

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Cicer reticulatum Ladiz.'DEN *C. arietinum* L.'YE SOĞUĞA TOLERANS
GENLERİNİN AKTARIMI VE POTANSİYEL FİZYOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL SEÇİM KRİTERLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER

Tuba DOĞRAMACI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ARALIK 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Cicer reticulatum* Ladiz.'DEN *C. arietinum* L.'YE SOĞUĞA TOLERANS
GENLERİNİN AKTARIMI VE POTANSİYEL FİZYOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL SEÇİM KRİTERLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Tuba DOĞRAMACI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ARALIK 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Cicer reticulatum* Ladiz.'DEN *C. arietinum* L.'YE SOĞUĞA TOLERANS
GENLERİNİN AKTARIMI VE POTANSİYEL FİZYOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL SEÇİM KRİTERLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Tuba DOĞRAMACI
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FDK-2024-6631 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ARALIK 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Cicer reticulatum* Ladiz.'DEN *C. arietinum* L.'YE SOĞUĞA TOLERANS
GENLERİNİN AKTARIMI VE POTANSİYEL FİZYOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL SEÇİM KRİTERLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Tuba DOĞRAMACI
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 26/12/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cengiz TOKER (Danışman)

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI

Doç. Dr. Melike BAKIR

Doç. Dr. İbrahim ÇELİK

ÖZET

***Cicer reticulatum* Ladiz.'DEN *C. arietinum* L.'YE SOĞUĞA TOLERANS GENLERİNİN AKTARIMI VE POTANSİYEL FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL SEÇİM KRİTERLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Tuba DOĞRAMACI

Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Aralık 2025; 78 sayfa

Bitkilerde düşük sıcaklık ve don stresine verilen metabolik yanıtlar, soğuk toleransının belirlenmesinde kritik bir role sahiptir. Ancak önceki çalışmaların büyük çoğunluğu soğuk aklimasyonuna odaklandığından, don koşullarında gerçekleşen metabolik değişimler ile dayanıklı ve hassas genotiplerin seçiminde kullanılabilecek potansiyel seleksiyon kriterlerine dair bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, *Cicer arietinum* L. (CA 2969) ve *C. reticulatum* Ladiz. (AWC 602) türler arası melezinden köken alan 163 rekombinant kendilenmiş hattının (RIL) don koşullarında soğuğa dayanıklılık seviyeleri belirlenmiştir. Bu nohut hatlarından seçilen 5 dayanıklı ve 5 hassas RIL hattı don öncesi (4°C), don (-12°C) ve don sonrası koşullarında oluşan biyokimyasal değişimler, çok değişkenli istatistiksel yöntemler ve hedeflenen metabolit analizleri kullanılarak kapsamlı biçimde incelenmiştir. Don dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL hatları) genotiplerin organik asitleri [sitrik asit (CA), süksinik asit (SA), fumarik asit (FA), malik asit (MA) ve malonik asit (MoA)], yağ asitleri [palmitik asit (PA), stearik asit (StA), linoleik asit (LA) ve linolenik asit (LNA)] ve aminoasitlerden [aspartik asit (Asp) ve triptofan (Trp)] oluşan 11 temel metabolit açısından metabolik profilleri karşılaştırılmıştır. PLS-DA analizleri, üç uygulama koşulunda da dayanıklı ve hassas grupların belirgin şekilde ayrıştığını göstermiştir. VIP analizleri, tüm koşullarda MoA, MA ve LNA'nın gruplar arasındaki ayrımı en güçlü şekilde yansıtan değişkenler olduğunu ortaya koymuştur. Isı haritası analizi, dayanıklı genotiplerde don öncesinde LA, MoA, Trp, LNA, MA ve FA'nın; don koşullarında ise SA hariç tüm metabolitlerin; don sonrasında ise CA, MoA, PA, LA, FA, MA ve LNA'nın daha yüksek seviyelerde biriktiğini göstermiştir. Don stresine verilen yanıt metabolit düzeyinde incelendiğinde, dayanıklı genotiplerde organik asitler ve yağ asitlerinde belirgin artışlar gözlenirken; hassas genotiplerde bu metabolitlerde genel olarak azalış veya değişim göstermeme eğilimi ile daha sınırlı ve yetersiz bir metabolik adaptasyon ortaya koydukları belirlenmiştir. Don sonrası iyileşme fazında dayanıklı genotiplerin metabolit düzeylerinde belirgin azalış gözlenmesi, bu genotiplerin stres sonrasında homeostatik metabolik düzenlemeyi hızla geri kazanabildiğini göstermektedir. Sonuçlar, soğuğa dayanıklı nohut genotiplerinin membran akışkanlığını koruma, enerji üretimini artırma ve aminoasit metabolizmasını yeniden programlama gibi kritik mekanizmalar üzerinden daha etkin bir stres adaptasyonu geliştirdiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, soğuk toleransı ile ilişkili metabolik belirteçlerin tanımlanmasına katkı sağlamakta ve nohut ıslah programları için değerlendirilebilir biyokimyasal göstergeler sunmaktadır.

ANAHTAR KELİMELEER: Aminoasitler, Don stresı, Nohut, Organik asitler, Seleksıyon kriterleri, Yağ asitleri

JÜRİ: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI

Doç. Dr. Melike BAKIR

Doç. Dr. İbrahim ÇELİK



ABSTRACT

INTROGRESSION OF COLD TOLERANCE GENES FROM *Cicer reticulatum* Ladiz. TO *C. arietinum* L. AND RELATIONSHIPS BETWEEN POTENTIAL PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SELECTION CRITERIA

Tuba DOĞRAMACI

PhD Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Cengiz TOKER

December 2025; 78 pages

Metabolic responses to low temperature and freezing stress play a critical role in determining cold tolerance in plants. However, since most previous studies have focused on cold acclimation, information on metabolic changes occurring under freezing conditions and potential selection criteria for distinguishing tolerant and sensitive genotypes remains highly limited. In this study, the freezing tolerance levels of 163 RILs derived from an interspecific cross between *Cicer arietinum* L. (CA 2969) and *C. reticulatum* (AWC 602) were evaluated under freezing conditions. Among these chickpea lines, five freezing-tolerant and five sensitive RILs were selected, and biochemical changes occurring under pre-freezing (4°C), freezing (-12°C), and post-freezing conditions were comprehensively investigated using multivariate statistical approaches and targeted metabolite analyses. The metabolic profiles of tolerant (AWC 602 and tolerant RILs) and sensitive (CA 2969 and sensitive RILs) genotypes were compared based on 11 key metabolites consisting of organic acids [citric acid (CA), succinic acid (SA), fumaric acid (FA), malic acid (MA), and malonic acid (MoA)], fatty acids [palmitic acid (PA), stearic acid (StA), linoleic acid (LA), and linolenic acid (LNA)], and amino acids [aspartic acid (Asp) and tryptophan (Trp)]. PLS-DA analyses demonstrated a clear separation between tolerant and sensitive groups across all treatment conditions. VIP analyses revealed that MoA, MA, and LNA were the most influential variables distinguishing the groups under all conditions. Heatmap analysis showed higher accumulation of LA, MoA, Trp, LNA, MA, and FA in tolerant genotypes pre-freezing; all metabolites except SA during freezing; and CA, MoA, PA, LA, FA, MA, and LNA post-freezing. Metabolite-level evaluation of freezing responses indicated pronounced increases in organic and fatty acids in tolerant genotypes, whereas sensitive genotypes displayed decreases or minimal changes, reflecting a limited and insufficient metabolic adaptation. The marked reduction in metabolite levels during the post-freezing recovery phase in tolerant genotypes suggests their ability to rapidly restore homeostatic metabolic regulation after stress. Overall, the findings indicate that cold-tolerant chickpea genotypes develop a more effective stress adaptation through mechanisms such as maintaining membrane fluidity, enhancing energy production, and reprogramming amino acid metabolism. This study contributes to the identification of metabolic markers associated with cold tolerance and provides valuable biochemical indicators for chickpea breeding programs.

KEYWORDS: Amino acids, Chickpea, Fatty acids, Freezing stress, Organic acids, Selection criteria

COMMITTEE: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI

Assoc. Prof. Dr. Melike BAKIR

Assoc. Prof. Dr. İbrahim ÇELİK



ÖNSÖZ

Nohut, ülkemizde ve dünyada severek tüketilen, sofralarımızdan eksik olmayan değerli bir baklagildir. Özellikle hayvansal proteine erişimin zor olduğu bölgelerde ve et yemeyen toplumlarda bitkisel protein kaynağı olarak insanların yaşamında önemli bir yere sahiptir. Ancak küresel iklim değişikliği, alışılagelmiş yağış düzenlerini değiştirerek nohudun yetiştiriciliğini doğrudan etkilemektedir. İlkbahar dönemindeki kuraklıklar, bu kıymetli ürünün veriminde ciddi kayıplara yol açmakta ve üreticilerin karşı karşıya kaldığı zorlukları artırmaktadır. Bu nedenle nohut ekiminin kış dönemine kaydırılması, yağışlardan daha fazla faydalanma ve üretimde istikrar sağlama açısından önemli bir fırsat sunmaktadır. Bununla birlikte, kışlık ekim düşük sıcaklıklar ve don riskini beraberinde getirmekte ve nohut bitkisinin bu koşullara olan hassasiyeti önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu durum, soğuğa ve dona daha dayanıklı nohut hatlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu tez çalışmasının en temel amacı da, soğuk koşullara dayanıklı nohut hatlarının geliştirilmesine katkı sağlamak ve bu süreçte kullanılabilecek fizyolojik ve biyokimyasal göstergeleri ortaya koymaktır. İslah çalışmalarının en zorlu yönlerinden biri, araştırmanın doğal iklim koşullarına bağımlı olmasıdır. Bazı yıllar beklenen düşük sıcaklıklar meydana gelmez ve seleksiyon için uygun ortam sağlanamaz. Araştırmanın bir yılının boşa gitme ihtimali, süreci yavaşlatan büyük bir belirsizliktir. Bu nedenle kontrollü iklim odalarında yapılan çalışmalar araştırmacılar için önemli avantajlar sunar. Fakat yine de bitkilerin fenotipik değişimlerini takip etmek sabır ve zaman gerektirir. Bu noktada fizyolojik ve biyokimyasal ölçütlerin belirlenmesi, ıslah sürecinin hızlandırılmasına katkı sağlayacak önemli bir gereklilik hâline gelmiştir. Denemeler boyunca yalnızca bitkilerin dış görünüşlerine değil, adeta iç dünyalarındaki değişimlere de tanıklık edilmiştir. Donmuş gibi görünen bir bitkinin birkaç gün sonra yeniden canlanması, bu tez sürecinin en heyecan verici anlarından biri olarak anılarda kalmıştır. “Bu bitkilerin nasıl oluyor da bu zorlu koşullara rağmen hayatta kalabiliyor?” sorusu, araştırmaya olan merakı ve bağlılığı daha da derinleştirmiştir. Bu anlamda bu tez çalışması, bilimsel olduğu kadar duygusal ve öğretici bir yolculuğa dönüşmüştür.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, desteğini ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Cengiz TOKER’e içtenlikle teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında ve biyokimyasal analizlerde desteğini esirgemeyen ve bilgilerini paylaşan Prof. Dr. M. Fatih CENGİZ hocama teşekkür ederim.

Bu tez çalışması kapsamında doktora eğitimim süresince maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı’na (BİDEB) teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca TÜBİTAK BİDEB 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında desteklenmiş olmaktan dolayı memnuniyet duyuyor ve sağlanan bu değerli desteği içtenlikle takdir ediyorum.

Tez sürecinin her aşamasında moral ve motivasyon kaynağım olan annem Müşerref EKER’e ve babam Orhan EKER’e ne kadar teşekkür etsem azdır. Tez sürecinin en zorlu dönemlerinde bile yanımda olan, desteğini, anlayışını ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Ziya DOĞRAMACI’ya en derin sevgimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	5
2.1. Soğuk ve Donma Stresinin Nohut Bitkisinde Yarattığı Etkiler	5
2.2. Soğuk Toleransı için Genetik Çeşitlilik ve Islah.....	6
2.3. Soğuk Toleransında Rol Oynayan Fizyolojik ve Biyokimyasal Metabolitler	8
2.3.1. Organik asitler	8
2.3.2. Yağ asitleri.....	11
2.3.3. Aminoasitler	13
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Bitki Materyali	16
3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Soğuk Uygulamaları	16
3.3. Soğuğa Dayanıklılık Gözlemi	17
3.4. Biyokimyasal Analizler İçin Örneklerin Toplanması	18
3.5. Metabolit Ekstraksiyonu ve GC-MS Analizi	18
3.5.1. Metabolitlerin ekstraksiyonu	18
3.5.2. Türevlendirme.....	19
3.5.3. GC-MS analiz koşulları	20
3.6. Çalışmadaki Metabolitler	21
3.7. İstatistiksel Analizler	21
4. BULGULAR	23
4.1. 1-9 Ölçeğine Göre Genotiplerin Don Toleransı ve Fenotipik Dağılımları	23
4.2. PLS-DA Puan Grafiği	24

4.3. Isı Haritası	27
4.4. Don Öncesi, Don ve Don sonrası Koşullarına Göre Metabolitlerin Değişimi	29
4.4.1. Organik asitlerdeki değişimler.....	29
4.4.2. Yağ asitlerindeki değişimler	34
4.4.3. Aminoasitlerdeki değişimler.....	38
5. TARTIŞMA	41
5.1. <i>C. reticulatum</i> 'dan Kültür Nohuduna Soğuğa Dayanıklılık Aktarımı	41
5.2. Organik Asitlerin Soğuk Toleransındaki Rolü	41
5.2.1. Sitrik asit (CA).....	41
5.2.2. Süksinik asit (SA).....	43
5.2.3. Fumarik asit (FA)	44
5.2.4. Malik asit (MA)	46
5.2.5. Malonik asit (MoA)	47
5.3. Yağ Asitlerinin Soğuk Toleransındaki Rolü	49
5.4. Aminoasitlerin Soğuk Toleransındaki Rolü	51
5.4.1. Aspartik asit (Asp).....	51
5.4.2. Triptofan (Trp).....	52
6. SONUÇLAR	55
7. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Cicer reticulatum* Ladiz.’den *C. arietinum* L.’ye Soğuğa Tolerans Genlerinin Aktarımı ve Potansiyel Fizyolojik ve Biyokimyasal Seçim Kriterleri Arasındaki İlişkiler” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

26/12/2025

Tuba DOĞRAMACI

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat derece
g	: Gram
cm	: Santimetre
mm ³	: Milimetreküp
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
N	: Normalite
v	: Hacim
rpm	: Revolutions per minute
ppm	: Milyonda bir parça
dk	: Dakika
m/z	: kütle/yük (mass-to-charge ratio)
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
pH	: Potansiyel hidrojen

Kısaltmalar

AAE	: Asil aktifleştirici enzim
AOX	: Alternatif oksidaz
Asp	: Aspartik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
CA	: Sitrik asit
CAT	: Katalaz
COX	: Sitokrom C oksidaz
CS	: Sitrat sentaz
cyMDH	: Sitoplazmik malat dehidrogenaz

DEG	: Differantially expressed gene
DTC	: Dikarboksilat-trikarboksilat taşıyıcılar
FA	: Fumarik asit
FAD	: Yağ asidi desatüraz
FUM	: Fumaraz
GABA	: Gama aminobütirik asit
GC-MS	: Gas chromatography/mass spectrometry
IAA	: Indol asetik asit
JA	: Jasmonik asit
LA	: Linoleik asit
LNA	: Linolanik asit
LOX	: Lipoksigenaz
MA	: Malik asit
MDA	: Malondialdehit
MDH	: Malat dehidrogenaz
MoA	: Malonik asit
MtFAS	: Mitokdriyal yağ asidi sentezi
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NIST	: National Institute of Standards and Technology
PA	: Palmitik asit
PEPC	: Fosfoenolpirüvat Karboksilaz
PLS-DA	: Partial least squares-discriminant analysis
POD	: Peroksidaz
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
RIL	: Rekombinant kendilenmiş hat
RNA	: Ribonükleik asit

ROS	: Reaktif oksijen türleri
SA	: Süksinik asit
SDH	: Süksinat dehidrogenaz
SFA	: Doymuş yağ asidi
SOD	: Süperoksit dismutaz
StA	: Stearik asit
TCA	: Trikarboksilik asit
Trp	: Triptofan
UFA	: Doymamış yağ asidi
VIP	: Projeksiyonda değişken önemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. a) İklim odasında bitkilerin yetiştirilmesi ve soğuğa alıştırma aşaması b) İklim odasında don sıcaklıkları uygulaması.....	17
Şekil 3.2. Nohut bitkilerinde metabolit ekstraksiyon aşamaları a) Numunelerin ekstraksiyon için hazırlanması ve b) Bitki yapraklarının sıvı azot yardımıyla öğütülmesi c) Numunelere ekstraksiyon çözeltisi eklenmiş hali d) Ekstrakte edilmiş numuneler.....	19
Şekil 3.3. a) Türevlendirme yaptığımız bench b) Türevlendirme aşamasında iki faza ayrılmış numune c) GC-MS analizinde kullanılacak türevlendirilmiş numune.....	20
Şekil 4.1. AWC 602 (baba ebeveyn), CA 2969 (ana ebeveyn) ve 163 RIL hattının 1-9 ölçeğine göre dağılımları.	23
Şekil 4.2. a) Don şiddeti ve bitkilerin görünümü, b) Don sonrası koşullara alınan hassas kontrolün (ILC 533) ve hassas ebeveynin (CA 2969) fenotipik görünümü, c) İyileşme koşullarında daha önce dayanıklı olarak bildirilen ILC 8617 ve dayanıklı hatlarımızdan 132'nin fenotipik görünümü d) İyileşme koşullarında 1 puan alan hatlardan 165'nin fenotipi e) Soğuğa dayanıklılık skorlaması öncesi hassas kontrolün (ILC 533) ve hassas ebeveynin (CA 2969) fenotipik görünümü, f) Soğuğa dayanıklılık skorlaması öncesi dayanıklı hatlardan birinin fenotipik görünümü.....	24
Şekil 4.3. Don öncesi koşullarında dayanıklı ve hassas nohut genotiplerine ait a) PLS-DA puan grafiği ve b) PLS-DA VIP puan grafiği. D: Dayanıklı genotipler, H: Hassas genotipler	25
Şekil 4.4. Don koşullarında dayanıklı ve hassas nohut genotiplerine ait a) PLS-DA puan grafiği ve b) PLS-DA VIP puan grafiği. D: Dayanıklı genotipler, H: Hassas genotipler.....	26
Şekil 4.5. Don sonrası koşullarında dayanıklı ve hassas genotiplere ait a) PLS-DA puan grafiği ve b) PLS-DA VIP puan grafiği. D: Dayanıklı genotipler, H: Hassas genotipler.....	27
Şekil 4.6. Don öncesi koşullarda 11 metabolitin seviyelerini gösteren kısmi en küçük kareler ayrım analizi (PLS-DA) temelli ısı haritası (mesafe ölçüsü: Pearson; kümeleme algoritması: Ward). P1: CA 2969, P2: AWC 602, D: dayanıklı RIL'ler, H: hassas RIL'ler.....	28
Şekil 4.7. Don koşullarında 11 metabolitin seviyelerini gösteren kısmi en küçük kareler ayrım analizi (PLS-DA) temelli ısı haritası (mesafe ölçüsü: Pearson; kümeleme algoritması: Ward). P1: CA 2969, P2: AWC 602, D: dayanıklı RIL'ler, H: hassas RIL'ler.....	28
Şekil 4.8. Don sonrası koşullarda 11 metabolitin seviyelerini gösteren kısmi en küçük kareler ayrım analizi (PLS-DA) temelli ısı haritası (mesafe ölçüsü: Pearson; kümeleme algoritması: Ward). P1: CA 2969, P2: AWC 602, D: dayanıklı RIL'ler, H: hassas RIL'ler.....	29
Şekil 4.9. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında	

sitrik asit (CA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	30
Şekil 4.10. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında süksinik asit (SA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	31
Şekil 4.11. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında fumarik asit (FA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	32
Şekil 4.12. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında malik asit (MA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	33
Şekil 4.13. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında malik asit (MA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	34
Şekil 4.14. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında palmitik asit (PA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	35
Şekil 4.15. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında stearik asit (StA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	36
Şekil 4.16. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında linoleik asit (LA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	37
Şekil 4.17. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında linolenik asit (LNA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade	

etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	38
Şekil 4.18. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında aspartik asit (Asp) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	39
Şekil 4.19. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında triptofan (Trp) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).	40



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Soğuğa dayanıklılık gözlemi için kullanılan 1-9 görsel skorlama ölçeği (Singh vd. 1989).....	18
Çizelge 3.2. Çalışmadaki organik asitlerin, yağ asitlerinin ve aminoasitlerin isimleri ve tanımlama kriterleri (RT, MA, CAS No, Formül)	21



1. GİRİŞ

Nohut (*Cicer arietinum* L.), fasulyeden (*Phaseolus vulgaris* L.) sonra dünya çapında en fazla üretilen ikinci yemeklik dane baklagildir (FAOSTAT 2025; Gaur vd. 2008; Varshney vd. 2013) ve yüksek protein, lif, yağ ve karbonhidrat içeriğiyle beslenmede önemli bir yer tutar (Rachwa-Rosiak vd. 2015; Merga ve Haji 2019). Yaklaşık 52 ülkede yetiştirilen bu ürün, artan dünya nüfusunun sürdürülebilir bitkisel protein talebini karşılamada stratejik bir öneme sahiptir (Varshney vd. 2009; Grasso vd. 2022). Bununla birlikte, nohut üretimi hem canlı (biyotik) hem de cansız (abiyotik) stresler nedeniyle sınırlanmaktadır. Özellikle kuraklık, aşırı sıcaklık ve düşük sıcaklık stresi, nohutta verim düşüşünün başlıca nedenleri arasında yer alır (Millan vd. 2006; Mantri vd. 2010; Garg vd. 2015). İklim değişikliğiyle birlikte hem yüksek (>30°C) hem de düşük (<15°C) sıcaklıkların görülme sıklığı artmış ve bu durum nohut verimini ciddi şekilde düşürmüştür (Gaur vd. 2013; Kadiyala vd. 2016). Bu streslerin bir sonucu olarak nohut verimliliği hâlâ hektar başına yaklaşık 1 ton seviyesinde kalmaktadır (Chaturvedi vd. 2018; Roorkiwal vd. 2018).

Nohut, Akdeniz iklim kuşağında evrimleşmiş bir tür olduğundan düşük sıcaklıklara oldukça duyarlıdır (Croser vd. 2003; Kaur vd. 2008). Yetiştirme yeri ve zamanına bağlı olarak bitkiler hem vejetatif (Turan bölgesi ve Akdeniz ülkelerinde) hem de üreme (Hindistan Alt Kıtası ve Avustralya’da) dönemlerinde soğuk ve donma stresine maruz kalabilmektedir (Berger vd. 2005; Berger vd. 2012). Özellikle Kuzey Hindistan ve Güney Avustralya’da, çiçeklenme ve bakla oluşumu dönemlerinde karşılaşılan düşük sıcaklıklar (<20/10°C), polen canlılığını azaltmakta, polen tüpü büyümesini engellemekte, çiçek ve bakla dökülmesine yol açmakta ve verimi %30–40 oranında düşürmektedir (Berger vd. 2011; Rani vd. 2020). Hava sıcaklığı küresel ölçekte arttığı ve bu yüzyılın sonuna kadar da artmaya devam edeceği beklenmektedir (Stocker 2014). Bu değişikliklere, Akdeniz bölgelerinde ilkbaharda yağışın azalmasıyla yağış düzeninde de değişikliğin eşlik etmesi öngörülmektedir (Giorgi ve Lionello 2008). Kuraklık stresi, bitkisel üretimdeki en önemli sınırlayıcı faktörlerden biridir ve ilkbahar yağışlarının azalması, şiddetli kuraklık koşullarının sıklığını artırmıştır (Giorgi ve Lionello 2008; Homer vd. 2016). Sonbahar ekimi, yağıştan en iyi şekilde yararlanmanın ve geç dönem kuraklıklarından kaçınmanın yollarından biridir. İlkbahar ekimine kıyasla daha yüksek verim ve verim istikrarı sağlar. Ayrıca, sonbahar ekiminde daha iyi toprak örtüsü ve koruması sayesinde su kullanım verimliliği artar ve toprak erozyonu azalır (Armoniene vd. 2013). Türkiye’de nohut genellikle ilkbaharda kuru tarım koşullarında yetiştirilir. Nohutun en hassas büyüme aşaması bakla oluşumu ve dane dolumu dönemleri olarak kabul edilmektedir. Nohut, genellikle Türkiye’deki düzensiz yağış rejimi ve haziran ayında yağışın sona ermesiyle verimin azalmasına neden olan geç dönem kuraklığından etkilenir. Akdeniz koşullarında sonbahar ekimi, nohut bitkisinin büyüme sezonunu uzatarak verimi %70’e kadar artırabilmektedir (Singh vd. 1997; Nezami ve Bagheri 2005); ancak bu ekim döneminde fideler erken kış donlarıyla karşı karşıya kalmakta ve donma stresine bağlı ölümler meydana gelebilmektedir (Zhu 2016; Pescador vd. 2017).

Nohutun optimum gelişimi için gündüz 21-26°C ve gece 18-21°C sıcaklık aralığı gerektiği düşünülürse (Duke 1981; Berger vd. 2012), bu tür donma olaylarının fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri ciddi şekilde bozacağı açıktır.

Düşük sıcaklık, bitkilerin coğrafi dağılımını sınırlayan ve tarımsal verimliliği önemli ölçüde azaltan temel cansız (abiyotik) stres etmenlerinden biridir (Su vd. 2015). Düşük sıcaklığın neden olduğu zararlar genellikle soğuk stresi (0°C'nin üzeri) ve donma stresi (0°C'nin altı) olarak sınıflandırılmaktadır (Solanke ve Sharma 2008). Soğuk stresi hücre zarı akışkanlığını azaltarak iyon dengesizliği, metabolik bozukluklar ve hücre hasara neden olmaktadır (Ruelland vd. 2009; Janska vd. 2010). Donma koşullarında hücre dışı buz kristallerinin oluşumu plazmoliz, zar hasarı, su kaybı ve aşırı ROS birikimine yol açmaktadır (Suzuki ve Mittler 2006; Takahashi vd. 2018). Uzun süreli donma, lipid peroksidasyonu ve protein denatürasyonunu artırarak bitki ölümüne kadar ilerleyebilen ciddi hasarlar oluşturmaktadır (Gull vd. 2019; Nabati vd. 2021). Donma stresinin bitki büyümesi ve gelişimi üzerindeki kısıtlayıcı etkileri, fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik süreçlerdeki değişimlerle ilişkilidir (Hasanfard vd. 2022). Örneğin, -12°C'nin nohut bitkilerinde hayatta kalma oranı ile fotosentetik pigmentler ve karbonhidrat birikimi üzerinde belirgin etkiler oluşturduğu bildirilmektedir (Nezami vd. 2022). Bitkilerin soğuk ve donma stresine karşı geliştirdiği başlıca koruyucu tepkiler arasında prolin birikimi, çözünür protein artışı, antioksidan enzim aktivasyonu (SOD, CAT, POD) ve zar lipid bileşiminde değişimler bulunmaktadır (Takahashi vd. 2016; Zhao vd. 2019; Feng vd. 2019). Soğuk stresine verilen yanıtların merkezinde zar lipidleri ve yağ asitleri yer almakta olup, düşük sıcaklık zar akışkanlığının azalmasına, iyon sızıntısına ve zarla ilişkili enzimlerin deaktivasyonuna neden olmaktadır (Los ve Murata 2004; Upchurch 2007). Bu nedenle bitkiler, yağ asidi doymamışlığını artırarak ve lipid metabolizmasını yeniden düzenleyerek membran stabilitesini korumaya çalışır. Aminoasit metabolizması da soğuk stresine karşı önemli bir uyum mekanizmasıdır. Soğuk koşullarda serbest aminoasit havuzunda değişimler meydana gelmekte; özellikle aromatik aminoasitlerden triptofan (Trp), oksin ve melatonin gibi indol türevli bileşiklerin biyosentezinde yer alarak stres adaptasyonunda kritik bir rol üstlenmektedir (Radwanski ve Last 1995; Maeda ve Dudareva 2012). Prolin, histidin, fenilalanin ve triptofan gibi aminoasitlerin birikimi ise ozmotik denge, zar stabilitesi ve ROS detoksifikasyonu açısından önemlidir (Henson vd. 2014; Raza vd. 2023). Bu süreçte TCA döngüsünün yeniden etkinleşmesi, organik asit içeriklerinde artış ve stres toleransı ile ilişkili genlerin düzenlenmesi önemli rol oynamaktadır (Jeon vd. 2018; Gao vd. 2022). Bu nedenle donma toleransına ilişkin mekanizmaların doğru şekilde değerlendirilmesi, bitkilerin kış dönemindeki hayatta kalma performansının öngörülmesi açısından önem taşımaktadır.

Nohutun yabani akrabaları olan *Cicer reticulatum* Ladiz. ve *C. echinospermum* P.H. Davis, kültür çeşitlerine kıyasla daha yüksek soğuk toleransı göstermekte ve dayanıklılık genlerinin önemli kaynakları olarak değerlendirilmektedir (Toker 2005; Berger vd. 2012). Nohut Akdeniz iklim kuşağında evrimleşmiş bir tür olduğundan düşük

sıcaklıklara karşı nispeten daha hassastır. Bu durum, özellikle kışlık ekim yapılan bölgelerde çimlenme, fide gelişimi, çiçeklenme ve verim üzerinde ciddi kayıplara yol açmakta ve soğuk toleransının artırılmasını, nohut ıslahı için kritik bir hedef hâline getirmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar soğuk stresine karşı kültür nohutunun genetik tabanının dar olduğu ve bunun da bitkinin adaptasyon kapasitesini sınırlandığı anlaşılmıştır (Varshney vd. 2021). Bu nedenle yabancı *Cicer* türleri, kültür nohudu ile karşılaştırıldığında daha geniş genetik çeşitliliğe sahip olmaları nedeniyle umut verici bir çözüm sunmaktadır (Toker vd. 2021; Mohanty vd. 2022; Kalve vd. 2024). Bu genetik zenginlik, soğuk stresi gibi sert çevre koşullarına daha fazla tolerans da dahil olmak üzere daha geniş bir adaptasyon yelpazesine dönüşmektedir (Arriagada vd. 2022).

Islah çalışmalarında uzun yıllardır kültür çeşitlerinin iyileştirilmesine odaklanılmış olsa da mevcut çeşitler genellikle sınırlı soğuk toleransı sergilemektedir (Berger vd. 2023). Berger vd. (2012), soğuk toleransı bakımından geliştirilmiş kültür nohudu olarak değerlendirilen ICCV 88501, ICCV 88503, CTS 60543, Rupali ve Sonali gibi çeşitlerin bile anlamlı bir soğuk dayanıklılığı ortaya koyamadığını bildirmiştir. Bu kırılma, kültüre alma sürecinde uygulanan seçim baskılarının bir sonucu olarak düşünülmekte; kültür nohudunun daha ılıman koşullara adapte olmasını sağlarken, yabancı akrabalarının daha soğuk ve yüksek rakımlı ekolojik nişlerde evrimleştiği belirtilmektedir (Redden vd. 2007). Bu nedenle kültür nohudu, vejetatif ve üreme aşamalarındaki soğuk dayanıklılığının önemli bir kısmını kaybetmiştir (Berger vd. 2012; 2023). Son çalışmalar, bazı yabancı *Cicer* türlerinin kültüre alınmış türler için ölümcül olabilecek donma sıcaklıklarına dahi dayanabildiğini göstermektedir (Kalve vd. 2024). *C. pinnatifidum* Jaub. & Spach, *C. judaicum* Boiss. ve özellikle *C. reticulatum*, yüksek rakımlı ve soğuk habitatlarda doğal olarak bulunduğu için soğuk stresi adaptasyonunda son derece umut verici genetik kaynaklar olarak ön plana çıkmaktadır (Berger vd. 2005; Mir vd. 2019). Bu türlerin ekstrem soğuk koşullara karşı geliştirdiği adaptasyon mekanizmalarının anlaşılması, nohut ıslah programlarına soğuk toleransını artırmaya yönelik stratejik bilgiler sağlamaktadır. Bu bağlamda, kültür bitkisinin dayanıklılık düzeyini artırmak için yabancı türlerin dayanıklılıkla ilişkili özellikleri ıslah programlarına aktarılabilir niteliktedir. Nitekim *C. reticulatum*, kültür nohudu ile doğal yakınlığı nedeniyle kolayca melezlenebilen yabancı bir tür olup, soğuğa dayanıklılık genlerinin kültür çeşitlerine aktarılması için doğrudan ıslah programlarında kullanılacak en uygun genetik kaynaklardan biridir. *C. reticulatum* türünden kültür nohuduna soğuğa dayanıklılık genleri aktarılmış (Singh ve Ocampo 1997; Sari vd. 2022) ve geliştirilen hatlarda soğuğa toleransla alakalı markör ve gen ifadesini ortaya koyan transkriptomlar çalışılmıştır (Mugabe vd. 2019; Bakir vd. 2025). Bununla beraber, türlerarası melezlemelerden ıslah edilmiş fide döneminde soğuğa toleranslı nohutlar çiftçi tarlalarına aktarılamamıştır. Aynı zamanda, soğuğa maruz bırakılan nohutlarda donma öncesi, donma sonrası sıcaklıklarda biyokimyasal aminoasitler ve yağ asitleri çalışılmamıştır. Bu çalışmanın amaçları: (i) türlerarası melezlemelerden elde edilen RIL'lerde soğuğa toleranslı ve hassas genotipleri belirlemek, (ii) don öncesi (4°C), don (-12°C) ve don sonrası koşullarında meydana gelen

biyokimyasal değişimleri, dona dayanıklı ve hassas genotiplerde karşılaştırmak, (iii) ileri ilişki analiz yöntemleri kullanılarak dona dayanıklılık ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkileri ortaya koymaktır.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Soğuk ve Donma Stresinin Nohut Bitkisinde Yarattığı Etkiler

Nohut (*Cicer arietinum* L.), Akdeniz ikliminde evrimleşmiş bir tür olduğundan düşük sıcaklıklara karşı hassastır; bu nedenle soğuk stresine maruz kalan bitkilerde büyüme, gelişme ve verimde önemli kayıplar görülür (Croser vd. 2003; Kaur vd. 2008; Thakur vd. 2010; Kumar vd. 2013). Üründe meydana gelen kayıpların yaklaşık yarısı düşük sıcaklık etkisinden kaynaklanmaktadır (Saxena 1990). Hindistan'ın kuzey bölgeleri ve Güney Avustralya başta olmak üzere birçok üretim alanında çiçeklenme döneminde sıcaklığın 15°C'nin altına düşmesi, soğuk stresini kritik bir sorun haline getirmektedir (Srinivasan vd. 1998; Clarke vd. 2004; Berger vd. 2006). Soğuk stresi, özellikle üreme dönemi gibi verimi belirleyen kritik aşamalarda çiçek dökülmesi, polen ve yumurta hücresi kısırlığı, döllenme başarısızlığı, azalmış bakla oluşumu ve yetersiz dane dolumu gibi ciddi fizyolojik bozukluklara yol açarak ürün verimini düşürür (Clarke ve Siddique 2004; Nayyar vd. 2005b; Nayyar vd. 2007; Thakur vd. 2010; Kumar vd. 2011). Nohudun tüm fenolojik evreleri düşük sıcaklıktan etkilenmekle birlikte, en fazla zarar üreme aşamasında ortaya çıkmaktadır (Rani vd. 2021).

Nohut bitkisinde soğuk stresi genel olarak üşüme (chilling, 0-15°C) ve donma (freezing, $\leq 0^\circ\text{C}$) olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır (Toker vd. 2007; Toker ve Mutlu 2011). Nohut, çimlenme döneminde 3-8°C gibi düşük sıcaklıklara ya da donma sıcaklıklarına maruz kalabilen bir serin mevsim bitkisidir. Bu koşullar fide oluşumunu ve canlılığını önemli ölçüde azaltır (Chen vd. 1983; Srinivasan vd. 1998; Bakht vd. 2006). Tohumun genetik yapısı, sıcaklık, soğuğa maruz kalma süresi ve emme öncesi nem miktarı, düşük sıcaklıkta çimlenme başarısını belirleyen başlıca faktörlerdir. 10°C'nin altındaki sıcaklıkların çimlenme hızını düşürdüğü gösterilmiştir (Roberts vd. 1980; Singh vd. 2009). Nohut için optimum çimlenme sıcaklığı 20°C olup, 5-35°C aralığı tolere edilebilir olarak kabul edilmektedir (Singh ve Dhaliwal 1972; Auld vd. 1988; Calcagno ve Gallo 1993). Soğuk koşullarda, tohum emme aşamasının ilk 30 dakikası kritik olup, 3-8°C'de yapılan emme çimlenmeyi %15, hızlı su alımıyla birlikte ise %65'e varan oranda azaltmaktadır (Tully vd. 1981; Chen vd. 1983). Kabuli tip nohutların ince tohum kabuğu nedeniyle suyu daha hızlı absorbe etmesi, bu tiplerde soğuk kaynaklı hasarın daha yaygın görülmesine neden olmaktadır (Tully vd. 1981). Düşük sıcaklık, kotiledonlardan besin mobilizasyonunu azaltarak tohumun enerji kullanımını sınırlar ve fide büyümesini yavaşlatır (Croser vd. 2003). Çeşitler arasında önemli miktarda genetik varyasyon bulunması, çimlenme döneminde soğuk toleranslı genotiplerin seçilmesini mümkün kılmaktadır (Ellis vd. 1986). Nohut, genellikle -8°C'ye kadar hayatta kalabilir; bazı genotiplerde bu sınır -12°C'ye kadar düşebilmektedir (Wery 1990; Croser vd. 2003). Bu durum mevcut gen havuzunda erken gelişim dönemleri için soğuk toleransı seçiminin mümkün olduğunu göstermektedir.

Nohudun en kritik ve soğuğa en duyarlı dönemi çiçeklenme evresidir (Sharma ve Nayyar 2014). 15°C'nin altındaki sıcaklıklar çiçek dökülmesine, bakla sayısının azalmasına ve tohum oluşumunda önemli kayıplara yol açar (Srinivasan vd. 1999; Berger vd. 2004; Clarke ve Siddique 2004). Erkek gametofit, soğuğa karşı oldukça hassastır. 10°C'nin altında mikrosporogenez ve polen gelişimi önemli ölçüde bozulur (Sharma ve Nayyar 2014; Kiran vd. 2019). Soğuk, özellikle premayotik ve tetrat aşamalarında

mikrospor ve mikrogametogenez sürecini durdurur. Genç mikrospor dönemindeki anterlerde anter açılması engellenirken, polen canlılığı da belirgin şekilde düşer (Oliver vd. 2007; Kiran vd. 2019). Yaşlı çiçekler, aynı stres altında daha yüksek polen canlılığına sahiptir; dolayısıyla genç erkek gametofitler soğuğa daha duyarlıdır. Soğuğa toleranslı genotipler ise fonksiyonel polen ve anter yapısını koruyarak tohum oluşumunu sürdürebilir (Clarke ve Siddique 2004; Kumar vd. 2011). Dişi gametofit de soğuktan etkilenmektedir. Yumurta canlılığı azalmakta, stigma alıcılığı düşmekte ve polen yükü azalmaktadır (Srinivasan vd. 1998; Kiran vd. 2019). Soğuk uygulanan çiçeklerden elde edilen polenler normal bitkileri döllese bile, dişi gametofitin işlev bozukluğu dölleme başarısını azaltmaktadır (Nayyar vd. 2005b). Düşük sıcaklıklar ayrıca tapetumun programlı hücre ölümünü bozarak mikrosporların gelişimine gereken besin akışını engeller (Kiran vd. 2019). Tapetum ve anter dokularındaki karbonhidrat eksikliği, çiçek dökülmesinin temel nedenlerinden biridir (Nayyar vd. 2005b; Sharma ve Nayyar 2014). Soğuk, çiçeklerde ABA birikimini artırır ve yüksek ABA düzeyleri çiçek dökülmesiyle ilişkilendirilmiştir (Thakur vd. 2010; Nayyar vd. 2005a). ABA'nın sakkaroz taşınmasını engellemesi, özellikle çiçeklenme döneminde besin eksikliklerine neden olur (Kumar vd. 2010; Sharma ve Nayyar 2016).

Soğuk stresi, dane dolumu süreçlerini geciktirir ve nihai tohum boyutunu küçültür (Nayyar vd. 2005b; Nayyar vd. 2007; Kaur vd. 2008). Zayıf vegetatif gelişme, gecikmiş çiçeklenme, çiçek-bakla dökülmesi ve düşük dane dolumu birlikte verim kaybına yol açar (Berger vd. 2004). Soğuk stresinin verim üzerindeki etkisi genotipe göre değişmekte olup, hassas genotiplerde kayıp çok daha ciddi boyutlara ulaşmaktadır (Singh vd. 1993). Singh vd. (1993), soğuğa hassas bir nohut hattının kış döneminde yalnızca 161 kg/ha verim verirken, daha dayanıklı bir nohut hattının aynı koşullarda 632 kg/ha verim verebildiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca glisin betain gibi uyumlu çözünür maddelerin birikimi, soğuk stresinde verimi %30'a kadar artırabilmektedir (Nayyar vd. 2005c).

Düşük sıcaklıklar, bitkilerin fizyolojik süreçlerini ciddi şekilde bozar (Thakur vd. 2010). 26 gün boyunca uygulanan 17,6/4,9°C (gündüz/gece) sıcaklıklarda bağlı yaprak su içeriği düşmüş; bu durum kök hidrolik iletkenliğindeki azalma, oksidatif hasar ve klorofil kaybı ile ilişkilendirilmiştir (Kumar vd. 2011). Çimlenme sırasında 13/10°C'de uygulanan soğuk stresi, α -amilaz aktivitesini baskılayarak şeker metabolizmasını bozmuş; mineral (N, P, K) alımını ve yaprak su durumunu olumsuz etkileyerek fide çıkışını yavaşlatmıştır (Farooq vd. 2017). Benzer şekilde, 5°C'ye kısa süreli maruz kalma, kök büyümesini ve köklerin su ve minerallerle ilişkili fonksiyonlarını zayıflatmış; 5/5°C'de stomaların kapanamaması yaprak su kaybını artırmıştır (Lee vd. 1993; Farooq vd. 2009; Heidarvand vd. 2011). Soğuğa dayanıklı genotiplerde, prolin ve belirli karbonhidratların (glikoz, ramnoz, mannoz) artışı ozmoregülasyona ve enerji ihtiyacının karşılanmasına katkı sağlar (Saghfi ve Eivazi 2014).

2.2. Soğuk Toleransı için Genetik Çeşitlilik ve Islah

Kış aylarında yetiştirilen nohutlar, büyüme dönemlerine bağlı olarak farklı soğuk stresi türleriyle karşılaşmakta ve bu durum bitki verimliliğini ciddi şekilde sınırlandırmaktadır. Hindistan ve Avustralya'da üreme döneminde görülen düşük sıcaklıklar çiçek dökümü, bakla dökümü ve zayıf tohum tutumuna yol açarken; Akdeniz bölgesinde genç bitkilerde erken dönemde kısıtlı vejetatif büyüme gözlenmektedir (Singh

vd. 1989; Saxena 1990; Chaturvedi vd. 2009; Sharma ve Nayyar 2014; Sharma ve Nayyar 2016). Bu bölgeler arasındaki temel fark, soğuk stresinin niteliğinden kaynaklanmaktadır: Akdeniz’de sıcaklıklar erken büyüme döneminde zaman zaman sıfırın altına düşerken, Hindistan ve Avustralya’da genellikle sıfırın üzerinde seyretmektedir. Bu nedenle, soğuğa dayanıklılık ıslah programlarının hedefleri bölgesel koşullara göre değişmekte; Akdeniz için donma toleransı (0°C’nin altı) öncelik kazanırken, Hindistan alt kıtası için üreme döneminde soğuğa dayanıklılık (0°C’ye kadar) önem taşımaktadır (Chaturvedi vd. 2009).

Nohutta soğuğa dayanıklı genetik kaynakların belirlenmesi amacıyla donma toleransını temel alan çeşitli tarama ölçekleri geliştirilmiştir (Singh vd. 1989 [1–9 ölçek]; Saccardo ve Calcagno 1990 [0–5 ölçek]). Buna karşın, üreme dönemindeki soğuk toleransını ölçmeye yönelik bir ölçek bulunmamaktadır. Bunun temel nedeni, çiçeklenme, anter gelişimi, bakla oluşumu, dane dolumu ve tohum gelişimi gibi süreçlerin düşük sıcaklıklara farklı derecelerde duyarlılık göstermesi ve mekanizmaların oldukça karmaşık olmasıdır (Sharma ve Nayyar 2014; Kiran vd. 2019). Örneğin, tohum büyümesi için kritik sıcaklık, bakla oluşumundan daha yüksek olup bakla oluşumunun minimum sıcaklıktan ziyade kümülatif sıcaklık ile ilişkili olabileceğine dair bulgular bulunmaktadır (Srinivasan vd. 1998). Ancak, daha eski çalışmalar bakla oluşumunun yalnızca minimum 8°C gece sıcaklıklarında gerçekleştiğini bildirdiğinden (Saxena 1990), bu gözlemlerin doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

Soğuğa dayanıklılık üzerine kültür nohut çeşitleri ve yabani *Cicer* türlerinde geniş kapsamlı çalışmalar yürütülmüştür. *C. arietinum* içinde M 450, ILC 8262, ICCV 88501, ICCV 88502, ICCV 88503, ICCV 88506, FLIP 84-70C, FLIP 84-71C ve FLIP 84-79C gibi hatlar soğuğa dayanıklı olarak tanımlanmıştır (Singh vd. 1990; Singh ve Saxena 1993). Bunun yanı sıra FLIP 81-293C, FLIP 82-127C, FLIP 82-128C (Wery 1990), ILC 8262, ILC 8617 ve FLIP 87-82C (Singh vd. 1995), ICCV 88501 ve ICCV 88503 (Srinivasan vd. 1998), FLIP 95-255C, FLIP 93-260C ve Sel95TH1716 (Kanouni vd. 2009) ile Sel96TH11404, Sel96TH11439, Sel96TH11488, Sel98TH11518, x03TH21 ve FLIP 93-261C (Saeed vd. 2010) soğuğa dayanıklı hatlar arasında yer almaktadır. Ayrıca kültür nohutlarının desi ve kabulü tipleri arasında soğuğa tepki bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Berger vd. 2012). Soğuğa toleransın, duyarlılığa baskın olup en az beş gen tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir (Malhotra ve Singh 1990). Son zamanlarda nohutta türler arası melezlemeden geliştirilen RIL’lerde soğuğa dayanıklılıkla ilişkili LG1, LG4 ve LG8 üzerinde üç QTL belirlenmiştir (Mugabe vd. 2019).

Son yıllarda, yabani *Cicer* türlerinin kültür nohutlarına kıyasla daha yüksek soğuğa dayanıklılığa sahip olduğu netleşmiştir (Singh vd. 1995; Berger vd. 2012; Mir vd. 2021). Birincil gen havuzundaki yabani türlerin kültür nohudu ile kolayca melezlenebilmesi, bu türleri ıslah programları için değerli donörler hâline getirmektedir. Yabani türler hem erken vejetatif dönemde donma toleransı hem de üreme döneminde soğuğa dayanıklılık açısından kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir. Özellikle *C. bijugum* Rech.f., *C. echinospermum* P.H. Davis ve *C. judaicum* Boiss. hem erken büyüme hem de üreme aşamasında kültür nohutlarından daha yüksek tolerans göstermektedir (Singh vd. 1990; Malhotra 1998; Berger vd. 2012). Yedi yıllık bir taramada, *C. reticulatum* Ladiz’in 26, *C. bijugum*’un 10, *C. echinospermum*’un dört, *C. pinnatifidum* Jaub. & Spach’ın iki

ve *C. judaicum*'un bir hattı donma toleransı sergilemiştir (Singh vd. 1995). Bu hatlar arasında *C. bijugum* Boiss.'in beş ve *C. reticulatum*'un dört hattı en yüksek toleransa sahiptir. Toker (2005), sekiz yabancı türden 43 hat üzerinde yaptığı değerlendirmede *C. bijugum*'u soğuğa dayanıklılığın en iyi kaynağı olarak belirlemiştir; incelenen altı genotipin tamamı dayanıklı bulunmuştur. Benzer şekilde *C. reticulatum*, *C. echinospermum* ve *C. pinnatifidum* türlerinde de çeşitli dayanıklı hatlar tespit edilmiştir.

Tanımlanan soğuğa dayanıklı kültür nohut hatları arasında CTS 60543 (ICCV 88516) ve CTS 11308 (ICCV 88510) bulunmaktadır (Clarke ve Siddique 2004). Polen seçimi yöntemi, Rupali ve Sonali gibi soğuğa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde başarıyla kullanılmıştır (Clarke vd. 2004). Bununla birlikte, bu çeşitler dahi çiçeklenme sonrası yaklaşık 10°C'de yetiştirildiklerinde uzun çiçek kapsülü aralıklarına sahip olmuş ve sınırlı soğuğa dayanıklılık göstermiştir (Berger vd. 2006). Yabancı türlerden *C. echinospermum*'un bir genotipi güçlü soğuğa dayanıklılık göstermiş, *C. reticulatum*'un JM2106 genotipi de benzer şekilde dayanıklı bulunmuştur (Clarke ve Siddique 2004; Berger vd. 2012). *C. echinospermum* ayrıca düşük sıcaklıkta erken bakla bağlama göstermiş ve en verimli kültür çeşidinden beş kat daha yüksek verim vermiştir. Bununla birlikte, Croser vd. (2003) tarafından bildirildiği üzere, gen bankalarında bulunan yabancı tür çoğaltmalarının çeşitlilik düzeyi göz önüne alındığında, gerçekte mevcut olan soğuğa dayanıklı kaynak sayısı literatürde bildirilenlerden daha düşük olabilir. Yine de yabancı *Cicer* türlerinin, hem stres toleransı hem de verim artışı açısından önemli bir kaynak olduğu açıktır. Örneğin, *C. reticulatum* (ILWC 124) ve *C. echinospermum* (ILWC 179) genotiplerinin kültür çeşidi ILC 482 ile melezlenmesi sonucu elde edilen hatlardan biri ILC 482'den %39 daha yüksek verim göstermiştir (Singh ve Ocampo 1997). Benzer şekilde kültür × yabancı melezleri, kontrol çeşitlerini verim bakımından geride bırakmıştır (Singh vd. 2005). Sonuç olarak, hem vejetatif hem de üreme dönemindeki soğuk stresinin verim düşüşüne neden olduğu bölgelerde, yabancı *Cicer* türleri hem soğuğa dayanıklılık hem de verim artırıcı özellikleri nedeniyle büyük potansiyele sahiptir. Dolayısıyla, birincil gen havuzundaki bu yabancı türler, bitki gelişim aşamalarının soğuk dönemle çakıştığı bölgelerde nohut verimliliğini artırmak için stratejik bir kaynak oluşturmaktadır.

2.3. Soğuk Toleransında Rol Oynayan Fizyolojik ve Biyokimyasal Metabolitler

2.3.1. Organik asitler

Mitokondrilerin temel görevi enerji (ATP) üretimi olsa da, bitki hücresinde bunun ötesine geçen çok sayıda kritik yardımcı fonksiyona sahiptir. Fotosentezin verimliliğinin düzenlenmesi, anabolik metabolizmanın ihtiyaç duyduğu karbon iskeletlerinin sağlanması, karbon–azot metabolik etkileşimleri, streslere verilen yanıtlar, hücrel redoks dengesinin korunması ve sinyalleme süreçleri bu görevlerden bazılarıdır (Araujo vd. 2012). Metabolik rolleri dışında bitki mitokondrileri; çiçek gelişimi, tohum çimlenmesi, meyve olgunlaşması gibi gelişimsel süreçlerde, ayrıca programlanmış hücre ölümü (PCD) ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde de önemli işlevler üstlenmektedir (Araujo vd. 2012). Bitki büyümesi ve hücrel bakım süreçleri boyunca mitokondriler; organik asitler, aminoasitler, askorbat, vitamin kofaktörleri ve diğer birçok temel metabolik olay için gerekli ara ürünler gibi çeşitli biyosentetik karbon iskeletlerinin kaynağını oluşturur. ATP üretiminin yanı sıra mitokondride yağ asitleri, askorbat, folat ve demir–kükürt kümeleri gibi vitamin kofaktörlerinin biyosentezi ile dallı zincirli aminoasitlerin, lipidlerin ve fitolün parçalanması gibi çok sayıda biyolojik süreç

gerçekleşir. Bu karmaşık metabolik ağ yalnızca solunum ve aminoasit biyosentezi için değil, aynı zamanda genel azot metabolizması için gerekli öncüllerin sağlanmasında da kritik rol oynar ve hücrel redoks düzeni ile stres yanıtlarına doğrudan katkıda bulunur (Zhang vd. 2018; Zhang ve Fernie 2018). Mitokondrilerin hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan dokularda temel enerji üretim merkezi olduğu düşünüldüğünde, hücrenin enerji ihtiyacının büyük ölçüde mitokondriyal solunuma bağımlı olması şaşırtıcı değildir (Zhang ve Fernie 2023).

TCA döngüsü yalnızca karbonhidrat, aminoasit, lipid ve protein metabolizmasını birbirine bağlayan bir köprü değil, aynı zamanda enerji üreten ve metabolizmayı çalıştıran indirgeyici bir motordur (Wang vd. 2016). TCA döngüsünde sekiz enzim vardır: sitrat sentaz (CSY), akonitaz (ACO), izositrat dehidrogenaz (IDH), α -ketoglutarat dehidrogenaz (α KGDH), süksinil-CoA sentetaz (SCoAL), süksinat dehidrogenaz (SDH), fumaraz (FUM) ve malat dehidrogenaz (MDH). Abiotik stres altında, TCA döngüsü bitkiler için önemli koruma sistemlerinden biridir (Fernie vd. 2004). Son zamanlarda, Wu vd. (2016), soğuk stresi altında *Dendrobium officinale*'nin transkriptomunu ve metabolomunu incelediler ve sitrik asit, süksinik asit ve fumarik asit gibi TCA döngüsündeki birkaç önemli ara ürünün birikiminin, izositrat liyaz (ICL), ACO ve SDH aktivitelerinde artışa neden olduğunu gösterdiler. Dong vd. (2020) *Poa pratensis* bitkisine ait soğuğa dayanıklı (PQ) ve hassas (PB) çeşitlerde yaptıkları çalışmanın RNA-seq verilerinde, PQ'da TCA döngüsü yolunda 16 farklı ifade edilen genin (DEG) zenginleştiğini, PB'de ise yalnızca 3 DEG'nin zenginleştiğini ve PQ'da zenginleşen 16 DEG'in, MDH ve SDH gibi TCA döngüsü yolunun temel enzimlerini kodlamada rol oynadığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, soğuk stresinin PB'deki TCA döngüsünün anahtar enzimleri olan MDH, SDH ve IDH aktivitelerini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur ve hassas bitkilerde, TCA döngüsünün engellenerek, organik asit üretimi azaldığı, metabolik hızın düştüğü vurgulanmıştır (Dong vd. 2020). Bununla birlikte, PQ'daki MDH, SDH ve IDH aktiviteleri soğuk stresi altında önemli ölçüde arttığı ve bu da sitrik asit, malik asit ve süksinik asit artışına neden olduğunu bildirmişlerdir (Dong vd. 2020). Bu enzimler arasında MDH aktivitesinin en fazla artmasına dikkat çekerek TCA döngüsünün normal şekilde çalışmasına ve diğer metabolik yollar için daha fazla organik madde sağlayacağını belirtmişlerdir (Dong vd. 2020). TCA döngüsü, hücrelerin enerji metabolizmasına katkıda bulunur ve enerji metabolizmasıyla ilgili genlerin ifadesi, stres altındaki bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için çok önemlidir (Avin-Wittenberg vd. 2012). Genel olarak fotosentez, bitkilerde enerji ve karbon iskeletlerinin temel kaynağıdır. Ancak stres koşulları altında fotosentetik aktivite genellikle baskılanır ve bu durumda hücrel enerji gereksiniminin karşılanmasında glikoliz ve TCA döngüsü gibi solunum yollarının görece önemi artar (Fernie vd. 2004). Bu sonuçlar, PQ'nun glikoliz ve TCA döngüsü yoluyla ilişkili genleri ve enzim aktivitelerini aktif olarak düzenleyerek soğuk stresine yanıt verebileceğini göstermiştir. Bu nedenle, glikoliz ve TCA döngüsü genlerinin moleküler işlevlerinin ortaya çıkarılması, bitki gelişimi hakkında daha derin bir anlayış sağlayabilir.

Soğuk stresi koşullarında bitkiler, dayanıklılık ile ilişkili metabolitlerin birikimini artırmak ve stresle ilişkili genlerin enzim aktivitelerinin düzenlenmesini sağlamak amacıyla hem metabolik hem de moleküler düzeylerde hızlı bir uyum yanıtı geliştirir (Li vd. 2025). Bu süreçte TCA döngüsü yeniden etkinleşerek yapısal genlerin ifadesinde ve organik asit içeriklerinde belirgin bir artış meydana gelir (Jeon vd. 2018; Gao vd. 2022).

TCA döngüsünde üretilen birçok ara metabolitin bitki stres toleransını artırmada önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Nitekim *Arabidopsis*'te çoğu TCA döngüsü ara ürünü ve aminoasidin soğuk toleransının artmasıyla birlikte biriktiği rapor edilmiştir (Pagter vd. 2017). Bitkiler, stres koşullarında enerji arzını artırmak ve metabolik dengeyi sürdürmek amacıyla TCA döngüsünü ve organik asit metabolizmasını yeniden düzenleyebilir (Guo vd. 2024). Soğuk stresine maruz kalan bütün bitkisinde sitrat, malat ve izositrat gibi temel organik asitlerin yukarı düzenlendiği ve bu metabolitlerin TCA döngüsünün aktivitesini destekleyerek koruyucu bileşikler gibi davrandığı bildirilmiştir (Li vd. 2025). TCA döngüsünden elde edilen birçok ara ürünün bitki stres toleransını iyileştirmede işlev gördüğü gösterilmiş olup sitrat ve malat birikimi bitkilerde soğuk koşullar altında da tespit edilmiştir (Zhang vd. 2019). Xu vd. (2020) soğuk aklimasyonu sırasında dört önemli TCA ara ürünün (sitrat, α -ketoglutarat, süksinat ve malat) ve iki enzim kodlayan genin (SDH ve ICL genleri dahil) ifade düzeylerinin arttığını göstermiştir. Bu sonuç, TCA döngüsünün aktive olduğunu ve soğuğa alışmış bütünün ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağladığını göstermektedir (Xu vd. 2020). Dyson vd. (2016), sitozolik fumaraz *FUM2* aracılığıyla gerçekleşen fumarik asit birikiminin, soğuğa dayanıklı *Arabidopsis thaliana* çeşidinde metabolizmanın soğuğa uyum sağlaması için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Mutant *Fum2* bitkilerinin, fotosentezi düşük sıcaklığa adapte etme yeteneklerini tamamen kaybettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, fumarik asit birikiminin, *Arabidopsis*'te düşük sıcaklık algılamasında önemli bir rol oynadığı, metabolik veya redoks sinyallerini dolaylı olarak düzenlediği veya muhtemelen doğrudan soğuk algılamada rol oynadığı sonucuna varmışlardır.

Soğuk aklimasyonu sırasında organik asit metabolizması, özellikle de malik asit, bitkilerin düşük sıcaklıklara verdiği yanıtların anlaşılmasında temel bir göstergedir. Kışlık çavdarda malik asit birikiminin soğuk aklimasyon sürecinde belirgin şekilde arttığı, buna paralel olarak NADP-malat dehidrogenaz, NAD-malat dehidrogenaz, PEPC ve NADP-malik enzim aktivitelerinin yükseldiği Crecelius vd. (2003) tarafından gösterilmiştir. Malik asit aynı zamanda stomaların düzenlenmesinde kritik bir ozmolit rolü üstlenmekte (Asai vd. 2000) ve soğuğa dayanıklı bitkilerde düşük sıcaklıklarda görülen stoma kapanması (Wilkinson vd. 2001), malatın mezofil hücrelerinde stabil kalmasını ve vakuolde tampon görevi görmesini gerektirmektedir (Crecelius vd. 2003).

Don koşullarında dayanıklı genotiplerde sitrik asit (CA) birikiminin artması, düşük sıcaklıklarda sitrat sentetaz (CS) aktivitesinin yükselmesiyle ilişkilendirilmektedir (Wang vd. 2022; Peng vd. 2022). Nitekim hem Wang vd. (2022) hem de Peng vd. (2022), kışlık buğdayda don sırasında CS ekspresyonunun belirgin şekilde arttığını ve bunun CA birikimini desteklediğini bildirmiştir. Ayrıca, CA ve malik asit gibi TCA ara ürünlerinin artışı, stres altında enerji gereksinimini karşılamak üzere TCA döngüsünün hızlandığını göstermektedir (Xu vd. 2020). Bununla birlikte, mitokondri-sitozol arası CA taşınımını düzenleyen dikarboksilat-trikarboksilat taşıyıcılarının (DTC) soğukta farklı regülasyonu, dayanıklı genotiplerde CA'nın yeniden dağılımını kolaylaştırarak metabolik adaptasyona katkı sağlayabilir (Dolce vd. 2014). Benzer şekilde, soğuğa dayanıklı *Arabidopsis* genotiplerinde sitozolik CA artışı, hassas mutantlarda ise azalması bu mekanizmayı desteklemektedir (Hoermiller vd. 2016). CA aynı zamanda asetil-CoA üretimi yoluyla membran lipidlerinin yeniden düzenlenmesi için önemli bir karbon kaynağı sağlayarak soğukta membran akışkanlığının korunmasına katkıda bulunur (Uemura vd. 1995). Ek olarak, organik asitlerin pH tamponlama kapasitesi (Igamberdiev ve Gardeström 2003;

Igamberdiev ve Eprintsev 2016) ve soğuk stresinde artan ROS oluşumuna karşı koruyucu etkileri (Shi vd. 2018) CA'nın dayanıklılıkta çok yönlü bir rol üstlendiğini göstermektedir.

Malonik asit, bitkilerde hem primer hem de sekonder metabolizmanın merkezinde yer alan önemli bir dikarboksilik asittir (Chen vd. 2011). Soğuk stresinde artan ROS'un yol açtığı lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'nın oksidasyonu, bitkilerde malonik asit üretiminin başlıca kaynaklarından biridir (Farmer ve Davoine 2007; Hung ve Kao 2004). Dayanıklı bitkilerde MDA'nın malonik aside dönüştürülerek detoksifiye edilmesi bu stres yanıtının kritik bir parçası olarak kabul edilmektedir (Kotchoni vd. 2006; Shin vd. 2009). Malonik asidin AAE13 enzimi tarafından malonil-CoA'ya dönüştürülmesi (Chen vd. 2011; Bowman vd. 2017) ise bu molekülü yalnızca bir detoksifikasyon ürünü olmaktan çıkararak yağ asidi biyosentezi, mtFAS (mitokondriyal yağ asidi sentezi), lipoik asit üretimi ve flavonoid gibi savunma metabolitlerinin oluşumuna bağlayan temel bir köprü haline getirir (Shirley 1996; Baud vd. 2003; Guan ve Nikolau 2016). Soğuk stresinde malonik asit ve malonil-CoA metabolizmasının uyarıldığı (Schmid vd. 2005; Tang ve Tang 2021) ve dayanıklı genotiplerde malonik asit birikiminin daha yüksek olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Chai vd. 2019; Ferizi vd. 2025).

2.3.2. Yağ asitleri

Bitkilerde soğuk stresine (chilling ve freezing) verilen fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tepkilerin merkezinde zar lipidleri ve yağ asitleri yer alır (Maksimov vd. 2017; Javidi vd. 2022). Düşük sıcaklık, bitki hücre zarlarının sıvı kristal fazdan jel benzeri bir faza geçmesine, membran akışkanlığının azalmasına, iyon sızıntısının artmasına ve membrana bağlı enzimlerin deaktivasyonuna neden olarak bitkinin yaşamsal süreçlerini doğrudan tehdit eder (Los ve Murata 2004; Upchurch 2007). Bu nedenle bitkiler, soğuk koşullarda hayatta kalabilmek için zar lipid bileşimini yeniden düzenleyen, yağ asidi doymamışlığını artıran ve lipid metabolizmasını yeniden programlayan kapsamlı bir adaptasyon mekanizması geliştirmiştir (Yan vd. 2025).

Zar stabilitesini belirleyen en önemli faktörlerden biri, doymuş (SFA) ve doymamış yağ asitleri (UFA) arasındaki dengedir. Bitkilerde UFA/SFA oranının artması, membran akışkanlığını koruyarak düşük sıcaklıklara uyumu kolaylaştırır (He ve Ding 2020; Javidi vd. 2022). Kloroplast zarlarında yer alan çoklu doymamış yağ asitleri, başta linoleik (18:2) ve linolenik asit (18:3), soğuk toleransının temel belirleyicileri olarak tanımlanmıştır (Routaboul vd. 2000; Iba 2002). Soğuğa dayanıklı türlerde fosfatidilgliserol (PG) içerisindeki doymuş yağ asidi oranı %20'nin altındayken, hassas türlerde bu oran %40'ın üzerine çıkabilmektedir (Murata vd. 1992). Bitkiler, düşük sıcaklık sırasında yağ asidi desatürazlarını (FAD2, FAD3, FAD5, FAD6, FAD7, FAD8) devreye sokarak membran lipidlerini hızla yeniden şekillendirir (Orlova vd. 2003; Barrero-Sicilia vd. 2017). Bu enzimler, yağ asidi zincirlerine çift bağ ekleyerek soğuğa adaptasyonu kolaylaştırır. Örneğin, *Arabidopsis*'te fad2 mutantının 6°C'de ölmesi, FAD2'nin soğuk koşullarında vazgeçilmez olduğunu gösterirken; FAD7/FAD8'in aşırı ekspresyonu trienoik asit seviyelerini artırarak soğuk toleransını arttırmaktadır (Miquel vd. 1993; Nishiuchi ve Iba 1998). Buna ek olarak, buğday ve keten gibi türlerde soğuk stresinin hem transkripsiyonel hem translasyon sonrası düzeyde yağ asidi desatürazlarını düzenleyebildiği gösterilmiştir (Horiguchi vd. 2000; Vrinten vd. 2005).

Soğuk stresinin lipid kompozisyonuna etkileri sadece yağ asidi doymamışlığı ile sınırlı değildir. Bitkiler aynı zamanda fosfolipid/protein oranı, fosfolipid sınıf değişimleri, digalaktosildiasilgliserol (DGDG) ve monogalaktosildiasilgliserol (MGDG) düzeyleri gibi yapısal unsurları da yeniden düzenler. Düşük sıcaklıkta fosfolipaz D (PLD) aktivitesinin artmasıyla üretilen fosfatidik asit (PA), hem membran onarımı hem de stres sinyal iletiminde görev alır (Barrero-Sicilia vd. 2017). Ayrıca bazı türlerde çok uzun zincirli yağ asitlerinin (VLCFA) soğuğa yanıt olarak arttığı ve kütiküler bariyerin korunmasına katkı sağladığı görülmüştür (Kosma vd. 2009; Zhukov 2015).

Soğuk stresine yanıtın merkezinde reaktif oksijen türleri (ROS) ve bunların tetiklediği lipid peroksidasyonu yer alır (Kazemi-Shahandashti vd. 2014). Oksidatif stres, özellikle UFA'ların peroksidasyonuna yol açarak zar bütünlüğünü bozabilir (Gaschler ve Stockwell 2017; Hashemi vd. 2019). Bu süreç boyunca MDA birikimi, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Mano 2012). Lipoksijenaz (LOX) enzimleri de soğuk sırasında UFA'ların oksidasyon ürünlerini üretir ve jasmonat (JA) biyosentezi gibi savunma yollarını başlatır (Mano vd. 2019; Viswanath vd. 2020). Nohut fidelerinde LOX aktivitesinin soğuk stresinde artması, ancak toleranslı genotiplerde kontrollü bir şekilde ilerlemesi, zar stabilitesinin korunmasında LOX'un çift yönlü rolünü ortaya koymaktadır (Kazemi-Shahandashti 2014; Javidi vd. 2022).

Son yıllarda lipidomik ve transkriptomik yaklaşımlar, soğuk stresinin bitkilerde çok katmanlı bir lipid yeniden şekillenmesi başlattığını göstermiştir (Higashi vd. 2015; Barrero-Sicilia vd. 2017; Yan vd. 2025). *Cannabis sativa*'da soğuk stresinin α -linolenik asit metabolizmasını, β -oksidasyonu ve JA biyosentezini aktive ettiği; tilakoid zarlarının çoklu doymamış DGDG ve SQDG türlerince zenginleşerek akışkanlığını artırdığı bildirilmiştir (Yan vd. 2025). *Arabidopsis*'te ise yüksek sıcaklık ve soğuk stresleri sırasında plastid ve ER arasındaki lipid transferinin hızlandığı, TAG birikiminin fazla 18:3 yağ asitlerini tamponlama mekanizması olabileceği öne sürülmüştür (Higashi vd. 2015).

Nohutta yapılan çalışmalar da benzer bulgular sunmaktadır. Soğuk stresine dayanıklı genotiplerde UFA içeriği, özellikle de C18:2 ve C18:3 düzeyleri, stres süresine bağlı olarak artmakta; bu artış hem membran stabilitesine hem de ROS birikiminin kontrolüne katkı sağlamaktadır (Javidi vd. 2022). Buna karşılık, hassas genotiplerde SFA'ların artması ve UFA'ların azalması, membran akışkanlığının bozulduğunu ve hücrel hasarın arttığını göstermektedir (Javidi vd. 2022). DBI (double bond index) değerinin yükselmesi, bitkilerde soğuk toleransının güçlü bir göstergesi olarak tanımlanmıştır.

Sonuç olarak, bitkilerin soğuk stresine verdiği yanıt, membran lipid bileşiminde yeniden şekillenme, desatüraz aktivitesinde artış, VLCFA ve fosfolipid sınıf değişimleri, oksidatif stres regülasyonu ve sinyal iletimi gibi çok yönlü mekanizmaların koordineli çalışmasıyla gerçekleşir. Yağ asitleri, bu karmaşık savunma sisteminin hem yapısal hem düzenleyici merkezinde yer almaktadır. Bu nedenle, soğuk stresine toleranslı genotiplerin belirlenmesinde yağ asidi profili, UFA/SFA oranı, DBI ve lipid peroksidasyon göstergeleri temel biyokimyasal belirteçler olarak değerlendirilmektedir.

2.3.3. Aminoasitler

Aminoasit metabolizması, bitkilerin düşük sıcaklık gibi abiyotik streslere karşı geliştirdiği uyum mekanizmalarında kritik bir role sahiptir (Han vd. 2021; Sun vd. 2023). Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde protein metabolizması yeniden düzenlenmekte, serbest aminoasit havuzu değişmekte ve özellikle aromatik aminoasitler bu koşullara cevapta önemli bir yer tutmaktadır (Henson vd. 2014). Aromatik aminoasitler içinde triptofan (Trp), yalnızca protein sentezinin temel bir bileşeni olmakla kalmayıp, aynı zamanda oksin ve melatonin gibi birçok indol türevli bileşiğin öncüsü olarak bitkilerin stres adaptasyonunda merkezi bir noktada yer almaktadır (Radwanski ve Last 1995; Maeda ve Dudareva 2012).

Soğuk koşullarda bitkiler, ozmotik dengeyi korumak, hücre yapısını stabilize etmek ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile başa çıkmak için çeşitli aminoasitleri biriktirmektedir (Han vd. 2021; Sun vd. 2023; Wang vd. 2023; Zhou vd. 2025). Prolin, histidin, fenilalanin ve triptofan gibi aminoasitler bu dönemde önemli artışlar gösterebilir (Henson vd. 2014; Raza vd. 2023). Özellikle Trp'nin soğuk stresinde düzenlenen en duyarlı aromatik aminoasitlerden biri olduğu çeşitli türlerde rapor edilmiştir. Örneğin *Avena sativa*'da dondurma sonrası Trp içeriği 3., 7. ve 14. günlerde kontrolün anlamlı şekilde üzerine çıkmıştır (Henson vd. 2014). Bu birikim, genellikle Trp biyosentez yolundaki anahtar enzimlerin aktivasyonu ile ilişkilidir. Şikimat yolunda yer alan DAHP sentaz, şikimat kinaz ve antranilat sentaz gibi enzimlerin ekspresyonu, soğuk koşullarda özellikle toleranslı genotiplerde artış göstermektedir (Tozawa vd. 2001; Wang vd. 2023).

Triptofan biyosentezinin soğuk toleransı ile ilişkisi proteomik analizlerde net şekilde görülmüştür. Şeker pancarında yapılan karşılaştırmalı proteomik çalışmada, soğuğa toleranslı TBP genotipinde Trp sentezi ile ilişkili proteinlerin (PISKL1, ASAS2, P2D3DA1) güçlü biçimde yukarı regüle edildiği, hassas genotipte ise değişmediği rapor edilmiştir (Wang vd. 2023). Aynı çalışmada, Trp'nin yaprak dokusunda birikmesi doğrudan donma toleransı ile ilişkilendirilmiştir. Çay bitkisinde yapılan kapsamlı transkriptomik ve fonksiyonel analizler, Antranilat Sentaz 2 (CsASA2) geninin soğuk tarafından güçlü bir şekilde indüklendiğini ve Trp sentezinde hız sınırlayıcı bir basamak olduğunu göstermiştir (Zhou vd. 2025). CsASA2'nin susturulması Trp birikimini azaltmış, ROS temizleme kapasitesini düşürmüş ve soğuk toleransını belirgin biçimde zayıflatmıştır. Aynı zamanda, CsASA2'nin yukarı akış düzenleyicisi olan etilen yanıt faktörü CsERF21-1, düşük sıcaklıkta hızla indüklenmiş, doğrudan CsASA2 promotörüne bağlanarak Trp biyosentezini aktive etmiştir (Zhou vd. 2025). Bu bulgular, Trp biyosentezinin transkripsiyonel olarak soğuk stresine entegre bir şekilde kontrol edildiğini göstermektedir.

Triptofanın soğuk stresindeki rolü uzun süre oksin sentezindeki konumuna bağlanmış olsa da, son çalışmalarda melatonin üretiminin Trp aracılı soğuk toleransında daha baskın mekanizma olduğu ortaya konmuştur (Zhou vd. 2025; Ren vd. 2025). Çay bitkisinde CsASA2 aşırı ekspresyonu, soğuk koşullarında oksin (IAA) seviyelerinde büyük değişiklik yaratmazken melatonin içeriğini güçlü biçimde artırmış, bunun sonucunda ROS birikimi azalmış ve antioksidan enzim aktiviteleri artmıştır (Zhou vd. 2025). Soya fasulyesinde yapılan çalışmalar da bu modeli doğrular niteliktedir. Ekzojen Trp uygulaması, düşük sıcaklık koşullarında endojen melatonin sentezini artırmış, ROS seviyelerini düşürmüş ve bitkinin soğuk toleransını iyileştirmiştir (Ren vd. 2025). Dahası,

melatonin sentez inhibitörü p-klorofenilalanin uygulaması Trp'nin olumlu etkilerini ortadan kaldırmıştır; bu da Trp'nin soğuk toleransını melatonin sentezi üzerinden sağladığını doğrudan kanıtlamaktadır. Benzer şekilde, çilek ve domates gibi diğer türlerde de Trp veya Trp türevlerinin melatonin birikimini artırarak soğuk toleransını yükselttiği gösterilmiştir (Lei vd. 2004; Ayyanath vd. 2024).

Soğuk stresinde ROS üretimi dramatik şekilde artmakta ve hücre zarları, proteinler ve DNA hasara uğrayabilmektedir (Chinnusamy vd. 2007). Trp birikimi ile artan melatonin, güçlü bir antioksidan olarak hem doğrudan ROS temizleyebilmekte hem de SOD, POD ve CAT gibi enzimlerin aktivitesini artırarak hücrenin oksidatif yükünü hafifletmektedir (Zhou vd. 2025). Çay bitkisinde CsASA2 susturulduğunda antioksidan enzim aktivitelerinin düşmesi, Fv/Fm değerlerinin azalması ve ROS birikiminin artması bu ilişkiyi açıkça göstermiştir (Zhou vd. 2025). Aynı şekilde soya fasulyesinde ekzojen Trp uygulaması H_2O_2 ve O_2^- birikimini %11–18 oranında azaltmıştır (Ren vd. 2025). Trp birikiminin yalnızca melatonin üretimini değil, CBF (C-repeat binding factor) soğuk yanıt yolunu da modüle ettiği gösterilmiştir. CsASA2 aşırı ekspresyonu olan *Arabidopsis* bitkilerinde, düşük sıcaklık altında CBF1, CBF2 ve CBF3 genlerinin ekspresyonu yabancı tipe kıyasla belirgin biçimde daha yüksek bulunmuştur (Zhou vd. 2025). Bu durum, Trp'nin soğuk sinyal yollarına metabolik ve transkripsiyonel düzeyde entegre olduğunu göstermektedir.

Düşük sıcaklık stresi altında bitkiler, karbon ve azot metabolizmasını yeniden yapılandırarak çok sayıda primer metaboliti düzenler. Sun vd. (2023), dört farklı düşük sıcaklık uygulamasına yanıt olarak yalnızca N-asetil-L-aspartik asidin anlamlı şekilde yukarı regüle olduğunu bildirerek, aspartat türevlerinin soğuk stresinde özel bir düzenleme altında olduğunu ortaya koymuştur. Aspartik asidin (Asp) hücre içi dağılımı da stres yanıtı için kritik ipuçları verir. Hoermiller vd. (2016), soğuk aklimasyon sırasında dayanıklı yabancı tiplerde sitozolik Asp seviyesinin belirgin şekilde arttığını, buna karşın hassas mutantlarda (spsal ve pgm) sitozolde azalarak plastidlerde biriktiğini raporlamıştır. Bu durum, dayanıklı genotiplerde plastidden sitozole doğru bir Asp akışı, hassas genotiplerde ise bunun tam tersine bir yönelme olduğunu göstermektedir (Hoermiller vd. 2016). Plastid–sitozol yönelimindeki bu farklılık, metabolik enerji gereksinimlerinin ve redoks dengesinin her genotipte farklı şekilde düzenlendiğini düşündürmektedir. Soğuk aklimasyonunda Asp, Asn, Glu ve Gln arasındaki bağlantılar enerji taşınımı ve azot fiksasyonu için belirleyicidir. Hoermiller (2016), Asp/Asn ve Glu/Gln için hücre içi bölme ilişkilerinin soğuk aklimasyonu sırasında çarpıcı biçimde değiştiğini; aklimasyona uğramış spsal hariç tüm genotiplerde bu dört aminoasidin plastidle ilişkili olduğunu göstermiştir. Glutamin ve glutamat plastidlerde amonyum fiksasyonu için zorunlu olduğundan (Mifflin & Habash 2002), bu ilişkinin kaybolması spsal mutantında düşük sıcaklık altında azot fiksasyonu kapasitesinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, hem spsal hem de pgm mutantlarında soğuk aklimasyonu sırasında toplam fumaratın %50 oranında azalmasıyla desteklenmektedir. Fumarat, malat gibi düşük karbon arzı koşullarında karbon rezervi görevi görür (Zell vd. 2010). Dolayısıyla her iki mutantın düşük fumarat seviyesi, azot metabolizmasını sürdürebilmek için karbon rezervlerinin tüketildiğini, yani karbon tedarikinin sınırlı olduğunu düşündürmektedir. Soğuk aklimasyon koşullarında Asp, Gln, Glu ve Asn için sitozolik bir kayma özellikle Col-0 ve spsal'de belirgindir (Hoermiller 2016). Ancak pgm mutantında bu kayma gözlenmemiştir. Bu durum, pgm'de AspAT/MDH temelli malat–

aspartat mekiğinin işlev bozukluğuna işaret etmektedir. Nitekim bu mutantta Asp ve Glu'nun sitozolik ilişkisinin tespit edilememesi ve plastid ile ilişkilerinin çok güçlü olması, redoks eşdeğerlerinin plastid-mitokondri arasında taşınmasında bir aksama olabileceğini göstermektedir. Heber (1974), Asp'nin yüksek hücrel konsantrasyonu nedeniyle oksaloasetattan daha etkili bir redoks taşıyıcısı olabileceğini öne sürmüştür. Dolayısıyla mekiğin bozulması, özellikle soğukta artmış oksidatif baskı altında pgm mutantında redoks dengesizliği oluşturabilir.

Asp, yalnızca protein yapı taşı değildir; aynı zamanda aminoasit biyosentezi, nükleotid üretimi, NAD sentezi, TCA döngüsü ve glikoliz ara ürünlerinin oluşumu dâhil birçok temel metabolik sürecin merkezinde yer alır (Han vd. 2021). Lizin, treonin, izolösin ve metiyonin gibi temel Asp ailesi aminoasitlerinin tamamı Asp anaerobik ağdan türetilir (Mifflin ve Habash 2002). Ayrıca Asp ve Glu, amidleriyle birlikte (Asn, Gln) bitkilerde azot taşınımının ve yeniden mobilizasyonunun ana bileşenleridir (Han vd. 2021). Bitkilerde Asp'nin hem karbon hem de azot metabolizmasını koordine etmesi, özellikle düşük sıcaklık, tuzluluk, su ve oksidatif stres gibi çevresel koşullarda Asp seviyesindeki değişimleri stres duyarlılığı ve adaptasyonun güçlü bir göstergesi hâline getirmektedir. Kuraklık, tuzluluk ve düşük sıcaklık uygulamalarında Asp konsantrasyonunun birçok türde anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (Zell vd. 2010; Sun vd. 2023). Soğuk stresinde çilek, çavdar ve incir gibi türlerde Asp seviyelerinin hızla artması, Asp'nin soğuk aklımasyonda erken yanıt verdiğini göstermektedir (Koehler 2015; Janmohammadi vd. 2018; Byeon vd. 2020). Asp artışı çoğu zaman Glu artışıyla paraleldir; her iki aminoasit de hem enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesinde hem de hücre içi ozmotik dengenin korunmasında önemli rol oynar. Asp aynı zamanda oksidatif strese yanıtın da hassas bir göstergesidir. *Arabidopsis* köklerinde menadionun tetiklediği oksidatif stresle Asp seviyelerinde hızlı bir düşüş, stres ortamı ortadan kalktıktan sonra ise yeniden yükseliş görülmüştür (Hoermiller vd. 2016). Bu dinamik değişim, Asp'nin redoks durumunu dengeleyen metabolik mekiğin (malat-aspartat döngüsü) önemli bir bileşeni olduğunu doğrulamaktadır (Heber 1974; Liepman ve Olsen 2004). Sonuç olarak Asp, stres koşullarında karbon ve azot akışını düzenleyen, redoks dengesi ve enerji metabolizmasını koordine eden ve hem abiyotik hem de biyotik stres tepkilerinde dinamik değişim gösteren kritik bir metabolit merkezidir. Asp seviyesindeki değişimler, bitkilerde hem erken stres algısının hem de uzun dönemli adaptasyonun önemli göstergelerinden biridir. Dolayısıyla Asp metabolizmasının soğuk stresinde incelenmesi, soğuğa toleransın metabolik temellerinin anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Cicer arietinum L. (CA 2969) × *C. reticulatum* Ladiz. (AWC 602) türler arası melezinden köken alan 163 RIL (Recombinant inbred lines, yani melezlendikten sonra saflaştırılmış hatlar) kullanılmıştır. Ana ebeveyn olarak kullanılan CA 2969, kabuli tip bir nohut olmakla beraber soğuk koşullara dayanımı bakımından hassas/duyarlı bir genotiptir (Toker vd. 2005). Baba ebeveyn olarak kullanılan AWC 602 (ILWC 142), tarımı yapılan nohudun yabani türlerinden olan *C. reticulatum* Ladiz.'e ait ve soğuk koşullara toleransı bakımında toleranslı/dayanıklı bir genotiptir (Toker vd. 2005).

3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Soğuk Uygulamaları

Denemeler, Akdeniz Üniveristesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü İklim Odalarında yürütülmüştür. Tohumlar, $64 \times 64 \times 78 \text{ mm}^3$ ölçülerinde gözlere sahip olan 20'li viyollerde yetiştirilmiştir. Viyoller toprak, perlit ve vermikülit [100:30:55 (g:g:g)] karışımıyla doldurulmuştur. Her bir viyol gözüne tek tohum ekimi yapılmıştır. Her genotip için tekerrür başına 5'er bitki yetiştirilmiş ve 3 tekerrür olarak deneme tasarlanmıştır. Bitkiler iklim odasında $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ve $18 \pm 1^\circ\text{C}$ (gündüz ve gece sıcaklıkları), 70 ± 2 nisbi nem oranı 14/10 saatlik fotoperiyotta (gündüz/gece) korunmuştur (Şekil 3.1a). Bitkiler, fide çıkışından itibaren 4 hafta boyunca bu koşullarda tutulmuştur ve 3 gün ara ile sulama yapılmıştır. Bitkiler, $280 \text{ IE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de yüksek basınçlı sodyum ve floresan lambalar altında yetiştirilmiştir.





Şekil 3.1. a) İklim odasında bitkilerin yetiştirilmesi ve soğuğa alıştırma aşaması **b)** İklim odasında don sıcaklıkları uygulaması

4 haftalık olan bitkiler soğuğa alıştırma (cold acclimation) uygulaması için 16°C /12°C (2 gün), 12°C/8°C (2 gün), 8°C/4°C (2 gün), 4°C/4°C (2 gün) sıcaklıklarda tutulmuştur (Şekil 3.1a). Soğuğa alıştırma uygulamasından sonra, bitkiler 0°C ile başlanarak 2°C/saatlik bir azalışla -2°C, -4°C, -6°C, -8°C, -10°C ve -12°C don sıcaklıklarına maruz bırakılmıştır ve her bir sıcaklıkta bir saat tutulmuştur (Şekil 3.1b). Bu uygulamanın ardından bitkiler buzlarının yavaş bir şekilde çözülmesi için 4°C'ye alınmış ve 24 saat bu koşullarda tutulmuştur ve ardında iyileşme dönemi için $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ve $18 \pm 1^\circ\text{C}$ (gündüz ve gece sıcaklıkları) koşullarına alınmıştır.

3.3. Soğuğa Dayanıklılık Gözlemi

Soğuğa dayanıklılık değerlendirmesi, bitkiler iyileşme koşullarına alındıktan sonra hassas kontrol olarak kullanılan ILC 533 genotipinin ölümü dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan 1–9 görsel skorlama ölçeği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Soğuğa dayanıklılık gözlemi için kullanılan 1-9 görsel skorlama ölçeği (Singh vd. 1989)

Dayanıklılık ölçeği	Reaksiyon kategorisi	Bitkilerin görünüşü
1	Çok yüksek derecede dayanıklı	Görünür hasar belirtisi yok
2	Oldukça dayanıklı	Yaprakçıkların %10'una kadar solma ve kuruma görülüyor, ölüm yok
3	Dayanıklı	Yaprakçıkların %11 ila %20'si solma ve dalların %20'sine kadar solma ve kuruma görülüyor, ölüm yok
4	Orta derecede dayanıklı	Yaprakçıkların %21 ila %40'ı ve dalların %20'sine kadar solma ve kuruma görülüyor, ölüm yok
5	Orta	Yaprakçıkların %41 ila %60'ı ve dalların %21 ila %40'ı solma ve kuruma gösteriyor, bitkilerin %5'ine kadar ölüm
6	Orta derecede hassas	Yaprakçıkların %61 ila %80'i ve dalların %41 ila %60'ı solma ve kuruma gösteriyor, bitkilerin %6 ila %25'i ölüm
7	Hassas	Yaprakçıkların %81 ila %99'u ve dalların %61 ila %80'i solma ve kuruma, %26 ila %50'si bitki ölümü
8	Çok hassas	Yaprakçıkların %100'ü ve dalların %81 ila %99'u solma ve kuruma, %51 ila %99'u bitki ölümü
9	Çok yüksek derecede hassas	%100 bitki ölümü

3.4. Biyokimyasal Analizler İçin Örneklerin Toplanması

Biyokimyasal analizler için yaprak örnekleri, don öncesi örnekleme soğuğa alıştırma uygulamasının son gününde (4°C/4°C), don sırası örnekleme don koşullarının son sıcaklık uygulaması olan -12°C'de ve don sonrası örnekleme ise bitkiler 4°C'de 24 saat tutulduktan sonra alınmıştır. Biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere, dayanıklılık gözlemi sonrasında belirlenen 1 ve 9 skoru alan beşer bitki seçilmiştir.

3.5. Metabolit Ekstraksiyonu ve GC-MS Analizi

3.5.1. Metabolitlerin ekstraksiyonu

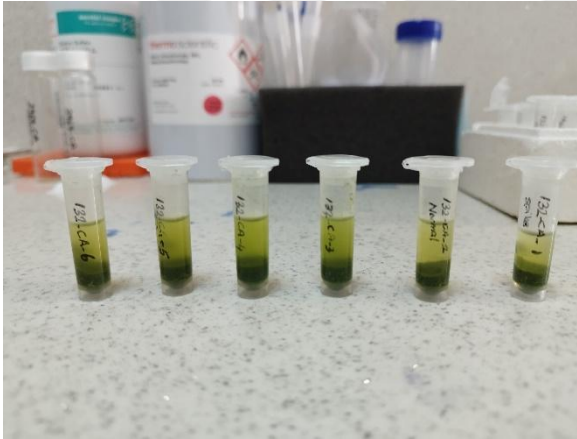
Metabolitlerin ekstraksiyonu için Nehela vd. (2016) ekstraksiyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Metabolitlerin ekstraksiyonu için nohut yaprak dokuları havan ve pistil yardımıyla sıvı azot kullanılarak öğütülmüştür. 100 mg öğütülmüş doku 1,5 mL'lik mikro santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Her numuneye 750 µL ekstraksiyon çözeltilisi (Metanol:Su:HCl (6 N); 80:19.9:0.1, v/v/v) eklenmiş ve 30 saniye boyunca vortex ile karıştırılmıştır. Numuneler 10 dakika boyunca buz üzerinde bekletilmiş, ardından 25°C'de 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan süpernatant dikkatlice toplanarak 2 mL'lik tüplere aktarılmıştır. Aynı işlem üç kez tekrarlanmış ve süpernatantlar birleştirilmiştir. Birleştirilen ekstraktlar azot gaz akışı altında kuruyana kadar konsantre edilerek -20°C'de saklanmıştır.



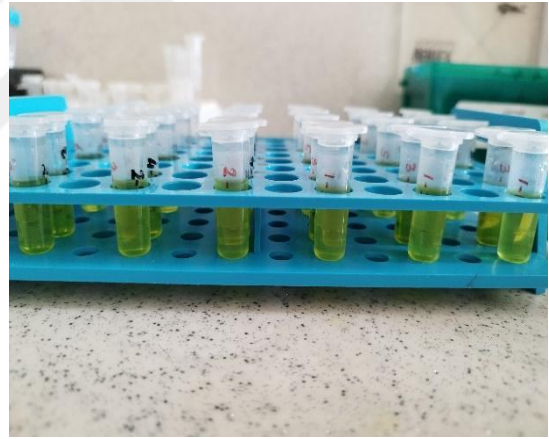
(a)



(b)



(c)



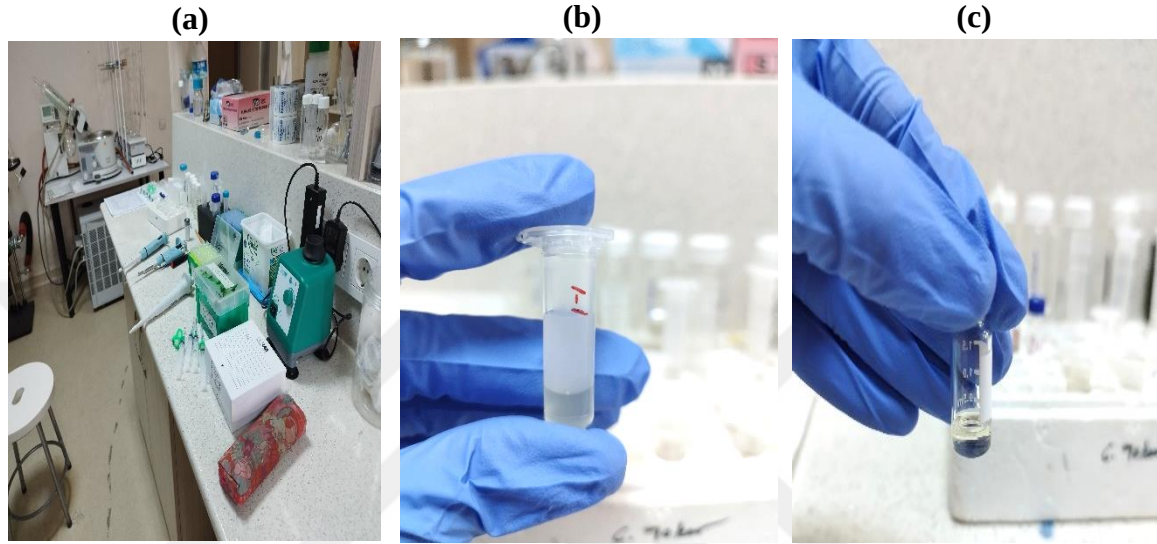
(d)

Şekil 3.2. Nohut bitkilerinde metabolit ekstraksiyon aşamaları **a)** Numunelerin ekstraksiyon için hazırlanması ve **b)** Bitki yapraklarının sıvı azot yardımıyla öğütülmesi **c)** Numunelere ekstraksiyon çözeltisi eklenmiş hali **d)** Ekstrakte edilmiş numuneler

3.5.2. Türevlendirme

Metil kloroformat ile türevlendirme için Smart vd. (2010) ve Rawlinson vd. (2015)'nin yöntemi kullanılmıştır. Analiz öncesinde kurutulmuş ekstraktlar 86,8 μL metanol içinde çözülmüş ve üzerine 13,2 μL trans-sinamik asit (1 ppm) iç standard olarak eklenmiştir. Daha sonra numuneye 200 μL %1 (w/v) sodyum hidroksit çözeltisi eklenerek süspansiyon oluşturulmuştur. Süspansiyona sırasıyla 147 μL metanol ve 34 μL piridin ilave edilerek 25-30 saniye boyunca vortex ile kuvvetlice karıştırılmıştır. Ardından 20 μL metil kloroformat (MCF) eklenmiş ve 25-30 saniye karıştırılmıştır. Aynı hacimde ikinci bir 20 μL MCF eklemesi yapılarak numuneler tekrar 25-30 saniye boyunca

karıştırılmıştır. Bu aşamadan sonra numunelere 400 μ L kloroform eklenerek 10 saniye karıştırılmış ve ardından 400 μ L 50 mM sodyum bikarbonat çözeltisi ilave edilmiştir. Numuneler 10-15 saniye karıştırıldıktan sonra 16100 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan iki fazdan alt organik faz, sulu ve bitki kalıntısı katmanlarını bozmadan dikkatlice yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Organik faza, nemin tamamen giderilmesi için susuz sodyum sülfat eklenmiştir. Bu çözeltiden 100 μ L alınarak GC-MS analizinde kullanılmıştır.



Şekil 3.3. a) Türevlendirme yaptığımız bench **b)** Türevlendirme aşamasında iki faza ayrılmış numune **c)** GC-MS analizinde kullanılacak türevlendirilmiş numune

3.5.3. GC-MS analiz koşulları

GC-MS analizleri Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü laboratuvarlarında yürütülmüştür. GC-MS analizleri, split/splitless enjektörlü bir Agilent 7890A gaz kromatografisi ve EI kaynaklı Agilent 5975C dört kutuplu kütle spektrometresi (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde HP-5ms kapiler kolon (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μ m) kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum sabit akış modunda (1.0 mL $\cdot$ dk⁻¹) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 1 μ L olup splitless modunda yapılmıştır. Enjektör ve dedektör sıcaklıkları 250°C'de tutulmuştur. Kolon sıcaklık programı: başlangıçta 40°C'de 1 dakika bekleme, ardından sıcaklığın 20°C $\cdot$ dk⁻¹ hızla 280°C'ye çıkarılması ve 3 dakika tutulması, sonrasında 4°C $\cdot$ dk⁻¹ hızla 295°C'ye yükseltip 10 dakika bekletilmesi şeklinde uygulanmıştır. Elektron iyonizasyonu (EI) 70 eV enerjide gerçekleştirilmiş, iyon kaynağı sıcaklığı 230°C, kadrupol sıcaklığı 150°C, transfer hattı sıcaklığı ise 250°C olarak ayarlanmıştır. Çözücü gecikmesi 7,5 dakika, tarama aralığı ise m/z 50–400 olarak belirlenmiştir. Veri toplama ve işleme Agilent MSD ChemStation yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Metabolit tanımları NIST-98 kütüphanesine göre yapılmış, tanımlamada eşleşme indeksi (match score) ≥ 900 olan bileşikler değerlendirilmiştir.

3.6. Çalışmadaki Metabolitler

Çalışmada kullandığımız organik asitlerin, yağ asitlerinin ve aminoasitlerin isimleri, alıkonulma süreleri, moleküler ağırlıklarına ait bilgiler Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Çalışmadaki organik asitlerin, yağ asitlerinin ve aminoasitlerin isimleri ve tanımlama kriterleri (RT, MA, CAS No, Formül)

NIST kütüphanesindeki metabolit isimleri	Metabolit isimleri	RT	MA	CAS Numarası	Formül
Propanedioic acid, dimethyl ester	Malonik asit	7,657	132,042	000108-59-8	C ₅ H ₈ O ₄
2-Butenedioic acid (E)-, dimethyl ester	Fumarik asit	8,522	144,042	000624-49-7	C ₆ H ₈ O ₄
Butanedioic acid, hydroxy-, dimethyl ester	Malik asit	9,541	162,053	001587-15-1	C ₆ H ₁₀ O ₅
Aspartic acid methyl ester	Aspartik asit	11,564	146,069	1000130-17-8	C ₆ H ₁₁ NO ₄
Butanedioic acid, methoxy-, dimethyl ester	Süksinik asit	11,779	176,068	004148-97-4	C ₇ H ₁₂ O ₅
2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester	Trans sinnamik asit (IS)	12,071	162,068	000103-26-4	C ₁₀ H ₁₀ O ₂
DL-Tryptophan, 5-methoxy-	Triptofan	12,529	234,1	028052-84-8	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃
Citric acid, trimethyl ester	Sitrik asit	12,611	234,074	001587-20-8	C ₉ H ₁₄ O ₇
Hexadecanoic acid, methyl ester	Palmitik asit	16,111	270,256	000112-39-0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	Linoleik asit	17,496	294,256	000112-63-0	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	Linolenik asit	17,566	292,24	000301-00-8	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
Octadecanoic acid, methyl ester	Stearik asit	17,665	298,287	000112-61-8	C ₁₉ H ₃₄ O ₂

RT: Alıkonma süresi (Retention time), MA: Moleküler ağırlık, IS: Internal standart

3.7. İstatistiksel Analizler

Don öncesi, don ve don sonrası uygulamalarına ait veriler, internal standart (IS) olarak kullanılan trans sinnamik asite göre aşağıdaki formülle normalize edilmiştir.

$$Normalizasyon = \frac{\text{Metabolit pik alanı}}{\text{IS pik alanı}}$$

Don öncesi, don ve don sonrası uygulamalarına ait veriler virgülle ayrılmış değerler (.csv) dosyaları olarak biçimlendirilmiştir ve MetaboAnalyst 6.0 sunucusuna (<http://www.metaboanalyst.ca>) yüklenmiştir (Lisec vd. 2006). Her bir uygulama için ayrı ayrı metabolitlerin iki grup ortalaması (dayanıklı/hassas) arasındaki istatistiksel anlamlılığını hesaplamak için tek değişkenli analiz (t-testi ve tek yönlü ANOVA) uygulanmıştır. Kapsamlı veri analizi için çok değişkenli yöntemler, Kısmi en küçük kareler ayırım analizi (PLS-DA) ve ısı haritasıyla hiyerarşik kümeleme uygulanmıştır. Bu yöntemde tüm değişkenler dikkate alınarak Pearson uzaklık ölçüsü ve Ward kümeleme algoritmasına dayalı bir ısı haritası (heatmap) oluşturulmuştur ve $P \leq 0,05$ anlamlılık düzeyi kullanılarak PLS-DA VIP (projeksiyonda değişken önemi) puanına göre her bir uygulamada dayanıklı ve hassas genotipler için ayrımı sağlayan en iyi metabolitler belirlenmiştir.

Veri analizi, SPSS 22 (IBM SPSS Statistics, IL, ABD) istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genotiplerin ve uygulamaların bağımlı değişkenler üzerindeki etkilerini ve genotip $\times$ uygulama interaksiyonunu belirlemek için ANOVA yapılmıştır. Uygulamalar ve genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları belirlemek için,

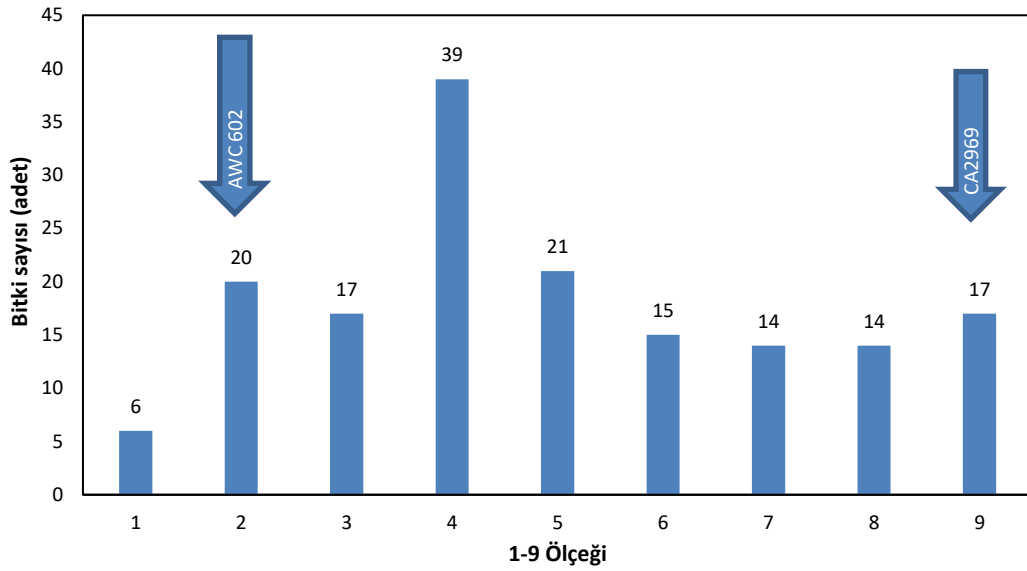
Tukey çoklu karşılaştırma ($P \leq 0,05$) testi kullanılarak her bir metabolitin ortalama karşılaştırması yapılmıştır. Tüm metabolitlere ait verilerin grafikleri Microsoft Excel çalışma dosyasında oluşturulmuştur.



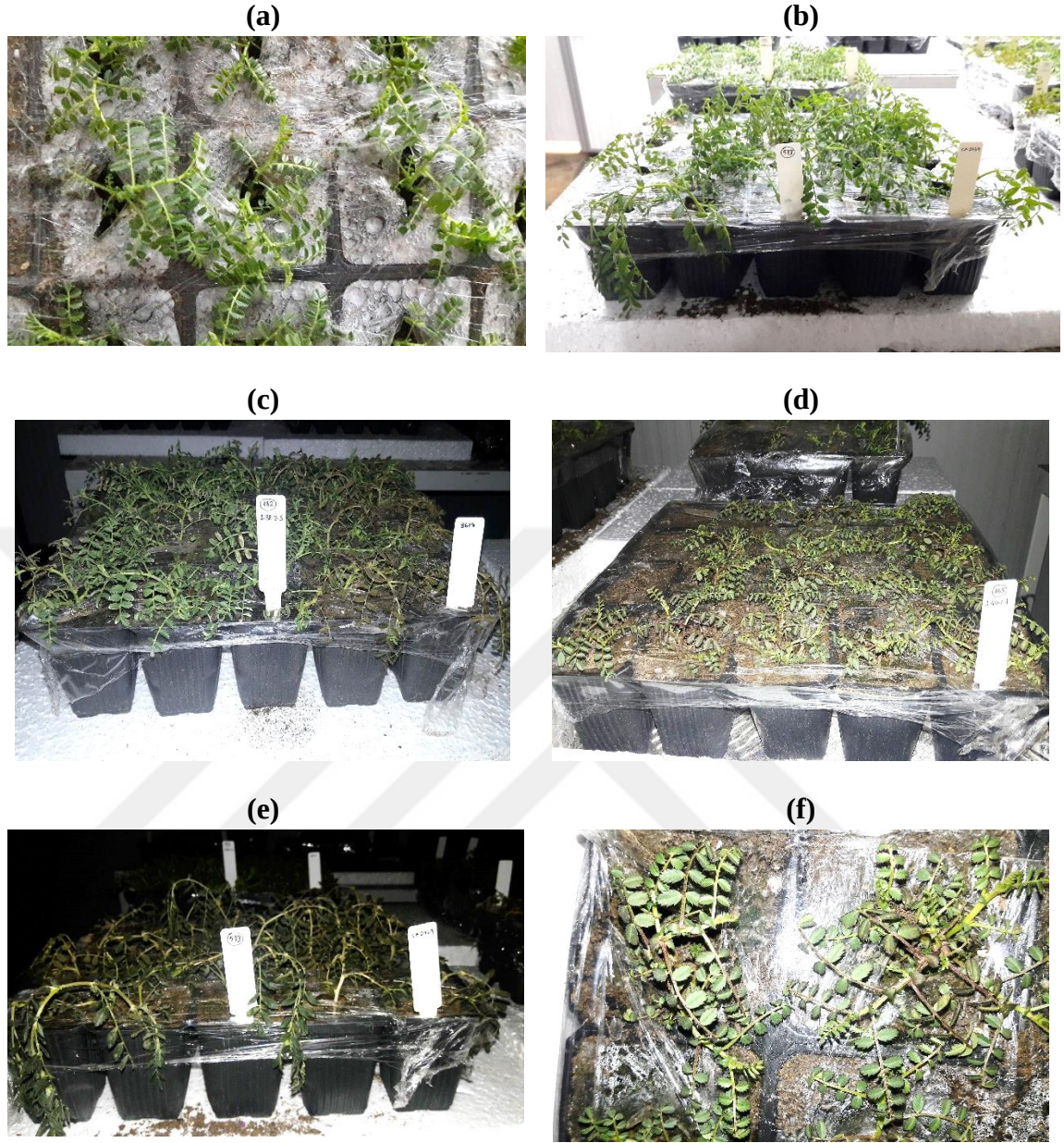
4. BULGULAR

4.1. 1-9 Ölçeğine Göre Genotiplerin Don Toleransı ve Fenotipik Dağılımları

Don koşullarından (-12°C) sonra iyileşme aşamasına alınan bitkilerde, hassas kontrol olarak kullanılan ILC 533 genotipinin ölümü esas alınarak, AWC 602 (baba ebeveyn), CA 2969 (ana ebeveyn) ve 163 RIL hattının soğuğa dayanıklılıkları 1-9 görsel ölçeği kullanılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). Bu değerlendirme sonucunda AWC 602 oldukça dayanıklı (2 puan), CA 2969 yüksek derecede hassas (9 puan) olarak belirlenmiştir. RIL’lerde ise altı genotipin çok yüksek derecede dayanıklı (1 puan) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1). 1-4 puan aralığında 82 genotip farklı derecede dayanıklı bulunurken, 5 puan alan 21 genotip toleranslı ve 6-9 puan aralığında 60 genotip farklı derecelerde soğuğa hassasiyete göstermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. AWC 602 (baba ebeveyn), CA 2969 (ana ebeveyn) ve 163 RIL hattının 1-9 ölçeğine göre dağılımları.



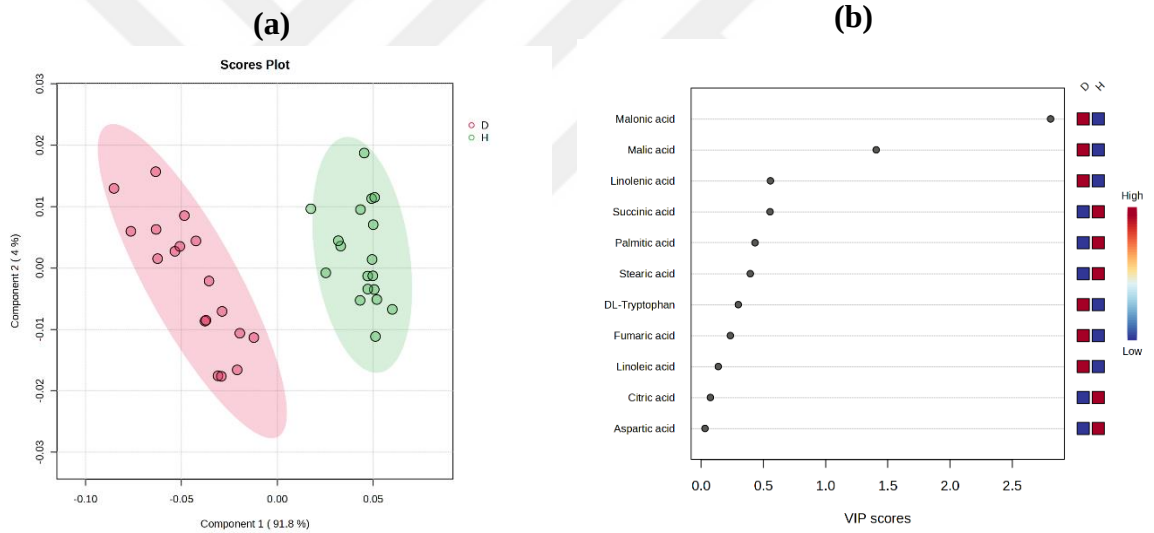
Şekil 4.2. a) Don şiddeti ve bitkilerin görünümü, b) Don sonrası koşullara alınan hassas kontrolün (ILC 533) ve hassas ebeveynin (CA 2969) fenotipik görünümü, c) İyileşme koşullarında daha önce dayanıklı olarak bildirilen ILC 8617 ve dayanıklı hatlarımızdan 132'nin fenotipik görünümü d) İyileşme koşullarında 1 puan alan hatlardan 165'nin fenotipi e) Soğuğa dayanıklılık skorlaması öncesi hassas kontrolün (ILC 533) ve hassas ebeveynin (CA 2969) fenotipik görünümü, f) Soğuğa dayanıklılık skorlaması öncesi dayanıklı hatlardan birinin fenotipik görünümü.

4.2. PLS-DA Puan Grafiği

Çok değişkenli veri analizi (multivariate analyses), çok değişkenli veri kümesinin boyutunu azaltmak ve örnekler arasındaki farklılıkları veya benzerlikleri belirlemek için kullanılır. Çok değişkenli analizde puan grafiğinin her noktası ayrı bir örneği temsil eder.

Örneklemeler arasındaki gruplamalar ve aykırı değerler, bir puan grafiğinde kolayca gözlemlenebilir.

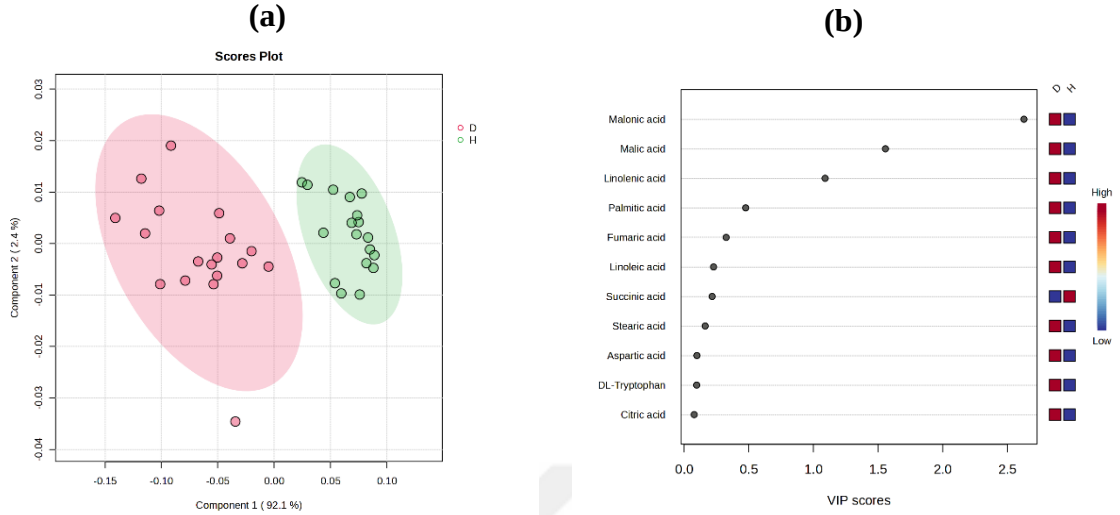
PLS-DA, gözlemlenen değişkenler ile grup etiketleri arasındaki ilişkiyi maksimum düzeyde kullanarak sınıflandırma yapan bir yöntemdir; bu çalışmada don öncesi (pre-freezing) koşullarındaki dayanıklı (D) ve hassas (S) genotiplerin 11 biyokimyasal parametre (yağ asitleri, aminoasitler, organik asitler) temelinde ayırım olup olmadığını incelemek için tercih edilmiştir. PLS-DA analizi iki bileşen (Component 1 ve Component 2) üzerinden yapılmış ve toplamda yaklaşık %95,8'lik varyansı (%91,8 + %4,0) açıklamaktadır (Şekil 4.3a). Component 1 eksenini gruplar arasındaki en belirgin ayırımı göstermektedir. Bu eksen boyunca bakıldığında dayanıklı genotipler negatif yönde, hassas genotipler pozitif yönde konumlanmıştır. Grupların elipsleri (%95 güven aralıkları) belirgin bir ayırım göstermektedir. Bu durum, don öncesi koşullarda dayanıklı ve hassas genotiplerin metabolik profillerinin farklı olduğunu göstermektedir. PLS-DA'da en iyi ayırımı sağlayan değişkenler, projeksiyondaki değişken önemlerine (VIP) göre sıralanmıştır (Şekil 4.3b). Don öncesi koşullarda, dayanıklı ve hassas grup arasında en yüksek ayırım gücünü sağlayan ilk 5 değişken malonik asit, malik asit, linolenik asit, süksinik asit ve palmitik asittir.



Şekil 4.3. Don öncesi koşullarında dayanıklı ve hassas nohut genotiplerine ait **a)** PLS-DA puan grafiği ve **b)** PLS-DA VIP puan grafiği. D: Dayanıklı genotipler, H: Hassas genotipler

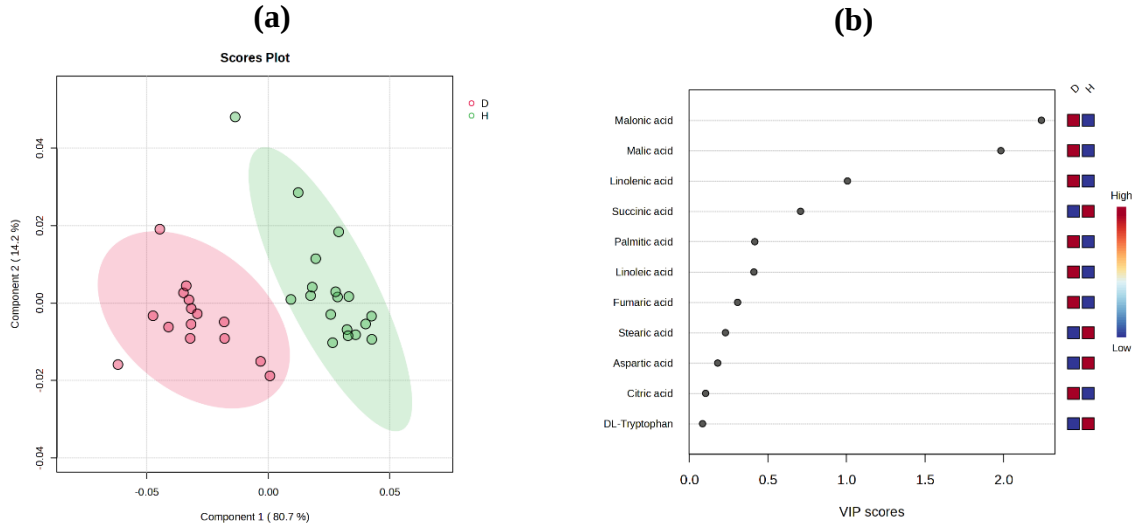
Don sırasındaki (freezing) koşullarda dayanıklı ve hassas genotipler arasında çalışılan biyokimyasal parametreler temelinde ayrışmanın olup olmadığını belirlemek için PLS-DA analizinden faydalanılmıştır. PLS-DA modelindeki ilk iki bileşenden Component 1 (%92,1) ve Component 2 (%2,4) toplam varyansın %94,5'ini açıklamaktadır (Şekil 4.4a). Component 1 eksenini boyunca dayanıklı genotiplerin negatif yönde geniş bir alan içerisinde dağıldığı görülürken, hassas genotiplerin pozitif yönde daha dar bir alanda ve genotiplerin birbirine yakın konumda dağıldığı görülmektedir. Component 1 eksenini, gruplar arasında belirgin bir şekilde ayrışmayı ortaya koymaktadır. Bu ayrışmaya neden olan en önemli değişkenler, projeksiyondaki değişken önemleri

(VIP) sıralamasına göre malonik asit, malik asit, linolenik asit, palmitik asit ve fumarik asittir (Şekil 4.4b).



Şekil 4.4. Don koşullarında dayanıklı ve hassas nohut genotiplerine ait **a)** PLS-DA puan grafiği ve **b)** PLS-DA VIP puan grafiği. D: Dayanıklı genotipler, H: Hassas genotipler

Don sonrası (post-freezing) koşullarda dayanıklı ve hassas genotipler arasında çalışılan biyokimyasal parametreler temelinde ayrışmanın olup olmadığını belirlemek için PLS-DA analizinden faydalanılmıştır. PLS-DA skor grafiği, don sonrası koşullarında dayanıklı (D) ve hassas (H) genotipler tamamen farklı alanlarda kümelenerek belirgin bir ayrışma olduğunu göstermektedir (Şekil 4.5a). Component 1 (%80,7) gruplar arasındaki temel varyasyonu açıklamakta olup, dayanıklı genotipler negatif, hassas genotipler ise çoğunlukla pozitif yönde konumlanmıştır. Elipsin yatay genişliği, hassas genotipler arasında Component 1 boyunca daha yüksek varyasyon olduğunu düşündürmektedir. Bu durum, bu grubun biyokimyasal yanıtlarında daha heterojen bir davranış sergileyebileceğini gösterir. Hassas genotiplerde elipsin şekli daha dikey bir dağılım göstermektedir ve bu da Component 2 yönünde (%14,2) belirli düzeyde içsel varyasyon (biyokimyasal çeşitlilik) bulunduğu işaret eder. PLS-DA'da en iyi ayrımı sağlayan değişkenler, projeksiyondaki değişken önemlerine (VIP) göre sıralanmıştır (Şekil 4.5b). Don sonrası koşullarda, dayanıklı ve hassas grup arasında en yüksek ayrım gücünü sağlayan ilk 5 değişken malonik asit, malik asit, linolenik asit, süksinik asit ve palmitik asittir.

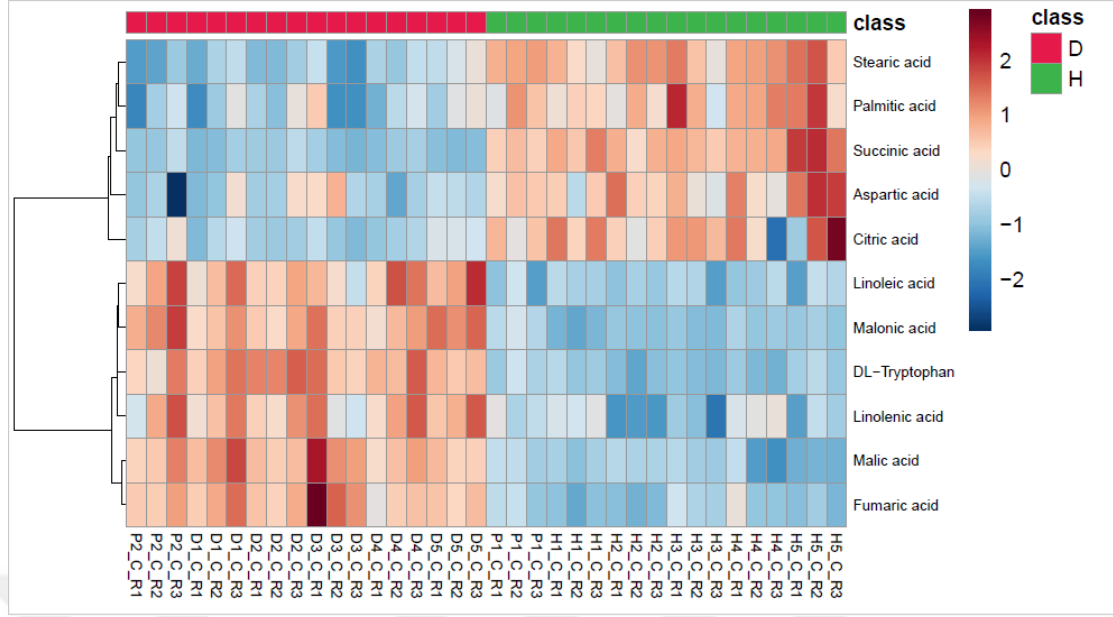


Şekil 4.5. Don sonrası koşullarında dayanıklı ve hassas genotiplere ait **a)** PLS-DA puan grafiği ve **b)** PLS-DA VIP puan grafiği. D: Dayanıklı genotipler, H: Hassas genotipler

4.3. Isı Haritası

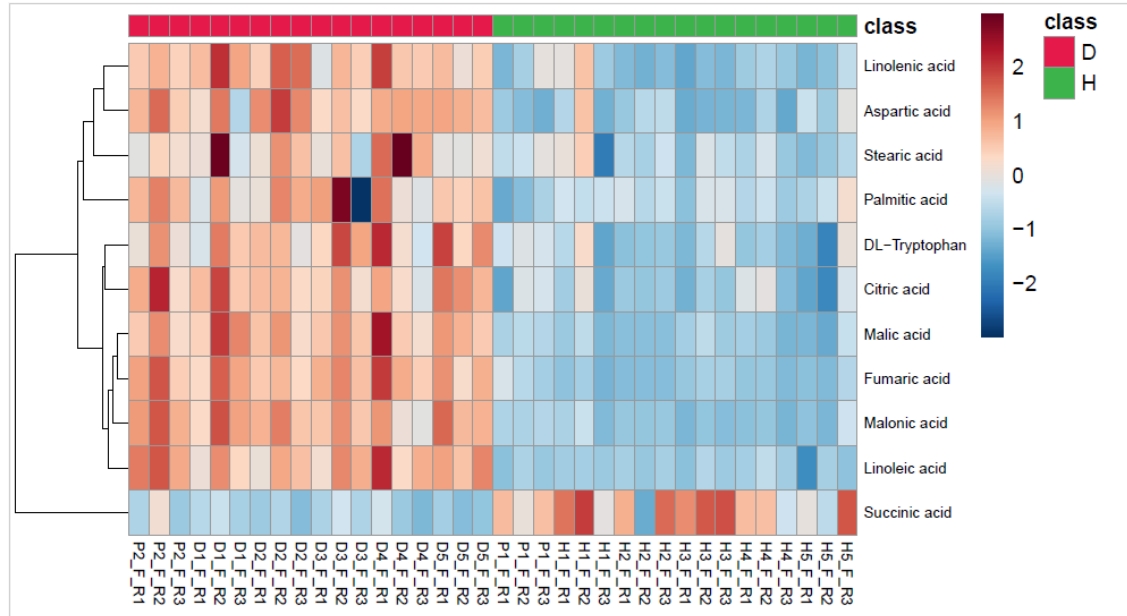
Don öncesi, don sırası ve don sonrası uygulamalarının dayanıklı ve hassas genotiplerde biyokimyasal bileşenlerin birikim profilleri üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, hiyerarşik kümeleme temelli ısı haritası analizi gerçekleştirilmiştir. Dayanıklı ve hassas genotipler arasındaki metabolik desen farklılıklarını daha net biçimde ortaya koymak için her bir uygulama koşuluna ait ısı haritaları ayrı olarak hazırlanmıştır.

Don öncesi ısı haritasına göre, biyokimyasal bileşenlerde dayanıklı ve hassas gruplar arasında ayrım olduğunu göstermektedir (Şekil 4.6). İlk kümede dayanıklı grupta linoleik asit, malonik asit, triptofan, linolenik asit, malik asit ve fumarik asidin daha yüksek seviyelerde birikiminin olduğu görülmektedir. İkinci kümede ise, hassas grupta stearik asit, palmitik asit, süksinik asit, aspartik asit ve sitrik asidin daha yüksek seviyelerde birikimi görülmektedir.



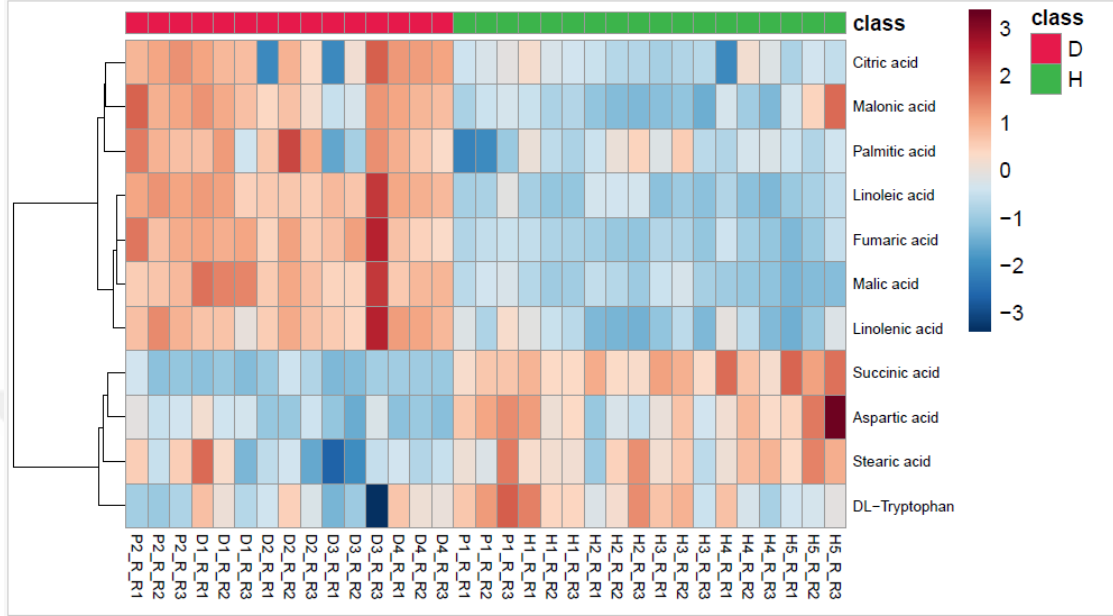
Şekil 4.6. Don öncesi koşullarda 11 metabolitin seviyelerini gösteren kısmi en küçük kareler ayırma analizi (PLS-DA) temelli ısı haritası (mesafe ölçüsü: Pearson; kümeleme algoritması: Ward). P1: CA 2969, P2: AWC 602, D: dayanıklı RIL'ler, H: hassas RIL'ler.

Don sırası ısı haritasına göre, biyokimyasal bileşenlerde dayanıklı ve hassas gruplar arasında ayrım olduğunu göstermekle beraber dayanıklı grupta süksinik asit hariç diğer bileşenlerin daha yüksek seviyede birikime sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.7). Bu ısı haritası, don stresine maruz kalan dayanıklı (D) ve hassas (H) genotipler arasında belirgin metabolik farklılıklar olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.7. Don koşullarında 11 metabolitin seviyelerini gösteren kısmi en küçük kareler ayırma analizi (PLS-DA) temelli ısı haritası (mesafe ölçüsü: Pearson; kümeleme algoritması: Ward). P1: CA 2969, P2: AWC 602, D: dayanıklı RIL'ler, H: hassas RIL'ler.

Don sonrası ısı haritasına göre, dayanıklı grubun sitrik asit, malonik asit, palmitik asit, linoleik asit, fumarik asit, malik asit ve linolenik asitte hassas gruba göre daha yüksek seviyelerde birikimler mevcuttur. Hassas gruplarda ise, süksinik asit, aspartik asit, stearik asit ve triptofan seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.8).

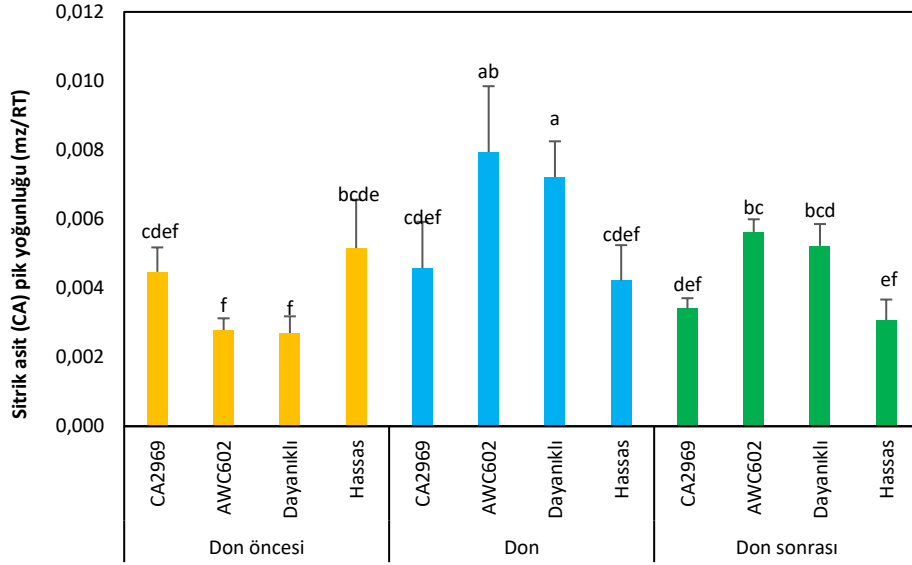


Şekil 4.8. Don sonrası koşullarda 11 metabolitin seviyelerini gösteren kısmi en küçük kareler ayrım analizi (PLS-DA) temelli ısı haritası (mesafe ölçüsü: Pearson; kümeleme algoritması: Ward). P1: CA 2969, P2: AWC 602, D: dayanıklı RIL'ler, H: hassas RIL'ler.

4.4. Don Öncesi, Don ve Don sonrası Koşullarına Göre Metabolitlerin Değişimi

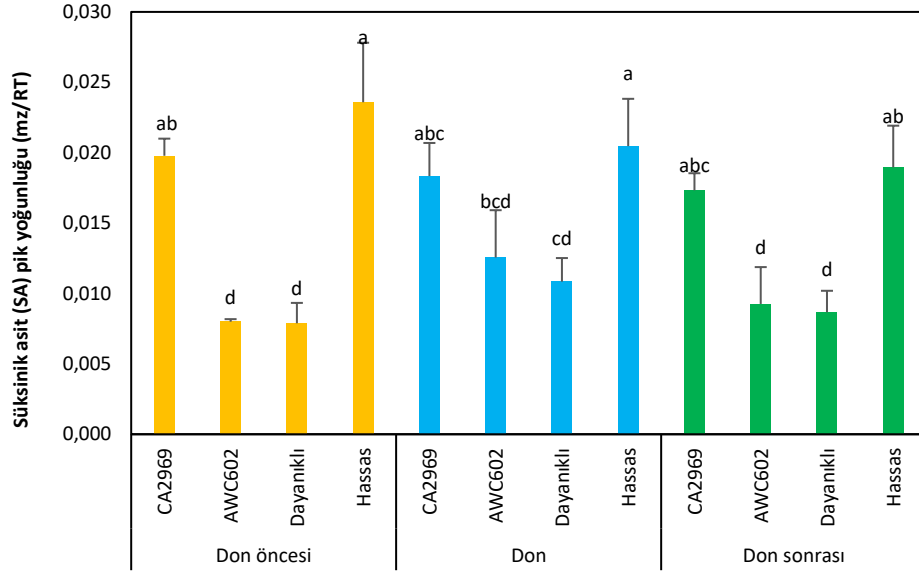
4.4.1. Organik asitlerdeki değişimler

Don öncesi (4°C) koşullarda, sitrik asit (CA) birikimi, dayanıklı genotiplerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları) hassas genotiplere (CA 2969 ve hassas RIL hatları) kıyasla daha düşük seviyelerde belirlenmiştir (Şekil 4.9). Bitkiler don koşullarına maruz bırakıldığında, dayanıklı genotiplerde CA seviyelerinde anlamlı bir artış kaydedilmiştir (AWC 602'de 1,85 kat; dayanıklı RIL'lerde 1,67 kat). Buna karşın, hassas ebeveyn (CA 2969) ve hassas RIL hatlarında, don öncesi koşullara kıyasla CA miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Don sonrası iyileşme evresinde, CA birikiminin don koşullarına kıyasla azalış eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. AWC 602 ve dayanıklı RIL hatlarında don koşullarına göre CA miktarlarında sırasıyla %29 ve %27 oranında azalış tespit edilmiştir. Hassas genotiplerde ise CA miktarındaki bu azalış oranı CA 2969'da %25 ve hassas RIL'lerde %28 oranında olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).



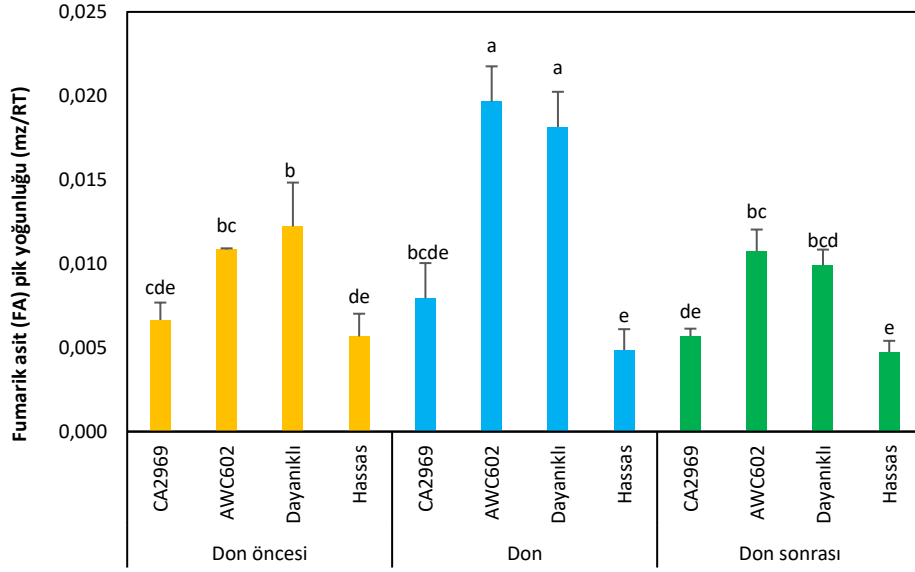
Şekil 4.9. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında sitrik asit (CA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

Don öncesi koşullarda süksinik asit (SA) birikimi incelendiğinde, hassas genotiplerde (CA 2969 ve hassas RIL hatları), dayanıklı genotiplere (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları) kıyasla daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). Don koşullarına geçiş yapıldığında, soğuğa dayanıklı bitkilerde SA miktarında artış eğilimi gözlenmiştir. AWC 602'de %57 ve dayanıklı RIL'lerde %38 oranında bir artış kaydedilmiştir. Buna karşılık, soğuğa hassas genotiplerde bu artış eğiliminin tersi yönde bir değişim belirlenmiş; CA 2969'da %7 ve hassas RIL hatlarında %13 oranında azalma meydana gelmiştir. Don sonrası iyileşme koşullarında, hem dayanıklı hem de hassas genotiplerde SA düzeyleri don koşullarına kıyasla azalma göstermiştir. Bu azalışın miktarı, dayanıklı bitkilerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL'lerde sırasıyla %26 ve %20 azalış) hassas genotiplere (CA 2969 ve hassas RIL'lerde sırasıyla %5 ve %7 azalış) kıyasla daha yüksek seviyede tespit edilmiştir. Uygulama koşullarının genelinde (Don Öncesi, Don ve Don Sonrası), hassas bitkilerde SA birikiminin sürekli olarak daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



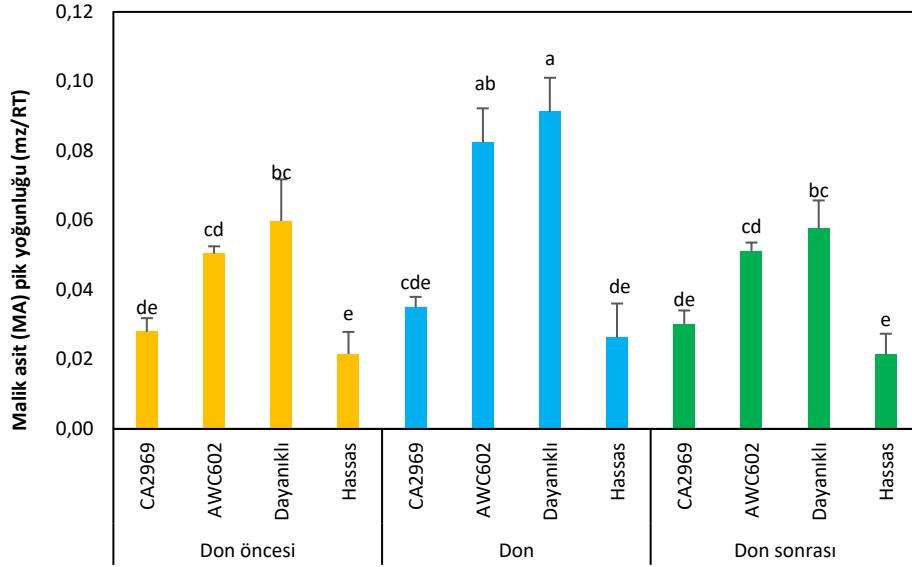
Şekil 4.10. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında süksinik asit (SA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

Don öncesi koşullarda fumarik asit (FA) düzeyleri incelendiğinde, bu bileşiğin birikiminin dayanıklı genotiplerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları), hassas genotiplere (CA 2969 ve hassas RIL hatları) kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11). Bitkiler don koşullarına maruz bırakıldığında, soğuğa dayanıklı bitkiler, FA miktarını don öncesi koşullara göre önemli ölçüde artırmıştır. Bu artış, AWC 602'de %81 ve dayanıklı RIL hatlarında %49 olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık, hassas genotiplerin don stresine verdiği yanıt farklılık göstermiştir: Hassas ebeveynde (CA 2969) %19 oranında bir artış gözlenirken, hassas RIL hatlarında %14 oranında bir azalış kaydedilmiştir. Don sonrası iyileşme koşullarında, FA birikimindeki genel eğilim, don koşullarına kıyasla azalış yönünde olmuştur. Dayanıklı hatlarda (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları) bu azalış miktarı, hassas hatlara göre daha belirgin seviyede gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).



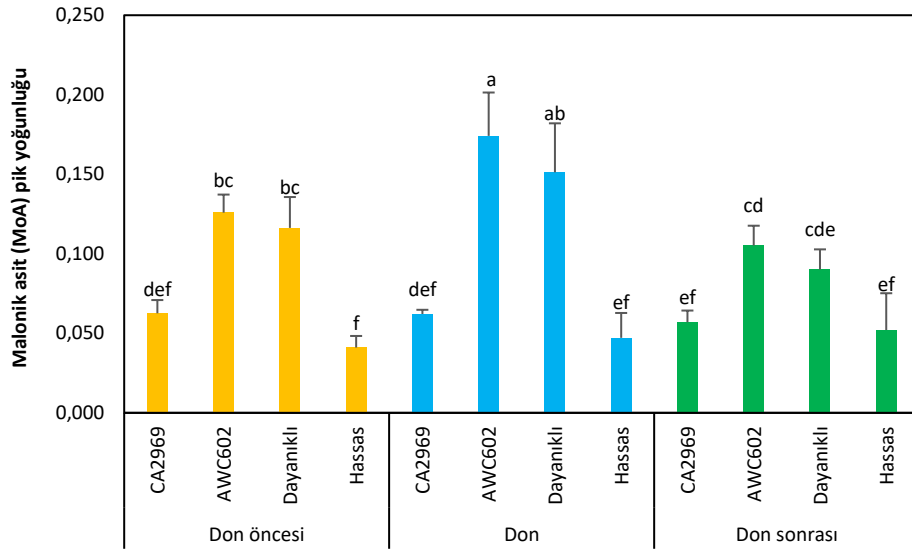
Şekil 4.11. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında fumarik asit (FA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

Don öncesi koşullarda, malik asit (MA) birikiminin dayanıklı genotiplerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları), hassas genotiplere (CA 2969 ve hassas RIL hatları) kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12). Bitkiler don koşullarına maruz bırakıldığında, genel olarak MA düzeylerinde bir artış eğilimi gözlenmiştir. Ancak bu artış miktarı, dayanıklı genotiplerde (AWC 602'de %64 ve dayanıklı RIL'lerde %53) anlamlı ölçüde daha yüksek iken, hassas genotiplerde (CA 2969'da %25 ve hassas RIL'lerde %22) daha düşük seviyelerde kalmıştır. Don sonrası iyileşme evresinde, MA birikiminin don koşullarına kıyasla azalış eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Bu azalış miktarı da, dayanıklı genotiplerde (AWC 602'de %38 ve dayanıklı RIL hatlarında %36) daha belirgin seviyelerde gözlenirken, hassas genotiplerde (CA 2969'da %13 ve hassas RIL'lerde %19) daha az olmuştur. Uygulama koşullarının bütününde (Don Öncesi, Don ve Don Sonrası), MA birikiminin sürekli olarak dayanıklı bitkilerde daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında malik asit (MA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

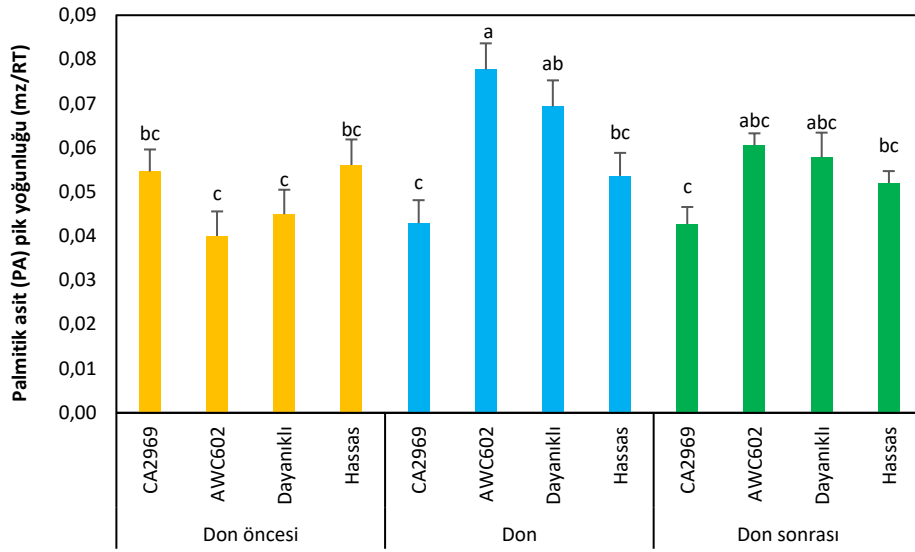
Don öncesi koşullarda, malonik asit (MoA) birikiminin dayanıklı genotiplerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları), hassas genotiplere (CA 2969 ve hassas RIL hatları) kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13). Bitkiler don koşullarına maruz bırakıldığında, soğuğa dayanıklı bitkiler, MoA miktarını don öncesi koşullara göre önemli ölçüde artırmıştır. Bu artış, AWC 602'de %38 ve dayanıklı RIL hatlarında %30 olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık, hassas genotiplerin don stresine verdiği yanıt farklılık göstermiştir: Hassas ebeveynde (CA 2969) önemli bir değişim gözlenmezken, hassas RIL hatlarında %14 oranında bir artış kaydedilmiştir. Don sonrası iyileşme evresinde, MoA miktarını don koşullarına göre önemli ölçüde azaltmıştır (AWC 602'de %39 ve dayanıklı RIL hatlarında %41). MoA birikiminin don koşullarına kıyasla azalış eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, hassas genotiplerin don stresine verdiği yanıt farklılık göstermiştir (CA 2969'da %8 azalış ve hassas RIL'lerde %10 artış) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında malik asit (MA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

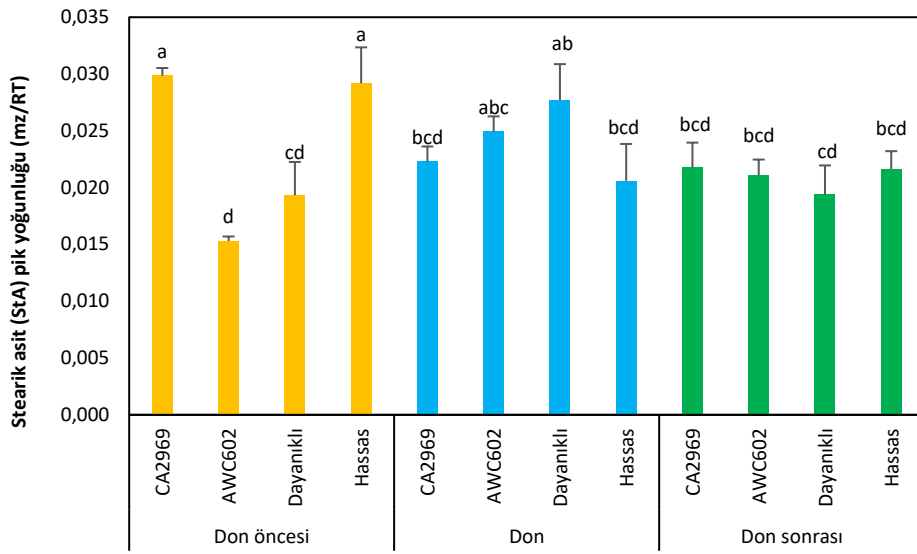
4.4.2. Yağ asitlerindeki değişimler

Don öncesi koşullarda yapılan analizlerde, palmitik asit (PA) seviyelerinin hassas genotiplerde (CA 2969 ve hassas RIL hatları), dayanıklı genotiplere (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları) kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Bitkilerin don sıcaklıklarına maruz kalması üzerine, soğuğa dayanıklı bitkilerde PA seviyeleri don öncesi duruma göre önemli ölçüde artmıştır. Bu artış, AWC 602'de %94 ve dayanıklı RIL'lerde %54 olarak belirlenmiştir. Buna karşın, don koşulları altında hassas bitkilerin PA seviyelerinde genel bir azalış eğilimi gözlenmiştir. Don sonrası iyileşme koşullarında, dayanıklı genotiplerde (AWC 602'de %22 ve dayanıklı RIL'lerde %17) PA seviyelerinde, don koşullarına kıyasla belirgin bir düşüş görülmüştür. Ancak, CA 2969 ve hassas RIL hatlarında, don koşullarına göre PA düzeylerinde kayda değer bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.14).



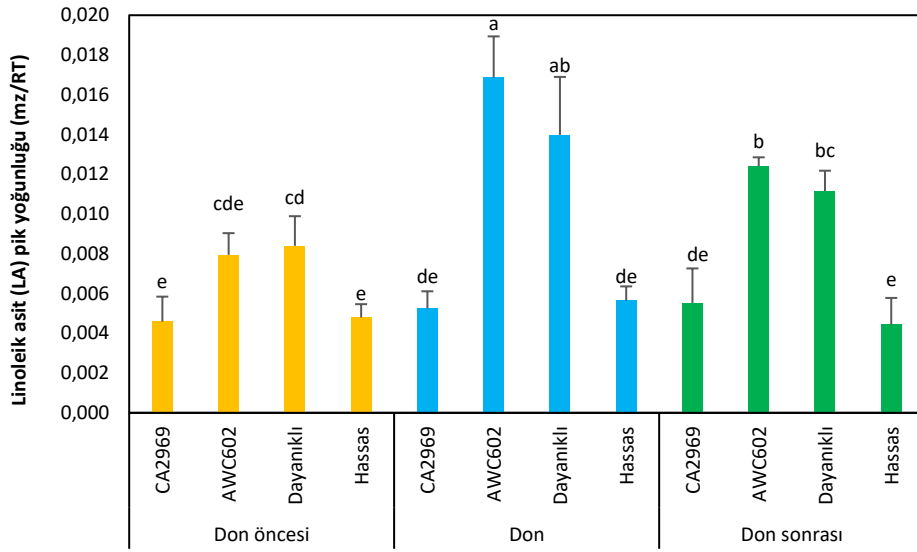
Şekil 4.14. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında palmitik asit (PA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

Don öncesi koşullarda, stearik asit (StA) düzeyleri incelendiğinde, hassas genotipler (CA 2969 ve hassas RIL hatları), dayanıklı genotiplere (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları) kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek birikim sergilemiştir (Şekil 4.15). Bitkiler donma sıcaklıklarına maruz bırakıldığında, dayanıklı ve hassas genotiplerin StA düzeylerinde zıt yönlü değişimler gözlenmiştir. Dayanıklı genotiplerde (AWC 602'de %63, dayanıklı RIL'lerde %43) StA miktarları artarken, hassas genotiplerde (CA 2969'da %25, hassas RIL'lerde %29) azalma tespit edilmiştir. Don sonrası iyileşme koşullarında, dayanıklı genotiplerin StA seviyelerinde, don koşullarına kıyasla belirgin bir düşüş kaydedilmiştir. Buna karşın, CA 2969 ve hassas RIL hatlarında, don koşullarına göre StA miktarında önemli bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.15).



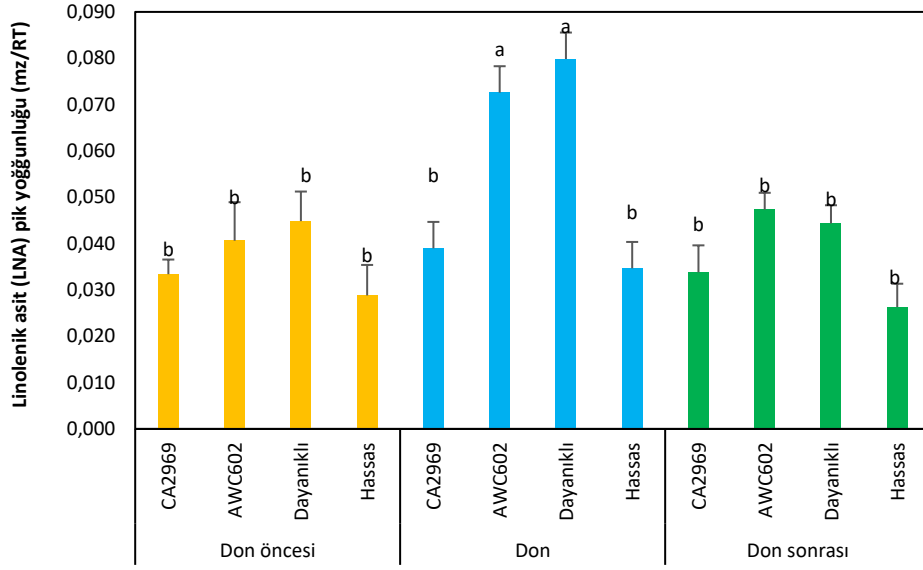
Şekil 4.15. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında stearik asit (StA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

Don öncesi koşullarda, Linoleik asit (LA) miktarı, dayanıklı genotiplerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları), hassas genotiplere (CA 2969 ve hassas RIL hatları) kıyasla daha yüksek düzeyde bulunmuştur (Şekil 4.16). Bitkiler don koşullarına maruz bırakıldığında, genel eğilim LA miktarını artırmak yönünde olmuştur. Ancak, dayanıklı genotiplerdeki artış miktarı hassas genotiplere göre önemli ölçüde yüksektir. Bu artış AWC 602'de %112 ve dayanıklı RIL hatlarında %66 iken, hassas genotiplerde bu oranlar CA 2969'da %14 ve hassas RIL'lerde %18 olarak kaydedilmiştir. Don sonrası iyileşme koşullarında, dayanıklı genotiplerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları), don koşullarına göre LA miktarında sırasıyla %26 ve %20 oranında azalış görülmüştür. Hassas genotiplerde ise CA 2969'da LA içeriğinde bir değişim gözlenmezken, hassas RIL'lerde %21 oranında bir azalış tespit edilmiştir. Uygulama koşullarının genelinde (Don Öncesi, Don ve Don Sonrası), LA birikiminin sürekli olarak dayanıklı bitkilerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında linoleik asit (LA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

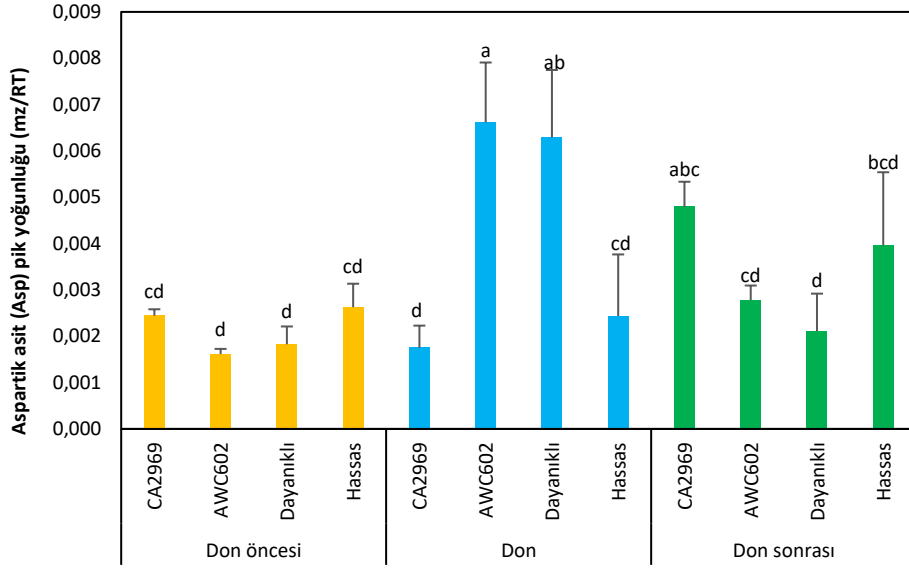
Don öncesi koşullarda, Linolenik asit (LNA) miktarı, dayanıklı genotiplerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları), hassas genotiplere (CA 2969 ve hassas RIL hatları) kıyasla daha yüksek seviyede bulunmuştur (Şekil 4.17). Bitkiler don koşullarına maruz bırakıldığında, genel eğilim LNA miktarını artırmak yönünde olmuştur. Dayanıklı genotiplerdeki artış miktarı hassas genotiplere göre önemli ölçüde yüksek seviyelerdedir. Bu artış AWC 602'de %79 ve dayanıklı RIL hatlarında %75 olarak kaydedilirken, hassas genotiplerde bu oranlar CA 2969'da %17 ve hassas RIL'lerde %20 olarak tespit edilmiştir. Don sonrası iyileşme koşullarında, LNA miktarı genel olarak azalış eğilimindedir. Ancak, dayanıklı genotiplerdeki azalış oranı hassas genotiplere göre daha yüksektir. AWC 602 ve dayanıklı RIL hatlarında, don koşullarına göre LNA miktarında sırasıyla %34 ve %44 oranında daha belirgin bir azalış göstermiştir. Hassas genotiplerde ise CA 2969'da %13 ve hassas RIL'lerde %24 oranında bir azalış tespit edilmiştir. Uygulama koşullarının bütününde (Don Öncesi, Don ve Don Sonrası), LNA birikiminin sürekli olarak dayanıklı bitkilerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında linolenik asit (LNA) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

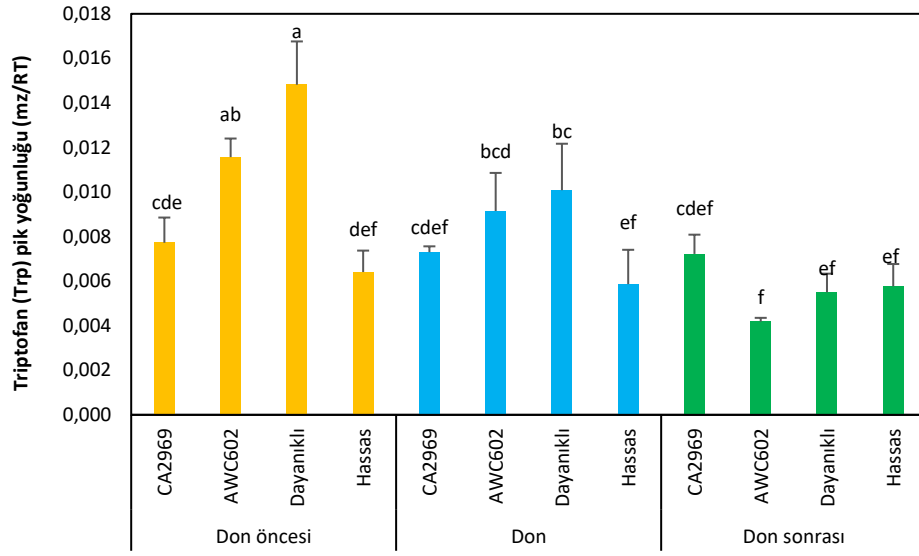
4.4.3. Aminoasitlerdeki değişimler

Don öncesi koşullarda, aspartik asit (Asp) miktarı, dayanıklı genotiplerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları), hassas genotiplere (CA 2969 ve hassas RIL hatları) kıyasla daha yüksek seviyede tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Bitkiler don koşullarına maruz bırakıldığında, dayanıklı ve hassas genotipler Asp değişimleri bakımından zıt davranışlar sergilemiştir. Dayanıklı genotiplerde önemli bir artış (AWC 602'de 3,1 kat ve dayanıklı RIL'lerde 2,4 kat) tespit edilirken, hassas genotiplerde azalış görülmüştür (CA 2969'da %28 ve hassas RIL'lerde %7 azalış). Don sonrası iyileşme koşullarında, dayanıklı ve hassas genotipler Asp değişimi bakımından birbirlerine tamamen zıt yanıtlar oluşturmuştur. Dayanıklı genotiplerde Asp seviyeleri keskin bir azalış eğiliminde iken (AWC 602'de %57 ve dayanıklı RIL'lerde %66 azalış), hassas genotiplerde önemli bir artış eğilimi gözlenmiştir (CA 2969'da %117 ve hassas RIL'lerde %63 artış) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında aspartik asit (Asp) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

Don öncesi koşullarda, Triptofan (Trp) miktarı, dayanıklı genotiplerde (AWC 602 ve dayanıklı RIL hatları), hassas genotiplere (CA 2969 ve hassas RIL hatları) kıyasla daha yüksek seviyede tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Bitkiler don koşullarına maruz bırakıldığında, genel eğilim Trp miktarını azaltmak yönünde olmuştur. Dayanıklı genotiplerde önemli bir azalış (AWC 602'de %21 ve dayanıklı RIL'lerde %32 azalış) tespit edilirken, hassas genotiplerde bu azalış daha düşük miktarda görülmüştür (CA 2969'da %5 ve hassas RIL'lerde %9 azalış). Don sonrası iyileşme koşullarında, dayanıklı genotiplerde Trp içeriğindeki azalış eğilimi, don koşullarına göre daha da keskinleşerek devam etmiştir (AWC 602'de %54 ve dayanıklı RIL'lerde %45 azalış). Buna karşılık, hassas genotiplerde don koşullarına kıyasla Trp miktarında önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Soğuğa dayanıklı (AWC 602 ve dayanıklı RIL'ler) ve hassas (CA 2969 ve hassas RIL'ler) nohut genotiplerinde don öncesi, don ve don sonrası koşullarında triptofan (Trp) seviyeleri. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SE) göstermektedir. Farklı harfler genotipler arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0,05$; Tukey HSD).

5. TARTIŞMA

5.1. *C. reticulatum*'dan Kültür Nohuduna Soğuğa Dayanıklılık Aktarımı

Nohutun yabani akrabaları, uzun yıllardır soğuğa dayanıklılık açısından önemli genetik kaynaklar olarak önerilmektedir (van der Maesen ve Pundir 1984; Singh vd. 1998; Toker 2005; Mir vd. 2021). Yabani ve kültür nohut türlerini karşılaştıran bir çalışmada, yabani türlerin, en iyi soğuğa dayanıklı kültür çeşitlerinden dahi anlamlı derecede daha yüksek soğuk toleransına sahip olduğu bildirilmiştir (Toker 2005). Mevcut çalışmamızda, kontrollü koşullar altında yürütülen soğuğa dayanıklılık taramaları sonucunda, *C. arietinum* × *C. reticulatum* türler arası melezinden geliştirilmiş RIL popülasyonunda umut vadeden soğuğa dayanıklı nohut hatları belirlenmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Elde edilen bulgular, RIL'ler arasında soğuğa dayanıklılık bakımından belirgin bir varyasyonun bulunduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.1). Genetik çalışmalar, transgresif açılmaların genellikle her iki ebeveyninden gelen ve aynı yönde etki gösteren alellerin bir araya gelmesi sonucu ortaya çıktığını ve bu durumun tamamlayıcı gen etkisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (de Vicente ve Tanksley 1993; Rieseberg vd. 1999). Bu nedenle, her iki ebeveyninden de “istenen” veya “istenmeyen” alelleri birlikte taşıyan melez bireylerin, ebeveynlerin performansını aşan ya da beklenenden daha uç fenotipler sergilemesi olasıdır. Mevcut RIL popülasyonunda da transgresif açılmaların bir sonucu olarak, soğuğa dayanıklı yabani ebeveyn olan AWC 602'den daha üstün performans gösteren hatların bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). 1–9 dayanıklılık görsel ölçeğine göre 1 ile 4 arasında puan alan çok sayıda RIL hattının tespit edilmesi, *C. reticulatum*'dan döllere soğuğa dayanıklılık ile ilişkili alellerin başarıyla aktarılabildiğini göstermektedir (Şekil 4.1). Nitekim Mugabe vd. (2019), *C. arietinum* (ICC4958) × *C. reticulatum* (PI 489777) melezinden geliştirdikleri RIL popülasyonunda benzer şekilde *C. reticulatum* kökenli soğuğa dayanıklılık alellerinin kültür nohuduna aktarıldığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, LG1, LG4 ve LG8 üzerinde konumlanan üç farklı soğuğa dayanıklılık QTL'inin belirlenmesi, yabani türlerin nohut ıslahında önemli genetik kaynaklar sunduğunu desteklemektedir.

5.2. Organik Asitlerin Soğuk Toleransındaki Rolü

5.2.1. Sitrik asit (CA)

Bu çalışmada sitrik asit (CA) birikiminin üç farklı sıcaklık aşamasında (don öncesi, don ve don sonrası) dayanıklı ve hassas nohut genotipleri arasında farklılık göstermesi (Şekil 4.9), TCA döngüsü metabolizmasının soğuk stresine verilen yanıtta kritik rolünü ortaya koymuştur. Don öncesi koşullarda dayanıklı genotiplerde düşük CA düzeyleri bulunması, stres başladığında metabolik plastisite ile hızlı bir yeniden düzenleme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir (Sun vd. 2016; Zhang vd. 2016). Don sırasında dayanıklı hatlarda belirgin CA artışı (Şekil 4.9), soğuğa adaptasyon sırasında TCA döngüsü akışının yeniden yönlendirildiğini ve karbon akımının stratejik olarak CA üzerine kaydırıldığını göstermektedir (Kaplan vd. 2004). Buna karşın hassas hatlarda CA miktarında anlamlı bir değişimin olmaması, bu genotiplerin TCA döngüsünü yeniden yapılandırma kapasitesinin sınırlı olduğunu düşündürmektedir.

Dayanıklı genotiplerde don sırasında CA birikiminin artması birkaç temel biyokimyasal mekanizma üzerinden açıklanabilir. İlk olarak, sitrat sentaz (CS)

aktivitesinin düşük sıcaklıklarda artış gösterebildiği bildirilmiştir (Wang vd. 2022; Peng vd. 2022); bu durum CA sentezini artırarak birikmesine neden olabilir. Don koşullarında dayanıklı bitkilerde CA birikiminin hassaslardan daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Song vd. 2017; Peng vd. 2022; Wang vd. 2022). Wang vd. (2022) kışlık buğdayda yaptıkları çalışmada don koşullarına (-4°C) maruz bırakılan buğdaylarda sitrat sentaz enziminin ekspresyonun iki katına çıktığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde Peng vd. (2022) kışlık buğdayda -10°C sıcaklıkta sitrat sentaz enzim ekspresyonun ciddi miktarda arttığını rapor etmişlerdir. Xu vd. (2020), sitrat ve malatın artan konsantrasyonlarının, spesifik enzim kodlayan genlerin yukarı düzenlenmiş ifadesiyle birlikte, stres koşulları altında ATP sentezi için gerekli olan sitrik asit döngüsünün yükselmiş aktivitesini gösterdiğini öne sürmektedir. İkinci olarak sitratın mitokondriden sitozole taşınmasını sağlayan hayvanlara özgü sitrat taşıyıcısı (CiC) ve bitkilere özgü dikarboksilat-trikarboksilat taşıyıcısı (DTC) (Dolce vd. 2014) soğuk stresinde farklı regülasyon gösterebilir, bu durum dayanıklı genotiplerde CA taşınımını ve yeniden dağılımını kolaylaştırarak metabolik adaptasyona katkı sağlayabilir. Hoermiller vd. (2016) *Arabidopsis thaliana*'da yaptıkları çalışmada soğuğa dayanıklı yabancı tipte sitozolde sitrat artışı olurken hassas mutantlarda sitratın hem sitozolde hem de plastidlerde azaldığını rapor etmişlerdir. DTC tarafından mitokondriden sitozole oksaloasetat karşılığında ihraç edilen sitrat da sitrat liyaz tarafından asetil-CoA ve oksaloasetata dönüştürülebilir ve yağ asidi uzaması ve izoprenoid sentezi için kullanılabilir (Dolce vd. 2014). CA'nın lipid metabolizmasında bu kritik bir rolü sayesinde asetil-CoA'nın önemli bir öncüsü olarak membran lipidlerinin yeniden düzenlenmesi için karbon kaynağı sağlar. Soğuk toleransının membran akışkanlığı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Uemura vd. 1995). Bu nedenle dayanıklı genotiplerde artan CA, membran onarımı ve yağ asidi biyosentezi için materyal sağlayarak hücre zarı bütünlüğünü korumaya yardımcı olabilir. Hassas genotiplerde don sırasında CA seviyelerinin değişmemesi ise metabolik yönlendirme kapasitesinin sınırlı olmasına ve lipid yeniden düzenlemesinin yetersiz kalmasına bağlı olabilir. CA'nın artması sadece TCA akışının bir sonucu değildir; aynı zamanda hücresel düzeyde koruyucu işlevler de sağlar. Organik asitlerin pH tamponlama kapasitesiyle soğuk koşullarında hücre içi pH'nın korunmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir (Igamberdiev ve Gardeström 2003; Igamberdiev ve Eprintsev 2016; Panchal vd. 2021). Soğuk stresinde ROS üretimi ve mitokondriyal disfonksiyonun stres şiddetini artırdığı göz önünde bulundurulduğunda (Shi vd. 2018), CA birikiminin dayanıklı genotiplerde oksidatif hasarı azaltabilecek bir mekanizma oluşturduğu anlaşılabilir.

Don sonrası iyileşme döneminde hem dayanıklı hem hassas genotiplerde CA düzeylerinde azalma görülmesi, CA birikiminin stresle ilişkili geçici bir yanıt olduğunu göstermektedir. Ancak dayanıklı genotiplerin don sonrası fenotipik olarak iyileşme göstermesi ve hassas genotiplerin büyük ölçüde zarar görmesi, CA birikiminin zamanlamasının ve boyutunun soğuk dayanıklılığı açısından kritik olduğunu göstermektedir (Şekil 4.6-4.9). Bu bulgu, soğuk stresine verilen yanıtın yalnızca metabolit miktarıyla değil, metabolik akışın ne zaman, hangi hızda ve hangi yollar üzerinden yönlendirildiğiyle ilişkili olduğunu teyit etmektedir (Guy vd. 2008; Theocharis vd. 2012).

Sonuç olarak bulgularımız, CA'nın soğuğa yanıt ve don toleransında merkezi bir rolü olduğunu göstermektedir. CA birikimi, dayanıklı genotiplerde TCA döngüsünün yeniden yapılandırılması, redoks homeostazının korunması, membran stabilitesinin

desteklenmesi ve metabolik plastisitenin artırılması gibi çok yönlü mekanizmalarla ilişkili olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bu nedenle CA yalnızca bir metabolit değil, aynı zamanda stres adaptasyonunun biyokimyasal bir belirteci olarak değerlendirilebilir. Gelecekte yapılacak enzim aktivite ölçümleri, izotopik akış çalışmaları ve alt-hücre düzeyindeki metabolit analizleri CA'nın soğuk toleransındaki rolünü daha ayrıntılı biçimde açıklığa kavuşturacaktır.

5.2.2. Süksinik asit (SA)

Bu çalışmada süksinik asit (SA) düzeylerinin don öncesi, don sırası ve don sonrası dönemlerde farklı soğuğa dayanıklılık düzeylerine sahip nohut genotiplerinde değişimi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, SA'nın don stresine verilen metabolik yanıtın hem duyarlılık hem de dayanıklılık açısından kritik bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir (Şekil 4.10). Don öncesi koşullarda hassas genotiplerde gözlenen yüksek SA birikimi (Şekil 4.6), stres duyarlılığı ile ilişkilendirilen erken mitokondriyal disfonksiyonu akla getirmektedir. Hassas bitkilerde süksinat dehidrogenaz (SDH) aktivitesinin düşük olması ve TCA döngüsünün daha zayıf çalışması, süksinatın döngüde birikmesine neden olabilmektedir (Karami-Moalem vd. 2017). Karami-Moalem vd. (2017) nohut bitkisinde yaptıkları çalışmada, soğuğa dayanıklı bitkilerde CaSDH'nin göreceli ifadesinin soğuk stresin (4°C) birinci ve üçüncü günlerinde değişmeden kaldığını, altıncı günde ise seviyesinin kontrol koşullarına kıyasla 2,7 kat arttığını bulmuşlardır. Buna karşılık, soğuk uygulamaları altında hassas bitkilerde bu genin transkript seviyesinde önemli bir azalma gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada soğuk stresinde SDH kompleksinin rolü iki olası senaryoyle açıklanmaktadır: (1) SDH aktivitesi, enerji tüketen metabolik süreçlere yanıt olarak ATP üretimini artırabilir; (2) SDH ve alternatif oksidaz (AOX) gen ekspresyonundaki artış, AOX yolunun daha aktif hale gelmesine katkıda bulunabilir. Bu iki yolun nohutta soğuk stres altında eş zamanlı çalışıp çalışmadığı henüz net olmadığı için sitokrom yolunun son solunum kompleksi olan CaCOX geninin ekspresyonu incelenmiştir. Sonuçlar, soğuk stres sırasında dayanıklı genotiplerde CaCOX'un 70 kat artarken hassas genotiplerde azaldığını göstermiştir. Dayanıklı genotiplerdeki bu artış, daha yüksek solunum kapasitesi, artan antioksidan savunma ve daha düşük hasar düzeyleriyle uyumlu bulunmuştur. Üçüncü ve altıncı günlerde yüksek CaSDH, CaAOX ve CaCOX ekspresyonu ile düşük H₂O₂ seviyeleri bu senaryoları desteklemektedir. Ayrıca SDH kaynaklı ROS sinyalleri, SOD, askorbat ve prolin gibi koruyucu yanıtları indükleyerek stres toleransına katkı sağlayabilir. Genel olarak, dayanıklı bitkilerde sitokrom ve AOX yollarının birlikte çalışarak yeni bir enerji ve redoks dengesi oluşturduğu öne sürülmektedir (Karami-Moalem vd. 2017).

Farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalar, don koşullarında soğuğa dayanıklı çeşitlerin hassas çeşitlere kıyasla daha yüksek süksinik asit (SA) birikimi gösterdiğini bildirmektedir (Song vd. 2017; Wang vd. 2023). Ayrıca, Hoermiller vd. (2016) *Arabidopsis thaliana*'nın soğuğa hassas mutantlarında SA seviyelerinin kontrol koşullarına göre soğuk koşullarda neredeyse yarı yarıya azaldığını bildirmişlerdir. Bu bulgular, SA artışının don stresine karşı gelişen metabolik savunma mekanizmalarının önemli bir parçası olduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim çalışmamızda da don koşullarında dayanıklı genotiplerde belirgin bir SA artışı gözlenirken hassaslarda azalış gözlenmiştir (Şekil 4.10), bu durum önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Wang vd. (2023), şekerpancarında (-2 ve -5°C) yürüttükleri çalışmada SA üretiminde görev alan enzimlerin ekspresyonunun dayanıklı ve hassas çeşitlerde farklı biçimde düzenlendiğini

göstermiştir. Adenilsüksinat sentetaz 2 ve argininosüksinat sentaz genlerinin dayanıklı TBP çeşidinde belirgin şekilde artması, bu çeşidin don stresinde SA üretimini destekleyen güçlü bir metabolik kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, TCA döngüsünde görev alan mitokondriyal süksinat-CoA ligaz (SCoAL) enziminin yalnızca dayanıklı çeşitte artış göstermesi, TBP'nin soğuk stresinde daha kararlı ve işlevsel bir TCA döngüsünü sürdürebildiğini işaret etmektedir.

Çalışmamızdaki bulgular, dayanıklı genotiplerde gözlenen SA artışının GABA şantı aktivasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. GABA şantı, glutamat → GABA → süksinik aldehit → süksinik asit akışıyla çalışan ve özellikle stres koşullarında karbon dengesinin korunmasını sağlayan önemli bir metabolik yoldur (Charron vd. 2008; Shelp vd. 1999; Bown ve Shelp 1997). GAD ve GABA transaminaz tarafından yönetilen bu yolun aktivasyonu, süksinik aside giden alternatif bir karbon kaynağı oluşturur (Tsushida ve Murai 1987; Shelp vd. 1999; Michaeli ve Fromm 2015). Bu süksinik asit ile TCA döngüsü beslenir (Li vd. 2021). Süksinatın TCA döngüsüne girmesiyle üretilen büyük miktardaki enerji, bitkinin abiyotik streslere karşı direncini artırır (Hijaz ve Killiny 2019).

Don sonrası iyileşme sürecinde SA düzeylerinin her iki genotip grubunda azalmasına karşın, bu azalmanın dayanıklı genotiplerde daha belirgin olması dikkat çekicidir (Şekil 4.10). Bu bulgu, dayanıklı bitkilerin don stresinden sonra metabolik toparlanma mekanizmalarını daha hızlı devreye soktuğunu göstermektedir. SA'nın bu dönemde tüketilmesi, TCA döngüsünün yeniden hızlanması ve solunum etkinliğinin artması ile ilişkili olabilir. Hassas genotiplerde SA düzeyinin daha sınırlı azalması ise don sonrası metabolik aktivitenin hâlâ baskılandığını ve iyileşmenin gerçekleşmediğini göstermektedir. Nitekim çalışmadaki hassas bitkilerin don sonrası dönemde fenotipik olarak toparlanamaması da bu metabolik sonuçlarla uyumludur.

Genel olarak değerlendirildiğinde, çalışma sonuçları SA'nın don stresine verilen yanıtın hem metabolik baskılanma hem de metabolik toparlanma süreçlerini güçlü bir şekilde yansıttığını göstermektedir. Hassas bitkilerde don öncesi yüksek SA birikimi ve don sırasında düşüş, metabolik dengesizliğin göstergesi iken; dayanıklı bitkilerde don sırasında belirgin artış ve don sonrasında hızlı azalma, hem stres toleransının hem de toparlanma kapasitesinin temel belirleyicilerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Bu bulgular, SA'nın nohut genotiplerinde soğuğa dayanıklılığın anlaşılması ve potansiyel metabolik göstergelerin belirlenmesi açısından önemli bir bileşen olduğunu ortaya koymaktadır.

5.2.3. Fumarik asit (FA)

Bu çalışmada elde edilen bulgular, fumarik asit (FA) birikiminin soğuğa dayanıklı ve hassas genotiplerde belirgin biçimde farklılaştığını göstermiştir (Şekil 4.11). Don öncesi koşullarda dayanıklı genotiplerin hassas genotiplere kıyasla daha yüksek FA düzeyleri sergilemesi, dayanıklılıkla ilişkili temel bir metabolik stratejiye işaret etmektedir (Şekil 4.6, 4.11). Literatürde dayanıklı bitkilerin düşük sıcaklıklara hazırlık sürecinde karbon depolama amaçlı organik asitleri, özellikle fumaratı artırdığı bildirilmiştir (Dyson vd. 2016; Araújo vd. 2011). Fumaratın bu dönemde artması, hem karbon/azot dengesinin sağlanması hem de hücre içi ozmolaritenin korunması açısından avantaj sağlamaktadır (Chia vd. 2000; Pracharoenwattana vd. 2010; Araújo vd. 2011).

Don uygulaması sırasında dayanıklı genotiplerde gözlenen FA'daki belirgin artış (Şekil 4.11), bu bitkilerin stres altında TCA döngüsünü yeniden yapılandırarak FA birikimini artırdığını göstermektedir. Soğuk koşullarında TCA akışının FA yönünde kayması, mitokondriyal enerji üretiminin optimizasyonu ve NAD⁺/NADH dengesinin düzenlenmesi açısından kritik bir adaptasyondur (Nunes-Nesi vd. 2013; Igamberdiev ve Eprintsev, 2016). Ayrıca FA'nın, malat–fumarat mekiği üzerinden redoks tamponu görevi gördüğü, böylece soğuk stresine bağlı reaktif oksijen türlerinin etkisini hafiflettiği bildirilmiştir (Sweetlove vd. 2010). Bu bilgiler, dayanıklı genotiplerde don sırasında gözlenen FA artışının, oksidatif stresin kontrol altına alınması ve metabolik akışın yeniden düzenlenmesiyle ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, FA'nın, nişastaya benzer şekilde fotosentez için alternatif bir karbon tutucu olduğunu açıkça göstermektedir (Pracharoenwattana vd. 2010; Tschoep vd. 2009; Zell vd. 2010). Ayrıca, nitrat asimilasyonu sırasında bir pH düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Pracharoenwattana vd. 2010). Bununla birlikte, FA gibi organik asitlerin karbon açlığı koşullarında önemli solunum substratları olduğu rapor edilmiştir (Gibon vd. 2009). Ayrıca, organik asitlerde daha az C depolandığında nişasta sentezi uyarılır (Fahnenstich vd. 2008) ve nişasta ve FA'nın tahsisi farklı şekilde düzenlenebilse de, her ikisinin de kullanımı sıkı bir şekilde koordine edilmiştir (Gibon vd. 2009). Bu çalışmaların sonuçları, FA'nın nişastaya benzer şekilde fotosentez için alternatif ve potansiyel olarak esnek bir karbon deposu olduğunu ve FA'nın *Arabidopsis*'in birincil metabolizmasında oldukça önemli bir metabolit olduğunu göstermektedir (Araújo vd. 2011). TCA döngüsü ara ürünlerinin, örneğin FA'nın mitokondriyal zar boyunca değişiminin, TCA döngüsünü glukoneogenez, glioksilat döngüsü ve aminoasitler ile nükleik asitlerin biyosentezi de dahil olmak üzere çeşitli metabolik süreçlerle ilişkilendirdiği iyi bilinmektedir (Haferkamp 2007; Linka ve Weber 2010; Picault vd. 2004).

Ilıman iklimlerdeki bitkilerde soğuk iklime uyum önemli bir süreç olsa da, düşük sıcaklığı algılayan mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır (Ruelland vd. 2009; Knight ve Knight 2012; Dyson vd. 2016). Dyson vd. (2016), sitozolik fumaraz *FUM2* aracılığıyla gerçekleşen organik asit FA'nın birikiminin, soğuğa dayanıklı *Arabidopsis*'te metabolizmanın soğuğa uyum sağlaması için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Mutant *Fum2* bitkileri, fotosentezi düşük sıcaklığa adapte etme yeteneklerini tamamen kaybetmiştir. FA birikiminin, *Arabidopsis*'te düşük sıcaklık algılamasında önemli bir rol oynadığı, metabolik veya redoks sinyallerini dolaylı olarak düzenlediği veya doğrudan soğuk algılamada rol oynadığı rapor edilmiştir (Dyson vd. 2016). Ayrıca, fumarat ve malat konsantrasyonlarının veya ikisi arasındaki dengenin de soğuğu algılamada aday sinyaller olabileceği bildirilmiştir (Scott vd. 2014).

Hassas genotiplerde ise don sırasında FA yanıtı tutarsızdır: Hassas ebeveynde (CA 2969) %19'luk bir artış gözlenirken hassas RIL hatlarında %14'lük bir azalış kaydedilmiştir (Şekil 4.11). Bu durum, hassas bitkilerde don stresine karşı metabolik uyum kapasitesinin düşük olduğunu, TCA döngüsünde gerekli yeniden programlamanın etkin biçimde gerçekleşmediğini düşündürmektedir. Literatürde hassas genotiplerin soğuk koşullarında TCA akışının baskılandığı, organik asit depolamasının yetersiz olduğu ve redoks dengesinin daha kolay bozulduğu belirtilmektedir (Kaplan vd. 2004; Fernie vd. 2004; Song vd. 2017). Bu nedenle hassas RIL hatlarında FA'nın azalması, metabolik çöküşün erken bir göstergesi olabilir. Don sonrası iyileşme döneminde hem

dayanıklı hem hassas genotiplerde FA düzeylerinin düşüş göstermesi, soğuk şokunun ardından metabolik akışın yeniden normalleşmeye başladığını düşündürmektedir. Ancak bu azalışın dayanıklı hatlarda daha belirgin olması, dayanıklı genotiplerin don sırasında biriktirdiği fumaratı iyileşme sürecinde hızla tüketerek enerji üretimi, onarım süreçleri ve karbon–nitrojen yeniden düzenlemesi için kullandığını işaret etmektedir (Lee vd. 2020). Hassas genotiplerde daha sınırlı bir düşüş gözlenmesi ise, bu bitkilerin don sonrası metabolik toparlanma kapasitesinin düşük olması ve TCA döngüsünün normale dönememesiyle ilişkilendirilebilir. Genel olarak sonuçlar, FA birikiminin soğuğa dayanıklılığın hem bir göstergesi hem de düzenleyicisi olduğunu ortaya koymaktadır. Dayanıklı hatlarda yüksek FA birikimi, don stresine metabolik adaptasyonun önemli bir bileşeni olup; karbon depolama, redoks tamponlama ve enerji metabolizmasının yeniden programlanması gibi süreçleri desteklemektedir.

5.2.4. Malik asit (MA)

Bu çalışmada elde edilen bulgular, malik asit (MA) birikiminin soğuk ve don stresine karşı geliştirilen metabolik adaptasyon mekanizmalarında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Şekil 4.12). Don öncesi koşullarda dayanıklı genotiplerde MA seviyelerinin hassas genotiplere kıyasla daha yüksek bulunması (Şekil 4.6, 4.12), bu genotiplerde TCA döngüsü akışının stres öncesinde dahi daha aktif olduğuna işaret etmektedir. Benzer şekilde, soğuğa toleranslı bitkilerin düşük sıcaklıklara karşı önceden hazırlanmış bir metabolik altyapıya sahip olduğu, özellikle organik asit birikiminin toleransla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kaplan vd. 2004; Zhang vd. 2017).

Don koşullarında MA seviyelerinde gözlenen artış, soğuk stresinin TCA döngüsündeki yeniden akış düzenlemelerini tetiklediğine dair bulgularla uyumludur (Fernie vd. 2004; Sweetlove vd. 2010). Bu artışın dayanıklı genotiplerde çok daha belirgin olması, bu genotiplerin mitokondriyal enerji metabolizmasını stres altında daha etkili şekilde sürdürebildiğini göstermektedir. Nitekim dayanıklı bitkilerde soğuk stresine yanıt olarak karbon metabolizmasının hızlı bir şekilde yeniden programlandığı, böylece MA gibi ara metabolitlerin sentezinin arttığı çeşitli çalışmalar tarafından ortaya konmuştur (Guy vd. 2008). Buna karşın hassas genotiplerdeki sınırlı MA artışı, düşük sıcaklığın mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki baskılayıcı etkisiyle ilişkili olabilir. Hassas genotiplerde TCA döngüsünün daha zayıf işlemesi, hem enerji üretimini hem de organik asit birikimini kısıtlayabilmektedir (Theocharis vd. 2012; Yamori vd. 2014).

Kışlık çavdarın soğuk aklımasyon koşullarında MA birikiminin belirgin şekilde arttığı daha önce Crecelius vd. (2003) tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada NADP-malat dehidrogenaz, NAD-malat dehidrogenaz, fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPC) ve NADP-malik enzim gibi MA metabolizması enzimlerinin aktiviteleri soğuğa maruz kalan bitkilerde anlamlı şekilde yükselmiş, buna karşın aklımasyon sonrası yeniden 22°C koşullarına alınan bitkilerde hem MA düzeyi hem de enzim aktiviteleri 1–2 gün içerisinde hızla düşmüştür. Bu bulgu, MA'nın soğuğa alıştıran çavdarda ek bir karbon havuzu ve CO₂ deposu olarak görev yaptığını ve bu fonksiyonun sadece 4°C'de uzun süreli alıştırma sonrası ortaya çıktığını göstermektedir. Benzer şekilde, alpin bitkisi *Ranunculus glacialis*'te de MA'nın yapraklarda en bol çözünür karbon bileşiği olduğu ve deaklımasyon sırasında hızla azaldığı gösterilmiştir (Streb vd. 2003). Bu sonuçlar, MA birikiminin soğuğa uyum sürecinin konservatif bir metabolik göstergesi olduğunu desteklemektedir.

MA aynı zamanda stomaların düzenlenmesinde de kritik bir rol üstlenmektedir. Özellikle bekçi hücrelerinde PEPCaz aktivitesiyle sentezlenerek vakuolar bir ozmolit gibi davranmakta ve hücre içi ozmotik basıncın korunmasına katkı sağlamaktadır (Asai vd. 2000). Soğuğa dayanıklı bitkilerin düşük sıcaklıklarda stomalarını kapattıkları bilinmektedir (Wilkinson vd. 2001). Stoma kapanması sırasında MA'nın bekçi hücrelerinde azalmasına karşın, diğer mezofil hücrelerinde MA'nın stabilitesinin korunması, sitozolik çözünen madde artışını kompanse edecek şekilde vakuolde MA birikiminin gerekliliğine işaret etmektedir (Crecelius vd. 2003). Nitekim sakkaroz ve rafinoz soğuk aklımasyonunda çavdar yapraklarında vakuolde değil sitozolde biriktiği bildirilmiştir (Koster ve Lynch 1992); bu nedenle ozmotik dengeyi sağlamak için MA'nın vakuoler bir tampon görevi üstlendiği düşünülmektedir (Crecelius vd. 2003). MA birikiminin sadece ozmotik denge açısından değil, enerji metabolizması bakımından da kritik olduğu görülmektedir. Xu vd. (2020), sitrat ve malatın artan konsantrasyonlarının TCA döngüsünde görev alan enzimleri kodlayan genlerin yukarı yönlü regülasyonu ile paralellik gösterdiğini ve bunun düşük sıcaklıkta ATP sentezinin desteklenmesi için TCA döngüsü akışının arttığını gösterdiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Vaitkevičiūtė vd. (2022), soğuk aklımasyon aşamasında tolerans gösteren genotiplerde yapraklarda glikoz ve MA'nın arttığını ve bu metabolit birikiminin donma hasarından güvenli istikrarlı bir ortam sağlamanın yanı sıra sürekli hücre bölünmesi ve nihai yeniden büyüme için gerekli olan enerjiyi sağlayarak SAM hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunabileceğini ifade etmiştir.

Sitoplazmik malat dehidrogenazın (cyMDH) rolüne ilişkin moleküler düzeydeki çalışmalar, MA'nın stres koşullarındaki düzenlenmesini daha da netleştirmektedir. cyMDH'nin özellikle indirgeyici yönde MA sentezini katalize ettiği (Noguchi ve Yoshida, 2008; Patore vd. 2007; Sweetman vd. 2009) ve düşük sıcaklık gibi abiyotik stres koşullarında MA birikimini artırarak toleransa katkıda bulunduğu tütün, elma ve *Stylosanthes guianensis* gibi türlerde gösterilmiştir (Chen vd. 2015; Wang vd. 2010; Yao vd. 2011). cyMDH aşırı ifade edildiğinde ATP üretiminin arttığı, fosforile olmayan solunum yolunun aktifleştiği ve TCA döngüsüne daha fazla MA beslenmesiyle solunum akışının sürdürüldüğü rapor edilmiştir (Yao vd. 2011; Wang vd. 2016). Bu durum hem karbon hem de enerji metabolizmasının soğuk stresine uyum sürecinde MA merkezli bir şekilde yeniden programlandığını göstermektedir. Ayrıca NADH/NAD⁺ oranının artmasıyla hücresel redoks durumunun düzenlenmesi ve ROS detoksifikasyon sistemlerinin beslenmesi için gerekli elektron akışının sağlanması MA metabolizmasının soğuk toleransındaki tamamlayıcı rolünü pekiştirmektedir (Wang vd. 2016).

Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, çalışmamızda soğuk koşullarında gözlenen MA artışı; (i) ozmotik dengenin korunması, (ii) karbon ve indirgeyici eşdeğer depolanması, (iii) TCA döngüsü akışının ve ATP üretiminin desteklenmesi, (iv) ROS detoksifikasyon mekanizmalarının enerji gereksiniminin karşılanması gibi çok yönlü süreçlerin bütünleşik bir sonucu olarak yorumlanabilir. Dolayısıyla MA, soğuk toleransının hem metabolik hem de fizyolojik düzeyde stratejik bir belirteci olarak ortaya çıkmaktadır.

5.2.5. Malonik asit (MoA)

Malonik asit (MoA), bitkilerde hem primer hem de sekonder metabolik süreçlerle yakından ilişkili, uzun yıllar boyunca biyokimyasal olarak varlığı bilinen ancak metabolik

rolü büyük ölçüde göz ardı edilen bir dikarboksilik asittir (Chen vd. 2011). Mitokondriyal yağ asidi sentezinin (mtFASII) başlangıç substratlarından biri olan MoA, Asil Aktifleştirici Enzim13 (AAE13) geni tarafından malonil-CoA'ya dönüştürülerek metabolik akışa katılır (Chen vd. 2011; Bowman vd. 2017). Malonil-CoA, hem yağ asidi sentezi ve uzaması hem de fitoaleksiner, flavonoidler, izoflavonoidler, poliketidler, antosiyanin pigmentleri ve birçok malonilatl bileşikler gibi çok sayıda sekonder metabolitin üretimi için zorunlu bir öncü moleküldür (Baud vd. 2003; Peer vd. 2001; Chen vd. 2011; Tang ve Tang 2021).

Bitki hücrelerinde MoA birçok kaynaktan üretilir: oksaloasetatın oksidatif dekarboksilasyonu (de Vellis vd. 1963), malonil-CoA hidrolizi (Stumpf ve Burris 1981), pirimidin yıkımı (Hayaishi ve Kornberg 1952) ve en önemlisi lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehitin (MDA) oksidasyonu (Hung ve Kao 2004; Kotchoni vd. 2006; Farmer ve Davoine 2007; Mène-Saffrané vd. 2007; Chen vd. 2011). Soğuk stresinde ROS artışına bağlı olarak MDA seviyelerinin yükseldiği bilinmektedir. MDA ise bitki hücreleri için oldukça toksiktir ve oksidasyon yoluyla MoA'ya dönüştürülerek detoksifiye edilir (Farmer ve Davoine, 2007; Shin vd. 2009; Sunkar vd. 2003; Kotchoni vd. 2006; Rodrigues vd. 2006; Huang vd. 2008; Shin vd. 2009). İlginç biçimde AAE13'ün ekspresyonunun hem ABA hem ozmotik stres ile uyarılması (Schmid vd. 2005), soğuk gibi stres koşullarında MoA-malonil-CoA döngüsünün daha aktif hale geldiğine işaret etmektedir. Farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalar, soğuk stresinin MoA birikimini artırdığı (Chai vd. 2019; Ferizi vd. 2025) ve dayanıklı bitkilerde MoA birikiminin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Chai vd. 2019).

Bitkilerde malonil-CoA'nın büyük bölümü asetil-CoA karboksilaz (ACCase) tarafından asetil-CoA'dan üretilir. Ancak malonil-CoA'nın doğrudan MoA'dan da sentezlenebileceği uzun yıllardır tartışılmakta olup, Chen vd. (2011) tarafından tanımlanan Arabidopsis AAE13 geni bu alternatif yolun bitkilerdeki karşılığıdır. Rekombinant AAE13 proteininin yalnızca MoA'yı substrat olarak kabul etmesi, enzimin yüksek özgülüğünü ve fizyolojik rolünün MoA detoksifikasyonu ve malonil-CoA üretimi olduğunu göstermektedir. AAE13'ün işlevi özellikle mitokondri için kritiktir. Guan ve Nikolau (2016), AAE13'ün hem sitozolde hem mitokondride farklı izoformlar şeklinde bulunduğunu ve mtFAS için gerekli malonil-CoA'nın doğrudan MoA'dan üretildiğini ortaya koymuştur. AAE13 mutantlarında MoA birikimi, lipoik asit biyosentezindeki bozulma ve buna bağlı fotorespiratuvar düzensizlikler görülmesi, MoA'nın mitokondride detoksifiye edilmesinin yaşamsal önemini açıkça göstermektedir. Liu vd. (2022), yağ asidi biyosentezinde yer alan birden fazla genin daha yüksek ekspresyonu palmitik asit, stearik asit, linoleik asit gibi serbest yağ asitlerinin soğuk stresinde artan birikimlerinin soğuk stresi toleransında rol oynadığını bildirmişlerdir. Malonil-CoA sentetaz ekspresyonunun soğuk stresi ile artması, Arabidopsis'te aşırı ekspresyonunun soğuk toleransını artırdığı rapor edilmiştir (Tang ve Tang 2021).

Mevcut çalışmamızdaki bulgular, yukarıdaki literatüre dayanarak dayanıklı genotiplerde ROS-MDA detoksifikasyonun daha etkin çalıştığını düşündürmektedir (Şekil 4.3-4.5, 4.13). Soğuk stresinin indüklediği lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA, dayanıklı bitkilerde MoA'ya dönüştürülerek etkili şekilde detoksifiye edilmiş olabilir. Hassas genotiplerde ise bu yol yeterince aktif olmayabilir ve bu nedenle MoA seviyesi düşük kalmış olabilir. Detoksifikasyon sonrası oluşan MoA birikimi aslında bir avantaj sağlayabilir. Dayanıklı genotipler MoA'yı AAE13 aracılığıyla malonil-CoA'ya

dönüştürüp: yağ asidi sentezini güçlendirebilir, flavonoid ve diğer savunma bileşiklerini artırabilir, mtFAS yoluyla lipoik asit üretimini sürdürebilir ve hatta enerji üretimini yağ asitlerinden sağlayarak termojenik bir avantaj yaratabilir. Bu durum soğuk koşullarda hücre içi ısının korunmasına da katkı sağlayabilir; tıpkı hayvan hücrelerinde soğuğa yanıt olarak yağdan enerji üretiminin artması gibi (Vaillancourt vd. 2009; Shen vd. 2025). Stresin ürettiği toksik bir molekül olan MDA'nın dayanıklı bitkilerde MoA'ya ve oradan da yaşamsal metabolik ara ürünlere dönüştürülmesi, hücreSEL yeniden doğuşun bir sembolü gibidir. Bu nedenle MoA'nın hem don öncesi hem don sırasında dayanıklılarda yüksek seyretmesi, bu genotiplerin soğuk stresini yönetme kapasitesinin metabolik bir göstergesidir. Sonuç olarak, dayanıklı genotiplerde gözlenen yüksek MoA düzeyleri, hem MDA detoksifikasyonunun etkinliğini hem de soğuk koşullar altında yağ asidi biosentezinin, enerji üretiminin ve savunma metabolizmasının sürekliliğini sağlayan MoA-malonil-CoA ekseninin güçlü çalıştığını göstermektedir. Bu metabolik esneklik, soğuğa toleransın temel bileşenlerinden biri olarak değerlendirilebilir.

5.3. Yağ Asitlerinin Soğuk Toleransındaki Rolü

Soğuk ve don koşullarında bitkilerin hayatta kalabilme kapasitesi, büyük ölçüde hücre zarının fiziksel özelliklerini koruma becerisine bağlıdır. Zar akışkanlığının sürdürülebilmesi için özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) düzeylerindeki değişimler kritik rol oynamaktadır (Javidi vd. 2022). Çalışmamızda, dayanıklı genotiplerde linoleik (18:2) ve α -linolenik asit (18:3) seviyelerinin artması (Şekil 4.16 ve 4.17), membran stabilitesinin korunmasında bu yağ asitlerinin temel bir fonksiyon üstlendiğini göstermektedir. Bu bulgu, membran lipidlerinin soğuk adaptasyonunda UFA birikimini vurgulayan çok sayıda çalışma ile uyumludur (Uemura ve Steponkus 1999; Krasensky ve Jonak, 2012; He ve Ding 2020). Bitkilerde yağ asidi biyosentezi ve doymamışlık derecesinin ayarlanması, düşük sıcaklıklara adaptasyonda temel bir stratejidir. Şeker pancarında yapılan çalışmada, yağ asidi sentezinin ana enzimlerinden 3-oksoasil-ACP sentaz I (FabF) ve doymuş yağ asitlerini doymamış bileşenlere dönüştüren stearoil-ACP 9-desaturaz enziminin soğukta yukarı düzenlendiği bildirilmiş olup (He ve Ding 2020), bu durum çalışmamızdaki dayanıklı genotiplerde gözlenen UFA artışlarını desteklemektedir (Şekil 4.16 ve 4.17). Benzer şekilde Angelcheva vd. (2014), soğuk aklimasyon sürecinde oleik (18:1), linoleik (18:2), α - ve γ -linolenik (18:3) asitlerde 1.6–2.8 kat artış olduğunu göstermiştir. Literatürde linolenik asidin (18:3) soğuk stresinde merkezi rolü özellikle vurgulanmıştır (Upchurch 2007; Kazemi-Shahandashti vd. 2014). Hem membran akışkanlığının korunması hem de oksilipin ve jasmonat sentezi için önemli bir öncü niteliğindedir (Liu vd. 2021; Upadyay vd. 2019). Kinoada don stresine verilen yanıtta α -linolenik asit metabolizmasının aktive olduğu, lizofosfolipit artışı ile membran akışkanlığının iyileştirildiği ve bunun don toleransını artırdığı gösterilmiştir (Xie vd. 2023; Lager vd. 2013). Benzer bir biçimde linolenik asitin LOX-AOS-AOC yolunu besleyerek JA üretimini artırdığı, JA'nın ise düşük sıcaklıklarda koruyucu etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Siboza vd. 2014). Biyomembranlarda UFA'ların varlığı, cis-çift bağlarının sterik etkisi nedeniyle zar akışkanlığını artırarak düşük sıcaklıklarda faz geçiş sıcaklığını düşürür (He vd. 2018). Özellikle C18:3 içeriği yüksek fosfolipitlerin, kloroplast fosfatidilgliserolü (PG) dahil, PSII fotoinhibisyonunu azaltmada kritik rol oynadığı bildirilmektedir (Nishida ve Murata 1996; Iba 2002; Sun vd. 2010). Dolayısıyla linolenik asit artışı, yalnızca membran akışkanlığını artırmakla kalmayıp fotosentetik aparatın korunmasına da katkıda bulunabilir.

Don koşulları aynı zamanda güçlü bir reaktif oksijen türleri (ROS) birikimine yol açar. ROS, membran lipidlerine saldırarak lipid peroksidasyonunu tetikler (Mittler 2002; Chen ve Arora 2014). Bu süreçte PUFA'lar bir yandan peroksidasyona karşı savunmasız olmakla birlikte diğer yandan ROS'u doğrudan tüketerek antioksidan işlev görür; ayrıca JA, AzA ve diğer oksilipinlerin üretimi yoluyla stres sinyallesini düzenler (He ve Ding 2020). Ancak aşırı lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan malondialdehit (MDA), hücre için toksik ileri lipoksidasyon ürünleri (ALE) oluşturarak membran bütünlüğünü daha da bozabilir (Farmer ve Davoine 2007; Deng vd. 2010). Bu nedenle PUFA seviyeleri ve ROS kontrolü arasındaki denge, don toleransının belirleyici unsurlarından biridir. Doymamış yağ asitlerinin fonksiyonları yalnızca yapısal rollerle sınırlı değildir. UFA'lar aynı zamanda Ca^{2+} sinyallesini, PLD δ aktivasyonu, JA ve SA metabolizmasının kontrolü gibi birçok sinyal yolunda düzenleyici rol oynamaktadır (Wang ve Wang 2001; Kachroo vd. 2001; Zhang vd. 2003). Özellikle α -linolenik asit, NOX aktivitesini uyararak kontrollü ROS üretimi ile savunma yanıtlarını güçlendirebilir (Yaeno vd. 2004). Böylece bitki hem membran bütünlüğünü koruyabilir hem de sinyal ağlarını yeniden şekillendirerek stres toleransını artırabilir.

C16/C18 yağ asitlerinin, biyomembran lipid çift tabakasının temel yapısal unsuru olan fosfolipit kuyruklarının birincil kaynaklarını oluşturduğu bilinmektedir (He ve Ding 2020). Tian vd. (2022), *Z. bungeanum* üzerinde yürüttükleri çalışmada, soğuğa dayanıklı (FG) çeşitte hem doymuş hem de doymamış yağ asitleri içeriğinin, hassas çeşitten (FX) daha yüksek olduğunu ve bunun FG'nin düşük sıcaklığa daha dayanıklı olmasına katkı sağladığını bildirmiştir. Aynı çalışmada stearik asit (StA) seviyesinin 4°C'deki 24 saatlik uygulama boyunca hassas genotipte daha yüksek seyrettiği, özellikle 6. ve 12. saatlerde zirve yaptığı ve 24. saatte belirgin biçimde azaldığı görülmektedir. Buna karşılık, dayanıklı genotipte stearik asit düzeyi ilk 12 saat boyunca büyük ölçüde sabit kalmış, 24. saatte ise belirgin bir artış göstermiştir. Nejadsadeghi vd. (2015), buğday bitkisinde 4°C'de gerçekleştirilen 14 günlük aklimasyon sürecinin ardından -5°C'de 24 saatlik don uygulaması yaparak yağ asidi profillerindeki değişimleri incelemiştir. Çalışmada, dayanıklı genotiplerde palmitik asit (PA) düzeyinin don koşullarında belirgin şekilde arttığı, buna karşılık hassas genotiplerde PA'nın ilk 12 saatte yükselip sonrasında önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir. StA açısından değerlendirildiğinde ise, aklimasyon süreci boyunca hassas genotiplerde daha yüksek seviyeler tespit edilmiş; don koşullarına geçildiğinde ise dayanıklı genotiplerde StA içeriğinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Nejadsadeghi vd. 2015). Birlikte ele alındığında, düşük sıcaklık stresi altında soğuğa dayanıklı ve hassas çeşitlerin yağ asidi tepki stratejilerinde farklılıklar olduğunu göstermektedir. Günümüzde, zar lipid bileşenlerinin modifikasyonunun düşük sıcaklık stresi sırasında hücre aktivitelerinde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Iba 2002) ve PA, StA gibi doymuş yağ asitlerinin de bu zar lipid modifikasyonunda önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Ayrıca, PA (C16:0) ve StA (C18:0) içeriklerinin artması hücre zarı dengesini ve akışkanlığını korumak için UFA'ları etkileyen bir sonraki elementlerin önemli substratları olarak da aktive oldukları anlamına gelmektedir (Kazemi-Shahandashti vd. 2014).

Tüm bu literatür bir arada değerlendirildiğinde, çalışmamızda dayanıklı genotiplerde gözlenen LA ve LNA artışının; membran akışkanlığını koruma, lipid peroksidasyonunu sınırlama, JA üretimi ve oksilipin sinyallesini artırma, Ca^{2+} ve ROS sinyallesini düzenleme, fotosentetik yapıları koruma gibi çok yönlü mekanizmalarla

don toleransını güçlendirdiğini düşündürmektedir. Dolayısıyla UFA birikimi, don toleransı yüksek genotiplerin temel özelliklerinden biri olup, düşük sıcaklıklara adaptasyonda hem yapısal hem de sinyal iletimine yönelik bütüncül bir koruma mekanizması oluşturmaktadır. Ayrıca, PA ve StA doymuş yağ asitlerinin don koşullarında dayanıklı genotiplerde artması zar lipidlerinin yeniden şekillendirilmesi, zar akışkanlığının korunması için doymamış yağ asitlerinin üretimi için temel kaynak oluşturarak don toleransına katkıda bulunduklarını düşündürmektedir.

5.4. Aminoasitlerin Soğuk Toleransındaki Rolü

5.4.1. Aspartik asit (Asp)

Soğuk stresine verilen metabolik yanıtlar, özellikle karbon–azot etkileşimleri, hücre içi bölümler arası metabolit akışı ve redoks düzenlemesi üzerinden şekillenen karmaşık bir düzenleme ağına sahiptir (Sun vd. 2023; Hoermiller 2017). Bu çalışmada, soğuk koşullarda dayanıklı genotiplerde aspartik asit (Asp) seviyelerinin artması, buna karşın hassas genotiplerde azalması, soğuk toleransının temel belirleyicilerinden biri olarak görünmektedir (Şekil 4.18). Bu bulgu, literatürde Asp'nin stres fizyolojisindeki kritik rolüne dair geniş ölçekli kanıtlarla uyumludur (Koehler vd. 2015; Janmohammadi vd. 2018; Chai vd. 2019; Byeon vd. 2020). Asp birçok abiyotik stres koşuluna duyarlı bir metabolittir ve kuraklıkta (Jia vd. 2016; Ullah vd. 2017), tuzlulukta (Ali vd. 2019; Li vd. 2017), oksidatif stres altında (Lehmann vd. 2009; Lehmann vd. 2012), besin yetersizliğinde (Ngyuyen vd. 2019) ve düşük sıcaklıkta (Koehler vd. 2015; Janmohammadi vd. 2018; Chai vd. 2019; Byeon vd. 2020) Asp seviyelerinde önemli değişiklikler rapor edilmiştir. Bu çalışmalar Asp'nin stres yanıtı ve metabolik adaptasyon için düzenleyici bir merkez olduğunu göstermektedir. Özellikle azot sınırlandırması altında Asp'nin aminoasit–organik asit dengesini yönlendirdiği (Lima vd. 2003; Schlüter vd. 2013; Vitor vd. 2018) göz önüne alındığında, çalışmamızdaki dayanıklı genotiplerde Asp artışı, azot ve karbon metabolizmasının etkin uyumunu göstermektedir.

Sun vd. (2023), düşük sıcaklık altında (4°C'den -13°C'ye değişen sıcaklık uygulamalarında) *Saussurea involucrata* bitkisinde diğer aminoasitlere kıyasla sadece Asp seviyesinin anlamlı biçimde arttığını göstermiştir; bu durum Asp metabolizmasının soğuk stresine özel duyarlılığına işaret eder niteliktedir. Hoermiller (2017), *Arabidopsis thaliana*'nın soğuğa dayanıklı yabani tiplerinde (WT) Asp'nin sitozolde yüksek, plastidlerde ise daha düşük olduğunu; hassas mutantlarda (pgm) bunun tersine plastidlerde birikim, sitozolde azalma olduğunu bildirmiştir. Bu düzen, soğuk koşullarında dayanıklı bitkilerde plastidden sitozole doğru belirgin bir Asp akışı, hassas mutantlarda ise ters yönde bir akış gerçekleştiğini göstermektedir (Hoermiller 2017). Asp/asparagin ile Glu/glutamin arasındaki hücre içi dağılım farklılıklarının özellikle aklimasyon sırasında belirginleştiği bilinmektedir. Hoermiller (2017), soğuk aklimasyona uğramış genotiplerde Asp dahil birçok aminoasitin plastitler ile sitozol arasında farklı şekillerde ilişkilendiğini, özellikle *psa1* mutantında plastit–sitozol ilişkisi kaybının, düşük sıcaklıkta N-fiksasyonu için bir sınırlamaya işaret ettiğini belirtmiştir. Bu görüş, aklimasyona uğramış *psa1* ve *pgm* mutantlarında toplam fumarat içeriğindeki %50'lik azalma ile de desteklenmiştir; çünkü fumarat ve malat, düşük karbon arzında karbon rezervi olarak kullanılmaktadır (Zell vd. 2010). Dolayısıyla hassas bitkilerde azalan Asp seviyeleri, karbon rezervlerinin (malat, fumarat) yetersiz kullanımı ve sınırlanan azot asimilasyonu ile ilişkili olabilir.

Asp değişiminin soğuk stresine adaptasyonla bağlantılı olduğu farklı türlerde gösterilmiştir. Örneğin çilekte (Koyama 2000; Koehler vd. 2015) ve incirde (Byeon vd. 2020) soğuk koşullarında Asp seviyeleri belirgin şekilde artmıştır. Benzer biçimde soğuğa dayanıklı çavdar çeşitlerinde Asp içeriği soğuğa alıştırmaya sırasında artış göstermiştir (Janmohammadi vd. 2018). Chai vd. (2019), soğuk aklimasyonunda dayanıklı üzüm çeşidi *V. amurensis*'te Asp dahil birçok metabolitin sürekli arttığını, hassas *V. vinifera* çeşitlerinde ise bu etkinin daha sınırlı olduğunu bildirmiştir. Bu örnekler, çalışmamızdaki dayanıklı nohut genotiplerinde Asp artışını, hassaslarda ise azalışını destekler niteliktedir.

Asp, metabolizmanın merkezinde yer alan birçok biyomolekülün sentezinde görev yapan temel bir öncüdür. Asp'nin nükleotidlerin, NAD'nin, TCA ara ürünlerinin ve aminoasitlerin biyosentezindeki kritik rolü geniş biçimde tanımlanmıştır (Alkan vd. 2018; Caspi vd. 2020; Han vd. 2021). Ayrıca Asp'nin hücre çoğalması için sınırlayıcı bir metabolit olduğu, nükleotid biyosentezi ve redoks dengesi üzerinde belirleyici rol oynadığı gösterilmiştir (Birsoy vd. 2015; Sullivan vd. 2015). Bitkilerde ise Asp, azot asimilasyonunun düzenlenmesinde (Miflin ve Habash 2002), karbon iskeletlerinin yönlendirilmesinde (Lima vd. 2003; Schlüter vd. 2013; Yagi vd. 2014; Tiwari vd. 2020) ve stres tepkilerinde önemli rol oynamaktadır (Lima vd. 2003; Schlüter vd. 2013). Soğuk stresinin tetiklediği malat–aspartat mekiği, sitozolik NADH'nin mitokondriye taşınmasında Asp'nin anahtar rol oynadığı bir mekanizmadır (Heber 1974; Liepman ve Olsen 2004). Bu mekanizmanın bozulması, Hoermiller (2017)'in pgm mutantında gözleildiği şekilde sitozolik Asp seviyesinin azalmasına ve plastidyal ilişkinin belirginleşmesine yol açabilir. Çalışmamızda hassas genotiplerde Asp seviyesinin düşmesi, soğuk stresinde enerji metabolizmasının sürdürülebilmesi için gerekli olan redoks transferinin etkin yürütülemediğine işaret etmektedir.

Chai vd. (2019)'nın soğuk aklimasyonu sırasında üzüm çeşitlerinde rapor ettiği organik asit dinamikleri (malonat, sitrat, succinat, malat, fumarat) çalışmamızdaki bulgularla paralellik göstermektedir. Dayanıklı çeşitlerde malat ve fumaratın yüksek düzeyde ve soğukla birlikte artması, Asp'nin artışıyla birlikte karbon metabolizmasının güçlü şekilde yeniden yönlendirildiğini düşündürmektedir. Buna karşın hassas çeşitlerde Asp azalması, malat–aspartat döngüsünün ve karbon rezervlerinin sınırlı kullanımını yansıtabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada soğuk koşullarında dayanıklı nohut genotiplerinde Asp seviyelerinin artması, literatürde Asp'nin soğuk yanıtının olumlu düzenlenmesiyle ilgili güçlü kanıtlarla tutarlıdır. Hassas genotiplerde Asp seviyesinin azalması ise azot asimilasyonu, malat–aspartat mekiği, redoks dengesi ve karbon rezervleri kullanımındaki yetersizlik ile ilişkilendirilebilir. Asp'nin merkezi metabolik rolü dikkate alındığında, Asp dinamiklerinin soğuk toleransının belirlenmesinde kritik bir biyobelirteç olduğu ve farklı metabolik ağların koordinasyonunu yansıttığı açıktır.

5.4.2. Triptofan (Trp)

Bitkilerde triptofan (Trp) biyosentez yolu, yalnızca birincil metabolizmadaki aromatik aminoasit üretimi açısından değil, aynı zamanda büyüme, gelişme ve stres yanıtlarının düzenlenmesinde yer alan indol türevli metabolitlerin sentezi açısından da kritik bir öneme sahiptir. Trp'nin sentezlendiği şikimat yolu, bitki fizyolojisinde birincil

ve ikincil metabolizmayı birbirine bağlayan kilit bir merkez olup, çevresel streslere adaptasyonun düzenlenmesinde aktif rol oynar (Becerra-Moreno vd. 2015; Wei vd. 2018). Korismattan türeyen Trp yolu, hem oksin (IAA) hem de melatonin gibi indol türevi metabolitlerin biyosentezine öncülük eder ve bu metabolitlerin stres toleransında önemli işlevleri bulunmaktadır (Radwanski ve Last 1995; Wang vd. 2016).

Farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalar, soğuk stresinin triptofan sentezinde görevli gen ve enzimleri kuvvetle indüklediğini, buna karşın hassas genotiplerde bu yanıtın zayıf olduğunu göstermektedir (Wang vd. 2023; Zhaou vd. 2025; Henson vd. 2024). Wang vd. (2023) tarafından yapılan çalışmada, PISK1, P2D3DA1 ve ASAS2 gibi Trp biyosentezinde görevli proteinlerin ekspresyonu, don stresi altında soğuğa dayanıklı TBP çeşidinde belirgin şekilde artarken, hassas SME çeşidinde değişmemiştir. Aynı çalışmada qRT-PCR analizleri, proteomik bulguları doğrulamış ve donma stresi altında Trp yolunun yalnızca dayanıklı çeşitte aktive olduğunu göstermiştir. Şikimat kinaz, DAHP aldolaz ve antranilat sentaz gibi enzimler, Trp ve diğer aromatik aminoasitlerin (tirozin, fenilalanin) üretiminde temel görevler üstlenir ve özellikle korismat üretimindeki artış, indol metabolizmasının aşağı akışındaki birçok savunma bileşiğinin sentezini tetikler (Maeda ve Dudareva 2012). Bu bağlamda, dayanıklı nohut genotiplerinde donma toleransının metabolik temellerinden birinin Trp biyosentezinin güçlendirilmesiyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.19).

Trp, IAA ve melatonin gibi birçok indol bileşiğinin ortak öncüsüdür. Bu indoller bitkide hücre bölünmesi, genişlemesi, kök gelişimi, sinyal iletimi ve antioksidan savunmanın düzenlenmesi gibi süreçlerde görev alır (Rehaman vd. 2021; Cancé vd. 2022). Soğuk stresi, bitkilerde reaktif oksijen türlerinin birikimini artırarak oksidatif strese neden olur ve indoller, antioksidan potansiyeli artırarak ve reaktif oksijen türlerinin homeostazını koruyarak stresi hafifletir (Zhaou vd. 2025). Melatonin özellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) temizlenmesinde rol alması, soğuk stresine maruz kalan bitkilerde oksidatif hasarı azaltarak membran bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir (Lei vd. 2004; Ding vd. 2017). Çay bitkisinde yapılan çalışmalar, antranilat sentaz 2 (ASA2)'nin soğuk stresine yanıt olarak güçlü bir şekilde indüklendiğini ve Trp birikimini artırarak melatonin ve IAA sentezini teşvik ettiğini göstermiştir (Zhaou vd. 2025). ASA2'nin susturulması, Trp ile birlikte IAA ve melatonin seviyelerini düşürmüş, ROS birikimini artırmış ve soğuk toleransını ciddi şekilde zayıflatmıştır. Ters yönde, ASA2'nin aşırı ekspresyonu hem çay hem de Arabidopsis'te soğuk toleransını artırmış; antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, POD, CAT) yükseltmiş, MDA birikimini azaltmış ve fotosistem II verimliliğini korumuştur. Bu sonuçlar, Trp'nin soğuk stresine karşı koruyucu etkilerinin büyük ölçüde melatonin ve IAA üzerinden gerçekleştiğini, yani Trp yolunun indol metabolizmasına karbon akışını artırarak stres toleransını modüle ettiğini göstermektedir (Zhaou vd. 2025). Bizim bulgularımızda don öncesi koşullarda dayanıklı bitkilerde Trp sentezinin artıp ardından gelen don koşullarında savunma mekanizması için Trp'nin melatonin vb. indol bileşiklerinin üretiminde kullanıldığını düşündürmektedir (Şekil 4.19).

Ekzojen Trp uygulamalarının çeşitli bitkilerde soğuk stresini hafiflettiği bilinmektedir (Ayyanath vd. 2024; Mustafa vd. 2018). Trp uygulaması, düşük sıcaklık altında iyon sızıntısını ve MDA birikimini azaltmış, ROS birikimini düşürmüş, prolin gibi osmoregülatörlerin birikimini artırmış, antioksidan enzim faaliyetlerini güçlendirmiş, yaprak klorofil floresansını korumuştur (Ren vd. 2025). Bu bulgular Trp'nin stres

toleransını artırmadaki doğrudan ve dolaylı etkilerini desteklemektedir (Zhaou vd. 2025). Düşük sıcaklık stresi altında tolerant genotiplerde triptofan uygulamasının taze ve kuru ağırlık üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Buna karşılık, hassas genotiplerde triptofan uygulaması bu parametreleri belirgin şekilde artırmıştır. Bu durum, hassas genotiplerde soğuk koşullar altında triptofan sentezinin yetersiz kaldığını ve dışarıdan sağlanan triptofan ile büyümenin desteklenebildiğini göstermektedir. Tolerant genotiplerde ise endojen triptofan sentezi zaten yeterli düzeyde olduğundan, dışarıdan uygulama büyüme üzerinde ek bir avantaj sağlamamıştır (Ren vd. 2025). Düşük sıcaklık stresi, yapraklarda palizat doku bütünlüğünün bozulmasına ve sünger parankimasının kaybına yol açmaktadır. Triptofan uygulaması ise palizat dokusunun gözenekliliğini ve yapısal bütünlüğünü iyileştirerek bu tahribatı azaltmıştır. Bu bulgu, palizat parankimasının soğuk stresinde fotosentezin sürdürülebilmesi için kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Genel olarak, düşük sıcaklık sinyal iletiminin triptofan tarafından desteklendiği ve soya fasulyesi fidelerinin soğuk direncinin bu mekanizma üzerinden düzenlendiği; bu süreçte melatoninin ise kilit bir rol oynadığı ifade edilmiştir (Fan vd. 2018; Qari vd. 2022). Sonuç olarak, triptofan biyosentezi ve indol türevlerine yönelen metabolik akışın artırılması, bitkilerde donma ve soğuk stresine karşı güçlü bir metabolik ve fizyolojik adaptasyon mekanizması oluşturmaktadır.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasından ulaşılan sonuçlar aşağıda verilmiştir:

1. *C. arietinum* × *C. reticulatum* melezinden elde edilen 163 RIL hattında soğuğa dayanıklılık değerlendirilmiş ve populasyon genelinde geniş bir fenotipik varyasyon belirlenmiştir ve yabani ebeveynin dayanıklılık genlerinin sonraki nesillere başarıyla aktarılabildiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen sonuçlar, *C. reticulatum* kaynaklı dayanıklılık allellerinin kültür nohudunun ıslah programlarında etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.
2. Metabolik düzeyde elde edilen bulgular, fenotipik dayanıklılıkla uyumlu bir ayrımın varlığını desteklemiştir. Don öncesi koşullarda yapılan PLS-DA analizi, dayanıklı ve hassas genotiplerin metabolik profillerinin belirgin şekilde ayrıldığını göstermiştir. MoA, MA, LNA, SA ve PA, dayanıklı ve hassas gruplar arasındaki ayrımı en iyi yansıtan metabolitler olarak belirlenmiştir. Bu metabolitlerin, soğuk aklimasyon aşamasında soğuk toleransının belirlenmesinde potansiyel biyokimyasal göstergeler ve seleksiyon kriterleri olabileceği sonucuna varılmıştır.
3. Don koşullarında gerçekleştirilen PLS-DA analizi, dayanıklı ve hassas nohut genotiplerinin biyokimyasal yanıtları arasında belirgin bir ayrışma olduğunu ortaya koymuştur. Bu ayrışmada MoA, MA, LNA, PA ve FA en yüksek katkıyı sağlayan metabolitler olmuştur. Bu metabolitlerin, don koşullarında soğuk toleransının belirlenmesinde potansiyel biyokimyasal göstergeler ve seleksiyon kriterleri olabileceği sonucuna varılmıştır.
4. Don sonrası koşullarda da PLS-DA sonuçları, dayanıklı ve hassas genotiplerin tamamen farklı bölgelerde kümelenerek iki grubun biyokimyasal profillerinin keskin şekilde ayrıldığını göstermiştir. VIP analizine göre don sonrası ayrımı en güçlü şekilde belirleyen metabolitler MoA, MA, LNA, SA ve PA olarak belirlenmiştir.
5. Bu çalışmada incelenen organik asitler, soğuğa dayanıklı ve hassas genotipler arasında belirgin metabolik farklılıklar ortaya koymuştur. Don öncesi koşullarında incelenen organik asitlerin büyük çoğunluğunda (CA, FA, MA ve MoA) dayanıklı genotipler, hassas genotiplere kıyasla daha yüksek birikim göstermiştir. Buna karşılık SA, don öncesi dönemde hassas genotiplerde daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, organik asit profillerinin soğuğa tolerans düzeyleri açısından genotipler arasında soğuğa aklimasyondan itibaren belirgin farklılıklar taşıdığını göstermektedir.
6. Bitkiler don koşullarına maruz bırakıldığında organik asitlerin birikim yanıtları genotipler arasında keskin şekilde ayrılmıştır. Dayanıklı genotipler, don stresine karşı tüm organik asit düzeylerinde belirgin artışlarla yanıt vermiştir. Buna karşın hassas genotiplerde organik asit yanıtı zayıf, sınırlı veya ters yönlü gerçekleşmiştir.
7. Don sonrası koşullarında tüm organik asitlerde don dönemine kıyasla genel bir düşüş eğilimi tespit edilmiştir. Bu düşüş, dayanıklı genotiplerde hassas genotiplere kıyasla daha belirgin olmuştur. Hassas genotiplerde ise bu azalışlar daha sınırlı düzeyde kalmış; bazı metabolitlerde (örneğin MoA'da hassas RIL'lerde %10 artış) iyileşme döneminde dengesiz bir metabolik yanıt ortaya çıkmıştır. Genel olarak bu bulgular, organik asit metabolizmasının soğuğa toleransın belirlenmesinde kritik rol oynadığını ve dayanıklı genotiplerin don stresini tolere edebilmek için organik asit metabolizmasını daha etkin biçimde düzenlediğini ortaya koymaktadır.
8. Bu çalışmada incelenen yağ asitleri, soğuğa dayanıklı ve hassas genotipler arasında belirgin metabolik farklılıklar ortaya koymuştur. Don öncesi dönemde PA ve StA düzeylerinin hassas genotiplerde daha yüksek olmasına karşın, don stresinde bu iki

doymuş yağ asidinin özellikle dayanıklı genotiplerde artış göstermesi, dona dayanıklılık mekanizmasında doymuş yağ asitlerinin önemine dikkat çekmektedir. Buna karşılık, LA ve LNA gibi doymamış yağ asitlerinin tüm uygulama koşullarında dayanıklı genotiplerde sürekli olarak daha yüksek bulunması ve don sırasında bu artışın hassas genotiplere kıyasla çok daha belirgin olması, dayanıklı bitkilerin düşük sıcaklıkta yağ asidi metabolizmasına bağlı dayanıklılık mekanizmalarının güçlü olduğunu ortaya koymuştur. Don sonrası iyileşme döneminde dayanıklı genotiplerde PA, StA, LA ve LNA seviyelerindeki düşüş, bu bitkilerin stres sonrası metabolik dengeyi yeniden kurma yeteneğinin yüksek olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuçlar, yağ asidi profillerinin soğuk toleransının belirlenmesinde önemli biyokimyasal göstergeler olduğunu desteklemektedir.

9. Aminoasit profili genel olarak değerlendirildiğinde, Asp ve Trp düzeylerindeki farklılaşmaların soğuk/don toleransı ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Don öncesi koşullarda, her iki aminoasidin de dayanıklı genotiplerde hassas genotiplere kıyasla daha yüksek düzeylerde bulunması, metabolik hazırlığın dayanıklılık ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Don koşullarında, Asp içeriği bakımından dayanıklı ve hassas genotipler zıt yönlü tepkiler vermiş; dayanıklı genotiplerde belirgin bir artış gözlenirken, hassas genotiplerde azalış meydana gelmiştir. Buna karşılık Trp içeriği tüm genotiplerde azalmakla birlikte, bu düşüş dayanıklı grupta daha belirgin gerçekleşmiştir. Don sonrası iyileşme aşamasında, Asp düzeylerinde dayanıklı genotiplerde keskin bir azalma, hassas genotiplerde ise belirgin bir artış eğiliminin ortaya çıkması, stres sonrası toparlanma süreçlerinde farklı metabolik stratejilerin devreye girdiğini göstermektedir. Trp açısından ise dayanıklı genotiplerde don koşullarına kıyasla daha güçlü bir azalış sürerken, hassas genotiplerde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu bulgular, Asp ve Trp'nin hem don öncesi metabolik hazırlığı hem de don ve iyileşme aşamalarındaki farklı adaptif yanıtları yansıtarak soğuk/don toleransının belirlenmesinde potansiyel göstergeler olabileceğini ortaya koymaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Ali, Q., Haider, M.Z., Shahid, S., Aslam, N., Shehzad, F., Naseem, J., ... and Hussain, S.M. 2019. Role of amino acids in improving abiotic stress tolerance to plants. In *Plant tolerance to environmental stress* (pp. 175-204). CRC Press.
- Alkan, H.F., Bogner-Strauss, J.G. 2019. Maintaining cytosolic aspartate levels is a major function of the TCA cycle in proliferating cells. *Mol. Cell. Oncol.*, 6, e1536843.
- Angelcheva, L., Mishra, Y., Antti, H., Kjellsen, T.D., Funk, C., Strimbeck, R.G., and Schröder, W.P. 2014. Metabolomic analysis of extreme freezing tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *New Phytologist*, 204(3), 545-555.
- Araujo, W.L., Nunes-Nesi, A., Nikoloski, Z., Sweetlove, L.J., and Fernie, A.R. 2012. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant, cell & environment*, 35(1), 1-21.
- Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., and Fernie, A.R. 2011. Fumarate: multiple functions of a simple metabolite. *Phytochemistry*, 72(9), 838-843.
- Armoniene, R., Liatukas, Z. and Brazauskas, G. 2013. Evaluation of freezing tolerance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under controlled conditions and in the field. *Zemdirbyste* 100: 417-424.
- Arriagada, O., Cacciuttolo, F., Cabeza, R. A., Carrasco, B., and Schwember, A.R. 2022. A comprehensive review on chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding for abiotic stress tolerance and climate change resilience. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6794.
- Arslan, Ö., Eyidogan, F., and Ekmekci, Y. 2018. Freezing tolerance of chickpea: biochemical and molecular changes at vegetative stage. *Biol plant* 62(1):140–148.
- Asai, N., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kamada, H., and Kondo, N. 2000. Role of malate synthesis mediated by phosphoenolpyruvate carboxylase in guard cells in the regulation of stomatal movement. *Plant and Cell Physiology*, 41(1), 10-15.
- Auld, D.L., Bettis, B.L., Crock, J.E., Kephart, K.D. 1988. Planting date and temperature effects on germination, emergence, and seed yield of chickpea. *Agron. J.* 80, 909–914. doi: 10.2134/agronj1988.00021962008000060014x
- Avin-Wittenberg, T., Tzin, V., Angelovici, R., Less, H., and Galili, G. 2012. Deciphering energy-associated gene networks operating in the response of Arabidopsis plants to stress and nutritional cues. *The Plant Journal*, 70(6), 954-966.
- Ayyanath, M.M., Shukla, M.R., Sriskantharajah, K., Hezema, Y.S., and Saxena, P.K. 2024. Stable indoleamines attenuate stress—a novel paradigm in tryptophan metabolism in plants. *Journal of Pineal Research*, 76(2), e12938.
- Bakht, J., Bano, A., Dominy, P. 2006. The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function. *J. Exp. Bot.* 57, 3707–3715. doi: 10.1093/jxb/erl120
- Bakır, M., Teber, S., Can, T., Kahriman, A., Toker, C., and von Wettberg, E. B. 2025. Comparative transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of freezing stress responses in cultivated and wild *Cicer* species. *Scientific Reports*, 15(1), 36317.

- Bali, S., Kaur, P., Jamwal, V.L., Gandhi, S.G., Sharma, A., Ohri, P., ... and Ahmad, P. 2020. Seed priming with jasmonic acid counteracts root knot nematode infection in tomato by modulating the activity and expression of antioxidative enzymes. *Biomolecules*, 10(1), 98.
- Barrero-Sicilia, C., Silvestre, S., Haslam, R.P., and Michaelson, L.V. 2017. Lipid remodelling: Unravelling the response to cold stress in *Arabidopsis* and its extremophile relative *Eutrema salsugineum*. *Plant Science*, 263, 194-200.
- Baud, S., Guyon, V., Kronenberger, J., Wuillème, S., Miquel, M., Caboche, M., ... and Rochat, C. 2003. Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 33(1), 75-86.
- Becerra-Moreno, A., Redondo-Gil, M., Benavides, J., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., and Jacobo-Velázquez, D. A. 2015. Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot. *Frontiers in plant science*, 6, 837.
- Berger, J.D., Ali, M., Basu, P.S., Chaudhary, B.D., Chaturvedi, S.K., Deshmukh, P.S., et al. 2006. Genotype by environment studies demonstrates the critical role of phenology in adaptation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to high and low yielding environments of India. *Field Crops Res.* 98, 230–244.
- Berger, J.D., Buck, R., Henzell, J.M., and Turner, N.C. 2005. Evolution in the genus *Cicer*—vernalisation response and low temperature pod set in chickpea (*C. arietinum* L.) and its annual wild relatives. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56(11), 1191-1200.
- Berger, J.D., Kumar, S., Nayyar, H., Street, K.A., Sandhu, J.S., Henzell, J.M., ... and Clarke, H.C. 2012. Temperature-stratified screening of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genetic resource collections reveals very limited reproductive chilling tolerance compared to its annual wild relatives. *Field Crops Research*, 126, 119-129.
- Berger, J.D., Milroy, S.P., Turner, N.C., Siddique, K.H.M., Imtiaz, M., and Malhotra, R. 2011. Chickpea evolution has selected for contrasting phenological mechanisms among different habitats. *Euphytica*, 180(1), 1-15.
- Berger, J.D., Turner, N.C., Siddique, K.H.M., Knights, E.J., Brinsmead, R.B., Mock, I., et al. 2004. Genotype by environment studies across Australia reveals the importance of phenology for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. *Aust. J. Agric. Res.* 55, 1071–1084.
- Berger, J.D., Whisson, K., Brownlee, J., Henzell, S.L., and Onyemaobi, O. 2023. A surprising role for vernalization in low temperature adaptation in wild and domestic *Cicer* (chickpea). *Field Crops Research*, 301, 109031.
- Birsoy, K., Wang, T., Chen, W.W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., Sabatini, D.M. 2015. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell*, 162, 540–551.
- Bowman, C. E., Rodriguez, S., Alpergin, E. S. S., Acoba, M. G., Zhao, L., Hartung, T., ... and Wolfgang, M.J. 2017. The mammalian malonyl-CoA synthetase ACSF3 is

- required for mitochondrial protein malonylation and metabolic efficiency. *Cell chemical biology*, 24(6), 673-684.
- Bown, A.W., and Shelp, B.J. 1997. The metabolism and functions of [gamma]-aminobutyric acid. *Plant Physiology*, 115(1), 1.
- Byeon, S. E., and Lee, J. 2020. Differential responses of fruit quality and major targeted metabolites in three different cultivars of cold-stored figs (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae*, 260, 108877.
- Calcagno, F., Gallo, G. 1993. Physiological and morphological basis of abiotic stress resistance in chickpea. In. *Breed. Stress Tolerance Cool-Season Food Legumes*, 293–309.
- Cancé, C., Martin-Arevalillo, R., Boubekur, K., and Dumas, R. 2022. Auxin response factors are keys to the many auxin doors. *New Phytologist*, 235(2), 402-419.
- Caspi, R., Billington, R., Keseler, I.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P.E., Ong, W.K., Paley, S., Subhraveti, P., Karp, P.D. 2020. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes—A 2019 update. *Nucleic Acids Res.*, 48, D445–D453.
- Chai, F., Liu, W., Xiang, Y., Meng, X., Sun, X., Cheng, C., ... and Li, S. 2019. Comparative metabolic profiling of *Vitis amurensis* and *Vitis vinifera* during cold acclimation. *Horticulture Research*, 6.
- Charron, J.B.F., Ouellet, F., Houde, M., and Sarhan, F. 2008. The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC plant biology*, 8(1), 86.
- Chaturvedi, S.K., Jha, S.K., Singh, N.P., Gaur, P.M., and Varshney, R.K. 2018. Technological and policy intervention for increasing chickpea production in India. *Pulse India*, 8(1), 7-12.
- Chaturvedi, S.K., Mishra, D. K., Vyas, P., and Mishra, N. 2009. Breeding for cold tolerance in chickpea. *Trends in Biosciences*, 2(2), 1-4.
- Chen, H., Kim, H. U., Weng, H., and Browse, J. 2011. Malonyl-CoA synthetase, encoded by ACYL ACTIVATING ENZYME13, is essential for growth and development of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(6), 2247-2262.
- Chen, K., and Arora, R. 2014. Understanding the cellular mechanism of recovery from freeze-thaw injury in spinach: possible role of aquaporins, heat shock proteins, dehydrin and antioxidant system. *Physiol Plant* **150**: 374–387.
- Chen, T H.H., Yamamoto, S.D.K., Gusta, L.V., Slinkard, A.F. 1983. Imbibitional chilling injury during chickpea germination. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 108, 944–948.
- Chen, Z.J., Sun, L.L., Liu, P.D., Liu, G.D., Tian, J. and Liao, H. 2015. Malate synthesis and secretion mediated by a manganese-enhanced malate dehydrogenase confers superior manganese tolerance in *Stylosanthes guianensis*. *Plant Physiol.* **167**, 176–188.
- Chia, D.W., Yoder, T.J., Reiter, W.-D., and Gibson, S.I. 2000. Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. *Planta* 211, 743–751.

- Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*, 12(10), 444-451.
- Clarke, H., Khan, T. N., Siddique, K.H.M. 2004. Pollen selection for chilling tolerance at hybridisation leads to improved chickpea cultivars. *Euphytica* 139, 65–74. doi: 10.1007/s10681-004-2466-y
- Clarke, H.J., and Siddique, K.H.M. 2004. Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development. *Field Crop Res.* 90, 323–334. doi: 10.1016/j.fcr.2004.04.001
- Crecelius, F., Streb, P., and Feierabend, J. 2003. Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*, 54(384), 1075-1083.
- Croser, J.S., Clarke, H.J., Siddique, K.H.M., and Khan, T.N. 2003. Low-temperature stress: implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 185–219. doi: 10.1080/713610855
- De Vellis, J., Shannon, L. M., and Lew, J.Y. 1963. Malonic acid biosynthesis in bush bean roots. I. Evidence for oxaloacetate as immediate precursor. *Plant physiology*, 38(6), 686.
- de Vicente, M.C. and Tanksley, S.D. 1993. QTL Analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics*, 134: 585–596.
- Deng, Y., Xu, L., Zeng, X., Li, Z., Qin, B., He, N. 2010. New perspective of GABA as an inhibitor of formation of advanced lipoxidation end-products: It's interaction with malondiadehyde. *J. Biomed. Nanotechnol.* 6, 318–324. doi: 10.1166/jbn.2010.1130
- Ding, F., Liu, B., and Zhang, S. 2017. Exogenous melatonin ameliorates cold-induced damage in tomato plants. *Scientia Horticulturae*, 219, 264-271.
- Dolce, V., Cappello, A. R., and Capobianco, L. 2014. Mitochondrial tricarboxylate and dicarboxylate–tricarboxylate carriers: from animals to plants. *IUBMB life*, 66(7), 462-471.
- Dong, W., Ma, X., Jiang, H., Zhao, C., and Ma, H. 2020. Physiological and transcriptome analysis of *Poa pratensis* var. anceps cv. Qinghai in response to cold stress. *BMC Plant Biology*, 20(1), 362.
- Duke, J. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Springer Science & Business Media.
- Dyson, B.C., Miller, M.A., Feil, R., Rattray, N., Bowsher, C.G., Goodacre, R., ... and Johnson, G.N. 2016. FUM2, a cytosolic fumarase, is essential for acclimation to low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 172(1), 118-127.
- Ellis, R.H., Covell, S., Roberts, E.H., Summerfield, R.J. 1986. The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. XI. Intraspecific variation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) at constant temperatures. *J. Exp. Bot.* 37, 1503–1515. doi: 10.1093/jxb/37.10.1503
- Fahnenstich, H., Saigo, M., Niessen, M., Drincovich, M.F., Flügge, U.I., and Maurino, V.G. 2008. Malate and fumarate emerge as key players in primary metabolism:

- Arabidopsis thaliana* overexpressing C4-NADP-ME offer a way to manipulate the levels of malate and to analyse the physiological consequences. In: Allen, J.F., Gantt, E., Golbeck, J.H., Osmond, B. (Eds.), *Photosynthesis Energy From the Sun*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 971–975.
- Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z., and Chen, L. 2018. Melatonin: a multifunctional factor in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1528.
- FAOSTAT. 2025. <http://www.fao.org/faostat/#data/QC>. [Son erişim tarihi: 10.10.2025].
- Farmer, E.E., and Davoine, C. 2007. Reactive electrophile species. *Current opinion in plant biology*, 10(4), 380-386.
- Farooq, M., Hussain, M., Nawaz, A., Lee, D.J., Alghamdi, S. S., Siddique, K.H. 2017. Seed priming improves chilling tolerance in chickpea by modulating germination metabolism, trehalose accumulation and carbon assimilation. *Plant Physiol. Biochem.* 111, 274–283. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.12.012
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A. 2009. “Plant drought stress: effects, mechanisms and management,” in *Sustainable agriculture* (Dordrecht: Springer), 153–188.
- Feng, W., Li, J., Long, S., and Wei, S. 2019. A DREB1 gene from zoysiagrass enhances *Arabidopsis* tolerance to temperature stresses without growth inhibition. *Plant Science*, 278, 20-31.
- Ferizi, R., Ramadan, M. F., and Maxhuni, Q. 2025. Evaluation of Relevant Metabolites in Plants in Conditions of Environmental Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*.
- Fernie, A. R., Carrari, F., and Sweetlove, L.J. 2004. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current opinion in plant biology*, 7(3), 254-261.
- Gao, C., Mumtaz, M. A., Zhou, Y., Yang, Z., Shu, H., Zhu, J., ... and Wang, Z. 2022. Integrated transcriptomic and metabolomic analyses of cold-tolerant and cold-sensitive pepper species reveal key genes and essential metabolic pathways involved in response to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6683.
- Garg, R., Bhattacharjee, A., and Jain, M. 2015. Genome-scale transcriptomic insights into molecular aspects of abiotic stress responses in chickpea. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(3), 388-400.
- Gaschler, M.M., and Stockwell, B.R. 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419-425.
- Gaur, P.M., Jukanti, A.K., Samineni, S., Chaturvedi, S.K., Basu, P.S., Babbar, A., ... and Laxmipathi Gowda, C.L. 2013. Climate change and heat stress tolerance in chickpea. *Climate change and plant abiotic stress tolerance*, 837-856.
- Gaur, P.M., Krishnamurthy, L., and Kashiwagi, J. 2008. Improving drought-avoidance root traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.)-current status of research at ICRIAT. *Plant Production Science*, 11(1), 3-11.
- Gibon, Y., Pyl, E.-T., Sulpice, R., Lunn, J.E., Höhne, M., Günther, M., and Stitt, M. 2009.

- Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant Cell Environ.* 32, 859–874.
- Giorgi, F. and Lionello, P. 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change* 63: 90-104.
- Grasso, N., Lynch, N. L., Arendt, E. K., and O'Mahony, J. A. (2022). Chickpea protein ingredients: A review of composition, functionality, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 21(1), 435-452.
- Guan, X., and Nikolau, B.J. 2016. AAE 13 encodes a dual-localized malonyl-CoA synthetase that is crucial for mitochondrial fatty acid biosynthesis. *The Plant Journal*, 85(5), 581-593.
- Gull, A., Lone, A.A., and Wani, N.U.I. 2019. “Biotic and abiotic stresses in plants,” in *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. Ed. A. B. De Oliveira (London, UK: IntechOpen), 1–19.
- Guo, R., Zhou, Z., Cai, R., Liu, L., Wang, R., Sun, Y., ... and Guo, C. 2024. Metabolomic and physiological analysis of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in response to saline and alkaline stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 207, 108338.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J., and Hinch, D.K. 2008. Metabolomics of temperature stress. *Physiologia plantarum*, 132(2), 220-235.
- Haferkamp, I. 2007. The diverse members of the mitochondrial carrier family in plants. *FEBS Lett.* 581, 2375–2379.
- Han, M., Zhang, C., Suglo, P., Sun, S., Wang, M., and Su, T. 2021. L-aspartate: An essential metabolite for plant growth and stress acclimation. *Molecules*, 26(7), 1887.
- Hasanfar, A., Rastgoo, M., Darbandi, E.I., Nezami, A., and Chauhan, B.S. 2022. Freezing stress affects the efficacy of clodinafop-propargyl and 2,4-D plus MCPA on wild oat (*Avena ludoviciana* Durieu) and turnipweed [*Rapistrum rugosum* (L.) All.] in wheat (*Triticum aestivum* L.). *PloS One* 17 (10), e0274945. doi: 10.1371/journal.pone.0274945
- Hashemi, S., Asrar, Z., Pourseyedi, S., and Nadernejad, N. 2019. Investigation of ZnO nanoparticles on proline, anthocyanin contents and photosynthetic pigments and lipid peroxidation in the soybean. *IET nanobiotechnology*, 13(1), 66-70.
- Hayaishi, O., and Kornberg, A. 1952. Metabolism of cytosine, thymine, uracil, and barbituric acid by bacterial enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 197(2), 717-732.
- He, M., and Ding, N.Z. 2020. Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response. *Frontiers in plant science*, 11, 562785.
- He, M., He, C. Q., and Ding, N.Z. 2018. Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Front. Plant Sci.* 9, 1771. doi: 10.3389/fpls.2018.01771
- Heber, U. 1974 Metabolite exchange between chloroplasts and cytoplasm. *Annual*

Review of Plant Physiology **25**, 393–421.

- Heidarvand, L., Maali-Amiri, R., Naghavi, M. R., Farayedi, Y., Sadeghzadeh, B., Alizadeh, K. 2011. Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russ. J. Plant Physiol.* **58**, 157–163. doi: 10.1134/S1021443711010080
- Henson, C. A., Duke, S. H., and Livingston III, D. P. 2014. Metabolic changes in *Avena sativa* crowns recovering from freezing. *PLoS One*, **9**(3), e93085.
- Higashi, Y., Okazaki, Y., Myouga, F., Shinozaki, K., and Saito, K. 2015. Landscape of the lipidome and transcriptome under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports*, **5**(1), 10533.
- Hijaz, F., and Killiny, N. 2019. Exogenous GABA is quickly metabolized to succinic acid and fed into the plant TCA cycle. *Plant signaling & behavior*, **14**(3), e1573096.
- Hoermiller, I.I., Naegele, T., Augustin, H., Stutz, S., Weckwerth, W., and Heyer, A.G. 2017. Subcellular reprogramming of metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment*, **40**(5), 602-610.
- Homer, A., Sahin, M. and Kucukozdemir, U. 2016. Evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) germplasm for winter hardiness in central anatolia, Turkey, using field and controlled environment. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **52**: 55-63.
- Horiguchi, G., Fuse, T., Kawakami, N., Kodama, H., and Iba, K. 2000. Temperature-dependent translational regulation of the ER ω -3 fatty acid desaturase gene in wheat root tips. *The Plant Journal*, **24**(6), 805-813.
- Huang, W., Ma, X., Wang, Q., Gao, Y., Xue, Y., Niu, X., ... and Liu, Y. 2008. Significant improvement of stress tolerance in tobacco plants by overexpressing a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene from maize (*Zea mays*). *Plant molecular biology*, **68**(4), 451-463.
- Hung, K.T., and Kao, C.H. 2004. Hydrogen peroxide is necessary for abscisic acid-induced senescence of rice leaves. *Journal of plant physiology*, **161**(12), 1347-1357.
- Iba, K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual review of plant biology*, **53**(1), 225-245.
- Igamberdiev, A.U., and Eprintsev, A.T. 2016. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Frontiers in plant science*, **7**, 1042.
- Igamberdiev, A.U., and Gardeström, P. 2003. Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1606**(1-3), 117-125.
- Janmohammadi, M., Sabaghnia, N., and Mahfoozi, S. 2018. Frost tolerance and metabolite changes of rye (*Secale cereale*) during the cold hardening and overwintering. *Acta physiologiae plantarum*, **40**(3), 42.
- Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S., and Ovesná, J. 2010. Cold stress and acclimation–

- what is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology*, 12(3), 395-405.
- Javidi, M.R., Maali-Amiri, R., Poormazaheri, H., Niaraki, M. S., and Kariman, K. 2022. Cold stress-induced changes in metabolism of carbonyl compounds and membrane fatty acid composition in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 192, 10-19.
- Jeon, J., Kim, J. K., Wu, Q., and Park, S.U. 2018. Effects of cold stress on transcripts and metabolites in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Environmental and Experimental Botany*, 155, 488-496.
- Jia, X., Sun, C., Zuo, Y., Li, G., Li, G., Ren, L., and Chen, G. 2016. Integrating transcriptomics and metabolomics to characterise the response of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) to progressive drought stress. *Bmc Genomics*, 17(1), 188.
- Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J., Klessig, D.F. 2001. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9448–9453. doi: 10.1073/pnas.151258398
- Kadiyala, M.D.M., Charyulu, D.K., Nedumaran, S., Shyam, D.M., Gumma, M.K., and Bantilan, M.C.S. 2016. Agronomic management options for sustaining chickpea yield under climate change scenario. *Journal of Agrometeorology*, 18(1), 41-47.
- Kalve, S., House, M.A., and Tar'an, B. 2024. Freezing stress response of wild and cultivated chickpeas. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1310459.
- Kanouni, H., Khalily, M., Malhotra, R S. 2009. Assessment of cold tolerance of chickpea at rainfed highlands of Iran. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 5, 250–254.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D.W., Zhao, W., Schiller, K.C., Gatzke, N., ... and Guy, C.L. (2004). Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 136(4), 4159-4168.
- Karami-Moalem, S., Maali-Amiri, R., and Kazemi-Shahandashti, S.S. 2018. Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 122, 31-39.
- Karimzadeh Soureshjani, H., Nezami, A., Nabati, J., Oskoueian, E., and Ahmadi-Lahijani, M.J. 2022. The physiological, biochemical, and molecular modifications of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings under freezing stress. *J. Plant Growth Regul.*, 1– 16. doi: 10.1007/s00344-021-10369-4
- Kasote, D.M., Jayaprakasha, G.K., Singh, J., Ong, K., Crosby, K.M., and Patil, B.S. 2020. Metabolomics-based biomarkers of Fusarium wilt disease in watermelon plants. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(4), 591-596.
- Kaur, G., Kumar, S., Nayyar, H., Upadhyaya, H.D. 2008. Cold stress injury during the pod-filling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): effects on quantitative and qualitative components of seeds. *J. Agron. Crop Sci.* 194, 457–464. doi: 10.1111/j.1439-037X.2008.00336.x
- Kazemi-Shahandashti, S.S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A., and Ramezani, S. S. 2014. Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 171(13), 1106-1116.

- Kiran, A., Kumar, S., Nayyar, H., and Sharma, K.D. 2019. Low temperature-induced aberrations in male and female reproductive organ development cause flower abortion in chickpea. *Plant, cell & environment*, 42(7), 2075-2089.
- Knight, M.R., and Knight, H. 2012. Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytol* 195: 737–751
- Koehler, G., Rohloff, J., Wilson, R.C., Kopka, J., Erban, A., Winge, P., ... and Randall, S.K. 2015. Integrative “omic” analysis reveals distinctive cold responses in leaves and roots of strawberry, *Fragaria* × *ananassa* ‘Korona’. *Frontiers in plant science*, 6, 826.
- Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lu, S., Joubes, J., and Jenks, M.A. 2009. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 151(4), 1918-1929.
- Koster, K.L., and Lynch, D.V. 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma rye. *Plant Physiology*, 98(1), 108-113.
- Kotchoni, S. O., Kuhns, C., Ditzer, A., Kirch, H.H., and Bartels, D. 2006. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, cell & environment*, 29(6), 1033-1048.
- Krasensky, J., and Jonak, C. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1593-1608.
- Kumar, S., Malik, J., Thakur, P., Kaistha, S., Sharma, K. D., Upadhyaya, H. D., et al. 2011. Growth and metabolic responses of contrasting chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes to chilling stress at reproductive phase. *Acta Physiol. Plant.* 33, 779–787. doi: 10.1007/s11738-010-0602-y
- Kumar, S., Nayyar, H., Bhanwara, R.K., Upadhyaya, H.D. 2010. Chilling stress effects on reproductive biology of chickpea. *J. Agric. Res.* 8, 1–14.
- Kumar, S., Thakur, P., Kaushal, N., Malik, J. A., Gaur, P., Nayyar, H. 2013. Effect of varying high temperatures during reproductive growth on reproductive function, oxidative stress and seed yield in chickpea genotypes differing in heat sensitivity. *Arch. Agron. Soil Sci.* 59, 823–843. doi: 10.1080/03650340.2012.683424
- Lager, I., Yilmaz, J.L., Zhou, X.R., Jasieniecka, K., Kazachkov, M., Wang, P., Zou, J., Weselake, R., Smith, M.A., Bayon, S., et al. 2013. Plant Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholine Acyltransferases (LPCATs) Have Different Specificities in Their Forward and Reverse Reactions. *J. Biol. Chem.*, 288, 36902–36914.
- Lee, T. M., Lur, H. S., Chu, C. 1993. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. I. Endogenous abscisic acid levels. *Plant Cell Environ.* 16, 481–490. doi: 10.1111/j.1365-3040.1993.tb00895.x
- Lehmann, M., Laxa, M., Sweetlove, L. J., Fernie, A. R., and Obata, T. 2012. Metabolic recovery of *Arabidopsis thaliana* roots following cessation of oxidative stress. *Metabolomics*, 8(1), 143-153.

- Lehmann, M., Schwarzländer, M., Obata, T., Sirikantaramas, S., Burow, M., Olsen, C. E., ... and Laxa, M. 2009. The metabolic response of *Arabidopsis* roots to oxidative stress is distinct from that of heterotrophic cells in culture and highlights a complex relationship between the levels of transcripts, metabolites, and flux. *Molecular Plant*, 2(3), 390-406.
- Lei, X. Y., Zhu, R. Y., Zhang, G. Y., and Dai, Y. R. 2004. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines. *Journal of pineal research*, 36(2), 126-131.
- Lei, X.Y., Zhu, R.Y., Zhang, G.Y., and Dai, Y.R. 2004. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines. *Journal of pineal research*, 36(2), 126-131.
- Li, H., Dong, S., Wang, S., Song, K., Zhang, X., and Yang, L. 2025. Transcriptomics and metabolomics reveal that seed cold priming enhances cold tolerance in tobacco seedlings by activating lignin biosynthesis and auxin signaling pathways. *Industrial Crops and Products*, 236, 122034.
- Li, L., Dou, N., Zhang, H., and Wu, C. 2021. *The versatile GABA in plants. Plant Signal Behav* 16: 1862565.
- Li, M., Guo, R., Jiao, Y., Jin, X., Zhang, H., and Shi, L. 2017. Comparison of salt tolerance in Soja based on metabolomics of seedling roots. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1101.
- Liepmann, A.H., and Olsen, L.J. 2004. Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(1), 73-89.
- Lima, J. D., and Sodek, L. 2003. N-stress alters aspartate and asparagine levels of xylem sap in soybean. *Plant science*, 165(3), 649-656.
- Linka, N., and Weber, A.P.M. 2010. Intracellular metabolite transporters in plants. *Mol. Plant*. 3, 21–53.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., and Fernie, A.R. 2006. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 1(1), 387-396.
- Liu, W., Zhang, R., Xiang, C., Zhang, R., Wang, Q., Wang, T., Li, X., Lu, X., Gao, S., Liu, Z., et al. 2021. Transcriptomic and Physiological Analysis Reveal That α -Linolenic Acid Biosynthesis Responds to Early Chilling Tolerance in Pumpkin Rootstock Varieties. *Front. Plant Sci.*, 12, 669565.
- Liu, X., Wei, R., Tian, M., Liu, J., Ruan, Y., Sun, C., and Liu, C. 2022. Combined transcriptome and metabolome profiling provide insights into cold responses in Rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes with contrasting cold-stress sensitivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13546.
- Los, D.A., and Murata, N. 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1666(1-2), 142-157.
- Maeda, H., and Dudareva, N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 63(1), 73-105.

- Maksimov, E.G., Mironov, K.S., Trofimova, M.S., Nechaeva, N.L., Todorenko, D.A., Klementiev, K. E., ... and Los, D.A. 2017. Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria. *Photosynthesis research*, 133(1), 215-223.
- Malhotra, R.S., and Singh, K.B. 1990. The inheritance of cold tolerance in chickpea. *J. Genet. Breed.* 44, 227–230.
- Malhotra, R.S., and Singh, K.B. 1991. Gene action for cold tolerance in chickpea. *Theor. Appl. Genet.* 82, 598–601. doi: 10.1007/BF00226796
- Mano, J.I. 2012. Reactive carbonyl species: their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59, 90-97.
- Mano, J.I., Kanameda, S., Kuramitsu, R., Matsuura, N., and Yamauchi, Y. 2019. Detoxification of reactive carbonyl species by glutathione transferase tau isozymes. *Frontiers in plant science*, 10, 487.
- Mantri, N.L., Ford, R., Coram, T.E., and Pang, E.C. 2010. Evidence of unique and shared responses to major biotic and abiotic stresses in chickpea. *Environmental and experimental botany*, 69(3), 286-292.
- Mène-Saffrané, L., Davoine, C., Stolz, S., Majcherczyk, P., and Farmer, E.E. 2007. Genetic removal of tri-unsaturated fatty acids suppresses developmental and molecular phenotypes of an *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutant: Whole-body mapping of malondialdehyde pools in a complex eukaryote. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35749-35756.
- Merga, B., and Haji, J. 2019. Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1615718.
- Michaeli, S., and Fromm, H. 2015. Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined? *Front Plant Sci* 6: 419.
- Mifflin B.J. and Habash D.Z. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* 53, 979–987.
- Mifflin, B.J., and Habash, D.Z. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of experimental botany*, 53(370), 979-987.
- Millan, T., Clarke, H.J., Siddique, K.H., Buhariwalla, H.K., Gaur, P.M., Kumar, J., ... and Winter, P. 2006. Chickpea molecular breeding: new tools and concepts. *Euphytica*, 147(1), 81-103.
- Miquel, M., James Jr, D., Dooner, H., and Browse, J. 1993. Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13), 6208-6212.
- Mir, A.H., Bhat, M.A., Dar, S.A., Sofi, P.A., Bhat, N.A., and Mir, R.R. 2021. Assessment of cold tolerance in chickpea (*Cicer spp.*) grown under cold/freezing weather conditions of North-Western Himalayas of Jammu and Kashmir, India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(5), 1105-1118.

- Mir, A.H., Bhat, M.A., Fayaz, H., Dar, S.A., Maqbool, S., Bhat, N.A., ... & Mir, R.R. 2019. Assessment of cold tolerance in chickpea accessions in North-Western Himalayas of Jammu and Kashmir India. *J Pharm Phytochem*, 8(4), 2268-2274.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trend Plant Sci* 7: 405–410.
- Mohanty, J.K., Jha, U.C., Dixit, G.P., and Parida, S.K. 2022. Harnessing the hidden allelic diversity of wild *Cicer* to accelerate genomics-assisted chickpea crop improvement. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5697-5715.
- Mugabe, D., Coyne, C.J., Piaskowski, J., Zheng, P., Ma, Y., Landry, E., ... and Abbo, S. 2019. Quantitative trait loci for cold tolerance in chickpea. *Crop Science*, 59(2), 573-582.
- Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y., and Nishida, I. 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature*, 356(6371), 710-713.
- Mustafa, A., Imran, M., Ashraf, M., and Mahmood, K. 2018. Perspectives of using L-tryptophan for improving productivity of agricultural crops: A review. *Pedosphere*, 28(1), 16-34.
- Nabati J., Hasanfarid, A., Nezami, A., Ahmadi-Lahijani, M.J., Boroumand Rezazadeh, E. 2021. Gas exchange variables as promising criteria for screening freezing-tolerant faba bean (*Vicia faba* L.) landraces at early growth stages. *Legum Sci* 3(1):e72.
- Narayan, V.S. and Nair, P.M. 1990. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 29: 367–375.
- Nayyar, H., Bains, T. S., Kumar, S., Kaur, G. 2005b. Chilling effects during seed filling on accumulation of seed reserves and yield of chickpea. *J. Sci. Food Agric.* 85, 1925–1930. doi: 10.1002/jsfa.2198
- Nayyar, H., Bains, T., Kumar, S. 2005a. Low temperature induced floral abortion in chickpea: relationship to abscisic acid and cryoprotectants in reproductive organs. *Env. Exp. Bot.* 53, 39–47. doi 10.1016/j.envexpbot.2004.02.011
- Nayyar, H., Chander, K., Kumar, S., Bains, T. 2005c. Glycine betaine mitigates cold stress damage in chickpea. *Agron. Sustain. Dev.* 25, 381–388. doi: 10.1051/agro:2005033
- Nayyar, H., Kaur, G., Kumar, S., Upadhyaya, H.D. 2007. Low temperature effects during seed filling on chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.): probing mechanisms affecting seed reserves and yield. *J. Agron. Crop Sci.* 193, 336–344. doi: 10.1111/j.1439-037X.2007.00269.x
- Nayyar, H., Kaur, G., Kumar, S., Upadhyaya, H.D. 2007. Low temperature effects during seed filling on chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.): probing mechanisms affecting seed reserves and yield. *J. Agron. Crop Sci.* 193, 336–344. doi: 10.1111/j.1439-037X.2007.00269.x
- Nejadsadeghi, L., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Ramezanpour, S., and Sadeghzade, B. 2015. Membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in tetraploid and hexaploid wheats. *Molecular biology reports*, 42(2), 363-372.

- Nezami, A. and Bagheri, A. 2005. Responsiveness of cold tolerant chickpea characteristics in fall and spring planting: II. Yield and yield components. *Iranian Journal of Field Crops Research* 3: 156-170.
- Nezami, A., Nabati, J., Mirmiran, S.M., Hasanfard, A., and Mohammadi, M. 2022. How does the freezing stress in the seedling stage affect the chickpea's morpho-physiological and biochemical attributes?. *Gesunde Pflanzen*, 75(4), 1107-1119.
- Nguyen, V. L., Palmer, L., Roessner, U., and Stangoulis, J. 2019. Genotypic variation in the root and shoot metabolite profiles of wheat (*Triticum aestivum* L.) indicate sustained, preferential carbon allocation as a potential mechanism in phosphorus efficiency. *Frontiers in Plant Science*, 10, 995.
- Nishida, I., and Murata, N. 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 541–568. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.541
- Nishiuchi, T., and Iba, K. 1998. Roles of plastid ϵ -3 fatty acid desaturases in defense response of higher plants. *Journal of Plant Research*, 111(4), 481-486.
- Noguchi, K., and Yoshida, K. 2008. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion*, 8(1), 87-99.
- Oliver, S.N., Dennis, E.S., Dolferus, R. 2007. ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant Cell Physiol.* 48, 1319–1330
- Orlova, I.V., Serebriiskaya, T.S., Popov, V., Merkulova, N., Nosov, A. M., Trunova, T.I., ... and Los, D.A. 2003. Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants. *Plant and cell physiology*, 44(4), 447-450.
- Ostergaard, E. 2008. Disorders caused by deficiency of succinate-CoA ligase. *Journal of inherited metabolic disease*, 31(2), 226-229.
- Pagter, M., Alpers, J., Erban, A., Kopka, J., Zuther, E., and Hinch, D.K. 2017. Rapid transcriptional and metabolic regulation of the deacclimation process in cold acclimated *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*, 18(1), 731.
- Palmieri, F., Pierri, C.L., De Grassi, A., Nunes-Nesi, A., and Fernie, A.R. 2011. Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *The Plant Journal*, 66(1), 161-181.
- Panchal, P., Miller, A. J., and Giri, J. 2021. Organic acids: versatile stress-response roles in plants. *Journal of Experimental Botany*, 72(11), 4038-4052.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N., and Flagella, Z. 2007. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: a case study: durum wheat mitochondria. *Journal of experimental botany*, 58(2), 195-210.
- Peer, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L., and Murphy, A. S. 2001. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 126(2), 536-548.
- Peng, K., Tian, Y., Cang, J., Yu, J., Wang, D., He, F., ... and Tan, Y. 2022. Overexpression of TaFBA-A10 from winter wheat enhances freezing tolerance in *Arabidopsis*

- thaliana*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(1), 314-326.
- Pescador, D.S., Sanchez, A.M., Luzuriaga, A.L., Sierra-Almeida, A. and Escudero, A. 2017. Winter is coming: plant freezing resistance as a key functional trait for the assembly of annual Mediterranean communities. *Annals of Botany* 121: 335-344.
- Picault, N., Hodges, M., Paimieri, L., and Palmieri, F. 2004. The growing family of mitochondrial carriers in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 9, 138–146.
- Pracharoenwattana, I., Zhou, W.X., Keech, O., Francisco, P.B., Udomchalothorn, T., Tschoep, H., Stitt, M., Gibon, Y., and Smith, S.M. 2010. *Arabidopsis* has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *Plant J.* 62, 785–795.
- Qari, S. H., Hassan, M. U., Chattha, M. U., Mahmood, A., Naqve, M., Nawaz, M., ... and Aljabri, M. 2022. Melatonin induced cold tolerance in plants: physiological and molecular responses. *Frontiers in Plant Science*, 13, 843071.
- Rachwa-Rosiak, D., Nebesny, E., and Budryn, G. 2015. Chickpeas—composition, nutritional value, health benefits, application to bread and snacks: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(8), 1137-1145.
- Radwanski, E.R., and Last, R.L. 1995. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *The Plant Cell*, 7(7), 921.
- Rani, A., Devi, P., Jha, U. C., Sharma, K. D., Siddique, K. H., and Nayyar, H. 2020. Developing climate-resilient chickpea involving physiological and molecular approaches with a focus on temperature and drought stresses. *Frontiers in plant science*, 10, 1759.
- Rawlinson, C., Kamphuis, L.G., Gummer, J.P., Singh, K.B., and Trengove, R.D. 2015. A rapid method for profiling of volatile and semi-volatile phytohormones using methyl chloroformate derivatisation and GC–MS. *Metabolomics*, 11(6), 1922-1933.
- Raza, A., Charagh, S., Abbas, S., Hassan, M.U., Saeed, F., Haider, S., ... and Varshney, R.K. 2023. Assessment of proline function in higher plants under extreme temperatures. *Plant Biology*, 25(3), 379-395.
- Redden, R.J., and Berger, J.D. 2007. History and origin of chickpea. In *Chickpea breeding and management* (pp. 1-13). Wallingford UK: CABI.
- Rehaman, A., Mishra, A. K., Ferdose, A., Per, T. S., Hanief, M., Jan, A. T., and Asgher, M. 2021. Melatonin in plant defense against abiotic stress. *Forests*, 12(10), 1404.
- Ren, C., Cheng, T., Jia, J., Cao, L., Zhang, W., Zhang, S., ... and Yu, G. 2025. Exogenous tryptophan enhances cold resistance of soybean seedlings by promoting melatonin biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 177(2), e70189.
- Rieseberg, L.H., Archer, M.A. and Wayne, R.K. 1999. Transgressive segregation, adaptation, and speciation. *Heredity*, 83: 363–372.
- Roberts, E. H., Summerfield, R. J., Minchin, F. R., Hadley, P. 1980. Phenology of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) in contrasting aerial environments. *Exp. Agric.* 16, 343–360. doi: 10.1017/S001447970001200X
- Rodrigues, S.M., Andrade, M.O., Gomes, A.P.S., DaMatta, F.M., Baracat-Pereira, M.C.,

- and Fontes, E. P. 2006. Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of experimental botany*, 57(9), 1909-1918.
- Roorkiwal, M., Jain, A., Kale, S.M., Doddamani, D., Chitikineni, A., Thudi, M., and Varshney, R.K. 2018. Development and evaluation of high-density Axiom® Cicer SNP Array for high-resolution genetic mapping and breeding applications in chickpea. *Plant Biotechnology Journal*, 16(4), 890-901.
- Routaboul, J. M., Fischer, S. F., and Browse, J. 2000. Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant physiology*, 124(4), 1697-1705.
- Ruelland, E., Vaultier, M.N., Zachowski, A., and Hurry, V. 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. In JC Kader, M Delseny, eds, *Advances in Botanical Research*, Vol 49. Academic Press, Cambridge, MA, pp 35–150.
- Saccardo, F., and Calcagno, F. 1990. Consideration of chickpea plant ideotypes for spring and winter sowing.
- Saeed, A., and Darvishzadeh, R. 2017. Association analysis of biotic and abiotic stresses resistance in chickpea (*Cicer spp.*) using AFLP markers. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 31, 698–708. doi: 10.1080/13102818.2017.1333455
- Saghfi, S., Eivazi, A.R. 2014. Effects of cold stress on proline and soluble carbohydrates in two chickpea cultivars. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3, 591–595.
- Sari, D., Sari, H., Eker, T., Ikten, C., Uzun, B., & Toker, C. 2022. Intraspecific versus interspecific crosses for superior progeny in *Cicer* species. *Crop Science*, 62(6), 2122-2137.
- Saxena, M.C. 1990. Problems and potential of chickpea production in the nineties. *Chickpea Nineties*, 13–25.
- Saxena, M.C. 1990. Problems and potential of chickpea production in the nineties. *Chickpea in the Nineties*, 13-25.
- Schlüter, U., Colmsee, C., Scholz, U., Bräutigam, A., Weber, A. P., Zellerhoff, N., ... and Sonnewald, U. 2013. Adaptation of maize source leaf metabolism to stress related disturbances in carbon, nitrogen and phosphorus balance. *BMC genomics*, 14(1), 442.
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., ... and Lohmann, J. U. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics*, 37(5), 501-506.
- Scott, I.M., Ward, J.L., Miller, S.J., Beale, M.H. 2014. Opposite variations in fumarate and malate dominate metabolic phenotypes of *Arabidopsis* salicylate mutants with abnormal biomass under chilling. *Physiol Plant* 152: 660–674.
- Sharma, K. D., and Nayyar, H. 2014. Cold stress alters transcription in meiotic anthers of cold tolerant chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC research notes*, 7(1), 717.
- Sharma, K.D., and Nayyar, H. 2016. Regulatory networks in pollen development under cold stress. *Frontiers in plant science*, 7, 402.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., and McLean, M.D. 1999. Metabolism and functions of gamma-

- aminobutyric acid. *Trends Plant Sci* **4**: 1360–1385.
- Shen, X., Miao, S., Zhang, Y., Guo, X., Li, W., Mao, X., and Zhang, Q. 2025. Stearic acid metabolism in human health and disease. *Clinical Nutrition*, **44**, 222-238.
- Shi, Y., Ding, Y., and Yang, S. 2018. Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation. *Trends in plant science*, **23**(7), 623-637.
- Shin, J. H., Kim, S. R., and An, G. 2009. Rice aldehyde dehydrogenase7 is needed for seed maturation and viability. *Plant physiology*, **149**(2), 905-915.
- Siboza, X.I., Bertling, I., and Odindo, A.O. 2014. Salicylic acid and methyl jasmonate improve chilling tolerance in cold-stored lemon fruit (*Citrus limon*). *J. Plant Physiol.* , **171**, 1722–1731.
- Singh, K.B., and Ocampo, B. 1997. Exploitation of wild *Cicer* species for yield improvement in chickpea. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 418–423. doi: 10.1007/s001220050578
- Singh, K.B., Malhotra, R.S., and Saxena, M.C. 1990. Sources for tolerance to cold in *Cicer* species. *Crop Science*, **30**(5), 1136-1138.
- Singh, K.B., Malhotra, R.S., and Saxena, M.C. 1995. Additional sources of tolerance to cold in cultivated and wild *Cicer* species. *Crop science*, **35**(5), 1491-1497.
- Singh, K.B., Malhotra, R.S., Saxena, M.C. 1989. Chickpea evaluation for cold tolerance under field conditions. *Crop Sci.* **29**, 282–285. doi: 10.2135/cropsci1989.0011183X002900020009x
- Singh, K.B., Malhotra, R.S., Saxena, M.C. 1993. Relationship between cold severity and yield loss in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Agron. Crop Sci.* **170**, 121–127.
- Singh, K.B., Malhotra, R.S., Saxena, M.C., and Bejiga, G. 1997. Superiority of winter sowing over traditional spring sowing of chickpea in the Mediterranean region. *Agronomy Journal*, **89**(1), 112-118.
- Singh, K.B., Ocampo, B., and Robertson, L.D. 1998. Diversity for abiotic and biotic stress resistance in the wild annual *Cicer* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **45**(1), 9-17.
- Singh, K.B., Saxena, M.C. 1993. *Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes* (UK, Wiley: Chichester), 17–35.
- Singh, N.H., Dhaliwal, G.S. 1972. Effect of soil temperature on seedling emergence in different crops. *Plant Soil.* **37**, 441–444.
- Singh, S., Gumber, R.K., Joshi, N., Singh, K. 2005. Introgression from wild *Cicer reticulatum* to cultivated chickpea for productivity and disease resistance. *Plant Breed.* **124**, 477–480. doi: 10.1111/j.1439-0523.2005.01146.x
- Singh, S., Singh, D., Rao, V.U.M. 2009. Seedling establishment of chickpea cultivars in varying sowing environments under field conditions. *J. Agrometeorol.* **11**, 148–151.
- Smart, K.F., Aggio, R.B., Van Houtte, J.R., & Villas-Bôas, S.G. 2010. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Nature*

- protocols*, 5(10), 1709-1729.
- Solanke, A.U., and Sharma, A.K. 2008. Signal transduction during cold stress in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14(1), 69-79.
- Song, Y., Liu, L., Wei, Y., Li, G., Yue, X., and An, L. 2017. Metabolite profiling of adh1 mutant response to cold stress in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2072.
- Srinivasan, A., Johansen, C., and Saxena, N.P. 1998. Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): characterization of stress and genetic variation in pod set. *Field Crops Research*, 57(2), 181-193.
- Srinivasan, A., Saxena, N. P., Johansen, C. 1999. Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): genetic variation in gamete development and function. *Field Crops Res.* 60, 209–222. doi: 10.1016/S0378-4290(98)00126-9
- Stocker, T. editor. 2014. Climate change 2013: the physical science basis: Working group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press.
- Streb, P., Aubert, S., Gout, E., and Bligny, R. 2003. Reversibility of cold-and light-stress tolerance and accompanying changes of metabolite and antioxidant levels in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *Journal of experimental botany*, 54(381), 405-418.
- Stumpf, D.K., and Burris, R.H. 1981. Biosynthesis of malonate in roots of soybean seedlings. *Plant physiology*, 68(5), 992-995.
- Su, L., Dai, Z., Li, S., and Xin, H. 2015. A novel system for evaluating drought–cold tolerance of grapevines using chlorophyll fluorescence. *BMC plant biology*, 15(1), 82.
- Sullivan, L.B., Gui, D.Y., Hosios, A.M., Bush, L.N., Freinkman, E., Vander Heiden, M.G. 2015. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell*, 162, 552–563.
- Sun, C. X., Gao, X. X., Li, M. Q., Fu, J. Q., and Zhang, Y.L. 2016. Plastic responses in the metabolome and functional traits of maize plants to temperature variations. *Plant biology*, 18(2), 249-261.
- Sun, Q., Ma, L., and Zhu, X. 2023. Metabolomics-based exploration the response mechanisms of *Saussurea involucreata* leaves under different levels of low temperature stress. *BMC genomics*, 24(1), 297.
- Sun, Y.L., Li, F., Su, N., Sun, X.L., Zhao, S. J., and Meng, Q.W. 2010. The increase in unsaturation of fatty acids of phosphatidylglycerol in thylakoid membrane enhanced salt tolerance in tomato. *Photosynthetica* 48, 400–408. doi: 10.1007/s11099-010-0052-1
- Sunkar, R., Bartels, D., and Kirch, H.H. 2003. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal*, 35(4), 452-464.
- Suzuki, N., and Mittler, R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia*

- plantarum, 126(1), 45-51.
- Sweetlove, L.J., Beard, K F., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., and Ratcliffe, R.G. 2010. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in plant science*, 15(8), 462-470.
- Sweetman, C., Deluc, L. G., Cramer, G. R., Ford, C. M., and Soole, K. L. 2009. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry*, 70(11-12), 1329-1344.
- Takahashi, D., Imai, H., Kawamura, Y., and Uemura, M. 2016. Lipid profiles of detergent resistant fractions of the plasma membrane in oat and rye in association with cold acclimation and freezing tolerance. *Cryobiology*, 72(2), 123-134.
- Takahashi, D., Uemura, M., and Kawamura, Y. 2018. Freezing tolerance of plant cells: from the aspect of plasma membrane and microdomain. Survival strategies in extreme cold and desiccation: Adaptation mechanisms and their applications, 61-79.
- Tang, W., and Tang, A.Y. 2021. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* malonyl-CoA synthetase gene enhances cold stress tolerance by activating mitogen-activated protein kinases in plant cells. *Journal of Forestry Research*, 32(2), 741-753.
- Thakur, P., Kumar, S., Malik, J.A., Berger, J.D., Nayyar, H. 2010. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Env. Exp. Bot.* 67, 429–443. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.09.004
- Theocharis, A., Clément, C., and Barka, E. A. 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, 235(6), 1091-1105.
- Tian, J., Tian, L., Chen, M., Chen, Y., and Wei, A. 2022. Low temperature affects fatty acids profiling and key synthesis genes expression patterns in *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2319.
- Tiwari, J. K., Sapna, D. E. V. I., Buckseth, T., Nilofer, A. L. I., Singh, R. K., Zinta, R., & Chakrabarti, S. K. 2020. Precision phenotyping of contrasting potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties in a novel aeroponics system for improving nitrogen use efficiency: In search of key traits and genes. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(1), 51-61.
- Toker, C. 2005. Preliminary screening and selection for cold tolerance in annual wild *Cicer* species. *Genet. Resour. Crop Evol.* 52, 1–5. doi: 10.1007/s10722-005-1743-5
- Toker, C., Berger, J., Eker, T., Sari, D., Sari, H., Gokturk, R.S., ... and von Wettberg, E.J. 2021. *Cicer turcicum*: A new *Cicer* species and its potential to improve chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 12, 662891.
- Tozawa, Y., Hasegawa, H., Terakawa, T., and Wakasa, K. 2001. Characterization of rice anthranilate synthase α -subunit genes OASA1 and OASA2. Tryptophan accumulation in transgenic rice expressing a feedback-insensitive mutant of OASA1. *Plant Physiology*, 126(4), 1493-1506.
- Tschoep, H., Gibon, Y., Carillo, P., Armengaud, P., Szecowka, M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Koehl, K., and Stitt, M. 2009. Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*

- Environ. 32, 300–318.
- Tsushida, T., and Murai, T. 1987. Conversion of glutamic acid to γ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(11), 2865-2871.
- Tully, R.E., Musgrave, M.E., Leopold, A.C. 1981. The seed coat as a control of imbibitional chilling injury. *Crop Sci.* 21, 312–317. doi: 10.2135/cropsci1981.0011183X002100020026x
- Uemura, M., and Steponkus, P.L. 1999. Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *Journal of Plant Research*, 112(2), 245.
- Uemura, M., Joseph, R.A., and Steponkus, P.L. 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant physiology*, 109(1), 15-30.
- Ullah, N., Yüce, M., Neslihan Öztürk Gökçe, Z., and Budak, H. 2017. Comparative metabolite profiling of drought stress in roots and leaves of seven Triticeae species. *BMC genomics*, 18(1), 969.
- Upadhyay, R.K., Handa, A.K., and Mattoo, A.K. 2019. Transcript Abundance Patterns of 9- and 13-Lipoxygenase Subfamily Gene Members in Response to Abiotic Stresses (Heat, Cold, Drought or Salt) in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Highlights Member-Specific Dynamics Relevant to Each Stress. *Genes*, 10, 683.
- Upchurch, R.G. 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology letters*, 30(6), 967-977.
- Vaillancourt, E., Haman, F., and Weber, J.M. 2009. Fuel selection in Wistar rats exposed to cold: shivering thermogenesis diverts fatty acids from re-esterification to oxidation. *The Journal of Physiology*, 587(17), 4349-4359.
- Vaitkevičiūtė, G., Aleliūnas, A., Gibon, Y., and Armonienė, R. 2022. The effect of cold acclimation, deacclimation and reacclimation on metabolite profiles and freezing tolerance in winter wheat. *Frontiers in Plant Science*, 13, 959118.
- van der Maesen, L.J.G., and Pundir, R.P.S. 1984. Availability and use of wild *Cicer* germplasm. *Plant Genet. Resour. Newsl.* 57: 19–24.
- Vanlerberghe, G.C. 2013. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6805–6847. doi: 10.3390/ijms14046805
- Varshney, R.K., Hiremath, P.J., Lekha, P., Kashiwagi, J., Balaji, J., Deokar, A.A., ... and Hoisington, D.A. 2009. A comprehensive resource of drought-and salinity-responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC genomics*, 10(1), 523.
- Varshney, R.K., Roorkiwal, M., Sun, S., Bajaj, P., Chitkineni, A., Thudi, M., ... and Liu, X. 2021. A chickpea genetic variation map based on the sequencing of 3,366 genomes. *Nature*, 599(7886), 622-627.
- Varshney, R.K., Song, C., Saxena, R.K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A.G., ... and Cook, D.R. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a

- resource for trait improvement. *Nature biotechnology*, 31(3), 240-246.
- Viswanath, K.K., Varakumar, P., Pamuru, R.R., Basha, S.J., Mehta, S., and Rao, A.D. 2020. Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *Journal of Plant Biology*, 63(2), 83-95.
- Vitor, S. C., do Amarante, L., and Sodek, L. 2018. Are phloem-derived amino acids the origin of the elevated malate concentration in the xylem sap following mineral N starvation in soybean?. *Planta*, 248(2), 437-449.
- Vrinten, P., Hu, Z., Munchinsky, M. A., Rowland, G., and Qiu, X. 2005. Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. *Plant physiology*, 139(1), 79-87.
- Wang, C., and Wang, X. 2001. A novel phospholipase D of *Arabidopsis* that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane. *Plant Physiol.* 127, 1102–1112. doi: 10.1104/pp.010444
- Wang, L., Fu, J., Li, M., Fragner, L., Weckwerth, W., and Yang, P. 2016. Metabolomic and proteomic profiles reveal the dynamics of primary metabolism during seed development of lotus (*Nelumbo nucifera*). *Frontiers in Plant Science*, 7, 750.
- Wang, L., Geng, G., Pi, Z., Xu, Y., Liu, Y., Li, R., ... and Wang, Y. 2023. Comparative proteomic analysis of two contrasting cultivars reveals the mechanism of sugar beet response to freezing stress. *Environmental and Experimental Botany*, 213, 105452.
- Wang, Q., An, B., Wei, Y., Reiter, R. J., Shi, H., Luo, H., and He, C. 2016. Melatonin regulates root meristem by repressing auxin synthesis and polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1882.
- Wang, Q.F., Zhao, Y., Yi, Q., Li, K.Z., Yu, Y.X. and Chen, L.M. 2010. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic tobacco leaves: enhanced malate synthesis and augmented Al-resistance. *Acta Physiol. Plant*, 32, 1209–1220.
- Wang, Q.J., Sun, H., Dong, Q.L., Sun, T.Y., Jin, Z.X., Hao, Y.J., and Yao, Y.X. 2016. The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via the cytosolic malate dehydrogenase gene in transgenic apple plants. *Plant biotechnology journal*, 14(10), 1986-1997.
- Wang, W., Wang, X., Lv, Z., Khanzada, A., Huang, M., Cai, J., ... and Jiang, D. 2022. Effects of cold and salicylic acid priming on free proline and sucrose accumulation in winter wheat under freezing stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(6), 2171-2184.
- Wei, C., Yang, H., Wang, S., Zhao, J., Liu, C., Gao, L., ... and Wan, X. (2018). Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(18), E4151-E4158.
- Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H.E. and Wang, X. 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses role of phospholipase D α in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 31994-32002.
- Wery, J. 1990. Adaptation to frost and drought stress in chickpea and implications in plant

- breeding. *Option Mediterraneennes-Ser. Seminaires* 9, 77–85.
- Wery, J., Silim, S. N., Knights, E. J., Malhotra, R. S., Cousin, R. 1994. “Screening techniques and sources of tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes,” in *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes* (Dordrecht: Springer), 439–456.
- Wilkinson, S., Clephan, A.L., and Davies, W.J. 2001. Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant *Commelina communis* leaves but not in cold-sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. *Plant Physiology*, 126(4), 1566-1578.
- Wu, Z.G., Jiang, W., Chen, S.L., Mantri, N., Tao, Z. M., and Jiang, C.X. 2016. Insights from the cold transcriptome and metabolome of *Dendrobium officinale*: global reprogramming of metabolic and gene regulation networks during cold acclimation. *Frontiers in plant science*, 7, 1653.
- Xie, H., Wang, Q., Zhang, P., Zhang, X., Huang, T., Guo, Y., ... and Qin, P. 2022. Transcriptomic and metabolomic analysis of the response of quinoa seedlings to low temperatures. *Biomolecules*, 12(7), 977.
- Xu, J., Chen, Z., Wang, F., Jia, W., and Xu, Z. 2020. Combined transcriptomic and metabolomic analyses uncover rearranged gene expression and metabolite metabolism in tobacco during cold acclimation. *Sci. Rep.* 10:5242. doi: 10.1038/s41598-020-62111-x
- Xu, J., Chen, Z., Wang, F., Jia, W., and Xu, Z. 2020. Combined transcriptomic and metabolomic analyses uncover rearranged gene expression and metabolite metabolism in tobacco during cold acclimation. *Scientific Reports*, 10(1), 5242.
- Yaeno, T., Matsuda, O., and Iba, K. 2004. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J.* 40, 931–941. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02260.x
- Yagi, T., Sako, M., Moriuti, S., Shounaka, M., Masaki, K., & Yamamoto, S. 1993. Purification and characterization of aspartate aminotransferase isoenzymes from Rice Bran. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(12), 2074-2080.
- Yan, B., Chang, C., Gu, Y., Sui, Y., Zheng, N., Fang, Y., ... and Zhang, L. 2025. Lipidomic remodeling in *Cannabis sativa* L. under cold tolerance. *Industrial Crops and Products*, 224, 120346.
- Yancey, P.H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cyro-protectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* 208: 2819-2830.
- Yao, Y.X., Dong, Q.L., Zhai, H., You, C.X. and Hao, Y.J. 2011. The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 257–264.
- Zell, M.B., Fahnenstich, H., Maier, A., Saigo, M., Voznesenskaya, E.V., Edwards, G.E., ...and Maurino, V.G. 2010. Analysis of *Arabidopsis* with highly reduced levels of malate and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. *Plant Physiology*, 152(3), 1251-1262.
- Zhang, B., Jia, D., Gao, Z., Dong, Q., and He, L. Physiological responses to low

- temperature in spring and winter wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, 96, 1967–1973.
- Zhang, J., Luo, W., Zhao, Y., Xu, Y., Song, S., and Chong, K. 2016. Comparative metabolomic analysis reveals a reactive oxygen species-dominated dynamic model underlying chilling environment adaptation and tolerance in rice. *New Phytologist*, 211(4), 1295-1310.
- Zhang, W., Wang, C., Qin, C., Wood, T., Olafsdottir, G., Welte, R., et al. 2003. The oleate-stimulated phospholipase D, PLD δ , and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 2285–2295. doi: 10.1105/tpc.013961
- Zhang, W.F., Gong, Z.H., Wu, M.B., Chan, H., Yuan, Y.J., Tang, N., ... and Deng, W. 2019. Integrative comparative analyses of metabolite and transcript profiles uncovers complex regulatory network in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit undergoing chilling injury. *Scientific reports*, 9(1), 4470.
- Zhang, Y., and Fernie, A.R. (2023). The role of TCA cycle enzymes in plants. *Advanced Biology*, 7(8), 2200238.
- Zhang, Y., and Fernie, A.R. 2018. On the role of the tricarboxylic acid cycle in plant productivity. *Journal of integrative plant biology*, 60(12), 1199-1216.
- Zhang, Y., Swart, C., Alseekh, S., Scossa, F., Jiang, L., Obata, T., ... and Fernie, A.R. 2018. The extra-pathway interactome of the TCA cycle: expected and unexpected metabolic interactions. *Plant Physiology*, 177(3), 966-979.
- Zhao, L., Yang, T., Xing, C., Dong, H., Qi, K., Gao, J., ... and Huang, X. 2019. The β -amylase PbrBAM3 from pear (*Pyrus betulaefolia*) regulates soluble sugar accumulation and ROS homeostasis in response to cold stress. *Plant science*, 287, 110184.
- Zhou, F., Gao, Y., Wang, H., Gou, S., Zhao, Y., Wei, Z., ... and Bai, J. 2025. CsERF21-l-CsASA2 module positively regulates cold tolerance by promoting tryptophan biosynthesis in tea plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 221, 109610.
- Zhu, J.K. 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.
- Zhukov, A.V. 2015. Palmitic acid and its role in the structure and functions of plant cell membranes. *Russian journal of plant physiology*, 62(5), 706-713.

ÖZGEÇMİŞ

Tuba DOĞRAMACI

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2020-2025	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri A.B.D., Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2020	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri A.B.D., Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2013-2017	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Tene, T.M., **Eker, T.**, Canci, H., Babacan, U., Cengiz, M.F., and Toker, C. 2025. Star of biochemical traits of heat-tolerant and heat-sensitive *Phaseolus* genotypes in coping with heat stress. *Plant Growth Regulation*, 1-18. Q1
2. Sari, H., **Eker, T.**, Tosun, H.S., Mutlu, N., Celik, I., and Toker, C. 2023. Mapping QTLs for super-earliness and agro-morphological traits in RILs population derived from interspecific crosses between *Pisum sativum* × *P. fulvum*. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(1), 663-676. Q2
3. Bulat, F., Sari, D., Sari, H., **Eker, T.**, Özay, H., and Toker, C. 2023. Molecular identification of ascochyta blight of *Cicer montbretii* Jaub. & Spach. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 36(1), 7-12. ESCI
4. Tene, T. M., Sari, H., Canci, H., Maaruf, A., **Eker, T.**, and Toker, C. 2023. Traits related to heat stress in *Phaseolus* species. *Agriculture*, 13(5), 953. Q1
5. Sari, H., **Eker, T.**, Sari, D., Aksoy, M., Bakır, M., Dogdu, V., Toker, C., and Canci, H. 2023. The Fastest and Most Reliable Identification of True Hybrids in the Genus *Pisum* L. *Life*, 13(11), 2222. Q2
6. **Eker, T.**, Erler, F., Sari, H., Sari, D., Berger, J., and Toker, C. 2022. Deployment of *Cicer echinospermum* PH Davis for resistance to *Callosobruchus chinensis* L. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129(4), 843-851. Q2

7. **Eker, T.**, Sari, H., Sari, D., Canci, H., Arslan, M., Aydinoglu, B., Ozay, H., and Toker, C. 2022. Advantage of multiple pods and compound leaf in kabuli chickpea under heat stress conditions. *Agronomy*, 12(3), 557. Q1
8. Sari, D., Sari, H., **Eker, T.**, Ikten, C., Uzun, B., and Toker, C. 2022. Intraspecific versus interspecific crosses for superior progeny in *Cicer* species. *Crop Science*, 62(6), 2122-2137. Q2
9. **Eker, T.**, Sari, D., Sari, H., Tosun, H.S., and Toker, C. 2022. A kabuli chickpea ideotype. *Scientific reports*, 12(1), 1611. Q1
10. Sari, H., Sari, D., **Eker, T.**, and Toker, C. 2021. De novo super-early progeny in interspecific crosses *Pisum sativum* L.× *P. fulvum* Sibth. et Sm. *Scientific Reports*, 11(1), 19706. Q1
11. Toker, C., Berger, J., **Eker, T.**, Sari, D., Sari, H., Gokturk, R.S., ... & von Wettberg, E.J. 2021. *Cicer turcicum*: A new *Cicer* species and its potential to improve chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 12, 662891. Q1
12. Sari, H., Sari, D., **Eker, T.**, Zeybek, A., and Toker, C. 2021. Effect of seed priming on germination of relict beautiful vavilov, *Vavilovia formosa* (Stev.) Al. Fed. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 34(1), 101-108.
13. Chrigui, N., Sari, D., Sari, H., **Eker, T.**, Cengiz, M.F., Ikten, C., and Toker, C. 2020. Introgression of resistance to leafminer (*Liriomyza cicerina* Rondani) from *Cicer reticulatum* Ladiz. to *C. arietinum* L. and relationships between potential biochemical selection criteria. *Agronomy*, 11(1), 57. Q1
14. Aydin, H., Sari, D., Sari, H., **Eker, T.**, Aykurt, C., and Toker, C. 2021. Phylogenetic relationships among *Pisum* L. species from Asia Minor inferred from pollen and seed coat morphology. *Grana*, 60(5), 347-355. Q3
15. Kivrak, K. G., **Eker, T.**, Sari, H., Sari, D., Akan, K., Aydinoglu, B., Catal, M., and Toker, C. 2020. Integration of extra-large-seeded and double-podded traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Agronomy*, 10(6), 901. Q1
16. Sari, H., Sari, D., **Eker, T.**, Aydinoglu, B., Canci, H., Ikten, C., Goktuürk, R.S., Zeybek, A., Symkal, P., and Toker, C. 2020. Inheritance and expressivity of neoplasm trait in crosses between the domestic pea (*Pisum sativum* subsp. *sativum*) and tall wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*). *Agronomy*, 10(12), 1869. Q1
17. Esen, A., Sari, H., Erler, F., Adak, A., Sari, D., **Eker, T.**, ... and Toker, C. 2019. Screening and selection of accessions in the genus *Pisum* L. for resistance to pulse beetle (*Callosobruchus chinensis* L.). *Euphytica*, 215(4), 82. Q2
18. Celmeli, T., Sari, H., Canci, H., Sari, D., Adak, A., **Eker, T.**, and Toker, C. 2018. The nutritional content of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in comparison to modern varieties. *Agronomy*, 8(9), 166. Q1
19. **Eker, T.**, Erler, F., Adak, A., Imrek, B., Guven, H., Tosun, H. S., ... and Ikten, C. 2018. Screening of chickpea accessions for resistance against the pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L.(Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 76, 51-57. Q1

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Ma'ruf, A., Sari, D., **Eker, T.**, Sari, H., and Toker, C. Impact of Wild *Cicer* Species on Production under Climate Change, Tam Metin Bildiri, Proceedings of The Third

- International Conference on Sustainable Innovation (ICoSI 2019), 30 Temmuz 2019, 31 Temmuz 2019.
2. Toker, C., Bakır, M., Sarı, H., Sarı, D., Adak, A., **Eker, T.**, Çancı, H., Mutlu, N., and P. Symkal, P. Relationship between transgressive segregations and genetic distances based on SRR markers in *Pisum* species, Özet Bildiri, European Biotechnology Congress, 26 Nisan 2018, 28 Nisan 2018.
 3. Sarı, H., Esen, A., Erler, F., Adak, A., Sarı, D., **Eker, T.**, Cenci, H., Ikten, C., Kahriman, A. and Toker, C. Evaluation of *Pisum* Species for Resistance to the Pulse Beetle, *Callosobruchus chinensis* L., Özet Bildiri, 1st International GAP Agriculture and Livestock Congress, UGAP 2018, 25 Nisan 2018, 27 Nisan 2018.
 4. Erler, F., **Eker, T.**, Imrek, B., Güven, H., Toker, C., Tosun, H.S., Sarı, D., Sarı, H., and Adak, A. Evaluation of chickpea genotypes for resistance against the pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae)., Özet Bildiri, International Congress of the New Approaches and Technologies for Sustainable Development, 21 Eylül 2017, 24 Eylül 2017.

