (5’-3’)
AHP1 Forward	<i>Solyc01g080540</i>	CAGCACTCTGTTTGTGGGGT
AHP1 Reverse		GTTCTTCGCAGCAGTTACGG
AHP2 Forward	<i>Solyc06g084410</i>	TGAGTCTTCTCCCCACATC
AHP2 Reverse		AGGGTGGGAAGAGAACACCT

2.8. Çimlendirme Testi

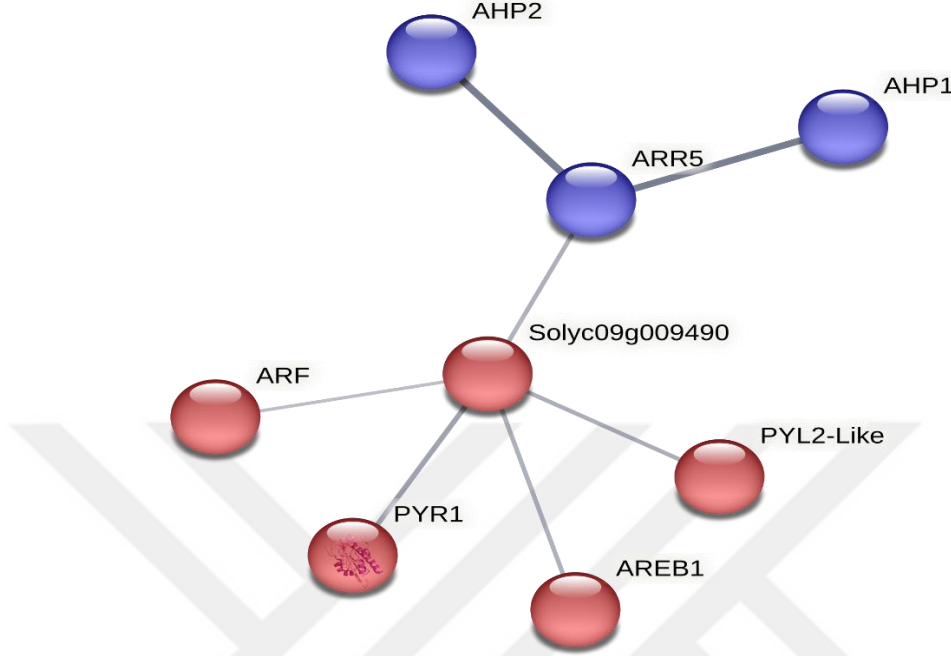
Crocker ve *ahp* bitkilerinin çimlenme sürelerini kıyaslamak için, her iki çeşidin tohumları, 2,2 g/L MS, %20 sükroz, 2,8 g/L fitajel ve 0 mM veya 150 mM mannitol içeren ortamlara sterilizasyon işleminin ardından ekildi. Tohum sterilizasyonu, %70'lik alkolde 30 saniye, %5'lik çamaşır suyunda 20 dakika ve steril saf su ile 6 kere durulanacak şekilde yapıldı.

2.9. Stres Uygulaması

Elde edilen bitkilere iki farklı şekilde stres uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak, bitkiler 0 mM, 100 mM, 150 mM ve 200 mM mannitol ve %20 sükroz, 2,2g/L MS, 2,8 g/L fitajel ve pH 5,8 olan ortamlara ekildi ve mutant bitkiler ile mutant olmayan bitkiler kıyaslandı. Bir diğer stres uygulamasında ise, tohumlar %20 sükroz, 2,2 g/L MS, 2,8 g/L fitajel ve pH 5,8 olan ortamlara ekilerek çimlendirildi. Çimlenmenin ardından, 1 cm'lik sürgün oluşturan bitkiler, 0 mM, 100 mM ve 200 mM mannitol içeren katı MS (%20 sükroz, 2,2 g/L MS, 2,8 g/L fitajel ve pH 5,8) ortamına aktarıldı ve bir hafta boyunca stres koşulları altındaki gelişimleri gözlemlendi. Stres uygulamasının ardından, örnekler MS ortamından alınarak yaş ağırlıkları ölçüldü. Yaş ağırlığı ölçülen örnekler, 48 saat boyunca 55 °C'de etüv içerisinde kurutulduktan sonra, kuru ağırlıkları ölçüldü.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları



Şekil 3.1 Domateste, sitokinin ve ABA sinyalizasyon yollarında bulunan proteinlerin PPI analizi; Mavi (Sitokinin sinyalizasyonu), Kırmızı (ABA sinyalizasyonu)

Sitokinin sinyalizasyon yolağının negatif düzenleyicisi olan *Type-A* ARR5, ABA sinyalizasyonu tarafında fosforilasyona uğramakta ve bu fosforilasyon ARR5 proteininin stabilitesini artırmaktadır (Huang et al., 2018). PPI analizi sonucuna göre, ilgilenilen *AHP* genlerinin, *Type-A* ARR5 (*Solyc05g006420*) üzerinden, ABA sinyalizasyonundan sorumlu *Solyc09g009490*, *ARF* (*Solyc11g044560*), *PYL2-Like* (*Solyc12g095970*), *AREB1* (*Solyc04g78840*) ve *PYR1* (*Solyc08g076960*) genleri ile ilişkisi bulunmuştur.

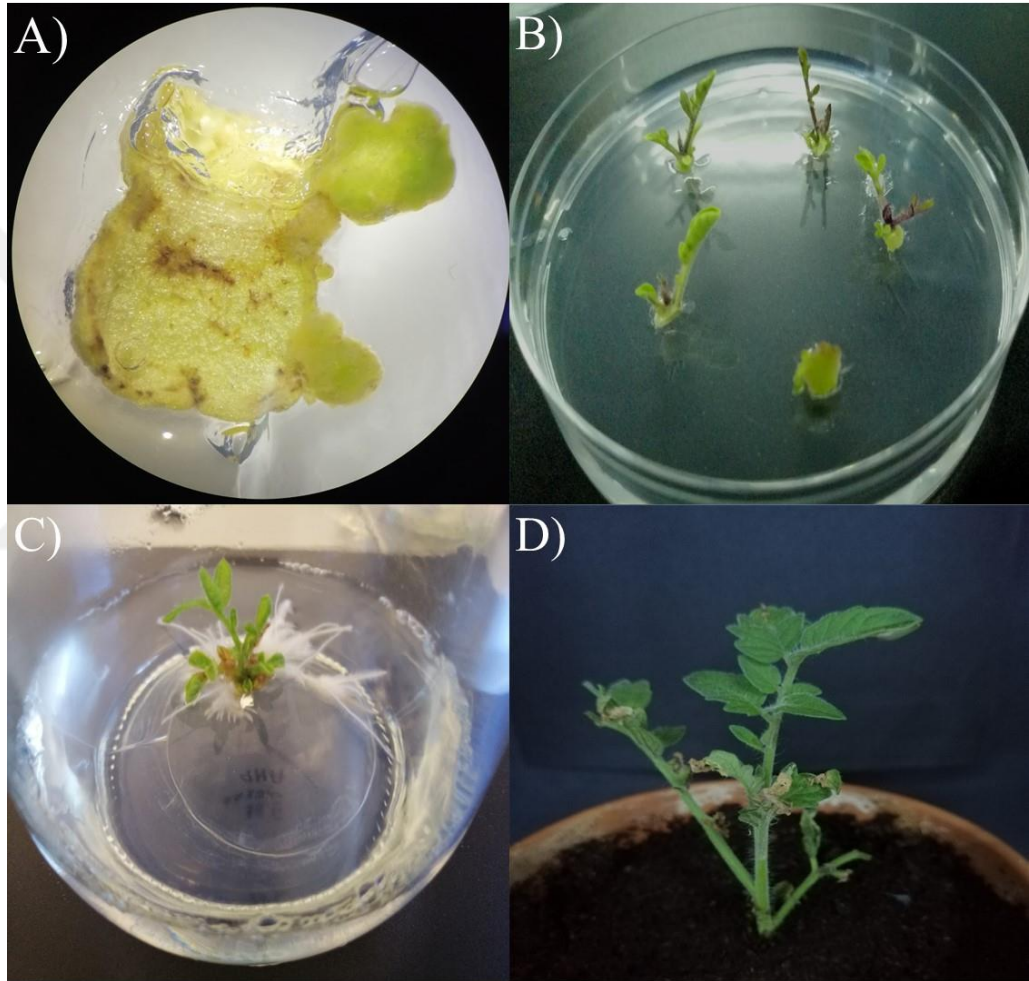
3.2. Transgenik Bitkilerin Elde Edilmesi

Transgenik hatların doku kültür süreci gözlemlenmiş ve aşamalar kaydedilmiştir. Bu aşamalar sırasıyla; kallus aşaması, sürgün aşaması, köklendirme aşaması, bitkinin toprağa alınması ve dış ortama aktarılması, sera ortamında bitkinin yetiştirilerek tohumların toplanması şeklindedir.

Transformasyonun ardından, bitki kotiledonları, uygun bitki büyüme düzenleyicilerini içeren katı MS besiyerine aktarılmış ve kallus oluşumu indüklenmiştir. Oluşan kalluslar, uygun boyutlara gelene kadar, aynı oranlarda

besiyerinde, 10 günde bir alt kültüre alınarak, kültürlenmiştir. Kallus oluşumunu indüklemek için ortam içerisine 2 mg/L benziladenin ve 0,5 mg/L oranında bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiştir.

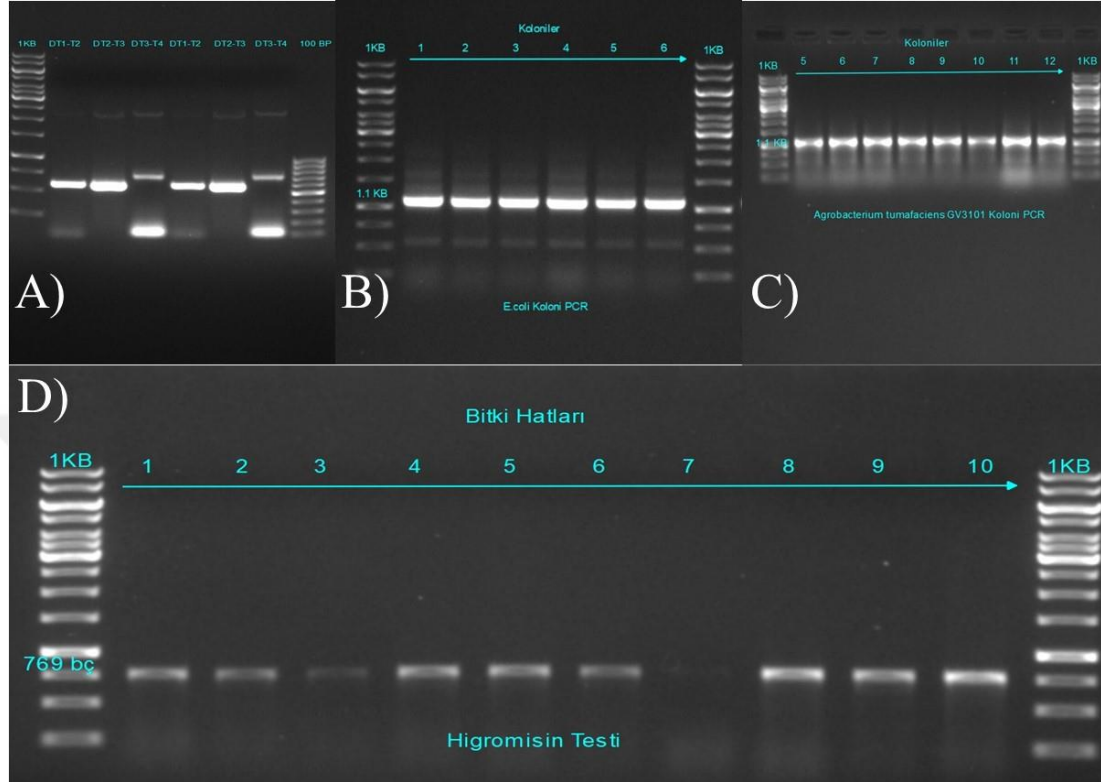
Kallus boyutları istenilen aşamaya geldiği zaman, katı MS ortamının bitki büyüme düzenleyicisi oranları değiştirilerek, sürgün oluşumu uyarılmıştır. Bu işlem için, bitki büyüme düzenleyicilerinin oranı 2 mg/L benziladenin ve 0,1 mg/L indol asetik asit şeklindedir.



Şekil 3.2 Transgenik bitkilerin elde edilme aşamaları sırasıyla; Kallus oluşum aşaması (A), sürgün oluşum aşaması (B), kök oluşum aşaması (C), dış ortama alıştırılan transgenik bitki (D)

Sürgün oluşumunu tamamlayan bitkiler, kök oluşturma için, köklendirme ortamına aktarılarak, ortalama 30 ile 45 gün arası bu ortamlarda bekletilmiştir. Kök oluşumunu indükleyebilmek için katı MS ortamına 0,5 mg/L indol asetik asit eklenmiştir.

Dış ortama alıştırılan Transgenik bitkilerden genomik DNA izolasyonu yapıldı. Ardından, bitkilerin Transgenik olduğunun doğrulanması için higromisin genine uygun primerlerle PCR yapılarak, agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.



Şekil 3.3 Transgenik bitki elde etme aşamalarında yapılan PCR işlemlerinin agaroz jel görüntüleri

DT1T2, DT2T3 ve DT3T4 (Şekil 8 A), *E.coli*'ye aktarılmış pHSE401 için koloni (Şekil 8 B), *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılmış pHSE401 için koloni (Şekil 8 C) ve elde edilen bitkilerin kontrolü için bitki genomik DNA'sı ve higromisin geni primerleri kullanılarak yapılan PCR (Şekil 8 D) sonuçlarının agaroz görüntüsü

verilmektedir. Bütün agaroz jeller 0,6% oranında agaroz içermektedir ve 1KB thermo DNA ladder kullanılarak kontrol edilmiştir.



Şekil 3.4 Sera koşullarında yetiştirilen *ahp* T₀ bitkileri

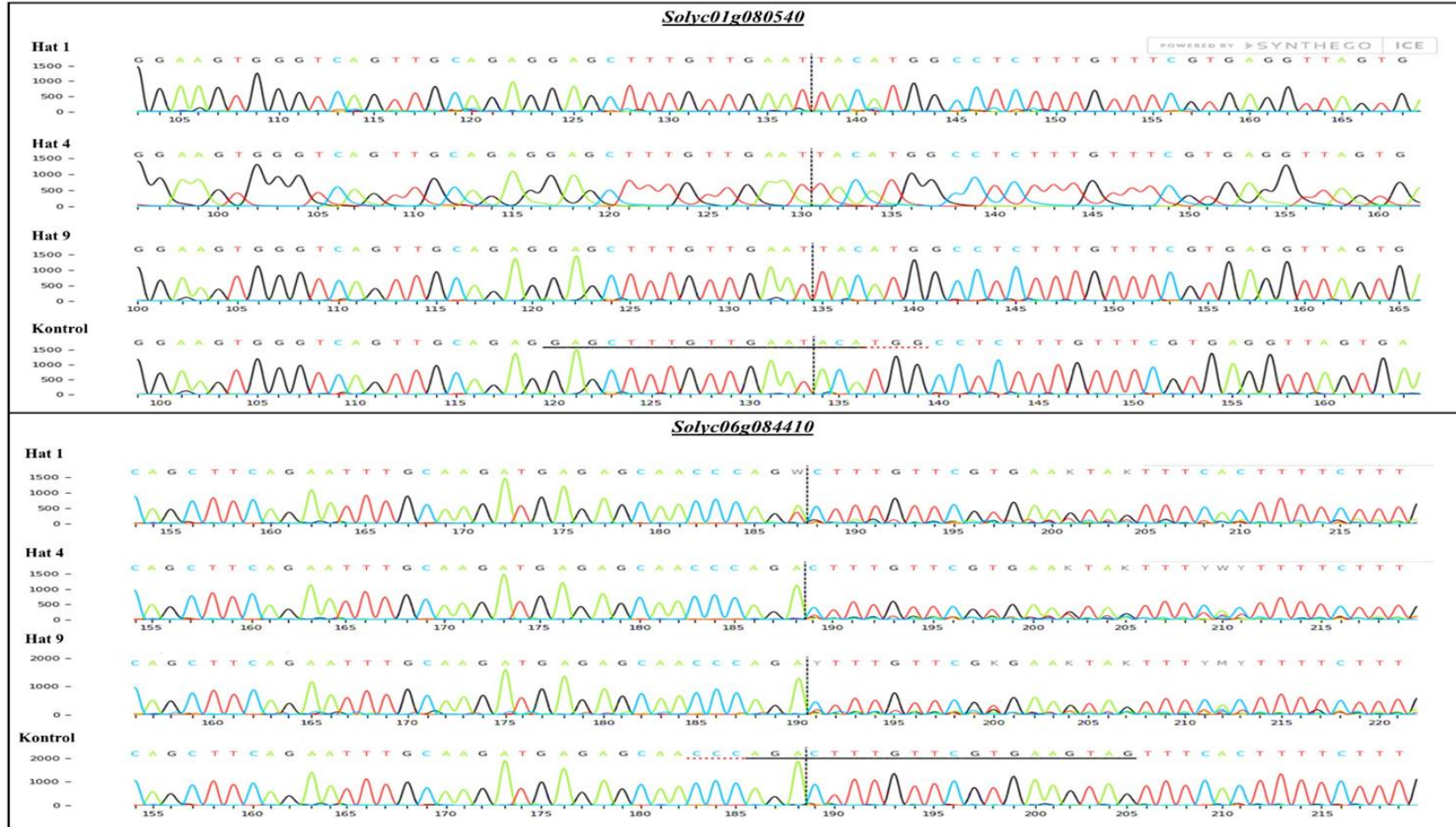
Dış ortama alıştırılan transgenik bitkiler, sera ortamına (25 °C ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) taşındı ve üç ay boyunca burada yetiştirilerek meyveleri toplanıp tohumları alındı.

3.3. Mutasyon Kontrolü

Transgenik olduğu higromisin testi ile doğrulanana *ahp* hatlarından elde edilen genomik DNA'lar ve *AHP* genlerini amplifiye etmeye uygun primerler kullanılarak PCR yapıldı. PCR sonucu pozitif çıkan hatların örnekleri sanger dizileme metodu ile dizilendi.

Tablo 3.1 DSDecode M aracı kullanılarak yapılan mutasyon analizi

HAT	Gen	Allel	DNA Dizisi (5'-3')	Mutasyon Tipi
<i>ahp-1</i>	<i>AHP 1</i>	1	GCAGAGAGCTTTGTTGAATTACATGGCCTCTTTGT	İnsersiyon
		2	GCAGAGGAGCTTTGTTGAATTACATGGCCTCTTTGT	İnsersiyon
	<i>AHP2</i>	1	AACCCAGACTTTGTTTCGTGAAG	Mutasyon Yok
		2	AACCCAGTCTTTGTTTCGTGAAT	Karmaşık Varyant
	<i>AHP 1</i>	1	GCAGAGGAGCTTTGTTGAATTACATGGCCTCTTTGT	İnsersiyon
		2	GCAGAGGAGCTTTGTTGAATTACATGGCCTCTTTGT	İnsersiyon
	<i>AHP2</i>	1	AACCCAGACTTTGTTTCGTGAAG	Mutasyon Yok
		2	AACCCAGATTTTGTTCGGGATTT	Karmaşık Varyant
<i>ahp-9</i>	<i>AHP 1</i>	1	GCAGAGGAGCTTTGTTGAATTACATGGCCTCTTTGT	İnsersiyon
		2	GCAGAGGAGCTTTGTTGAATTACATGGCCTCTTTGT	İnsersiyon
	<i>AHP2</i>	1	AACCCAGACTTTGTTTCGTGAAG	Mutasyon Yok
		2	AACCCAGATCTTGATCCG----- GAAAA	Substitüsyon ve delesyon
Crocker	<i>AHP1</i>		GCAGAGGAGCTTTGTTGAATACATGGCCTCTTTGT	
	<i>AHP2</i>		AACCCAGACTTTGTTTCGTGAAG	



Şekil 3.5 Solyc06g084410 geninin ICE-Synthego aracı kullanılarak yapılan mutasyon kontrolü sonuçlar

ICE-Synthego mutasyon analizi sonucunda *AHP1* (*Solyc01g080540*) genini hedef alan gRNA25'in 12 bitkiden 11'inde, gRNA 3'ün 7 bitkiden 6'sında ve gRNA29'un ise 11 bitkiden 5'inde çalıştığı tespit edilmiştir.

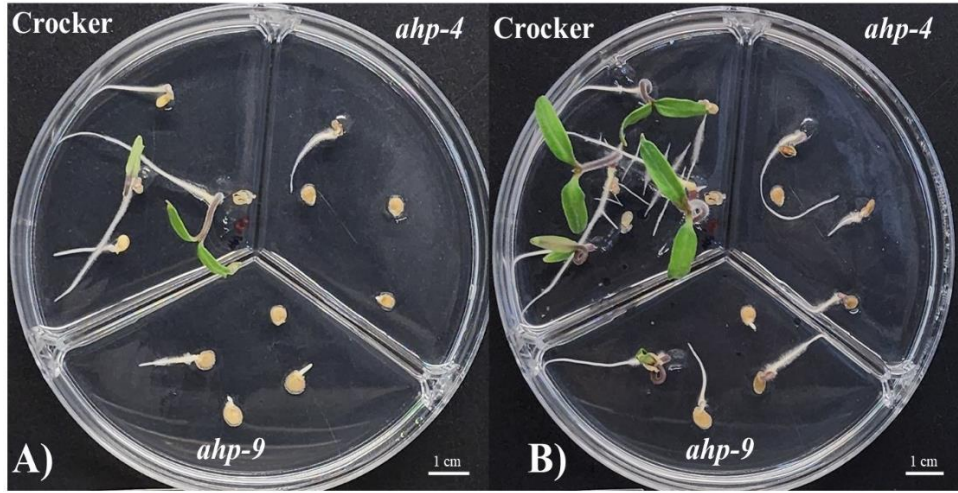
Çimlendirme testinde kullanılan hatların *Solyc06g084410* geni açısından mutasyon durumları sekans sonuçlarının ICE-synthego aracı kullanılarak analizi şekil 3.5'te gösterilmiştir.

DSDDecode M analizinde ise, bütün gRNA'ların hedef aldığı bölgelerde mutasyon olduğu ancak, yalnızca *AHP1*'i hedef alan gRNA açısından 3 hatta (8, 9, 11) homozigot mutasyon olduğu gözlenmiştir. *AHP2*'yi hedef alan hiçbir hatta Homozigot mutasyon oluşmazken, 3 tane hatta (6, 10, 11) ise her iki allelde de mutasyon oluşmuş, ancak bu mutasyonlar birbirinden farklıdır.

3.4. Çimlendirme Testi

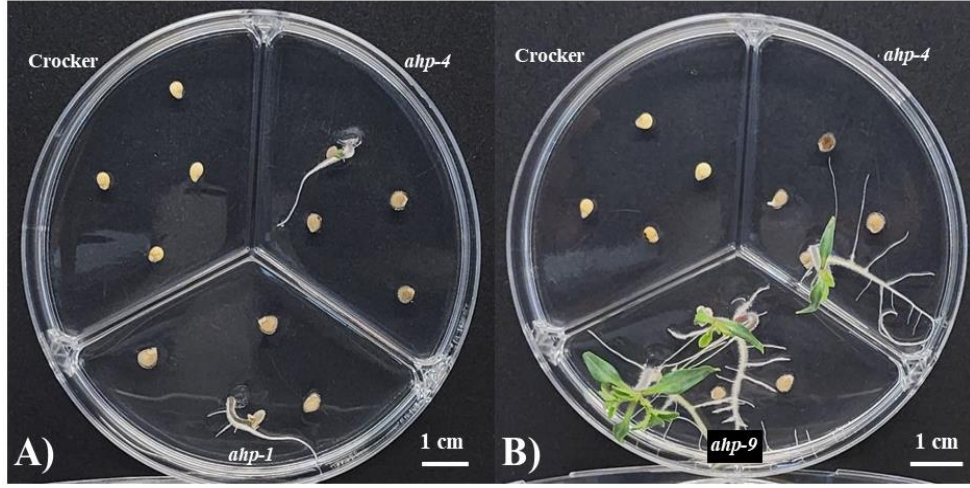
Absisik asit, ana bitkideki tohum gelişimi sırasında tohumda dormansiye düzenleyen ana hormondur (Sano & Marion-Poll, 2021). Tohum gelişimi sırasında ABA, rezerv birikimini pozitif regüle ederken, embriyo oluşumunu inhibe etmektedir ve bununla birlikte, sadece geç olgunlaşma evrelerinde zigotik dokular tarafından üretilen ABA, dormansi halinin indüksiyonunda baskın bir role sahiptir (Seo et al., 2016). Absisik asit ve sitokinin, aralarında bulunan zıt yönlü ilişki ile birçok gelişim ve yanıt aşamasını düzenlemektedir (Huang et al., 2018). Ayrıca, giberellin ve ABA arasında da zıt yönlü bir ilişki de bulunmaktadır (Razem et al., 2006).

Sitokininin çimlenme üzerindeki rolünü anlamak için, çimlendirme ortamlarına ekilen *ahp* ve Crocker tohumları, çimlenme süresi bakımından farklılık göstermiştir. Bu farklılığın nedeni *ahp* bitkilerinde sitokinin sinyalizasyonunun kesilmesinden dolayı artan ABA sinyalizasyonu tohumda dormansi durumunun indüklenmesine sebep olmuştur. Bu dormansinin nedeni azalan giberellin sinyalizasyona bağlı olmaktadır (Razem et al., 2006). Crocker çeşidi ekimden 4 gün sonra çimlenmeye başlarken, *ahp* bitkilerinde bu süre 6 gün kadar sürmüştür. Crocker çeşidine kıyasla *ahp-4/9* tohumlarının çimlenmelerinde gecikme olduğu görülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Çimlendirme testi sonuçları; A) Ekim işleminden 5 gün sonrası, B) Ekim işleminden 7 gün sonrası

Olgun kuru tohumların bir özelliği, tohum olgunlaşması sırasında 10.000'den fazla mRNA biriktirmelerine ve bunları çimlenme sırasında proteinleri sentezlemek için şablon olarak kullanmalarına izin vermesidir. Bu depolanmış mRNA'lardan bazıları, tohumlar uzun süreli stresli koşullara maruz kaldıktan sonra bile proteine dönüşebilir halde kaldıklarından, uzun ömürlü mRNA'lar olarak da adlandırılır. Olgun tohumlar, transkripsiyonel inhibitörlerin mevcudiyetinde bile çimlenebilir ve bu yetenek orta tohum gelişiminde kazanılır. Tohumlarda biriken mRNA'nın türü, bitki hormonu olan absisik asit ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Galland & Rajjou, 2015; Sajeev et al., 2019). Mannitol içermeyen çimlendirme ortamlarında yapılan çimlenme testi sonuçlarına göre, *ahp* tohumları geç çimlenip Crocker tohumları erken çimlenirken, 150mM mannitol içeren çimlendirme ortamlarında çimlenme süresi farklılık göstermiştir.



Şekil 3.7 150mM mannitol içeren 1/2 MS ortamında çimlenme testi

150mM mannitol içeren ortamlarda 15 günün ardından *ahp* tohumları çimlenme gösterirken, Crocker tohumlarında çimlenme görülmemiştir. Bu sonuçlara göre mannitol içeriği her iki bitki tohumlarının da çimlenmelerini geciktirmesine rağmen, bu geciktirici etki *ahp* tohumlarında daha azdır (Şekil 3.7).

3.5. Kuraklık Stresi Testi

Kuraklık stresi uygulaması için mannitol kullanılmıştır. Farklı oranlarda mannitol uygulanarak (0mM, 100mM, 200mM) bitkilerin bu duruma yanıtları incelenmiştir. Mannitol içermeyen ortamda çimlendirilen bitkiler, ilk sürgünü oluşturana kadar bu ortamda bekletildi. İlk sürgünü oluşturan bitkiler mannitol ortamına alındı ve bir hafta sonra görüntü alındı. Crocker ve *ahp-4* bitkilerinin 1 haftalık kuraklık koşullarına yanıtları şekil 3.8’de gösterilmiştir.

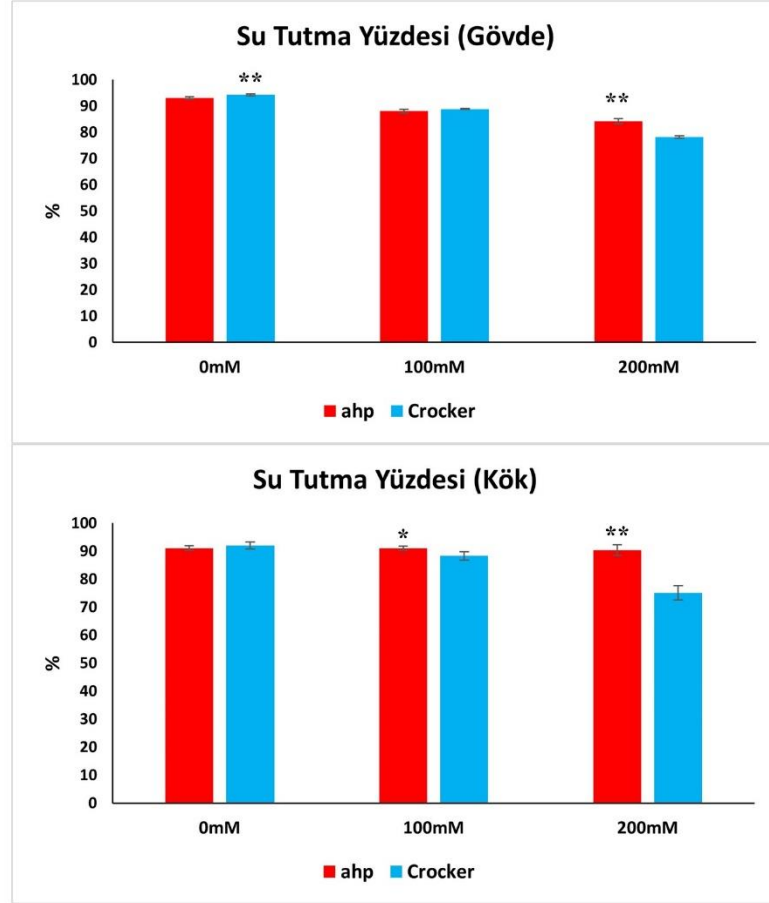


Şekil 3.8 Mannitol ortamındaki Crocker ve *ahp-4* bitkileri. 0mM mannitol içeren ortamlar (A ve B), 100mM içeren ortamlar (C ve D), 200mM mannitol içeren ortamlar (E ve F), Crocker çeşidi (A, C, E) ve *ahp-4* (B, D, F) şeklinde verilmiştir.

Arabidopsis thaliana bitkisinde *AHP* genlerinin susturulması, ABA aracılı stoma kapanmasına yol açmış, bundan dolayı da kuraklık koşullarında su kaybını azaltmıştır (Nishiyama et al., 2013). Mısır bitkisinde de *ABP9* geninin, ABA sinyalizasyonunu artırmasından dolayı stomanın kapanmasına neden olduğu ortaya koyulmuştur (Zhang et al., 2011). Kuraklığın, *ahp* bitkilerine üzerine etkisini görmek için sürgün ucu 1 cm'ye ulaşınca Crocker ve *ahp* bitkileri kuraklık stresine tabi tutulmuştur. Stres olmayan koşullarda Crocker bitkileri *ahp* bitkilerinden daha iyi gelişim göstermesine rağmen, 100mM mannitol aracılı kuraklık stresi uygulandığında, *ahp-4* bitkisi gövde gelişiminde Crocker çeşidi ile eşitlik göstermiş, 200mM'da ise Crocker turgor basıncını kaybetmişken, *ahp-4* yaşamaya devam etmiştir. Ayrıca, stres koşullarında *ahp-4* bitkisinin kök gelişimi artarken, Crocker çeşidi, kuraklık koşuluna kök gelişimi açısından tepki gösterememiştir (Şekil 3.8).

ABA'nın bitkilerde su tutma üzerine iki şekilde etkisi olduğu bilinmektedir. Birincisi ve en çok bilineni koruyucu hücreler üzerine olan etkisinden dolayı stomaların kapanmasını sağlayan biyokimyasal etkisi, diğeri ise yaprak damar

dokularındaki su geçirgenliğini azaltarak göstermiş olduğu hidrolik etkidir (Pantin et al., 2013). *ahp* bitkilerinin su tutma kapasitesi hakkında yorum yapabilmek adına gövde ve kök ağırlıkları, yaş ve kuru olacak şekilde, *ahp* ve Crocker bitkilerinden alınan veriler sonucunda, bitkilerin gövde ve köklerindeki su tutma kapasiteleri hesaplanmıştır. Sonuçlar arasındaki fark T testi ile istatistiksel olarak yorumlanarak, önem düzeylerine göre gösterilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 *ahp* ve Crocker bitkilerinin, farklı oranlarda mannitol içeren ortamlarda, kök ve gövdelerdeki su tutma yüzdeleri

T testi sonuçlarına göre, 0mM mannitol içeren ortamda, gövde de su tutma yüzdesi bakımından Crocker çeşidi, *ahp* bitkilerine kıyasla daha yüksek oranda su tutmuş olup, T testi değeri 0,002376 olarak bulunmuştur. 100mM mannitol içeren ortamlarda, gövde açısından önemli bir fark görülmezken, 200mM mannitol içeren ortamlarda *ahp* bitkilerinin su tutma yüzdesi Crocker çeşidine kıyasla, önemli derecede yüksek bulunmuş olup, yapılan T testi değeri 0,009183 olarak bulunmuştur.

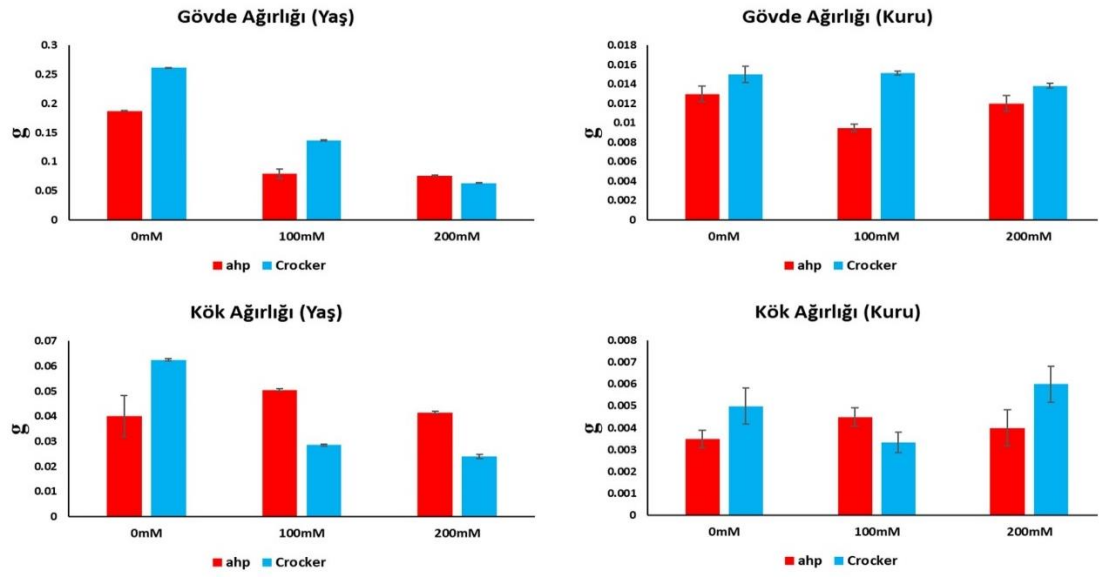
Kök açısından ise, 0 mM mannitol içeren ortamda önemli bir fark bulunmazken, 100 mM mannitol içeren ortamda *ahp* bitkilerinin su tutma kapasitesi önemli, 200mM mannitol içeren ortamda ise çok önemli derecede yüksek bulunmuştur. T testi sonuçları sırasıyla 0,2964 (0 mM mannitol), 0,02804 (100 mM mannitol) ve 0,0005 (200 mM mannitol) olarak bulunmuştur. Buradan anlaşılması gereken, *ahp* mutant bitkilerdeki azalan sitokinin sinyalizasyonu sonucu ABA sinyalizasyonu Crocker çeşidine kıyasla artmış olduğundan, ABA'nın su tutma kapasitesi üzerine olan olumlu etkisi *ahp* bitkilerinin kuraklık koşullarına adaptasyonunu kolaylaştırmıştır.

ABA miktarlarının, belli bir seviyeye kadar artmasının lateral kök gelişimini artırdığı bilinmektedir (Kai et al., 2008; Nakayama et al., 1999). Normal koşullar ve kuraklık altında, Crocker bitkisine kıyasla *ahp* kök gelişimi de farklılık göstermiştir. *AHP* genlerinin çeltik bitkisinde bastırılması kuraklık koşullarında lateral kök gelişimini indüklemiştir (Sun et al., 2014). Biz de kök gelişimlerini kıyaslamak için veriler alarak bu durumu destekledik. *ahp* bitkilerinin lateral ve ana kök ağırlıkları genel anlamda Crocker çeşidine kıyasla daha fazla gelişmiştir. Buradan anlaşılabilecek olan, kuraklık stresine maruz bırakılan *ahp* ve Crocker bitkilerinin arasında fark oluşmasının bir sebebi de *ahp* bitkilerinin kök sistemlerinin daha iyi gelişmesinden dolayı, ortamda zaten az miktarda bulunan su içeriğine daha rahat ulaşabiliyor olmasıdır.



Şekil 3.10 *ahp-4* ve Crocker bitkilerinin 0mM, 100mM ve 200mM mannitol içeren ortamlarda 1 hafta kaldıktan sonraki görüntüleri (Soldan sağa doğru 0mM mannitol, 100mM Mannitol ve 200mM Mannitol içeren ortamlardan alınan bitkiler gösterilmektedir. Crocker bitkisi (A), *ahp* bitkileri (B))

Şekil 3.10'da görüldüğü gibi, Crocker ve *ahp* bitkileri ortamda bulunan mannitol konsantrasyonu arttıkça, gelişimsel olarak gerilemişlerdir. Ancak, 200 mM mannitol altında Crocker çeşidi oluşan strese yanıt veremeyip, turgor basıncını kaybetmiş ve gerekli fizyolojik ve morfolojik süreçleri devam ettiremeyecek duruma gelirken, *ahp* bitkileri 200 mM mannitol altında kök gelişimini artırarak, kuraklık koşullarına daha iyi adapte olabilmıştır. *Arabidopsis thaliana*'dan alınan *AtAREB1*'in soya fasülyesinde yüksek düzeyde ifade ettirilmesi su eksikliğine karşı toleransı artırmıştır (Barbosa et al., 2013). Ayrıca, *AtABF3* geninin *Gossypium hirsutum*'da ifade ettirilmesi dehidrasyona karşı toleransı artırmıştır (T. C. Kerr et al., 2018). Sonuç olarak, sitokinin sinyalizasyonunun azalmasından dolayı artan ABA sinyalizasyonu, *ahp* mutantlarının artan stres koşullarına adaptasyonunu artırdığı anlaşılmaktadır.



Şekil 3.11 Kuraklık deneyi ardından alınan örneklerden yapılan yaş ve kuru ağırlık ölçüm analizleri

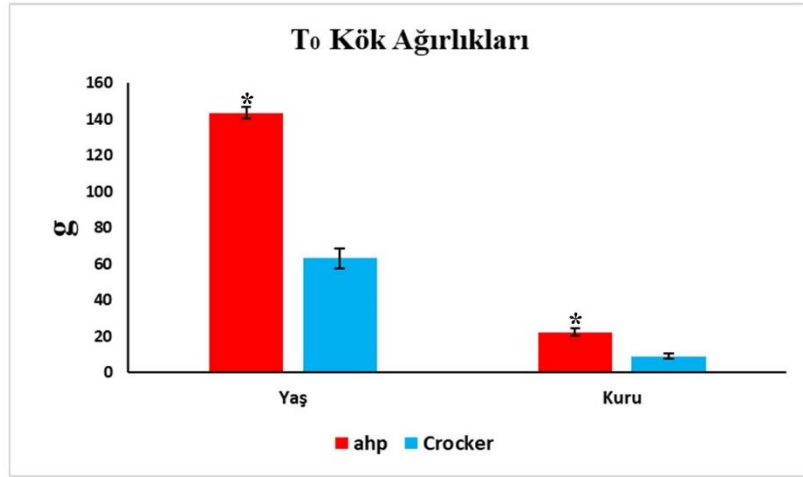
Gövde ve kök ağırlık analizleri, Crocker bitkilerine kıyasla *ahp* bitkilerinin, kuraklık koşullarından daha az etkilendiğini, yaş ve kuru ağırlık şeklinde ortaya koymaktadır.

Serada yetiştirilen T_0 *ahp* ve Crocker bitkilerinin meyveleri hasat edildikten sonra kökleri alınmıştır. Hasat edilen köklerin yaş ve kuru ağırlıklarına bakılmıştır.



Şekil 3.12 Hasattan sonra görüntülenen bitki kökleri

Kök ağırlıkları açısından, Crocker bitkilerine kıyasla, *ahp* bitkilerinin kök yapısı daha çok gelişmiştir. Çeltikte *AHP* genlerinin baskılanmasının, ozmotik stres altındaki bitkilerde lateral kök gelişiminin artmasıyla sonuçlandığı daha önce de ortaya koyulmuştur (Sun et al., 2014). Ayrıca, sitokininin, oksin sinyalizasyonunun negatif düzenleyicileri olan *AUX/IAA* ve *SHY2/IAA3* genlerini indükleyerek ve oksin taşınmasının pozitif düzenleyicisi olan *AUX1* geninin ifadesini baskılayarak kök gelişiminde olumsuz etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Moubayidin et al., 2009; Schaller et al., 2015). Domateste bu etkinin nasıl olduğunu görmek adına, yaş ve kuru kök ağırlıkları kıyaslanmıştır. Kıyaslanan, yaş ve kuru ağırlıkların ortalaması alınarak T testi yapılmış olup, sonuçlar grafik üzerinde gösterilmiştir. T testi sonuçlarına göre yaş ağırlıklar arasındaki farkın önem düzeyi 0,03064 ve kuru ağırlıklar arasındaki farkın önem düzeyi 0,01642 olarak bulunmuştur (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 T₀ bitkilerinden alınan kök örneklerinin ağırlıklarının kıyaslanması

Sera koşullarında (ortalama 25 °C ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) yetiştirilen *ahp* ve Crocker çeşitlerinin kökleri alınarak kıyaslandıktan sonra yaş ve kuru ağırlıklarının karşılaştırılması şekil 3.13’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *ahp* bitkileri Crocker bitkilerine kıyasla daha fazla kök üretmiş olup, bu durum literatür taraması ile örtüşmektedir. Sonuç olarak, sitokinin sinyalizasyonunun kesilmesi sonucu, sitokinin ve oksinin kök gelişimi açısından zıt yönlü ilişkisi ve daha önce de bahsedildiği üzere ABA sinyalizasyonundaki artış kök gelişimine olumlu yansıdığını söylemek mantıklı olacaktır.

4. SONUÇ

Bu tez çalışmasının sonucunda, daha önce farklı organizmalarda fonksiyonları tanımlanmış olan sitokinin sinyalizasyonundan sorumlu *AHP* genlerinin domates bitkisindeki fonksiyonları araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, bu genler kuraklığa toleransta, kök gelişiminde ve su tutma kapasitesinde negatif rol oynamaktadırlar. Bu nedenle, bu genlerin susturulması, ozmotik stres altındaki bitkilerde su tutma kapasitesinin, kuraklık toleransının ve kök oluşumunun artmasıyla sonuçlanmıştır. Ancak, genlerin bulunduğu sinyal yolağı olan ve bitkilerde hücre bölünmesi ve sürgün oluşumunun başlamasından sorumlu sitokinin sinyalizasyonunun azaltılması sonucu olarak, normal koşullar altında bitki gelişimi gerilemiştir. Elde edilen bulgular ileride Domates bitkisinde bu alanda yapılacak olan moleküler karakterizasyon çalışmalarına ve sitokinin-oksin, sitokinin-ABA hormon sinyal yolaklarının anlaşılması üzerine olan çalışmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- Aharoni, A., & Galili, G. (2011). Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 239-244.
- Akagi, T., Henry, I. M., Ohtani, H., Morimoto, T., Beppu, K., Kataoka, I., & Tao, R. (2018). A Y-encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit. *The Plant Cell*, 30(4), 780-795.
- Andersen, T. G., Naseer, S., Ursache, R., Wybouw, B., Smet, W., De Rybel, B., Vermeer, J. E., & Geldner, N. (2018). Diffusible repression of cytokinin signalling produces endodermal symmetry and passage cells. *Nature*, 555(7697), 529-533.
- Anlar, H. G., & Bacanlı, M. (2020). Lycopene as an antioxidant in human health and diseases. In *Pathology* (pp. 247-254). Elsevier.
- Aremu, A. O., Masondo, N. A., Sunmonu, T. O., Kulkarni, M. G., Zatloukal, M., Spichal, L., Doležal, K., & Van Staden, J. (2014). A novel inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) influences the biochemical parameters and photosynthetic apparatus in NaCl-stressed tomato plants. *Planta*, 240(4), 877-889.
- Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., Moison, M., Blanchet, S., Ichanté, J. L., & Chabaud, M. (2012). Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 24(9), 3838-3852.
- Arunanondchai, P., Fei, C., Fisher, A., McCarl, B. A., Wang, W., & Yang, Y. (2018). How does climate change affect agriculture? In *The Routledge handbook of agricultural economics* (pp. 191-210). Routledge.
- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E. R., Qian, Q., Kitano, H., & Matsuoka, M. (2005). Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 309(5735), 741-745.
- Aswath, C. R., Kim, S. H., Mo, S. Y., & Kim, D. H. (2005). Transgenic plants of creeping bent grass harboring the stress inducible gene, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, are highly tolerant to drought and NaCl stress. *Plant growth regulation*, 47(2), 129-139.
- Azzi, A., & Stocker, A. (2000). Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in lipid Research*, 39(3), 231-255.
- Bae, S., Park, J., & Kim, J.-S. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30(10), 1473-1475.
- Baek, D., Chun, H. J., Kang, S., Shin, G., Park, S. J., Hong, H., Kim, C., Kim, D. H., Lee, S. Y., & Kim, M. C. (2016). A role for Arabidopsis miR399f in salt, drought, and ABA signaling. *Molecules and cells*, 39(2), 111.
- Baek, D., Shin, G., Kim, M. C., Shen, M., Lee, S. Y., & Yun, D.-J. (2020). Histone deacetylase HDA9 with ABI4 contributes to abscisic acid homeostasis in drought stress response. *Frontiers in plant science*, 11, 143.
- Baetz, U., & Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in plant science*, 19(2), 90-98.
- Baiano, A., & Del Nobile, M. A. (2016). Antioxidant compounds from vegetable matrices: Biosynthesis, occurrence, and extraction systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(12), 2053-2068.
- Bailey-Serres, J., Parker, J. E., Ainsworth, E. A., Oldroyd, G. E., & Schroeder, J. I. (2019). Genetic strategies for improving crop yields. *Nature*, 575(7781), 109-118.
- Bandurska, H., Stroiński, A., & Kubiś, J. (2003). The effect of jasmonic acid on the accumulation of ABA, proline and spermidine and its influence on membrane injury under water deficit in two barley genotypes. *Acta physiologiae plantarum*, 25(3), 279-285.
- Baranska, M., Schütze, W., & Schulz, H. (2006). Determination of lycopene and β -carotene content in tomato fruits and related products: comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8456-8461.

- Barbosa, E. G. G., Leite, J. P., Marin, S. R. R., Marinho, J. P., de Fátima Corrêa Carvalho, J., Fuganti-Pagliarini, R., Farias, J. R. B., Neumaier, N., Marcelino-Guimarães, F. C., & de Oliveira, M. C. N. (2013). Overexpression of the ABA-dependent AREB1 transcription factor from *Arabidopsis thaliana* improves soybean tolerance to water deficit. *Plant molecular biology reporter*, 31(3), 719-730.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Benderradji, L., Saibi, W., & Brini, F. (2021). Role of ABA in Overcoming Environmental Stress: Sensing, Signaling and Crosstalk. *Annu. Agric. Crop Sci*, 6, 1070.
- Bergounoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32(1), 170-189.
- Bielach, A., Podlešáková, K., Marhavý, P., Duclercq, J., Cuesta, C., Müller, B., Grunewald, W., Tarkowski, P., & Benková, E. (2012). Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in *Arabidopsis* by cytokinin. *The Plant Cell*, 24(10), 3967-3981.
- Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., Benková, E., Mähönen, A. P., & Helariutta, Y. (2011). A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology*, 21(11), 917-926.
- Blasco, R. B., Karaca, E., Ambrogio, C., Cheong, T.-C., Karayol, E., Minero, V. G., Voena, C., & Chiarle, R. (2014). Simple and rapid in vivo generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Cell reports*, 9(4), 1219-1227.
- Bohn, T., Desmarchelier, C., Dragsted, L. O., Nielsen, C. S., Stahl, W., Rühl, R., Keijer, J., & Borel, P. (2017). Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. *Molecular nutrition & food research*, 61(6), 1600685.
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.
- Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Bürkle, L., & Schmülling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, 44(2), 314-333.
- Brugière, N., Zhang, W., Xu, Q., Scolaro, E. J., Lu, C., Kahsay, R. Y., Kise, R., Trecker, L., Williams, R. W., & Hakimi, S. (2017). Overexpression of RING domain E3 ligase ZmXerico1 confers drought tolerance through regulation of ABA homeostasis. *Plant physiology*, 175(3), 1350-1369.
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807-838.
- Caers, M., Rudelsheim, P., Van Onckelen, H., & Horemans, S. (1985). Effect of heat stress on photosynthetic activity and chloroplast ultrastructure in correlation with endogenous cytokinin concentration in maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 26(1), 47-52.
- Carmody, M., Waszczak, C., Idänheimo, N., Saarinen, T., & Kangasjärvi, J. (2016). ROS signalling in a destabilised world: A molecular understanding of climate change. *Journal of plant physiology*, 203, 69-83.
- Casaretto, J., & Ho, T.-h. D. (2003). The transcription factors HvABI5 and HvVP1 are required for the abscisic acid induction of gene expression in barley aleurone cells. *The Plant Cell*, 15(1), 271-284.
- Casaretto, J. A., & Ho, T.-h. D. (2005). Transcriptional regulation by abscisic acid in barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds involves autoregulation of the transcription factor HvABI5. *Plant molecular biology*, 57(1), 21-34.
- Ćetković, G., Savatović, S., Čanadanović-Brunet, J., Djilas, S., Vulić, J., Mandić, A., & Četojević-Simin, D. (2012). Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food chemistry*, 133(3), 938-945.

- Chang, L., Ramireddy, E., & Schmölling, T. (2013). Lateral root formation and growth of *Arabidopsis* is redundantly regulated by cytokinin metabolism and signalling genes. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), 5021-5032.
- Chang, L., Ramireddy, E., & Schmölling, T. (2015). Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66(15), 4759-4768.
- Chasse, G. A., Mak, M. L., Deretey, E., Farkas, I., Torday, L. L., Papp, J. G., Sarma, D. S., Agarwal, A., Chakravarthi, S., & Agarwal, S. (2001). An ab initio computational study on selected lycopene isomers. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 571(1-3), 27-37.
- Chatfield, S. P., Capron, R., Severino, A., Penttilä, P. A., Alfred, S., Nahal, H., & Provart, N. J. (2013). Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in WUSCHEL-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *The Plant Journal*, 73(5), 798-813.
- Chaudhry, S., & Sidhu, G. P. S. (2022). Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: a comprehensive review. *Plant cell reports*, 41(1), 1-31.
- Chen, K., Li, G. J., Bressan, R. A., Song, C. P., Zhu, J. K., & Zhao, Y. (2020). Absciscic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 25-54.
- Chen, Y., Chen, W., Li, X., Jiang, H., Wu, P., Xia, K., Yang, Y., & Wu, G. (2014). Knockdown of LjIPT3 influences nodule development in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology*, 55(1), 183-193.
- Choi, S. H., Kim, D.-S., Kozukue, N., Kim, H.-J., Nishitani, Y., Mizuno, M., Levin, C. E., & Friedman, M. (2014). Protein, free amino acid, phenolic, β -carotene, and lycopene content, and antioxidative and cancer cell inhibitory effects of 12 greenhouse-grown commercial cherry tomato varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(2), 115-127.
- Corte, L., Mahmoud, L., Moraes, T., Mou, Z., Grosser, J., & Dutt, M. (2019). Development of improved fruit, vegetable, and ornamental crops using the CRISPR/Cas9 genome editing technique. *Plants*, 8: 601. In.
- Cortleven, A., Nitschke, S., Klaumünzer, M., Abdelgawad, H., Asard, H., Grimm, B., Riefler, M., & Schmölling, T. (2014). A novel protective function for cytokinin in the light stress response is mediated by the *Arabidopsis* histidine kinase2 and *Arabidopsis* histidine kinase3 receptors. *Plant physiology*, 164(3), 1470-1483.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology*, 11(1), 1-14.
- Dar, N. A., Amin, I., Wani, W., Wani, S. A., Shikari, A. B., Wani, S. H., & Masoodi, K. Z. (2017). Absciscic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants. *Plant Gene*, 11, 106-111.
- Daszkowska-Golec, A. (2016). The role of absciscic acid in drought stress: how ABA helps plants to cope with drought stress. In *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2* (pp. 123-151). Springer.
- de Ollas, C., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2015). Jasmonoyl isoleucine accumulation is needed for absciscic acid build-up in roots of *Arabidopsis* under water stress conditions. *Plant, cell & environment*, 38(10), 2157-2170.
- de Ollas, C., & Dodd, I. C. (2016). Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. *Plant molecular biology*, 91(6), 641-650.
- de Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Jasmonic acid transient accumulation is needed for absciscic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia Plantarum*, 147(3), 296-306.
- De Rybel, B., Adibi, M., Breda, A. S., Wendrich, J. R., Smit, M. E., Novák, O., Yamaguchi, N., Yoshida, S., Van Isterdael, G., & Palovaara, J. (2014). Integration of growth and patterning during vascular tissue formation in *Arabidopsis*. *Science*, 345(6197), 1255-1259.

- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inzé, D., Foyer, C. H., & Zhang, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 33(3), 543-555.
- Deak, K. I., & Malamy, J. (2005). Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal*, 43(1), 17-28.
- Dejonghe, W., Okamoto, M., & Cutler, S. R. (2018). Small molecule probes of ABA biosynthesis and signaling. *Plant and Cell Physiology*, 59(8), 1490-1499.
- Delacôte, F., Perez, C., Guyot, V., Duhamel, M., Rochon, C., Ollivier, N., Macmaster, R., Silva, G. H., Pâques, F., & Daboussi, F. (2013). High frequency targeted mutagenesis using engineered endonucleases and DNA-end processing enzymes. *Plos one*, 8(1), e53217.
- Dennis, P. G., Miller, A. J., & Hirsch, P. R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS microbiology ecology*, 72(3), 313-327.
- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1085.
- Dossa, K., Mmadi, M. A., Zhou, R., Liu, A., Yang, Y., Diouf, D., You, J., & Zhang, X. (2020). Ectopic expression of the sesame MYB transcription factor SiMYB305 promotes root growth and modulates ABA-mediated tolerance to drought and salt stresses in Arabidopsis. *AoB Plants*, 12(1), plz081.
- Edelman, M., & Mattoo, A. K. (2008). D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma. *Photosynthesis research*, 98(1), 609-620.
- el-Showk, S., Help-Rinta-Rahko, H., Blomster, T., Siligato, R., Maree, A. F., Mähönen, A. P., & Grieneisen, V. A. (2015). Parsimonious model of vascular patterning links transverse hormone fluxes to lateral root initiation: auxin leads the way, while cytokinin levels out. *PLoS Computational Biology*, 11(10), e1004450.
- Estrada-Melo, A. C., Chao, C., Reid, M. S., & Jiang, C.-Z. (2015). Overexpression of an ABA biosynthesis gene using a stress-inducible promoter enhances drought resistance in petunia. *Horticulture Research*, 2.
- Feng, W., Lindner, H., Robbins, N. E., & Dinneny, J. R. (2016). Growing out of stress: the role of cell-and organ-scale growth control in plant water-stress responses. *The Plant Cell*, 28(8), 1769-1782.
- Fiers, M., Golemic, E., Xu, J., van der Geest, L., Heidstra, R., Stiekema, W., & Liu, C.-M. (2005). The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in Arabidopsis through a CLAVATA2-dependent pathway. *The Plant Cell*, 17(9), 2542-2553.
- Franco-Zorrilla, J. M., Martin, A. C., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A., & Paz-Ares, J. (2002). Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 32(3), 353-360.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., & Ishiyama, K. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(12), 2123-2132.
- Fujiwara, Y., Kiyota, N., Tsurushima, K., Yoshitomi, M., Horlad, H., Ikeda, T., Nohara, T., Takeya, M., & Nagai, R. (2012). Tomatidine, a tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice by inhibiting acyl-CoA: cholesterol acyl-transferase (ACAT). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(10), 2472-2479.
- Fujiwara, Y., Yahara, S., Ikeda, T., Ono, M., & Nohara, T. (2003). Cytotoxic major saponin from tomato fruits. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 51(2), 234-235.
- Gagné-Bourque, F., Bertrand, A., Claessens, A., Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2016). Alleviation of drought stress and metabolic changes in timothy (*Phleum pratense* L.) colonized with *Bacillus subtilis* B26. *Frontiers in plant science*, 7, 584.
- Galland, M., & Rajjou, L. (2015). Regulation of mRNA translation controls seed germination and is critical for seedling vigor. In (Vol. 6, pp. 284): Frontiers Media SA.

- Gallois, J.-L., Nora, F. R., Mizukami, Y., & Sablowski, R. (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes & Development*, 18(4), 375-380.
- Gargallo-Garriga, A., Preece, C., Sardans, J., Oravec, M., Urban, O., & Peñuelas, J. (2018). Root exudate metabolomes change under drought and show limited capacity for recovery. *Scientific reports*, 8(1), 1-15.
- Gazzarrini, S., & McCourt, P. (2003). Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Annals of botany*, 91(6), 605-612.
- Georgé, S., Tourniaire, F., Gautier, H., Goupy, P., Rock, E., & Caris-Veyrat, C. (2011). Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food chemistry*, 124(4), 1603-1611.
- Ghanem, M. E., Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R., Dodd, I. C., Lutts, S., & Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3039-3050.
- Gilroy, S., Read, N., & Trewavas, A. (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature*, 346(6286), 769-771.
- Gökdemir, G., Seçgin, Z., Uluisik, S., & Kavas, M. (2022). CRISPR/Cas9 knock-out of SIPHD_MS1 (Soly04g008420) gene results in complete male sterility in tomato. *Plant growth regulation*, 98(2), 329-341.
- Gong, X., Marisiddaiah, R., & Rubin, L. P. (2017). Inhibition of pulmonary β -carotene 15, 15'-oxygenase expression by glucocorticoid involves PPAR α . *Plos one*, 12(7), e0181466.
- Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G. A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G. W., Fernández, M. A., Holdsworth, M. J., Perez-Amador, M. A., & Kollist, H. (2012). Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *The Plant Cell*, 24(6), 2483-2496.
- Gordon, S. P., Heisler, M. G., Reddy, G. V., Ohno, C., Das, P., & Meyerowitz, E. M. (2007). Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem.
- Guha, T. K., & Edgell, D. R. (2017). Applications of alternative nucleases in the age of CRISPR/Cas9. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2565.
- Guo, D., Liang, J., Qiao, Y., Yan, Y., Li, L., & Dai, Y. (2012). Involvement of G1-to-S transition and AhAUX-dependent auxin transport in abscisic acid-induced inhibition of lateral root primordia initiation in *Arachis hypogaea* L. *Journal of plant physiology*, 169(11), 1102-1111.
- Guo, Y., & Gan, S. (2011). AtMYB2 regulates whole plant senescence by inhibiting cytokinin-mediated branching at late stages of development in Arabidopsis. *Plant physiology*, 156(3), 1612-1619.
- Hamel, L.-P., Nicole, M.-C., Duplessis, S., & Ellis, B. E. (2012). Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *The Plant Cell*, 24(4), 1327-1351.
- Hamilton, E. S., Jensen, G. S., Makshev, G., Katims, A., Sherr, A. M., & Haswell, E. S. (2015). Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science*, 350(6259), 438-441.
- Harding, S., & Smigocki, A. (1994). Cytokinins modulate stress response genes in isopentenyl transferase-transformed *Nicotiana glauca* plants. *Physiologia Plantarum*, 90(2), 327-333.
- Hare, P., Cress, W., & Van Staden, J. (1997). The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant growth regulation*, 23(1), 79-103.
- He, Y., Liu, Y., Li, M., Lamin-Samu, A. T., Yang, D., Yu, X., Izhar, M., Jan, I., Ali, M., & Lu, G. (2021). The Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA32 protein regulates ABA-mediated responses to drought stress. *Frontiers in plant science*, 12, 625493.

- Held, M., Hou, H., Miri, M., Huynh, C., Ross, L., Hossain, M. S., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., & Wang, T. L. (2014). Lotus japonicus cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *The Plant Cell*, 26(2), 678-694.
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*, 172(6), 1239-1259.
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in plant science*, 12(8), 343-351.
- Hong, J. H., Seah, S. W., & Xu, J. (2013). The root of ABA action in environmental stress response. *Plant cell reports*, 32(7), 971-983.
- Howard, A. C., McNeil, A. K., & McNeil, P. L. (2011). Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. *Nature communications*, 2(1), 1-8.
- Huang, X., Hou, L., Meng, J., You, H., Li, Z., Gong, Z., Yang, S., & Shi, Y. (2018). The antagonistic action of abscisic acid and cytokinin signaling mediates drought stress response in Arabidopsis. *Molecular plant*, 11(7), 970-982.
- Huque, A. M., So, W., Noh, M., You, M. K., & Shin, J. S. (2021). Overexpression of atbbd1, Arabidopsis bifunctional nuclease, confers drought tolerance by enhancing the expression of regulatory genes in aba-mediated drought stress signaling. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2936.
- Hwang, I., & Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*, 413(6854), 383-389.
- Iannucci, A., Fragasso, M., Platani, C., & Papa, R. (2013). Plant growth and phenolic compounds in the rhizosphere soil of wild oat (*Avena fatua* L.). *Frontiers in plant science*, 4, 509.
- Ioio, R. D., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Aoyama, T., Costantino, P., & Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322(5906), 1380-1384.
- Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A., & Mizuno, T. (2008). Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 49(1), 47-57.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
- Jansen, R., Embden, J. D. v., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jayathunge, K., Stratakis, A. C., Delgado-Pando, G., & Koidis, A. (2019). Thermal and non-thermal processing technologies on intrinsic and extrinsic quality factors of tomato products: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(3), e13901.
- Jeon, J., Kim, N. Y., Kim, S., Kang, N. Y., Novák, O., Ku, S.-J., Cho, C., Lee, D. J., Lee, E.-J., & Strnad, M. (2010). A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(30), 23371-23386.
- Jiang, J., Zhang, L., Zhou, X., Chen, X., Huang, G., Li, F., Wang, R., Wu, N., Yan, Y., & Tong, C. (2016). Induction of site-specific chromosomal translocations in embryonic stem cells by CRISPR/Cas9. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Jojoa-Cruz, S., Saotome, K., Murthy, S. E., Tsui, C. C. A., Sansom, M. S., Patapoutian, A., & Ward, A. B. (2018). Cryo-EM structure of the mechanically activated ion channel OSCA1. 2. *Elife*, 7.
- Jones, A. M. (2016). A new look at stress: abscisic acid patterns and dynamics at high-resolution. *New Phytologist*, 210(1), 38-44.
- Joshi, R., Sahoo, K. K., Tripathi, A. K., Kumar, R., Gupta, B. K., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2018). Knockdown of an inflorescence meristem-specific cytokinin oxidase–

- OsCKX2 in rice reduces yield penalty under salinity stress condition. *Plant, cell & environment*, 41(5), 936-946.
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in plant science*, 7, 1029.
- Kai, M., Vespermann, A., & Piechulla, B. (2008). The growth of fungi and *Arabidopsis thaliana* is influenced by bacterial volatiles. *Plant signaling & behavior*, 3(7), 482-484.
- Kang, J., Hwang, J.-U., Lee, M., Kim, Y.-Y., Assmann, S. M., Martinoia, E., & Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2355-2360.
- Kang, J., Lee, Y., Sakakibara, H., & Martinoia, E. (2017). Cytokinin transporters: GO and STOP in signaling. *Trends in plant science*, 22(6), 455-461.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., & Seo, M. (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), 9653-9658.
- Karadeniz, A., Topcuoğlu, Ş., & İnan, S. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10), 1061-1064.
- Kaur, C., Walia, S., Nagal, S., Walia, S., Singh, J., Singh, B. B., Saha, S., Singh, B., Kalia, P., & Jaggi, S. (2013). Functional quality and antioxidant composition of selected tomato (*Solanum lycopersicon* L) cultivars grown in Northern India. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 139-145.
- Kerr, T. C., Abdel-Mageed, H., Aleman, L., Lee, J., Payton, P., Cryer, D., & Allen, R. D. (2018). Ectopic expression of two AREB/ABF orthologs increases drought tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant, cell & environment*, 41(5), 898-907.
- Kerr, T. C. C., Abdel-Mageed, H., Aleman, L., Lee, J., Payton, P., Cryer, D., & Allen, R. D. (2018). Ectopic expression of two AREB/ABF orthologs increases drought tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant, cell & environment*, 41(5), 898-907. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pce.12906>
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 12.
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development*, 145(4), dev149344.
- Kim, J.-S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Ohme-Takagi, M., & Kondou, Y. (2012). *Arabidopsis* GROWTH-REGULATING FACTOR7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A. *The Plant Cell*, 24(8), 3393-3405.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J.-S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome research*, 24(6), 1012-1019.
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual review of plant biology*, 61, 561.
- Kinet, J., & Peet, M. (1997). *Tomato*.
- Kirsh, V. A., Hayes, R. B., Mayne, S. T., Chatterjee, N., Subar, A. F., Dixon, L. B., Albanes, D., Andriole, G. L., Urban, D. A., & Peters, U. (2006). Supplemental and dietary vitamin E, β -carotene, and vitamin C intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(4), 245-254.
- Kocot, J., Luchowska-Kocot, D., Kielczykowska, M., Musik, I., & Kurzepa, J. (2017). Does vitamin C influence neurodegenerative diseases and psychiatric disorders? *Nutrients*, 9(7), 659.

- Koevoets, I. T., Venema, J. H., Elzenga, J. T. M., & Testerink, C. (2016). Roots withstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. *Frontiers in plant science*, 7, 1335.
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593-1608.
- Ku, Y.-S., Sintaha, M., Cheung, M.-Y., & Lam, H.-M. (2018). Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3206.
- Kuromori, T., Seo, M., & Shinozaki, K. (2018). ABA transport and plant water stress responses. *Trends in plant science*, 23(6), 513-522.
- Kuromori, T., Sugimoto, E., & Shinozaki, K. (2021). Brachypodium BdABCG25 is a homolog of Arabidopsis AtABCG25 involved in the transport of abscisic acid. *FEBS letters*, 595(7), 954-959.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), 1-10.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., & Herrera-Rodriguez, M. B. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell*, 19(12), 3889-3900.
- Le Hir, R., Castelain, M., Chakraborti, D., Moritz, T., Dinant, S., & Bellini, C. (2017). At bHLH68 transcription factor contributes to the regulation of ABA homeostasis and drought stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum*, 160(3), 312-327.
- Lehotai, N., Kolbert, Z., Pető, A., Feigl, G., Ördög, A., Kumar, D., Tari, I., & Erdei, L. (2012). Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of Arabidopsis thaliana L. *Journal of Experimental Botany*, 63(15), 5677-5687.
- Leibfried, A., To, J. P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J., & Lohmann, J. U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, 438(7071), 1172-1175.
- Leshem, Y., Seri, L., & Levine, A. (2007). Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant Journal*, 51(2), 185-197.
- Li, C., Yue, J., Wu, X., Xu, C., & Yu, J. (2014). An ABA-responsive DRE-binding protein gene from Setaria italica, SiARDP, the target gene of SiAREB, plays a critical role under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 65(18), 5415-5427.
- Liang, Y., Mitchell, D. M., & Harris, J. M. (2007). Absciscic acid rescues the root meristem defects of the Medicago truncatula latd mutant. *Developmental biology*, 304(1), 297-307.
- Liao, X., Guo, X., Wang, Q., Wang, Y., Zhao, D., Yao, L., Wang, S., Liu, G., & Li, T. (2017). Overexpression of Ms DREB 6.2 results in cytokinin-deficient developmental phenotypes and enhances drought tolerance in transgenic apple plants. *The Plant Journal*, 89(3), 510-526.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(8), 1391-1406.
- Liu, X., & Huang, B. (2002). Cytokinin effects on creeping bentgrass response to heat stress: II. Leaf senescence and antioxidant metabolism. *Crop science*, 42(2), 466-472.
- Liu, X., Wang, J., & Sun, L. (2018). Structure of the hyperosmolality-gated calcium-permeable channel OSCA1. 2. *Nature communications*, 9(1), 1-9.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.-H., & Ma, L. (2007). AG protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science*, 315(5819), 1712-1716.

- Liu, Y., Wen, L., Shi, Y., Su, D., Lu, W., Cheng, Y., & Li, Z. (2021). Stress-responsive tomato gene *SlGRAS4* function in drought stress and abscisic acid signaling. *Plant Science*, 304, 110804.
- Liu, Z., Yuan, L., Song, X., Yu, X., & Sundaresan, V. (2017). AHP2, AHP3, and AHP5 act downstream of CKI1 in Arabidopsis female gametophyte development. *Journal of Experimental Botany*, 68(13), 3365-3373.
- Lohar, D. P., Schaff, J. E., Laskey, J. G., Kieber, J. J., Bilyeu, K. D., & Bird, D. M. (2004). Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and rhizobial symbioses. *The Plant Journal*, 38(2), 203-214.
- Lu, C., Chen, M.-X., Liu, R., Zhang, L., Hou, X., Liu, S., Ding, X., Jiang, Y., Xu, J., & Zhang, J. (2019). Abscisic acid regulates auxin distribution to mediate maize lateral root development under salt stress. *Frontiers in plant science*, 10, 716.
- Lynch, J., & Whipps, J. (1990). Substrate Flow in the Rhizosphere, 129.
- Magnan, F., Ranty, B., Charpentreau, M., Sotta, B., Galaud, J. P., & Aldon, D. (2008). Mutations in *AtCML9*, a calmodulin-like protein from Arabidopsis thaliana, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *The Plant Journal*, 56(4), 575-589.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
- Mähönen, A., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K., & Kinoshita, K. T. örm äkangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*, 311, 94-98.
- Maity, K., Heumann, J. M., McGrath, A. P., Kopcho, N. J., Hsu, P.-K., Lee, C.-W., Mapes, J. H., Garza, D., Krishnan, S., & Morgan, G. P. (2019). Cryo-EM structure of OSCA1. 2 from *Oryza sativa* elucidates the mechanical basis of potential membrane hyperosmolality gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(28), 14309-14318.
- Malnoy, M., Viola, R., Jung, M.-H., Koo, O.-J., Kim, S., Kim, J.-S., Velasco, R., & Nagamangala Kanchiswamy, C. (2016). DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Frontiers in plant science*, 7, 1904.
- Martí, R., Leiva-Brondo, M., Lahoz, I., Campillo, C., Cebolla-Cornejo, J., & Roselló, S. (2018). Polyphenol and L-ascorbic acid content in tomato as influenced by high lycopene genotypes and organic farming at different environments. *Food chemistry*, 239, 148-156.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2004). A novel regulatory pathway of sulfate uptake in Arabidopsis roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *The Plant Journal*, 38(5), 779-789.
- Maruyama, K., Urano, K., Yoshiwara, K., Morishita, Y., Sakurai, N., Suzuki, H., Kojima, M., Sakakibara, H., Shibata, D., & Saito, K. (2014). Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. *Plant physiology*, 164(4), 1759-1771.
- Mason, M. G., Jha, D., Salt, D. E., Tester, M., Hill, K., Kieber, J. J., & Eric Schaller, G. (2010). Type-B response regulators ARR1 and ARR12 regulate expression of *AtHKT1*; 1 and accumulation of sodium in Arabidopsis shoots. *The Plant Journal*, 64(5), 753-763.
- Mathan, J., Singh, A., & Ranjan, A. (2021). Sucrose transport in response to drought and salt stress involves ABA-mediated induction of *OsSWEET13* and *OsSWEET15* in rice. *Physiologia Plantarum*, 171(4), 620-637.
- Mellor, N., Adibi, M., El-Showk, S., De Rybel, B., King, J., Mähönen, A. P., Weijers, D., & Bishopp, A. (2017). Theoretical approaches to understanding root vascular patterning: a consensus between recent models. *Journal of Experimental Botany*, 68(1), 5-16.
- Meng, W. J., Cheng, Z. J., Sang, Y. L., Zhang, M. M., Rong, X. F., Wang, Z. W., Tang, Y. Y., & Zhang, X. S. (2017). Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS specify the shoot stem cell niche by dual regulation of *WUSCHEL*. *The Plant Cell*, 29(6), 1357-1372.

- Merilo, E., Jalakas, P., Laanemets, K., Mohammadi, O., Hõrak, H., Kollist, H., & Brosché, M. (2015). Absciscic acid transport and homeostasis in the context of stomatal regulation. *Molecular plant*, 8(9), 1321-1333.
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., & Strong, F. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), 1392-1392.
- Mittler, R., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in biochemical sciences*, 37(3), 118-125.
- Miyakawa, T., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Tanokura, M. (2013). Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in plant science*, 18(5), 259-266.
- Mohan, T. C., Castrillo, G., Navarro, C., Zarco-Fernández, S., Ramireddy, E., Mateo, C., Zamarreño, A. M., Paz-Ares, J., Muñoz, R., & García-Mina, J. M. (2016). Cytokinin determines thiol-mediated arsenic tolerance and accumulation. *Plant physiology*, 171(2), 1418-1426.
- Mojica, F. J., & Rodriguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS journal*, 283(17), 3162-3169.
- Monselise, S., & Halevy, A. (1961). Detection of lycopene in pink orange fruit. *Science*, 133(3463), 1478-1478.
- Moreira, S., Bishopp, A., Carvalho, H., & Campilho, A. (2013). AHP6 inhibits cytokinin signaling to regulate the orientation of pericycle cell division during lateral root initiation. *Plos one*, 8(2), e56370.
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., & Sabatini, S. (2009). Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in plant science*, 14(10), 557-562.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Ioio, R. D., Di Mambro, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Current Biology*, 20(12), 1138-1143.
- Muchhal, U. S., & Raghothama, K. (1999). Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5868-5872.
- Muhammad Aslam, M., Waseem, M., Jakada, B. H., Okal, E. J., Lei, Z., Saqib, H. S. A., Yuan, W., Xu, W., & Zhang, Q. (2022). Mechanisms of Absciscic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1084.
- Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant physiology*, 169(1), 32-41.
- Munir, S., Liu, H., Xing, Y., Hussain, S., Ouyang, B., Zhang, Y., Li, H., & Ye, Z. (2016). Overexpression of calmodulin-like (ShCML44) stress-responsive gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses. *Scientific reports*, 6(1), 1-20.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, 59, 651.
- Muraro, D., Byrne, H., King, J., & Bennett, M. (2013). The role of auxin and cytokinin signalling in specifying the root architecture of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of theoretical biology*, 317, 71-86.
- Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J., & Tahara, S. (1999). Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4334-4339.
- Naylor, D., & Coleman-Derr, D. (2018). Drought stress and root-associated bacterial communities. *Frontiers in plant science*, 8, 2223.
- Negin, B., Shemer, O., Sorek, Y., & Eshed Williams, L. (2017). Shoot stem cell specification in roots by the WUSCHEL transcription factor. *Plos one*, 12(4), e0176093.
- Nguyen, K. H., Ha, C. V., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-González, M. A., Fujita, Y., Tran, U. T., Li, W., Tanaka, M., & Seki, M. (2016). *Arabidopsis* type B cytokinin

- response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), 3090-3095.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Kakimoto, T. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell*, 23(6), 2169-2183.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-Gonzalez, M. A., Van Ha, C., Fujita, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Herrera-Estrella, L. (2013). Arabidopsis AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(12), 4840-4845.
- Normile, D. (2017). China sprints ahead in CRISPR therapy race. In: American Association for the Advancement of Science.
- Noya, I., González-García, S., Bacenetti, J., Fiala, M., & Moreira, M. T. (2018). Environmental impacts of the cultivation-phase associated with agricultural crops for feed production. *Journal of Cleaner Production*, 172, 3721-3733.
- Pantin, F., Monnet, F., Jannaud, D., Costa, J. M., Renaud, J., Muller, B., Simonneau, T., & Genty, B. (2013). The dual effect of abscisic acid on stomata. *New Phytologist*, 197(1), 65-72.
- Patton, D. A., & Meinke, D. W. (1988). High-frequency plant regeneration from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports*, 7(4), 233-237.
- Pavlů, J., Novák, J., Koukalová, V., Luklová, M., Brzobohatý, B., & Černý, M. (2018). Cytokinin at the crossroads of abiotic stress signalling pathways. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2450.
- Pehlivan, F. E. (2017). Vitamin C: An antioxidant agent. *Vitamin C*, 2, 23-35.
- Peleg, Z., & Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 290-295.
- Peng, H., Yang, T., & Jurick, W. M. (2014). Calmodulin gene expression in response to mechanical wounding and *Botrytis cinerea* infection in tomato fruit. *Plants*, 3(3), 427-441.
- Pérez-Conesa, D., García-Alonso, J., García-Valverde, V., Iniesta, M.-D., Jacob, K., Sánchez-Siles, L. M., Ros, G., & Periago, M. J. (2009). Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. *Innovative food science & emerging technologies*, 10(2), 179-188.
- Perveen, T., Suleria, H., Anjum, F., Butt, M., Pasha, I., & Tomato, A. (2015). carotenoids and lycopenes chemistry; metabolism, absorption, nutrition, and allied health claims—a comprehensive review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 55(7), 919-929.
- Pinela, J., Oliveira, M., & Ferreira, I. (2016). Bioactive compounds of tomatoes as health promoters. *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables*, 2(3), 48-91.
- Porcel, R., Zamarreño, Á. M., García-Mina, J. M., & Aroca, R. (2014). Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC plant biology*, 14(1), 1-12.
- Przybylska, S. (2020). Lycopene—a bioactive carotenoid offering multiple health benefits: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 11-32.
- Puchta, H., & Fauser, F. (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal*, 78(5), 727-741.
- Puertolas, J., Alcobendas, R., Alarcon, J. J., & Dodd, I. C. (2013). Long-distance abscisic acid signalling under different vertical soil moisture gradients depends on bulk root water potential and average soil water content in the root zone. *Plant, cell & environment*, 36(8), 1465-1475.
- Qian, D., Zhang, Z., He, J., Zhang, P., Ou, X., Li, T., Niu, L., Nan, Q., Niu, Y., & He, W. (2019). Arabidopsis ADF5 promotes stomatal closure by regulating actin cytoskeleton remodeling in response to ABA and drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 70(2), 435-446.

- Qiu, P., Shandilya, H., D'Alessio, J. M., O'Connor, K., Durocher, J., & Gerard, G. F. (2004). Mutation detection using Surveyor™ nuclease. *Biotechniques*, 36(4), 702-707.
- Quiroz-Figueroa, F., Rodríguez-Acosta, A., Salazar-Blas, A., Hernández-Domínguez, E., Campos, M. E., Kitahata, N., Asami, T., Galaz-Avalos, R. M., & Cassab, G. I. (2010). Accumulation of high levels of ABA regulates the pleiotropic response of the *nhr1* Arabidopsis mutant. *Journal of Plant Biology*, 53(1), 32-44.
- Raiola, A., Rigano, M. M., Calafiore, R., Frusciante, L., & Barone, A. (2014). Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of inflammation*, 2014.
- Rao, A. (2002). Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Experimental biology and medicine*, 227(10), 908-913.
- Raza, A., Razzaq, A., Mehmood, S. S., Zou, X., Zhang, X., Lv, Y., & Xu, J. (2019). Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. *Plants*, 8(2), 34.
- Razem, F. A., Baron, K., & Hill, R. D. (2006). Turning on gibberellin and abscisic acid signaling. *Current opinion in plant biology*, 9(5), 454-459.
- Reyes-Olalde, J. I., Zúñiga-Mayo, V. M., Serwatowska, J., Chavez Montes, R. A., Lozano-Sotomayor, P., Herrera-Ubaldo, H., Gonzalez-Aguilera, K. L., Ballester, P., Ripoll, J. J., & Ezquer, I. (2017). The bHLH transcription factor SPATULA enables cytokinin signaling, and both activate auxin biosynthesis and transport genes at the medial domain of the gynoecium. *PLoS Genetics*, 13(4), e1006726.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., & Schmülling, T. (2006). Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, 18(1), 40-54.
- Romanov, G. A., Lomin, S. N., & Schmülling, T. (2018). Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! *New Phytologist*, 218(1), 41-53.
- Rong, X. F., Sang, Y. L., Wang, L., Meng, W. J., Zou, C. H., Dong, Y. X., Bie, X. M., Cheng, Z. J., & Zhang, X. S. (2018). Type-B ARR_s control carpel regeneration through mediating AGAMOUS expression in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 761-769.
- Rossopoff, O., Chelysheva, L., Saffar, J., Lecorgne, L., Gey, D., Caillieux, E., Colot, V., Roudier, F., Hilsen, P., & Berthomé, R. (2017). Direct conversion of root primordium into shoot meristem relies on timing of stem cell niche development. *Development*, 144(7), 1187-1200.
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, 148(3), 1547-1556.
- Saavedra, X., Modrego, A., Rodríguez, D., González-García, M. P., Sanz, L., Nicola, G., & Lorenzo, O. (2010). The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. *Plant physiology*, 152(1), 133-150.
- Sajeev, N., Bai, B., & Bentsink, L. (2019). Seeds: A unique system to study translational regulation. *Trends in plant science*, 24(6), 487-495.
- Sano, N., & Marion-Poll, A. (2021). ABA metabolism and homeostasis in seed dormancy and germination. *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5069.
- Schaller, G. E., Bishopp, A., & Kieber, J. J. (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*, 27(1), 44-63.
- Secgin, Z., Uluisik, S., Yıldırım, K., Abdulla, M. F., Mostafa, K., & Kavas, M. (2022). Genome-Wide Identification of the Aconitase Gene Family in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and CRISPR-Based Functional Characterization of SLACO2 on Male-Sterility. *International journal of molecular sciences*, 23(22), 13963.
- Séguéla, M., Briat, J. F., Vert, G., & Curie, C. (2008). Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in Arabidopsis through a growth-dependent pathway. *The Plant Journal*, 55(2), 289-300.

- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., & Battaglia, M. L. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10(2), 259.
- Seo, M., Kanno, Y., Frey, A., North, H. M., & Marion-Poll, A. (2016). Dissection of Arabidopsis NCED9 promoter regulatory regions reveals a role for ABA synthesized in embryos in the regulation of GA-dependent seed germination. *Plant Science*, 246, 91-97.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J. J., & Qiu, J.-L. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(8), 686-688.
- Sharma, S., Villamor, J. G., & Verslues, P. E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant physiology*, 157(1), 292-304.
- Shivram, H., Cress, B. F., Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2021). Controlling and enhancing CRISPR systems. *Nature chemical biology*, 17(1), 10-19.
- Sirko, A., Wawrzyńska, A., Brzywczy, J., & Sienko, M. (2021). Control of ABA signaling and crosstalk with other hormones by the selective degradation of pathway components. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4638.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J. M., Al-Niemi, T., Dyer, W. E., Ho, T.-H. D., & Qu, R. (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science*, 155(1), 1-9.
- Skoog, F. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol.,
- Soar, C. J., Speirs, J., Maffei, S., Penrose, A., McCarthy, M. G., & Loveys, B. (2006). Grape vine varieties Shiraz and Grenache differ in their stomatal response to VPD: apparent links with ABA physiology and gene expression in leaf tissue. *Australian journal of grape and wine research*, 12(1), 2-12.
- Speirs, J., Binney, A., Collins, M., Edwards, E., & Loveys, B. (2013). Expression of ABA synthesis and metabolism genes under different irrigation strategies and atmospheric VPDs is associated with stomatal conductance in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon). *Journal of Experimental Botany*, 64(7), 1907-1916.
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V. T., Govind, G., Seiler, C., & Kohli, A. (2012). Contrapuntal role of ABA: does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene*, 506(2), 265-273.
- Sridha, S., & Wu, K. (2006). Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 46(1), 124-133.
- Stahl, W., & Sies, H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Archives of biochemistry and biophysics*, 336(1), 1-9.
- Stemmer, M., Thumberger, T., del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J., & Mateo, J. L. (2015). CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *Plos one*, 10(4), e0124633.
- Sun, L., Zhang, Q., Wu, J., Zhang, L., Jiao, X., Zhang, S., Zhang, Z., Sun, D., Lu, T., & Sun, Y. (2014). Two rice authentic histidine phosphotransfer proteins, OsAHP1 and OsAHP2, mediate cytokinin signaling and stress responses in rice. *Plant physiology*, 165(1), 335-345.
- Sweetlove, L. J., Fell, D., & Fernie, A. R. (2008). Getting to grips with the plant metabolic network. *Biochemical Journal*, 409(1), 27-41.
- Szabo, K., Cătoi, A.-F., & Vodnar, D. C. (2018). Bioactive compounds extracted from tomato processing by-products as a source of valuable nutrients. *Plant foods for human nutrition*, 73(4), 268-277.
- Tang, N., Zhang, H., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2012). Constitutive activation of transcription factor OsZIP46 improves drought tolerance in rice. *Plant physiology*, 158(4), 1755-1768.

- Thole, J. M., Beisner, E. R., Liu, J., Venkova, S. V., & Strader, L. C. (2014). Absciscic acid regulates root elongation through the activities of auxin and ethylene in *Arabidopsis thaliana*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(7), 1259-1274.
- Tian, Q., Uhler, N. J., & Reed, J. W. (2002). *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *The Plant Cell*, 14(2), 301-319.
- Todaka, D., Zhao, Y., Yoshida, T., Kudo, M., Kidokoro, S., Mizoi, J., Kodaira, K. S., Takebayashi, Y., Kojima, M., & Sakakibara, H. (2017). Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *The Plant Journal*, 90(1), 61-78.
- Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2012). *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *The Plant Journal*, 69(2), 355-365.
- Tran, L.-S. P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(51), 20623-20628.
- van Zeijl, A., den Camp, R. H. O., Deinum, E. E., Charnikhova, T., Franssen, H., den Camp, H. J. O., Bouwmeester, H., Kohlen, W., Bisseling, T., & Geurts, R. (2015). Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide signaling triggers accumulation of cytokinins in *Medicago truncatula* roots. *Molecular plant*, 8(8), 1213-1226.
- Veerassamy, M., He, Y., & Huang, B. (2007). Leaf senescence and protein metabolism in creeping bentgrass exposed to heat stress and treated with cytokinins. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(4), 467-472.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16(1), 1-10.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R., & Pandey, M. (2017). Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161.
- Wang, J., Tian, C., Zhang, C., Shi, B., Cao, X., Zhang, T.-Q., Zhao, Z., Wang, J.-W., & Jiao, Y. (2017). Cytokinin signaling activates WUSCHEL expression during axillary meristem initiation. *The Plant Cell*, 29(6), 1373-1387.
- Wang, T., Zhang, H., & Zhu, H. (2019). CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops. *Horticulture Research*, 6.
- Wang, Y.-H., Que, F., Li, T., Zhang, R.-R., Khadr, A., Xu, Z.-S., Tian, Y.-S., & Xiong, A.-S. (2021). DcABF3, an ABF transcription factor from carrot, alters stomatal density and reduces ABA sensitivity in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Science*, 302, 110699.
- Wang, Y., Beath, M., Chalifoux, M., Ying, J., Uchacz, T., Sarvas, C., Griffiths, R., Kuzma, M., Wan, J., & Huang, Y. (2009). Shoot-specific down-regulation of protein farnesyltransferase (α -subunit) for yield protection against drought in canola. *Molecular plant*, 2(1), 191-200.
- Wang, Y., Shen, W., Chan, Z., & Wu, Y. (2015). Endogenous cytokinin overproduction modulates ROS homeostasis and decreases salt stress resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 6, 1004.
- Watanabe, K., Kobayashi, A., Endo, M., Sage-Ono, K., Toki, S., & Ono, M. (2017). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U., & Schmülling, T. (2010). Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *The Plant Cell*, 22(12), 3905-3920.
- Werner, T. s., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., & Schmülling, T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental

- alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, 15(11), 2532-2550.
- Williams, A., & de Vries, F. T. (2020). Plant root exudation under drought: implications for ecosystem functioning. *New Phytologist*, 225(5), 1899-1905.
- Wolfs, J. M., Hamilton, T. A., Lant, J. T., Laforet, M., Zhang, J., Salemi, L. M., Gloor, G. B., Schild-Poulter, C., & Edgell, D. R. (2016). Biasing genome-editing events toward precise length deletions with an RNA-guided TevCas9 dual nuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(52), 14988-14993.
- Wybouw, B., & De Rybel, B. (2019). Cytokinin—a developing story. *Trends in plant science*, 24(2), 177-185.
- Xie, M., Chen, H., Huang, L., O’Neil, R. C., Shokhirev, M. N., & Ecker, J. R. (2018). A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nature communications*, 9(1), 1-13.
- Xiong, C., Zhao, S., Yu, X., Sun, Y., Li, H., Ruan, C., & Li, J. (2020). Yellowhorn drought-induced transcription factor XsWRKY20 acts as a positive regulator in drought stress through ROS homeostasis and ABA signaling pathway. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 187-195.
- Xu, M., Li, H., Liu, Z.-N., Wang, X.-H., Xu, P., Dai, S.-J., Cao, X., & Cui, X.-Y. (2021). The soybean CBL-interacting protein kinase, GmCIPK2, positively regulates drought tolerance and ABA signaling. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 980-989.
- Xu, Y., Gianfagna, T., & Huang, B. (2010). Proteomic changes associated with expression of a gene (ipt) controlling cytokinin synthesis for improving heat tolerance in a perennial grass species. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3273-3289.
- Xu, Y., Tian, J., Gianfagna, T., & Huang, B. (2009). Effects of SAG12-ipt expression on cytokinin production, growth and senescence of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) under heat stress. *Plant growth regulation*, 57(3), 281-291.
- Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Zhu, Q., & Liu, L. (2002). Absciscic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta*, 215(4), 645-652.
- Yao, L., Cheng, X., Gu, Z., Huang, W., Li, S., Wang, L., Wang, Y.-F., Xu, P., Ma, H., & Ge, X. (2018). The AWPM-19 family protein OsPM1 mediates abscisic acid influx and drought response in rice. *The Plant Cell*, 30(6), 1258-1276.
- Yu, J., Tu, L., Subburaj, S., Bae, S., & Lee, G.-J. (2021). Simultaneous targeting of duplicated genes in *Petunia* protoplasts for flower color modification via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Plant cell reports*, 40(6), 1037-1045.
- Yuan, F., Yang, H., Xue, Y., Kong, D., Ye, R., Li, C., Zhang, J., Theprungsirikul, L., Shrift, T., & Krichilsky, B. (2014). OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*, 514(7522), 367-371.
- Yuan, L., Liu, Z., Song, X., Johnson, C., Yu, X., & Sundaresan, V. (2016). The CKI1 histidine kinase specifies the female gametic precursor of the endosperm. *Developmental cell*, 37(1), 34-46.
- YUASA, T., KUBO, Y., FUJIMAKI, W., & ISHII, T. (2021). Water Stress Activates The Expression of Absciscic Acid Transporter, VuABCG25, in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Cryobiology and Cryotechnology*, 67(1), 65-70.
- Zaripheh, S., Boileau, T. W.-M., Lila, M. A., & Erdman Jr, J. W. (2003). [14C]-lycopene and [14C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. *The Journal of nutrition*, 133(12), 4189-4195.
- Zhalnina, K., Louie, K. B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U. N., Shi, S., Cho, H., Karaoz, U., Loqué, D., & Bowen, B. P. (2018). Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature microbiology*, 3(4), 470-480.
- Zhang, A., Ji, Y., Sun, M., Lin, C., Zhou, P., Ren, J., Luo, D., Wang, X., Ma, C., & Zhang, X. (2021). Research on the drought tolerance mechanism of *Pennisetum glaucum* (L.) in the root during the seedling stage. *BMC genomics*, 22(1), 1-14.

- Zhang, B., Yang, X., Yang, C., Li, M., & Guo, Y. (2016). Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.
- Zhang, D., Li, Z., & Li, J.-F. (2016). Targeted gene manipulation in plants using the CRISPR/Cas technology. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(5), 251-262.
- Zhang, H., Liu, D., Yang, B., Liu, W.-Z., Mu, B., Song, H., Chen, B., Li, Y., Ren, D., & Deng, H. (2020). Arabidopsis CPK6 positively regulates ABA signaling and drought tolerance through phosphorylating ABA-responsive element-binding factors. *Journal of Experimental Botany*, 71(1), 188-203.
- Zhang, H., Zhu, H., Pan, Y., Yu, Y., Luan, S., & Li, L. (2014). A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in Arabidopsis. *Molecular plant*, 7(10), 1522-1532.
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J.-K. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 23(2), 104-119.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J., & Ismail, A. M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, 97(1), 111-119.
- Zhang, S., Haider, I., Kohlen, W., Jiang, L., Bouwmeester, H., Meijer, A. H., Schluepmann, H., Liu, C.-M., & Ouwerkerk, P. B. (2012). Function of the HD-Zip I gene Oshox22 in ABA-mediated drought and salt tolerances in rice. *Plant molecular biology*, 80(6), 571-585.
- Zhang, T.-Q., Lian, H., Zhou, C.-M., Xu, L., Jiao, Y., & Wang, J.-W. (2017). A two-step model for de novo activation of WUSCHEL during plant shoot regeneration. *The Plant Cell*, 29(5), 1073-1087.
- Zhang, X., Wang, L., Meng, H., Wen, H., Fan, Y., & Zhao, J. (2011). Maize ABP9 enhances tolerance to multiple stresses in transgenic Arabidopsis by modulating ABA signaling and cellular levels of reactive oxygen species. *Plant molecular biology*, 75(4), 365-378.
- Zhang, X., Wollenweber, B., Jiang, D., Liu, F., & Zhao, J. (2008). Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic Arabidopsis thaliana constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor. *Journal of Experimental Botany*, 59(4), 839-848.
- Zhang, Y., Kilambi, H. V., Liu, J., Bar, H., Lazary, S., Egbaria, A., Ripper, D., Charrier, L., Belew, Z. M., & Wulff, N. (2021). ABA homeostasis and long-distance translocation are redundantly regulated by ABCG ABA importers. *Science advances*, 7(43), eabf6069.
- Zhang, Y., Yang, J., Lu, S., Cai, J., & Guo, Z. (2008). Overexpressing SgNCED1 in tobacco increases ABA level, antioxidant enzyme activities, and stress tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(2), 151-158.
- Zhou, Y., He, R., Guo, Y., Liu, K., Huang, G., Peng, C., Liu, Y., Zhang, M., Li, Z., & Duan, L. (2019). A novel ABA functional analogue B2 enhances drought tolerance in wheat. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- Zhu, J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53, 247.
- Zhu, J.-K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.
- Zou, M., Guan, Y., Ren, H., Zhang, F., & Chen, F. (2008). A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance. *Plant molecular biology*, 66(6), 675-683.
- Zubo, Y. O., Blakley, I. C., Yamburenko, M. V., Worthen, J. M., Street, I. H., Franco-Zorrilla, J. M., Zhang, W., Hill, K., Raines, T., & Solano, R. (2017). Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), E5995-E6004.

ÖZ GEÇMİŞ

Abdullah AYDIN, Gazimağusa/K.K.T.C. Namık Kemal Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji bölümünden 28.06.2020 tarihinde mezun oldu. 2020 yılında OMÜ LEE Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. A seviyesinde İngilizce bilgisi mevcuttur.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : <https://orcid.org/0000-0003-1628-8064>

Yayınlar:

1. Abdullah Aydın, Musa Kavas, Bayram Ali Yerlikaya (2022), Domates Meyve Olgunlaşmasında AHP Geninin Anahtar Rolü Olabilir mi?, Molbiotech 74-84, E-ISBN:978-605-73778-7-6

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. TÜBİTAK 1001 Proje Bursiyeri