



**FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) GENOTİPLERİNDE
KURAKLIK VE TUZ STRESİ KOŞULLARINDA
MELATONİN UYGULAMASININ EPİGENETİK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Recep AYDINYURT

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Emre İLHAN**

2023

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) GENOTİPLERİNDE KURAKLIK ve TUZ
STRESİ KOŞULLARINDA MELATONİN UYGULANMASININ EPİGENETİK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Recep AYDINYURT

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emre İLHAN

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2023

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

31 / 08 / 2023

İmzası

Recep AYDINYURT

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) GENOTİPLERİNDE KURAKLIK ve TUZ STRESİ KOŞULLARINDA MELATONİN UYGULANMASININ EPİGENETİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Recep AYDINYURT

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emre İLHAN

Fasulye yüksek protein, düşük yağ, yüksek oranda vitamin ve mineral içerdiği için insan beslenmesinde kullanılan önemli bir baklagil türüdür. Bitkiler yaşamları boyunca çeşitli biyotik ve abiyotik streslere maruz kalırlar ve streslere dayanıklılıkta çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu çalışmada kuraklık ve tuz stresi koşulları altında fasulye genotiplerine ekzojen olarak uygulanan melatoninin kök ve yaprak dokularında biyokimyasal ve epigenetik değişimlerine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yedi gün boyunca çimlendirilen tohumlar daha sonra Hoagland çözeltisi içeren kaplarda 5 yapraklı döneme kadar yetiştirilmiş ve bu bitkilere 0 ve 200 µM melatonin püskürtme yöntemiyle yapraktan uygulanmıştır. 24 saat sonra farklı dozlarda tuz (0 ve 150 mM) ve PEG6000 (%0 ve %20) içeren Hoagland çözeltisine alınmıştır. Araştırmada biyokimyasal MDA ve H₂O₂, antioksidan enzim aktivitesi (SOD, POD ve CAT) ve DNA metilasyon değişimleri (CRED-iPBS) tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda her iki genotip üzerinde uygulanan stresler MDA ve H₂O₂ miktarlarında artışa; tuz stresinde uygulanan melatonin ise bu parametrelerde azalışa neden olduğu belirlenmiştir. Genotiplerin SOD, POD ve CAT antioksidan aktiviteleri uygulamalara göre değişkenlik göstermiştir. Diğer taraftan DNA metilasyonu sonuçlarına göre hem stres koşulları hem de melatonin uygulaması DNA metilasyonlarında değişime neden olmuştur. Fasulyede tuz ve kuraklık stresi koşulları altında melatoninin bu etkisinin genomik ve transkriptomik seviyelerde belirlenmesi bu çalışmadaki bulguları destekler nitelikte olacaktır.

2023, 85 sayfa

Anahtar Kelimeler: CRED-İPBS, Epigenetik, Gen ifadesi, *HpaII*, Metilasyon, *MspI*, Stres

ABSTRACT

MS. Thesis

EPIGENETIC EVALUATION OF MELATONIN APPLICATION in DROUGHT and SALT STRESS CONDITIONS in BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) GENOTYPES

Recep AYDINYURT

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emre İLHAN

Common beans are an important type of legume used in human nutrition to obtain high protein, low fat, high levels of vitamins and minerals. Plants are exposed to various biotic and abiotic stresses throughout their lives, and they have developed various mechanisms to withstand against stresses. The purpose of this study was to ascertain the impact of exogenous melatonin application to bean genotypes on biochemical and epigenetic alterations in root and leaf tissues under salt and drought stress conditions. The seeds germinated for seven days were then grown in containers with Hoagland's solution until the 5-leaf stage and 0 and 200 μ M melatonin was foliar sprayed to these plants. After 24 hours, they were placed in Hoagland's solution containing different doses of salt (0 and 150 mM) and PEG6000 (0 and 20%). Biochemical MDA and H₂O₂, antioxidant enzyme activity (SOD, POD and CAT) and DNA methylation changes (CRED-iPBS) were determined. The investigation revealed that the stresses provided to both genotypes increased the levels of MDA and H₂O₂, but the application of melatonin during salt stress decreased these parameters. SOD, POD and CAT antioxidant activities of the genotypes varied according to the treatments. Furthermore, according to DNA methylation results, both stress conditions and melatonin treatment caused changes in DNA methylation. Determination of this effect of melatonin under salt and drought stress conditions in bean at genomic and transcriptomic levels will support the findings of this study.

2023, 85 page

Keywords: CRED-IPBS, Epigenetics, Gene expression, *HpaII*, Methylation, *MspI*, Stress

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca; tez çalışmalarımın her aşamasında gerek bilgi, birikim ve tecrübeleri ile gerekse akademik ve manevi açıdan sağladığı desteklerden ötürü değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Emre İLHAN'a,

Çalışmalarım sırasında, istatistiksel analizler ve tez yazımında bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Murat AYDIN'a (Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Biyoteknoloji Anabilim Dalı), Arş. Gör. Ayşe Gül KASAPOĞLU'na, doktora öğrencileri Uzman Selman MUSLU'ya ve Ahmed Sidar AYGÖREN'e, Ziraat Yüksek Mühendisi Sümeyra UÇAR'a ve Esra YAPRAK'a ve yüksek lisans öğrencisi Burak Muhammed ÖNER'e

Laboratuvar kullanımı nedeniyle Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvar Koordinatörlüğüne,

Tez çalışmamda maddi kaynak sağladığı için Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Hayatım boyunca maddi ve manevi tüm destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Recep AYDINYURT
Ağustos 2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Bitki materyali.....	21
3.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve kimyasal içerikleri.....	21
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Araştırmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	24
3.2.2. Çalışmada kullanılan stres ajanları ve iyileştirici kimyasalların hazırlanışı.....	24
3.2.3. Biyokimyasal analiz amacıyla kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	25
3.2.4 CRED-iPBS çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	27
3.2.5 Jel elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler.....	29
3.2.6. Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirilmesi, bitkilerin yetiştirilmesi ve kimyasal ajanların uygulanması.....	29
3.3. Araştırmada incelenen konular.....	32
3.3.1. Biyokimyasal analizler.....	32
3.3.2. CRED-iPBS PCR analizleri.....	34
3.4. CRED-iPBS yönteminin uygulanması.....	36
3.4.1. CRED-iPBS PCR analizi.....	37
3.4.2. Elektroforez işlemi.....	37
3.4.3. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi.....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	39
4.1. Biyokimyasal Analizler.....	39

4.2. CRED-iPBS Analizleri	52
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	71



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
°	Derece
C	Santigrat
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
mg	Miligram

Kısaltmalar

ABA	Absisik Asit
APX	Peroksidaz
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyicileri
CAT	Katalaz
DNMT	DNA Metiltransferazlar
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FMO	Tüm Metilasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HMO	Yarı Metilasyon
İPBS	Primerler Arası Bağlanma Bölgesi
MDA	Malondialdehit
MEL	Melatonin
PEG	Polietilen Glikol
RE	Restriksiyon Enzimi
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TMO	Toplam Metilasyon
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 2000-2021 yılları arasında kuru fasulye üretim ve verim miktarı	2
Şekil 1.2. Kuru fasulye üretiminin kıtalara göre dağılımı	2
Şekil 1.3. Biyotik ve abiyotik stres faktörlerine genel bir bakış.....	4
Şekil 1.4. DNA metilasyonunun şematik gösterimi.....	8
Şekil.1.5. Melatonin'in genel yapısı	10
Şekil 4.1. iPBS 2395 primerine ait jel görüntüsü	54



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Hoagland ve arnon (H2395) ortamında kullanılan kimyasallar ve miktarları (Hoagland and Arnon 1938).	21
Çizelge 3.2. Enzim aktivitesi ölçümü amacıyla kullanılan kimyasallar	22
Çizelge 3.3. DNA izolasyonu, CRED, iPBS PCR ve jel elektroforez çalışmalarında kullanılan çözelti ve kimyasallar.....	23
Çizelge 3.4. İPBS çalışmasında kullanılan primerleri, bağlanma sıcaklığı ve baz dizisi	23
Çizelge 3.5. Stok çözülden alınan NaCl miktarları.....	24
Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan örneklerin jel yükleme sırası.....	30
Çizelge 3.7. Örneklerden elde edilen DNA'ların nanodrop spektrofotometre ölçümleri.....	35
Çizelge 3.8. PCR bileşenleri, miktarları ve PCR şartları.....	37
Çizelge 3.9. <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> enzimlerinin kesim durumunu göstermektedir. 0: bant yok, 1: bant mevcut demektir. Altı çizili sitozin metillenmiştir (Zhang et al. 2016).	38
Çizelge 4.1. Tuz stresi altında MDA miktarına ait varyans analiz sonuçları	40
Çizelge 4.2. NaCl ve melatonin uygulamalarına göre genotiplerin MDA, H ₂ O ₂ , SOD, POD ve CAT miktarları ¹	41
Çizelge 4.3. Tuz stresi altında H ₂ O ₂ miktarına ait varyans analiz sonuçları	42
Çizelge 4.4. Tuz stresi altında SOD miktarına ait varyans analiz sonuçları.....	43
Çizelge 4.5. Tuz stresi altında POD miktarına ait varyans analiz sonuçları.....	44
Çizelge 4.6. Tuz stresi altında CAT miktarına ait varyans analiz sonuçları.....	45
Çizelge 4.7. Kuraklık stresi altında MDA miktarına ait varyans analiz sonuçları	47
Çizelge 4.8. PEG6000 ve melatonin uygulamalarına göre genotiplerin MDA, H ₂ O ₂ , SOD, POD ve CAT miktarları.	47
Çizelge 4.9. Kuraklık stresi altında H ₂ O ₂ miktarına ait varyans analiz sonuçları	49
Çizelge 4.10. Kuraklık stresi altında SOD miktarına ait varyans analiz sonuçları.....	50
Çizelge 4.11. Kuraklık stresi altında POD miktarına ait varyans analiz sonuçları.....	51
Çizelge 4.12. Kuraklık stresi altında CAT miktarına ait varyans analiz sonuçları.....	52

Çizelge 4.13. Serra çeşidinin kök ve yaprak dokularındaki tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri	55
Çizelge 4.14. Elkoca 05 çeşidinin kök ve yaprak dokularındaki tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri.	58
Çizelge 4.15. Serra çeşidinin kök ve yaprak dokularındaki kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri.	59
Çizelge 4.16. Elkoca-05 çeşidinin kök ve yaprak dokularındaki kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri.....	60
Çizelge 4.17. Serra çeşidinin kök ve yaprak dokularında tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarında CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve (%) HMO, FMO ve TMO değerleri.	62
Çizelge 4.18. Elkoca 05 çeşidinin kök ve yaprak dokularında tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarında CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve (%) HMO, FMO ve TMO değerleri.	62
Çizelge 4.19. Serra çeşidinin kök ve yaprak dokularında kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarında CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve (%) HMO, FMO ve TMO değerleri.	62
Çizelge 4.20. Elkoca 05 çeşidinin kök ve yaprak dokularında kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarında CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve (%) HMO, FMO ve TMO değerleri.	63

1. GİRİŞ

Baklagiller (Fabaceae), içerdiği yüksek besin değerinden dolayı insanlar için temel besin kaynağıdır (Tharanathan and Mahadevamma 2003). Özellikle dünya nüfusunun beslenmesinde kuru tahıl olarak yaklaşık 20 baklagil türü mevcuttur (de Almeida Costa et al. 2006; Lin et al. 2008). Fabaceae familyasından Leguminosae'nin bir üyesi olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), yemeklik tane baklagillerden tür çeşitliliği yönünden oldukça zengin olan ve insan beslenmesinde önemli yer tutan bitkisel üründür (Bressani 1993; Graham and Ranalli 1997). Şimdiye kadar bilinen 50 adet fasulye türü olmasına rağmen bunlardan yalnızca beş tür (*P. vulgaris*, *Phaseolus lunatus* L., *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus acutifolius* A. Gray ve *Phaseolus polyanthus* Greenm.) temelde insan gıdası olarak kullanılmaktadır. Bu türler arasında en yaygın olarak kullanılanı ise *P. vulgaris* (2n=22 diploid)'dir (Broughton et al. 2003). *Phaseolus* cinsi yaklaşık 4 milyon yıl önce Mezoamerika'da ortaya çıkmıştır ve bu bölgede oldukça yaygın bulunmaktadır (Gepts et al. 1991; Delgado-Salinas et al. 2006).

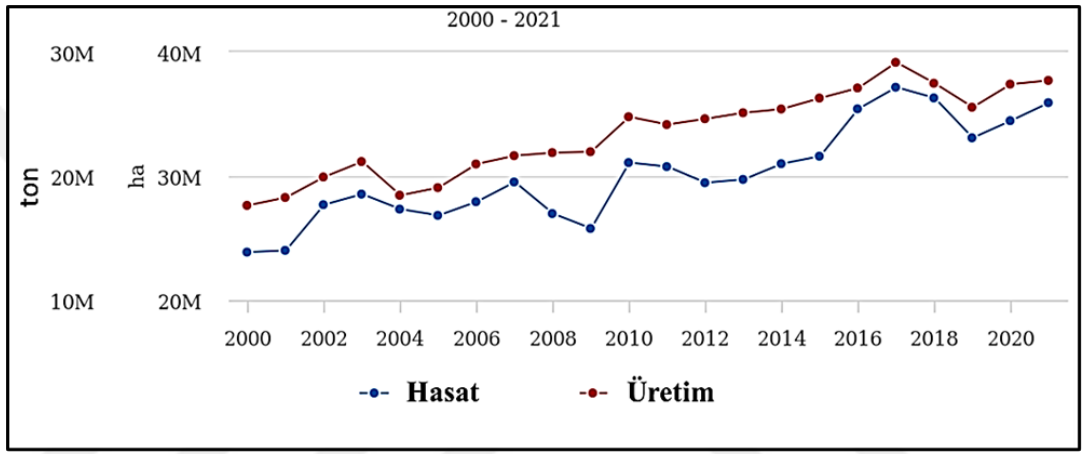
Fasulye, içerdiği yüksek proteinin yanında, karbonhidrat, lif, fitik asit, lektin, doymamış yağ asitleri ve vitamince (tiyamin (B1), askorbik asit (C), niyasin (B3), riboflavin (B2), B6 ve alfa tokoferol (E)) bakımından zengin bir bitkisel üründür. Aynı zamanda, fenolik asitler, flavonoidler ve proantosiyanidin gibi güçlü antioksidanları da bünyesinde barındırmaktadır (García-Lafuente et al. 2014; Nawaz et al. 2020). Fasulyedeki bu fenolik bileşikler, metal larını şelatlayarak ve/veya radikal üretim sürecinde yer alan enzimleri inhibe ederek serbest radikal türlerinin gelişimini sınırlama yeteneğine sahip olduklarından, antioksidanlar ve antimutajenik maddeler olarak hareket etme yeteneğine sahiptirler (Decker 1995; Rocha-Guzman et al. 2007). Bu fonksiyonel özellikleri nedeniyle fasulye sağlıklı beslenmenin önemli bir bileşeni olarak kabul edilmektedir.

Protein yetersizliği birçok ülkede önemli bir sorundur, özellikle yeterince et tüketimi olmayan bölgelerde yaşayan insanlar proteinin bir bölümünü fasulyeden karşılayabilmektedir (Granito et al. 2002). Günümüzde, fasulye, antimikrobiyal, antikanser, antioksidan, antiobezite, diyabet ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi çok çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde yararlı fizyolojik

1. GİRİŞ

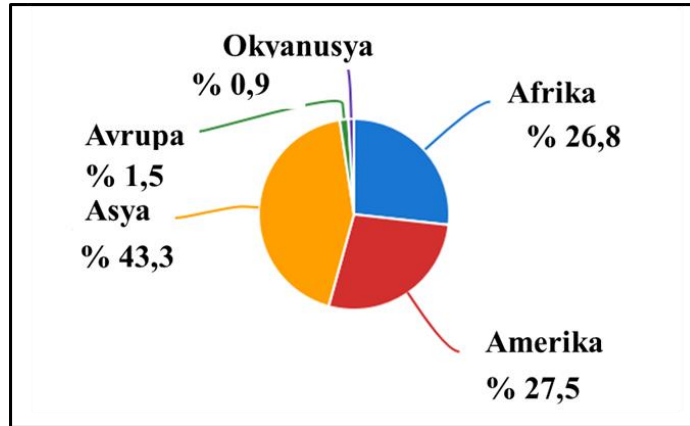
etkileri nedeniyle sağlık alanında oldukça ilgi görmüştür (Jenkins 2007; Chung et al. 2008; Zou and Chang 2014).

Kuru fasulye dünyada yaklaşık 126 ülkede yetiştirilmektedir ve baklagiller arasında en fazla ekim alanına sahiptir. FAO 2021 verilerine göre, dünya genelinde 34,8 milyon ha ekim alanında, 27,7 milyon ton kuru fasulye üretimi gerçekleştirilmiştir. Genel olarak kuru fasulye üretiminde yıllara göre artışlar meydana gelmiş ancak 2016 yılından bu yana fasulye üretiminde azalma gerçekleşmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. 2000-2021 yılları arasında kuru fasulye üretim ve verim miktarı (Anonymous 2021).

Yine, FAO 2021 verilerine göre, dünya toplam kuru fasulye üretiminin %43,3'ünü Asya, %27,5'ini Amerika, %26,8'ini Afrika, %1,5'ini Avrupa ve %0,9'unu Okyanusya oluşturmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Kuru fasulye üretiminin kıtalara göre dağılımı

1. GİRİŞ

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2020 verilerine göre kuru fasulye Türkiye’de, yaklaşık olarak 1,03 milyon dekar ekim alanına ve 279,51 bin ton üretime sahiptir. Aynı zamanda Türkiye’de ortalama verim 271 kg/da olarak gerçekleşmiştir (Anonim 2023).

Giderek artan dünya nüfusuna paralel olarak artan gıda talebini karşılayabilmek araştırmacılar tarafında küresel bir önceliktir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde gıda ihtiyacının daha fazla olacağı tahmin edilmektedir (Alexandratos and Bruinsma 2012). Bu sorunun üstesinden gelmek için bitkisel ürünlerin verim ve kalitesini arttırmaya yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir (Beebe et al. 2012).

Bitkiler doğaları gereği sesil organizmalar olduğundan dolayı hareket edemezler ve bundan dolayı buldukları yerde büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyen biyotik (böcek, nematod, fungus, bakteri, virüs vb.) ve abiyotik (tuz, kuraklık, sıcaklık, soğuk, sıcak vb.) stres etmenlerine sürekli maruz kalabilmektedirler (Koyro et al. 2012; Korkmaz ve Durmaz 2017) (Şekil 1.3). Bu stres etmenlerinden olan tuzluluk ve kuraklık dünyadaki ekilebilir arazilerin %10’undan fazlasını etkilemekte ve bitkisel ürünlerin gelişimini, büyümesini sınırlandırarak ciddi kayıplara yol açmaktadır (Bray et al. 2000). Fasulye glükofit bir bitki olduğundan dolayı yüksek tuz stresine toleranslı değildir. Özellikle dünyada, tuzluluk fasulye üretiminde ciddi azalmalara sebep olmuştur (Munns and Tester 2008).

1. GİRİŞ



Şekil 1.3. Biyotik ve abiyotik stres faktörlerine genel bir bakış (Baweja and Kumari 2020)

Toprak ve/veya su tuzluluğu, tuz içeriğinin oldukça yüksek olduğu yarı kurak ya da kurak alanlarda yetişen bitkilerin gelişimini, verim ve kalitesini azaltan abiyotik stres faktörlerinden biridir. Toprak tuzluluğu, ürün verimini ve üretkenliğini azaltarak dünya tarımı için küresel bir tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca tuzluluk sürdürülebilir tarımın gelecek yıllarda zarar görmesine yol açmaktadır. Yeryüzünde sulama alanlarının 45 milyon hektarından daha fazlası tuzluluktan zarar görmekte ve her yıl yaklaşık 1,5 milyon hektar toprak, yüksek tuzluluk seviyesinin bir sonucu olarak üretimden çıkarılmaktadır (Munns and Tester 2008). Diğer taraftan, dünyadaki kara alanlarının yaklaşık %7'sinin tuzluluktan etkilendiği tahmin edilmektedir (Rozema and Flowers 2008). Tuz stresi bitkilerde ozmotik stres ve iyon toksisitesi olmak üzere iki temel etkiye sahiptir. Aynı zamanda, toprakta bulunan yüksek ozmotik basıncın artmasına neden olarak bitkilerin K^+ ve Ca^{+2} gibi minerallerin almasını engellemektedir.

Tuzluluk stresi, bitkilerde hücre genişlemesi ve membran fonksiyonunun bozulmasının yanı sıra sitozolik metabolizmanın azalmasına da yol açmaktadır (Gull et

1. GİRİŞ

al. 2019). Aynı zamanda, tuzluluk sonucunda oluşan tuz iyonları bitkilerde toksik etkiye neden olmaktadır (Purty et al. 2008).

İklim değişikliği ile ortaya çıkan kuraklığın giderek artması tarımsal uygulamaları önemli ölçüde etkilemektedir. Bitkilerin tüm gelişme safhalarında kuraklığın meydana getirdiği olumsuz etkiler ortaya çıkmaktadır (Iwuala et al. 2019). Günümüzde, sıcaklık ve atmosferik CO₂ seviyelerindeki sürekli artışı dünya genelinde iklim değişikliğine yol açmıştır. Sıcaklık artışı ile yeryüzüne düşen ortalama yağış miktarının azalması kuraklık oranını artırmıştır. Şiddetli kuraklık koşulları nedeniyle bitkilerin kullanabileceği toprak suyu giderek azalmaktadır (Trenberth et al. 2014; Gull et al. 2019). Kuraklık stresi, bitkilerde biyokütleği azaltıp, bitkinin büyümesini ve gelişimini sınırlandırmaktadır. Kurak şartlarda, ilk olarak toprağın, daha sonra da bitkinin su alma potansiyeli azalır ve ilerleyen dönemlerde turgor basıncında düşüş meydana gelir. Bu düşüş stomaların kapanmasına neden olarak yaprak büyümesinin durmasına yol açar ve böylece fotosentezde ciddi düşüş meydana gelir (Anjum et al. 2011; Liu et al. 2018).

Tuz ve kuraklık stresi bitkilerde fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikler meydana getirmektedir (Nabi et al. 2019). Stres etmenleri sonucunda, stoma açıklığı, azalan CO₂ seviyesi ve fotosentez olaylarının zarar görmesi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) üretilmesine neden olmaktadır. Calvin döngüsünde elektron taşınmasında herhangi bir aksaklık fotosentez sırasında yüksek bir elektron sızıntısına yol açarak abiyotik stres kaynaklı reaktif oksijen türlerinin seviyelerini arttırmaktadır (Nadarajah et al. 2020).

ROT, redoks (indirgeme-oksidasyon) reaksiyonlarına girebilen ve biyolojik makromoleküller üzerinde oksidatif modifikasyonlar oluşturabilen ve böylece redoks sinyaline katkıda bulunabilen reaktif nitrojen, kükürt, karbon, selenyum, elektrofil ve halojen (RHS) türleri dahil olmak üzere reaktif türler ailesinin bir parçasıdır (Sies et al. 2022) ROT'lar, atmosferik oksijenin kısmen indirgenmiş veya uyarılmış formlarıdır. ROT'lar normal süreçlerde mitokondri, kloroplast, apoplast, endoplazmik retikulum ve peroksizom gibi hücre organellerinde sinyal molekülleri olarak işlev görmektedirler (Mitler 2017). ROT'ların birçok formu [hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikalleri (OH⁻), tekli oksijen (¹O₂) süperoksit anyonu (O₂⁻)] bulunmaktadır. Stres etmenleri

1. GİRİŞ

altında bitkilerde ROT üretimi artmaktadır. Artan ROT'lar fotosentetik pigmentleri, nükleik asitleri, proteinleri ve hücre membran lipidlerini parçalayarak bitkilerde oksidatif strese neden olmaktadır. ROT'lar son derece reaktiftir ve hücrelerde ciddi hasara neden olup bitkilerde ölüme yol açabilmektedir (Gill and Tuteja 2010; Moustafa-Farag et al. 2020). Diğer taraftan, hücrede artan ROT'un membranlara verdiği hasar sonucunda lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) üretilmektedir (Wang et al. 2019; Laxa et al. 2019). MDA'daki artış hücre membran hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Godoy 2021).

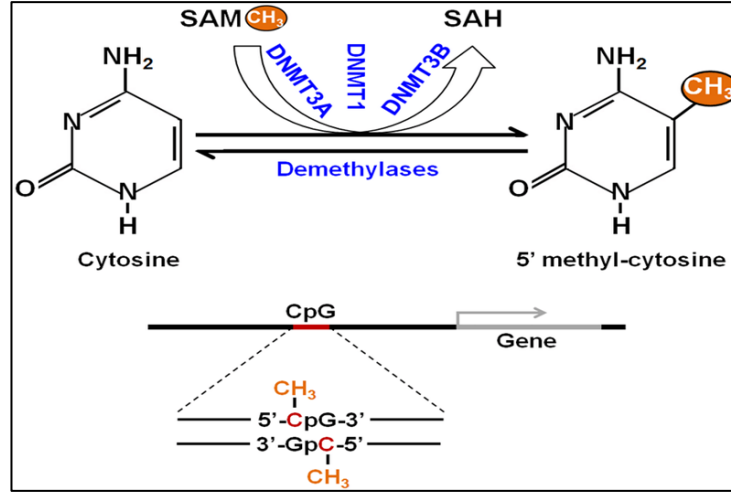
Bitkiler oksidatif hasara fizyolojik, moleküler ve hücresel seviyelerde yanıt vermektedir (Godoy et al. 2021). Bitkiler oksidatif hasar karşısında doğal bir savunma mekanizması geliştirmektedirler. Bu savunma stres sonucu artan ROT'ların temizlenmesine dayanmaktadır. Bu savunma mekanizması, bitkiler tarafından antioksidanların üretilmesi yoluyla geliştirilmektedir. Bitkilerde enzimatik [katalaz (CAT), peroksidaz (APX), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), dehidro askorbat redüktaz (DHAR), glutatyon askorbat monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), -S-transferaz (GST)] ve enzimatik olmayan [α -tokoferol, askorbat (AsA), fenolik bileşikler, karotenoidler, alkaloidler, glutatyon (GSH), flavonoidler ve prolin] antioksidan savunma mekanizmaları ile hücresel hasar azaltılabilmektedir (Caverzan et al. 2016; Ali et al. 2021).

Stres şartlarında bitkilerde antioksidanlardan farklı olarak koruma mekanizmaları geliştirilmektedir. Kuraklık, tuzluluk, soğuk gibi çeşitli abiyotik bitkilerde, absisik asidin (ABA) yükselmesine neden olur. ABA, stoma açılması, tohum gelişimi, embriyo morfogenezi, dormansi, proteinleri depolama ve lipidlerin sentezi gibi bitki gelişiminin çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde görev alan bir fitohormondur (Sreenivasulu et al. 2012). Bu özellikler bakımından ABA, bitkilerin yaşamsal döngülerinde birden çok fonksiyona sahiptir. Bununla birlikte, stres toleransındaki temel rolü ile stres hormonu olarak da bilinmektedir. Aynı zamanda, bitkilerin abiyotik ve biyotik streslere karşı adaptif tepkisinde yer alan temel bir haberci olarak kabul edilir. Geçmişten beri, kuraklık ve soğuk gibi çeşitli abiyotik stresler sırasında ABA'nın yüksek oranda artmasının, ABRE ve DRE yoluyla abiyotik stres transkriptomunun tetiklenmesinde rol oynadığı ortaya çıkmıştır (Posmyk and Janas 2009; Arnao and Hernández-Ruiz 2019).

1. GİRİŞ

ABA kuraklık stresi altında ilk sentezlendiği yer olan kök kısımlarından fazlasıyla üretilip, sırasıyla köklerden gövde ve yapraklara taşınarak stomaların kapanmasını sağlamaktadır (Vishwakarma et al. 2017). Yine, kuraklık stresinde ozmotik stres ve su dengesini düzenleyen ABA kuraklıkta görev alan birçok genin indüklenmesini sağlamaktadır (Banks 2018).

Bitkilerin strese karşı bir diğer cevabı olan moleküler tepkiler, genetik ve epigenetik olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Bitkilerde stres kaynaklı fenotipik tepkinin epigenetik kontrolü, esas olarak gen ifadesinin düzenlenmesini içermektedir. Stres faktörlerinde epigenetik düzenleme, küçük RNA türlerini ve kromatinin yeniden modellenmesi gibi süreçleri içeren bir sinyal yoluyla gerçekleşmektedir (Covelo-Molares et al. 2018). Başka bir ifadeyle epigenetik mekanizmalar, genlerin kromatin durumunu değiştirerek transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyelerde strese duyarlı genlerin düzenlenmesine katılmaktadır. Epigenetik mekanizmalar genel anlamda, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları [asetilasyon, deasetilasyon, fosforilasyon, histon metilasyonu (lizin ve arjinin metilasyonu) vb.] ve kromatinin yeniden modellenmesini kapsamaktadır (Bannister and Kouzarides 2011). DNA metilasyonu Hotchkiss tarafından 1948 yılında geliştirilen ve ilk keşfedilen epigenetik markördür. DNA metilasyonu, sitozin halkasının 5-karbonuna bir metil (CH₃) grubunun kovalent eklenmesi yoluyla gerçekleşmektedir. Bu durum transkripsiyonu değiştirmektedir. Aynı zamanda meydana gelen çoğu DNA metilasyonu, bir guanidin nükleotidinin yanında bir sitozin nükleotidinin bulunduğu CpG bölgesinde meydana gelmektedir. Bir genin promotör bölgesinde metillenmiş bir CpG adası bulunduğu anda, o genin ifadesi baskılanmaktadır (Mandal et al. 2017). DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) adı verilen bir metiltransferaz enzim ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir. Ökaryotik hücrelerde, DNMT'ler metiltransferaz 1 (DNMT1) ve de novo metiltransferazlar (DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L) olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. DNA metilasyonunun şematik gösterimi (Mandal et al. 2017)

Kromatin yeniden modellenmesi esas olarak DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları ile ilişkilidir. Bitkilerin normal gelişim süreçleri ve işlevleriyle birlikte çeşitli çevresel streslere yanıt vermek için karmaşık gen düzenleyici mekanizmalar geliştirdiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (Roy 2016). Aynı zamanda bu mekanizmalar, genlerin kromatin durumunu değiştirerek transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyelerde strese duyarlı genlerin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir.

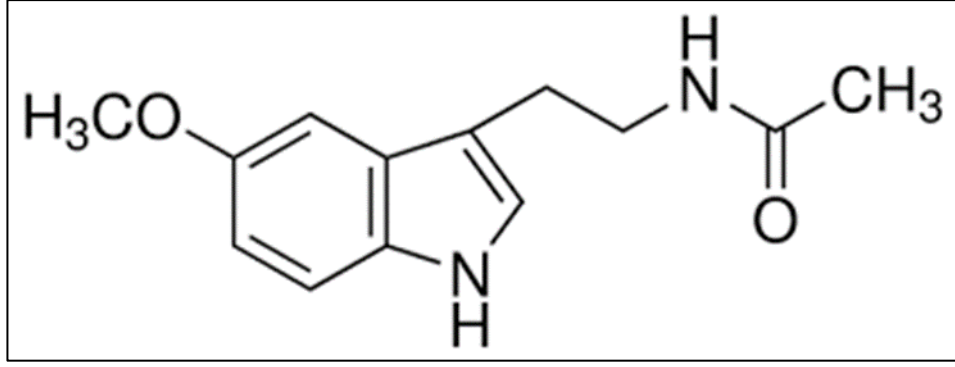
Geçmişten günümüze kadar stres faktörleri altında bitkilerde meydana gelen epigenetik değişikliklerin analizinde mevcut olan birçok teknikte tespit edilebilmektedir. İlk çalışmalarda genellikle Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) yöntemi kullanılmıştır. Ardından Enzimle Kesim-Rastgele Amplifikasyon (CRED-RA) tekniği geliştirilmiştir. Günümüzde ise birçok yeni yöntem ile genomdaki metilsitozin seviyesi veya metilasyon oranı belirlenebilmektedir (Altunkaynak et al. 2016). CRED-RA tekniği, genom metilasyon durumunu incelemek için güçlü bir tekniktir ve Cai et al. (1996) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknikte 5'-CCGG-3' dizisini tanıyan restriksiyon enzimleri (RE) (*MspI* ve *HpaII*), kullanılmaktadır. *MspI* ve *HpaII* enzimleri metil grubu sitozinde bulunduğu DNA'dan keser, ancak metil grubu dış sitozinde bulunursa DNA'yı parçalamazlar. Genellikle *HpaII* enzimi *MspI* enziminden daha az aktiftir (Rai et al. 2018). CRED-RA sonucunda elde edilen DNA parçaları PCR temelli marker teknikleri kullanılarak çoğaltılabilir.

1. GİRİŞ

Retrotranspozonlar, büyük bitki genomlarında yer alan sayıca nispeten fazla olan işlevsel genlerden oldukça fazla bulunan, RNA'nın transkripsiyonu ve ardından bu RNA'nın ters transkripsiyonu, bunu takiben oluşan cDNA'nın genomda yeni bir yere eklenmesi ile oluşan yer değiştirebilen elementlerdir. Gelişim süreçlerinde çoğu zaman inaktif haldedirler fakat stres koşullarında aktif halde bulunurlar. Bu elementler genomda buldukları yerdeki genlerin ifadesini tamamen değiştirebilme potansiyeline sahip olup bitişindeki gen veya genlerin ifadesini etkilerler. Ayrıca, bu elementlerin epigenetik düzenlenmeleri de yine aynı şekilde bitişindeki gen/genleri etkilemektedir. Kodlanan bölgelerde ya da yakınındaki bir bölgede yeni dizi eklenmeleri veya epigenetik aktivasyonu gen ifadesini değiştirmekte ve genomun hem yapısal hem de işlevsel olarak farklılaşmasına neden olmaktadır. Bu sebeplerden ötürü aynı zamanda da retrotranspozonların bitki gelişimi ve evriminde önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir (Vitte and Panaud 2005; Kashkush et al. 2003; Mansour 2007).

iPBS işaretçiler genetik çeşitlilik ve popülasyon yapısının belirlendiği çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Karık et al. 2019; Karagoz et al. 2020). iPBS (inter priming binding sites), transpoz elementlerin LTR bölgesi dizi bilgisine gerek duymamanın ortaya çıkardığı zorluğun üstesinden gelmek için tasarlanmıştır (Kalendar et al. 2010). LTR transpozonları tarafından paylaşılan bu bölgelerin arasında kalan intergenik DNA bölgelerini hedef alan primerler ile birbirine yakın iki PBS'nin (primer bağlanma bölgesi) PCR ile çoğaltılması tekniğidir.

Bitkiler doğal savunma mekanizmaları ile yüksek stres koşullarına karşı koruma sağlayamamaktadır. Bu nedenle günümüzde, bitki biyostimülanları stres altındaki bitkilere ekzojen olarak uygulanıp, stres toleransını iyileştirmektedirler (Khrpach et al. 2000). Özellikle ekzojen olarak uygulanan bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) bitkilerin strese karşı savunma mekanizmasını yönetmektedir (Bashir et al. 2020). Son zamanlarda stres çalışmalarında BBD'lerden biri olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) (Şekil 5) uygulamaları sonucunda bitkinin strese karşı tolerans gösterdiği bildirilmiştir. Melatonin, kuraklık gibi olumsuz koşullar altında büyüyen bitkilere stres toleransı da sağlayan bir büyüme düzenleyicisidir (Zhao et al. 2019). Melatonin düşük molekül ağırlığına sahip ve bu aktivitelerin bazılarını membran reseptörleri, nükleer reseptörler ve reseptörler aracılığıyla yapmaktadır (Reppert 1997).



Şekil.1.5. Melatonin'in genel yapısı (Anonymous 2023)

Posttranslasyonel seviyede gen ifadesi, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları bitkilerde strese bağlı olarak meydana gelen epigenetik değişikliklerdir ve bu değişiklikler aynı zamanda bitkilerin strese yanıtlarını da etkilemektedir (Şahin 2014). Bitkilerde melatoninin ekzojen olarak kullanıldığı çalışmalarda, melatoninin tohum çimlenmesi, fotosentez, meyve olgunlaşması, membran bütünlüğü, osmoregülasyon ve yaprak yaşlanmasında önemli roller oynadığı ve antioksidan savunma mekanizmasında görev alan genlerin ifadesini düzenleyerek bitkiyi strese karşı koruduğu bilinmektedir (Hassan et al. 2022; Zeng et al. 2022). Bu çalışmada kuraklık ve tuz stresi koşulları altında fasulye genotiplerine ekzojen olarak uygulanan melatoninin kök ve yaprak dokularında biyokimyasal ve epigenetik değişimlerinin izlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son 50 yılda artan dünya nüfusu ve ekonominin sürekli gelişmesiyle birlikte, başlıca ürünlerin tarımsal verimliliği talebe uygun olarak giderek artmıştır (Simkin et al. 2019; Zhang et al. 2021). Bu artış, agronomik yaklaşımlarla klasik ıslahadaki gelişmelerden kaynaklanmıştır. Ancak son yıllarda birçok ülkede, bitkisel ürün verimindeki artış yıllara göre duraksamaya ve hatta azalmaya başlamıştır (Fischer and Edmeades 2010; Ray et al. 2013; Long et al. 2015; Zhang et al. 2021). Bu azalma, araştırmacılar tarafından artan küresel ısınmayla birlikte, ortaya çıkan iklim değişikliklerinin bir sonucu olarak kabul edilmektedir. Diğer taraftan, Ma et al. (2020) çevresel streslerin (biyotik ve abiyotik) tarımsal üretimde çok büyük kayıplara neden olduğunu bildirmişlerdir. Tuzluluk ve kuraklık dünya genelinde bitkisel ürün üretimi ve verimliliğini ciddi şekilde azaltan en önemli iki abiyotik stres faktörleridir (Kaushal and Wani 2016; Singh et al. 2018).

Tuzluluk, tarım arazilerinin aşırı sulanması sonucunda tarımsal arazi yapısının bozulması ile ortaya çıkmaktadır. Tuzluluk genel olarak primer (kaya aşınması ve siklik tuzlar) ve sekonder (sulama, drenaj vb.) tuzluluk olarak ikiye ayrılmaktadır (Doğru vd 2020). Toprak tuzluluğu, tarih boyunca tarımın en önemli sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir (Nandal and Hooda 2013). Dünyada ekili alanların yaklaşık 1125 milyon ha tuzlulukla mücadele etmektedir (Wicke et al. 2011). Sulanan her beş araziden biri tuzluluktan etkilenmekte ve her yıl 1,5 milyon ha tarım arazisi tarımsal üretime uygunluğunu kaybetmektedir. Toprakta aşırı tuz birikmesi bitkinin ihtiyacı olan suyu kökleri ile alamamasına ve bunun sonucunda ozmotik ve iyon dengesinin bozulmasıyla bitkilerde strese yol açmaktadır (Hussain et al. 2019). Aynı zamanda, toprakta artan tuz miktarının neden olduğu ozmotik stres, bitkinin kullandığı su miktarını azaltarak ve fizyolojik kuraklığın oluşmasına neden olmaktadır. Diğer taraftan, iyon dengesinin bozulması ile bitkide iyonik stres meydana getirmektedir. İyonik stres ile ortamda artan Na^+ ve Cl^- iyonları, bitkide hayati öneme sahip Ca^{2+} , K^+ ve Mg^{2+} gibi makro besin elementlerinin alınmasını engelleyerek bitkide besin noksanlığına yol açmaktadır (Heidari and Jamshid 2010). Özellikle Na^+ iyonları hücre içine girmek için K^+ geçişini engeller ve hücre içinde K^+ iyonunun düşüşüne sebep olur. Bu durum stomaların kapanmasına, fotosentetik aktivitenin azalmasına, ROT'ların oluşumuna yol açarak programlanmış hücre ölümlerine sebep olmaktadır. Aynı zamanda hücre büyümesi ve

2. KAYNAK ÖZETLERİ

genişlemesine, hücre zarının yapısının bozulmasına ve çimlenme, kök, sürgün uzunluğunun azalması gibi olumsuz fizyolojik etkilere neden olmaktadır (Yildiz et al. 2020).

Baklada yapılan bir çalışmada (Abdel Latef et al. 2021), tuz stresi altında mineral homeostaz dengenin bozulduğu ve bunun sonucunda bitki gelişiminin yavaşladığı bildirilmiştir. Yine bu çalışmada, Na^+ 'nın sürgün, kök, gövde gibi organlarda aşırı birikmesiyle Ca^{+2} , K^+ , ve Mg^{+2} içeriğini azalttığı; Na^+ ve Cl^- iyonlarının hızlı absorpsiyon edilmesiyle birlikte, diğer iyonlarda önemli bir düşüş olduğu vurgulanmıştır.

Fasulye gibi glikofit bitkiler tuz stresine karşı oldukça hassastır. Fasulye, yüksek protein içeriğine sahip temel bitkisel üründür. Ayrıca fasulye amino asit, demir, kalsiyum, fosfor ve vitamin (B1, B2 vb.) minerallerince zengin olduğundan önemli bir yere sahiptir. Diğer taraftan içerdiği antioksidan içeriğiyle kanser riskini azaltmakta ve birçok hastalıkta tercih edilmektedir (Odabaşı 2021).

Gama et al. (2007) tuzluluk stresinin beş fasulye çeşidi üzerindeki etkisini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, çimlenmeden 3 hafta sonra farklı konsantrasyonlarda (0, 50 ve 100 mM NaCl) tuz stresi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda tuzluluğun yalnızca biyokütle verimi ve bağıl büyüme hızı üzerine, aynı zamanda morfolojik parametreler üzerinde de olumsuz etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonunun, fotosentez, terleme hızı ve stoma iletkenliğini, yaprak ozmotik potansiyeli ve yaprak turgorunu azalttığını belirtmişlerdir.

Tohum çimlenmesi, bitkinin gelişim fazındaki ilk önemli aşamasıdır. Tuzluluk bitkinin çimlenmesini olumsuz yönde etkilemektedir (Bewley et al. 2012). Al-huraby and Bafeel (2022) fasulye üzerine yaptıkları çalışmada, NaCl'nin artan konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150 ve 200 mM) çimlenme oranının azaldığını bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonunun fotosentetik aktiviteyi sınırladığı ve fotosentetik pigmentlerin azaldığını rapor etmişlerdir. Yapılan farklı bir çalışmada (Sitohy et al. 2020), fasulye, 1,3, 3,9 ve 7,8 dS m^{-1} tuz konsantrasyonlarında strese maruz bırakılmıştır. Çalışmanın sonucunda fotosentetik pigment, temel besin maddeleri, yaprak su tutma kapasitesi ve membran stabilite indeksi üzerine olumsuz etkileri tespit edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için optimum su seviyesi mevcudiyeti gereklidir. Toprak neminde azalma tane verimini ve kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (Elemike et al. 2019; Bal et al. 2021). Öte yandan, rizosferde optimumun altındaki su mevcudiyeti, bitkilerin gelişimi üzerinde olumsuz etki meydana getirmekte ve bitkilerde kuraklık stresine neden olmaktadır (Bal et al. 2021). Giderek artan küresel ısınmayla bu durum iyice artmaktadır. Kuraklık stresi dünya çapında ürün verimini etkileyen ciddi bir abiyotik streştir (Seleiman et al. 2021). Li et al. (2018), kuraklık stresi altında bitkilerin, fide gövdesi ve kök uzunluklarının ve toplam kuru ağırlıklarının azaldığını bildirmiştir. Aynı zamanda, şiddetli kuraklık stresi hücre membranında hasara ve membran bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır.

Arteaga et al. (2020) yaptıkları çalışmada, 47 fasulye (*P. vulgaris* L.) genotipinde kuraklık ve tuz stresinin bitki büyümesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda tuz ve kuraklık altında genotiplerin büyümesinin azaldığını bildirmişlerdir.

Genel olarak abiyotik stresler ilk olarak hücre membranına etki etmektedir (Mansour 2013). Tuzluluk ve kuraklık stresleri, hücrelerde ROT üretiminde artışa neden olmaktadır. Hücre içinde artan ROT'lar, membran lipidlerini ve proteinlerini parçalayarak lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasara neden olmakta ve bunun sonucunda da membran yapısı bozulmaktadır. Rawat et al. (2021), kuraklığa toleranslı bitki türlerinin, kuraklık stresinde membran stabilitesini, akışkanlığını ve bütünlüğünü koruyabilmesine rağmen kuraklığa hassas bitki türlerinde önemli seviyede membran hasarının meydana geldiğini bildirmişlerdir. Svetleva et al. (2012) yaptıkları çalışmada, 20 farklı fasulye genotipinin kuraklık toleransını tespit etmek için, biyokimyasal aktivitelerini (malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve prolin) ölçmüş ve bu ölçümler sonucunda MDA ve H₂O₂ seviyesi düşük olan genotipleri toleranslı olarak değerlendirmişlerdir.

Bitkilerin büyüme, gelişme ve fotosentetik yeteneklerini engelleyen önemli etkilerden biri de ROT ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulması ve hücre membranına zarar veren ROT'ların birikmesidir (Farooq et al. 2009).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Nagesh Babu and Devaraj (2008), tuz stresi altında fasulye fidelerinin antioksidanlar ve antioksidan enzimler açısından değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda yüksek tuz stresi altında H₂O₂ miktarının arttığı glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) miktarının değişkenlik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Saeidi-Sar et al. (2013) yaptıkları çalışmada, 200 mM NaCl ve 1 mM Askorbik asitin (AsA) büyüme parametreleri, fotosentetik ve fotosentetik olmayan pigmentler, potasyum içeriği, MDA ve H₂O₂ üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda tek başına 200 mM NaCl uygulamasında tüm büyüme parametrelerini, fotosentetik pigmentleri, antioksidan içeriğini azalttığı, MDA ve H₂O₂ içeriğini ise arttırdığını bildirmişlerdir. Buna karşın, AsA uygulamasının tek başına incelenen tüm parametreler üzerinde iyileştirici etkisinin olduğunu, özellikle NaCl ile uygulamasının, MDA ve H₂O₂ içeriğini azalttığı ve NaCl'nin tek başına meydana getirdiği olumsuz etkilerini ortadan kaldırdığını rapor etmişlerdir.

Yine, yapılan farklı çalışmada (Farhangi-Abriz and Torabian 2017), fasulyede farklı konsantrasyonlarda (0, 6 ve 12 dS m⁻¹) NaCl ve biyokömür (%10 ve %20 toplam kap kütlesi) uygulamalarının fizyolojik (sürgün ve kök ağırlığı) ve biyokimyasal parametreler (H₂O₂, O₂⁻, MDA, CAT, POD, APX ve SOD) üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda fasulyenin sürgün ve kök kuru ağırlıklarının her iki tuz konsantrasyonunda azaldığı, azalmanın 12 dS m⁻¹ NaCl uygulamasında daha fazla olduğu bulunmuştur. Yine NaCl uygulamalarının her iki konsantrasyonunda katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), peroksidaz (POD), polifenol oksidaz (PPO) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin azaldığı, MDA, O₂⁻ ve H₂O₂ içeriğinin azaldığı belirlenmiştir. Buna karşın NaCl ile biyokömür uygulamalarının MDA, O₂⁻ ve H₂O₂ içeriğini azalttığı, diğer parametreleri arttırdığı bildirilmiştir.

Kul et al. (2021) fasulyede yaptıkları çalışmada, 100 mM NaCl uygulamasının büyümede, klorofil içeriğinde ve yaprak su içeriğinde önemli bir azalmanın olduğunu, H₂O₂, MDA, prolin ve sakkaroz içeriğinde ise önemli bir artışın olduğunu bildirmişlerdir.

Terzi et al. (2010) yaptıkları çalışmada, Göynük 98, ES 855 Şehirali 90, Karacaşehir 90 ve Yunus 90 fasulye (*P. vulgaris* L.) çeşitlerine kuraklığa dayanıklı

2. KAYNAK ÖZETLERİ

çeşitleri belirlemek amacıyla kuralık stresine maruz bırakarak, fizyolojik (yaprak su içeriği, stoma iletkenliği, klorofil içeriği) ve biyokimyasal (H_2O_2 , CAT, APX ve GPX) süreçleri incelemişlerdir. Çalışma sonucunda hassas olarak belirlenen Karacaşehir 90 çeşidinde yaprak su içeriği, stoma iletkenliği ve klorofil içeriği azaldığını H_2O_2 içeriğinin arttığını tespit etmişlerdir.

Yang et al. (2010), fasulyede hidroponik sistemde, PEG6000 (polietilen glikol) uygulamasının etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonunda PEG6000 uygulamasının fasulyede ozmotik strese yol açtığını bildirmişlerdir.

Sadeghipour et al. (2012), fasulyede çevresel streslere karşı bitki tepkilerini modüle eden önemli sinyal moleküllerinden biri olan salisilik asidin (SA) ve kuraklığın lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri ve prolin içeriği üzerindeki etkisini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Araştırmada, kuraklığın kontrole göre MDA içeriği, bazı antioksidan enzim aktivitesi (SOD, CAT, APX) ve prolin seviyesini arttırarak membran lipid peroksidasyonuna yol açtığını bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada, kuraklıkla birlikte 0,5 mM SA uygulamasının MDA içeriğini azaltması sonucu lipid peroksidasyonunun azalması, antioksidan enzim aktivitelerinin (özellikle SOD) ve prolin seviyesinde daha fazla artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar ile SA gibi sinyal moleküllerinin uygun konsantrasyonlarının stresin meydana getirdiği olumsuz etkileri azaltacağı ya da ortadan kaldırabileceğini rapor etmişlerdir.

Kuraklığa toleransları farklı olan iki soya fasulyesi (*Glycine max* (L.) Merr.) çeşidi üzerine yapılan bir çalışmada (Guler and Pehlivan 2016), ekzojen olarak H_2O_2 'nin kuraklık toleransını iyileştirmedeki rolü değerlendirilmiştir. Çalışmada, kuraklık stresi uygulandıktan sonra 1 mM H_2O_2 bitki yapraklarına püskürtme yolu ile uygulanmıştır. Bu araştırmada, kuraklığın yaprak su potansiyeli, bağıl su içeriği ve fotosentetik pigment verileri ölçülmüştür. Yine kuraklığın 4. ve 7. günlerinde yaprak örnekleri hasat edilmiş ve SOD, CAT, APX, GR, MDHAR, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), H_2O_2 ve MDA içerikleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda kuraklık stresinin, yaprak su potansiyeli, bağıl su içeriği ve fotosentetik pigment içeriğini azalttığı, ancak lipid peroksidasyonunu (MDA) ve endojen H_2O_2 konsantrasyonunu artırdığını, buna karşın, ekzojen olarak uygulanan H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonunun, su durumunu, pigment içeriğini ve lipid

2. KAYNAK ÖZETLERİ

peroksidasyonunu iyileştirdiğini tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, H₂O₂'nin antioksidan sistemi düzenleyerek abiyotik ve biyotik stres altındaki bitkilerde sinyal molekülü olarak işlev gördüğü rapor edilmiştir. Keshavarz and Khodabin (2019), fasulyede kuraklık stresinin lipid peroksidasyonunu (süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz) artırdığını bildirmişlerdir.

Yapılan farklı çalışmada (Yildiztugay et al. 2020), fasulyede (*P. vulgaris*) tuz (100 mM NaCl), polietilen glikol (PEG6000 (%10)) ve ekzojen olarak bir flavonoid olan naringenin farklı konsantrasyonları (0,1 mM ve 0,4 mM) uygulanmış, fizyolojik ve biyokimyasal etkileri incelenmiştir. Araştırmada hem NaCl hem de PEG6000'de ozmotik potansiyel, klorofil flüoresansı (F_v / F_m) ve potansiyel fotokimyasal etkinlikte (F_v / F_o) azalmaya neden olduğu, tuz ve kuraklığın naringenin ile birlikte uygulanmasıyla bu parametreleri tuz ve kuraklığın tek uygulamalarının aksine arttığı bildirilmiştir. Yine bu çalışmada, naringenin tuz ve kuraklık tarafından azaltılan kloroplastik SOD, POX APX GR MDHAR ve DHAR aktivitelerini artırdığı rapor edilmiştir.

Bitkiler stres koşullarında çevreye daha iyi uyum sağlamak ve hayatta kalma olasılığını artırmak için antioksidan savunma mekanizmalarının yanında, son yıllarda keşfedilen ve bitkinin dış streslere verdiği tepkileri düzenleyen epigenetik mekanizmaya sahiptir (Sun et al. 2022). Epigenetik mekanizmalar, stres altındaki bitkilerde mahsulün iyileştirilmesi için potansiyel bir bitki yetiştirme aracı olarak kullanılabilir. Abiyotik stresler bitkide epigenetik değişikliklere neden olabilmektedir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, gen ifadesindeki temel rolleri nedeniyle en çok bilinen epigenetik mekanizmalardır (Liu and He 2020; Gupta and Garg 2023). Akhter et al. (2021), DNA metilasyonunun stres altındaki bitkilerde abiyotik strese yanıt olarak gen ifadesini modüle ederek, fenotipik değişiklikleri indükleyebilen epigenetik varyasyon için birincil mekanizma olduğunu bildirmişlerdir. Gupta and Garg (2023), tuz stresi altında hassas ve toleranslı nohut genotiplerinde meydana gelen metilasyon oranlarını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda hassas genotipte toleranslı genotipe göre daha fazla hipermetilasyonun meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yine, yapılan farklı bir çalışmada (Wang et al. 2011), kuraklığa toleranslı olarak yetiştirilen çeltikte DNA metilasyon oranı araştırılmış, hiper metilasyonun olmadığı rapor edilmiştir.

Bitkilerin genom çapındaki metilasyon modelindeki değişiklikleri tespit etmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Fulneček and Kovařík 2014). Bu yöntemlerden Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizm (AFLP), Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizm (MSAP) tekniği, sitozin metilasyonunu saptamak için Yüksek Performanslı Kapiller Elektroforez (HPCE) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) başarıyla kullanılmaktadır (Renau-Morata et al. 2005; Smýkal et al. 2007; Türkoğlu et al. 2022).

Aynı zamanda, enzimle kesim-rastgele amplifikasyon (CRED-RA) ve retrotranspozon temelli olan primerler arası bağlanma bölgesi (iPBS) markörleri (CRED-iPBS), bitkilerde metilasyon seviyesini ölçmek için kullanılan bir diğer tekniktir (Hosseinpour et al. 2022). Diğer taraftan, iPBS markörünün kullanımı, bitkilerin DNA profilindeki değişiklikleri izlemek için kolay ve hızlı bir yöntemdir (Nemli et al. 2015). Jeydar et al. (2023), CRED-iPBS tekniğinin, farklı bitki türlerinin metilasyon modellerini belirlemek için birçok çalışmada başarıyla uygulandığını bildirmişlerdir. Ayrıca CRED-RA tekniği bitki genomundaki sitozin metilasyonunun, tuzluluk, kuraklık, ağır metal gibi abiyotik streslerin neden olduğu toksisitenin belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır.

Hosseinpour et al. (2019), yaptıkları çalışmada, üç buğday çeşidinde (Haymana 79, Kılçıksız ve Bezostaja) farklı konsantrasyonlarında Al toksisitesinde CRED-iPBS tekniğini kullanarak DNA metilasyonu seviyelerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, en yüksek Al konsantrasyonunun DNA metilasyonuna neden olduğu bildirmişlerdir.

Hosseinpour et al. (2022), buğdayda (*Triticum aestivum* L.) tuz stresinde (250 mM NaCl), farklı konsantrasyonlarda bakır (II) oksit nanoparçacıkların (CuO-NP) (0, 50 ve 100 mg/ L ve bitki büyümesini teşvik eden bakteri (PGPB) (bakteri yok, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus pumilus*) uygulamalarında polimorfizm oranını iPBS tekniği ile ve ayrıca sitozin metilasyonunu CRED-iPBS tekniği kullanarak araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, 250 mM NaCl uygulamasında polimorfizm oranının oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın CuO-NP ve PGPB uygulamalarının bu olumsuz etkiyi azalttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca CRED-iPBS sonuçlarına göre, 250 mM NaCl stresi ve CuO-NPs uygulamaları ile PGPB'lerde *MspI* polimorfizm yüzdesinin *HpaII*

polimorfizm yüzdesinden daha yüksek olduğu ve tüm uygulamalarda DNA hipometilasyonunun meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Türkoğlu et al. (2022) fasulyede yaptıkları çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (0, 10^{-4} , 10^{-6} ve 10^{-8} mM) memeli cinsiyet hormonlarının (β -estradiol, östrojen, progesteron ve testosteron) DNA metilasyonu üzerine etkisini değerlendirmek için CRED-iPBS tekniği kullanmışlardır. Araştırmada, CRED-iPBS sonucunda 10^{-4} mM östrojen hormonunun hipermetilasyona yol açtığını bildirmişlerdir.

Buğdayın Karasu 90 çeşidinde yapılan farklı bir çalışmada (Arslan et al. 2019), farklı konsantrasyonlarda kuraklık (-2, -4, -6 bar PEG6000) ve putresin (0,01, 0,1, 1 mM) uygulamalarının DNA metilasyonu üzerine etkilerini RAPD ve CRED-RA tekniği ile incelemişlerdir. Çalışmada, kuraklık stresinin DNA metilasyonuna neden olduğu, bunun aksine putresin uygulamasının DNA demetilasyonuna yol açtığını rapor etmişlerdir.

Aydın et al. (2020) yaptıkları çalışmada, tuz stresine maruz bırakılan buğdayda (*T. aestivum*), β -estradiolün uygulanması ile DNA hasar seviyelerini ve DNA metilasyon modelindeki değişiklikleri tanımlamak için RAPD ve CRED-RA yöntemlerini kullanmışlardır. RAPD ve CRED-RA çalışmaları sonucunda tuz stresinin DNA metilasyonunu artırdığı, buna karşın tuzluluk stresinin neden olduğu artan metilasyon seviyesi, farklı konsantrasyonlarda β -estradiol ile muameleden sonra azaldığını belirlemişlerdir.

Fasulye üzerine yapılan bir çalışmada (Aydın et al. 2021), herbisit olarak farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20 ve 40 mg/L) uygulanan 2,4-D (2,4-diklorofenosi asetik asit) stresine karşı humik asitin (HA) farklı konsantrasyonlarının (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/L) DNA hasar seviyeleri ve DNA metilasyon değişiklikleri üzerindeki etkileri RAPD ve CRED-RA teknikleri kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmada RAPD ve CRED-RA sonuçlarına göre, 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarında yüksek DNA metilasyonunun meydana geldiği, buna karşın HA'nın artan konsantrasyonlarında, 2,4-D uygulamalarının neden olduğu DNA metilasyon seviyesinde genel olarak bir azalma olduğu bildirilmiştir.

Geçmişten günümüze kadar yapılan birçok çalışma abiyotik stresin bitkilerde meydana getirdiği hasarın iyileştirilmesine yönelik biyolojik uyarıcıların kullanılmasına odaklanmaktadır. Melatonin doğal bir biyo-uyarıcı madde olup, bitki büyümesinin uyarılmasında önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda tuzluluk ve kuraklık stresinin bitkilerde yıkıcı etkisini azaltan umut verici bitki büyüme düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. Zulfiqar et al. (2022), melatoninin tuz stresi atındaki bitkilerde, iyileştirici etki gösterip bitki büyümesi ve gelişmesini olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir.

Cao et al. (2019) araştırmalarında, soya fasulyesinde melatoninin kuraklık toleransındaki rolünü araştırmışlardır. Kuraklığın H₂O₂ ve MDA içeriğini artırarak lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasara neden olduğunu, melatonin uygulamasıyla bu hasarın olumsuz etkilerini iyileştirdiğini kaydetmişlerdir.

Yan et al. (2021) yaptıkları çalışmada, çeltikte tuz stresi ve melatonin uygulamalarının antioksidan kapasitesi üzerindeki etkisini incelenmişlerdir. Araştırmada tuz stresinde melatonin uygulamasından sonra daha düşük ROT (H₂O₂, O₂⁻, OH⁻) birikiminin olduğunu ve antioksidan enzim aktivitesinde güçlü bir artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

ElSayed et al. (2021) yaptıkları çalışmalarında tuz stresi (200 mM NaCl) altında fasulyede ekzojen melatonin (150 µM) uygulamasının fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler parametreler üzerine etkilerini araştırmışlardır. Tuz stresinin fotosentetik aktivitede (fotosistem II (PSII)), klorofil içeriğinde azalmaya, ROT içeriğinde ise artmaya yol açtığını bildirmişlerdir. Buna karşın ekzojen melatonin uygulamasının fotosentetik aktiviteyi iyileştirdiği ve antioksidan enzim aktivitelerini artırarak oksidatif hasarı azalttığını rapor etmişlerdir. Yine bu araştırmada tuz stresi uygulamasında kontrole kıyasla SOD, APX GR, CAT, peroksiredoksin Q (PrxQ) ve 2-sistein peroksiredoksin (2-Cys-Prx) kodlayan gen ifadelerinin arttığını, melatonin ile birlikte bu genlerin daha yüksek transkript seviyesine sahip olduğunu kaydetmişlerdir.

Yine fasulyede yapılan farklı bir çalışmada (Alinia et al. 2022), melatonin ve rhizobacterium (RS⁺) uygulamalarının tuzluluk toleransını artırmadaki olumlu etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda melatonin ve RS'nin, antioksidan enzim aktivitesini

2. KAYNAK ÖZETLERİ

(SOD, POD, CAT ve APX) artırarak MDA içeriğini azalttığı, klorofil a, b, karotenoid ve fotosentetik aktiviteyi koruduğu, bu bakımdan tuz stresinde artan ROT'ların meydana getirdiği hasarı azalttığı kaydedilmiştir.

Azizi et al. (2022) yaptıkları çalışmalarında melatoninin farklı konsantrasyonlarının (0, 100 ve 200 μ M), tuzluluk altında (0, 100 ve 200 mM NaCl) büyüme parametreleri üzerine ve antioksidan savunma sistemindeki rolünü araştırmışlardır. Tuzluluğun sürgün ve kök kuru ağırlığını, fotosentetik aktiviteyi azalttığı, MDA, H₂O₂, prolin ve buna bağlı olarak antioksidan enzim aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir. Tuzluluk altında ekzojen melatonin uygulamasının antioksidan enzim aktivitesini artırdığı ve buna bağlı olarak H₂O₂ ve MDA içeriğini azaltarak oksidatif hasarı iyileştirdiği rapor edilmiştir.

Başka bir çalışmada (Aygören et al. 2022), fasulyede tuz ve kuraklık stresine karşı uygulanan melatoninin SABATH genlerinin ifade seviyeleri üzerine etkileri in silico olarak incelemiş ve karşılaştırılmıştır. Araştırma tuz stresine karşı melatonin uygulamasının SABATH genlerin ifadesini etkilediği bildirilmiştir.

Yine fasulyede yapılan bir başka çalışmada (Asan 2022) tuz stresi (0, 100 ve 200 mM NaCl) altında Serra ve Elkoca 05 çeşitlerinde melatonin (0, 100, 150 ve 200 μ M) uygulanmasının morfolojik, fizyolojik ve moleküler parametreler üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda her iki çeşitte de bağıl su içeriği, klorofil içeriği ve mitotik indekste azalışa neden olduğu; hücre membranı hasarında ise artışa neden olduğu bildirilmiştir. Stresin bitkide yol açtığı bu olumsuz etkilerin ekzojen melatonin uygulamasıyla azaldığı bildirilmiştir.

Melatonin epigenetik süreçleri etkileyerek gen ifadesinin düzenlenmesinde anahtar role sahiptir (Linowiecka et al. 2023). Shan et al. (2022), domateste 0,5 mM melatonin uygulaması sonucunda DNA metilasyon seviyeleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda melatonin uygulamasıyla DNA metilasyon seviyelerinde azalma olduğu ve bu azalma ile SIACS10, SIEIN3, SIERF-A1 ve SIERT10 genlerinin ifade seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmada Elkoca 05 ve Serra çeşitleri bitki materyali olarak kullanılmıştır. Çeşitler Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden temin edilmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve kimyasal içerikleri

Sterilizasyon amacıyla kullanılan çözeltiler

- Etil alkol (EtOH) %70' lik
- Sodyum hipoklorit (NaOCl) %10' luk
- Dietil pirokarbonat (DEPC) 0,1'lik

Bitki çimlendirilmesi ve büyütülmesinde kullanılan kimyasal içerikleri

Çalışmada bitki çimlendirilmesi ve büyütülmesinde besin çözeltisi olarak Hoagland ve Arnon (1938) besin ortamı kullanılmıştır. Hoagland ve Arnon (1938) çözeltisine ait kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hoagland ve arnon (H2395) ortamında kullanılan kimyasallar ve miktarları (Hoagland and Arnon 1938).

Kimyasal	Miktar (mg/l)
Ca (NO ₃) ₂	656,4
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,03
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,08
Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃	5,32
MgSO ₄	240,76
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,08
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,22
MoO ₃	0,016
H ₃ BO ₃	2,86
MgCl ₂ •4H ₂ O	1,81
KNO ₃	606,6

Stres ajanı ve iyileştirici olarak kullanılan kimyasallar

- 0 ve 150 mM Sodyum klorür (NaCl)
- %0 ve %20 PEG6000
- 0 ve 200 µM melatonin

Enzim aktivitesi ölçümü amacıyla kullanılan çözelti ve kimyasallar

Enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan çözelti ve kimyasallar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Enzim aktivitesi ölçümü amacıyla kullanılan kimyasallar

Kimyasallar

Nitro blue tetrazolium (NMT)
L-methionine
Guaiakol
Polivinilpirolidon
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)
L-askorbik asit
Potasyum fosfat monobasic
Potasyum iyodid
Potasyum fosfat dibasic (K₂HPO₄)
Sodyum fosfat dibasic anhydrous (Na₂HPO₄)
Potasyum hidroksit
2-thiobarbiturik asit
Riboflavin
Hidrojen peroksit (H₂O₂)
Trikloroasetik asit

CRED-iPBS PCR çalışmasında kullanılan çözelti ve kimyasallar

DNA izolasyonu, CRED, iPBS PCR ve jel elektroforez çalışmalarında kullanılan çözelti ve kimyasallar Çizelge 3.3’te gösterilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.3. DNA izolasyonu, CRED, iPBS PCR ve jel elektroforez çalışmalarında kullanılan çözelti ve kimyasallar.

DNA izolasyonunda kullanılan çözelti ve kimyasallar
0.5 M EDTA PH=0,8
5 M NaCl
1M Tris-HCl
3 M Sodyum Asetat (PH= 5,2)
DNA ekstraksiyon tamponu (CTAB)
10 M Amonyum Asetat
Kloroform: İzooamil alkol
1X TE Buffer
10X TE Buffer
2-propanol (izopropanol)
Ribonükleaz (RNaz)
Proteinaz K
CRED için kullanılan çözelti ve kimyasallar
<i>HpaII</i> (NEB, R0171)
<i>MspI</i> (NEB, R0106)
<i>1X CutSmart® Buffer</i>
iPBS PCR çalışması için kullanılan kimyasallar
MgCl ₂
Primer
dNTP
Taq DNA polimeraz
dH ₂ O
Jel elektroforez için kullanılan çözelti ve kimyasallar
0,5X TBE tamponu
10X TBE tamponu
Agaroz
6x Loading buffer
Etidyum bromür

iPBS çalışmasında kullanılan primerler

iPBS çalışmasında kullanılan primerler ve bu primerlere ait bağlanma sıcaklığı ve baz dizisi Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. İPBS çalışmasında kullanılan primerleri, bağlanma sıcaklığı ve baz dizisi

Primer	Baz Dizisi 5'-3'	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
2400	CCCCTCCTTCTAGCGCCA	57,4
2075	CTCATGATGCCA	50,0
2083	CTTCTAGCGCCA	50,0
2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA	50,0
2394	GAGCCTAGGCCA	51,3
2387	GCGCAATACCCA	50,0
2081	GCAACGGCGCCA	55,0
2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	48,4
2226	CGGTGACCTTTGATACCA	50,0
2377	ACGAAGGGACCA	50,0

3.2. Yöntem

3.2.1. Araştırmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Sterilizasyon işlemi için kullanılan çözeltiler

Sodyum hipoklorit (NaOCl) (%1): %5 NaOCl içeren çamaşır suyundan (ticari ACE® marka) 200 mL alınmış ve 1.000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

EtOH (%70): Etanolden (%99,8) 700 mL alınarak, saf su yardımıyla 1.000 mL'ye tamamlanmıştır.

Tohum çimlendirme ve bitki büyütme besin çözeltisinin hazırlanması

Ticari Hoaglang ve Arnon karışımından (Sigma H2395-1L) 1,6 g alınarak 1 L saf suda çözülürülerek hazırlanmıştır.

3.2.2. Çalışmada kullanılan stres ajanları ve iyileştirici kimyasalların hazırlanışı

NaCl stok çözeltisinin hazırlanışı

Çalışmada kullanılmak üzere 1 M NaCl (58,44 g/mol) stok solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışmada hazırlanmış olan stok solüsyonundan kullanılacak olan NaCl konsantrasyonları için alınan miktarlar Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Stok çözeltiden alınan NaCl miktarları

Konsantrasyon (mM)	1 M NaCl/ 1 L
0	0
150	150 mL

PEG6000 çözeltisinin hazırlanışı

Çalışmada kuraklık stresi PEG6000 kullanılarak oluşturulmuştur. 1 L'lik %20'lik PEG6000 hazırlamak için 200 g PEG6000 (Sigma, 1546580)'den alınıp 800 mL saf suda çözdürülmüş ve 1.000 mL'ye yine saf su ile tamamlanmıştır.

Melatonin (1mM) stok çözeltisinin hazırlanışı

1 mM melatonin (232,28 g/mol) 23,228 mg melatonin tartılarak 50 mL etanolde çözdürülmüş ve 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Çalışmada kullanılan melatonin konsantrasyonu (0 ve 200 µM) stok çözeltiden elde edilmiştir.

3.2.3. Biyokimyasal analiz amacıyla Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Potasyum hidroksit (KOH) (0,2 M) çözeltisi

11,22 g/l KOH tartılarak saf suda çözdürülmüş ve son hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Potasyum fosfat (KH₂PO₄) (0,1 M) çözeltisi

0,1 M potasyum fosfat (KH₂PO₄) çözeltisi bitki örneklerinin öğütülmesinde kullanılmaktadır ve bu çözelti, 0,1 mM EDTA ve 1 M KH₂PO₄, %0,3'lük PVP ve içermektedir. İlk olarak 0,68 g KH₂PO₄ saf su yardımıyla çözdürülmüş ve bu çözeltinin pH: 6,75'e KOH (0,2 M) ile ayarlanmıştır. Ardından karışıma 0,014 g EDTA ve 0,15 g PVP ilave edilerek tekrar çözdürülmüş ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

Trikloroasetikasit (TCA) (%5) çözeltisi

50 mL saf suda 5 g TCA çözdürülerek, son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

Tiyobarbütirik asit (TBA) (%0,5) + TCA (%20) çözeltisi

20 g TCA ve 0,5 g TBA 50 mL saf suda çözdürülmüş ve hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

Riboflavin (100 µM) çözeltisi

2 µM riboflavin çözeltisi SOD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmaktadır. Riboflavinden 0,038 g tartılarak 1.000 mL olacak şekilde saf suda çözdürülmüş ve ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) reaksiyon çözeltisi

H₂O₂ analizinde kullanılmak üzere ilk olarak 1 M potasyum iyodür (KI) ve 10 mM KH₂PO₄ içeren çözelti hazırlanmıştır. KH₂PO₄'den 0,0272 g tartılarak saf suda çözdürülmüş ve pH: 7,0'a KOH ile ayarlanmıştır. Ardından çözeltiye KI'den 3,32 g eklenerek çözdürülmüş ve toplam hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Süperoksit dismutaz (SOD) reaksiyon çözeltisi

Bu reaksiyon çözeltisi 50 mM K₂HPO₄, 13 mM L-Metiyonin, 75 µM NMT ve 0,1 mM EDTA içermektedir. İlk olarak K₂HPO₄'den 2,61 g tartılıp, bir kısım saf suda çözdürülmüş ve pH:7,8'e KOH (0,2 M) kullanılarak ayarlanmıştır. Sonrasında bu solüsyona 0,018 g NMT, 0,0087 g EDTA ve 0,58 g L-metiyonin ilave edilerek son hacim 300 mL'ye saf su kullanılarak tamamlanmıştır. Çözelti ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Peroksidaz (POD) reaksiyon çözeltisi

Bu reaksiyon çözeltisi 1 mM 0,014 EDTA, 0,1 M Na₂HPO₄, 6 mM gayakol, 4 mM H₂O₂, %0,3 PVP içermektedir. Bu çözeltinin hazırlanması için ilk olarak Na₂HPO₄'den 0,89 g tartılmış ve bir miktar saf su ile çözdürülerek, pH:5,5'e

ayarlanmıştır. Sırasıyla 0,014 g EDTA ve 0,15 g PVP çözelti içine ilave edilmiş ve toplam hacim 50 mL'ye tamamlandıktan sonra +4°C'de saklanmıştır.

Katalaz (CAT) reaksiyon çözeltisi

CAT enzim reaksiyon çözeltisi, 100 mM KH₂PO₄ (pH=7.0) ve 10 mM H₂O₂ içeren çözelti için 6,8 g KH₂PO₄ çözdürülerek pH=7.0'ye ayarlanmış, son hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.4 CRED-iPBS çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Çalışmada DNA izolasyonu aşamasında kullanılan tüm çözeltilerin hazırlanışı aşağıda gösterilmiştir.

Tris-HCl (1 M) (pH = 8,0) (1.000 mL)

700 mL saf suda 121,1 g Tris-base tartılarak çözdürülmüş ve konsantre HCl (%37,2-12,1 M)'den 42,0 mL eklenerek toplam hacim 1.000 mL'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

EDTA (0.5 M) (pH = 8,0) (1.000 mL)

136,1 g EDTA hassas terazide tartılarak bir miktar saf su içinde çözdürülmüş ve 20,0 g NaOH bu çözeltiliye ilave edilmiştir. Sonrasında pH = 8,0'a ayarlanmış ve toplam hacim 1.000 mL'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

NaCl (5 M) (500 mL)

NaCl'den 146,1 g tartılarak 450 mL saf suda çözdürülerek toplam hacim 500 mL'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

TE Buffer (10X) (1.000 mL)

0,5 M EDTA'dan 20,0 mL 880 mL saf su içerisine eklenmiş ve daha sonra 100 mL Tris-HCl (1 M) (pH = 8,0) eklenmiş ve 1.000 mL'ye tamamlanmıştır.

TE Buffer (1X) (1.000 mL)

1X TE Buffer elde etmek için önceden hazırlanan 10X TE Buffer'dan 100 mL alınarak 1 L'lik şişeye aktarılmış ve üzeri saf su yardımıyla 1.000 mL'ye tamamlanmıştır. (1X TE Buffer DNA örneklerinin çözdürülmesi aşamasında kullanılmıştır).

Sodyum Asetat (3 M) (pH = 5,2) (100 mL)

80 mL saf su içinde 40,8 g sodyum asetat (pH = 5,2) çözdürülmüş ve 100 mL saf su ile tamamlanmıştır. (pH ayarlaması glasiyel asetik asit (GAA) yardımıyla sağlanmıştır).

Amonyum Asetat (10 M)

Amonyum asetat'dan 77,0 g tartılarak 800 mL saf suda çözdürülmüş ve 1.000 mL'ye tamamlanmıştır.

DNA ekstraksiyon tamponu (50 mL)

1,0 g toz CTAB 20,0 mL saf suda manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözdürülmüş ve üzerine 0,5 g sodyum bisülfid (%0,1 eklenerek çözdürülmüştür. Ardından çözeltiliye 14 mL NaCl (5 M), 2,0 mL EDTA (0.5 M), 5,0 mL Tris-HCl (1 M), ve 0,1 mL (%0,2) β -merkaptotanol ilave edilmiş son hacim 50 mL'ye saf su ile tamamlanarak su banyosunda yaklaşık 65°C'de 40 dk boyunca bekletilmiştir.

Ribonükleaz (RNaz) (10 mg/ mL)

Ribonükleaz'dan 100 mg tartılıp 10,0 mL saf su ile çözdürülmüştür.

Proteinaz K (10 mg/ mL)

Proteinaz K'dan 100 mg tartılıp 10,0 mL saf su ile çözdürülmüştür.

3.2.5. Jel elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler

10X TBE tamponu

Tris-base'den 108,0 g ve borik asit'den 55,0 g tartılarak bir miktar saf su ile çözdürülmüş ve çözelti üzerine 40,0 mL EDTA (0,5 M) eklenip toplam hacim 1.000 mL'ye saf su yardımıyla tamamlanmıştır.

0,5X TBE tamponu

0,5X TBE tamponu elde etmek için önceden hazırlanan 10X TBE'den 50,0 mL alınarak şişeye aktarılmış ve üzerine 950 mL saf su eklenerek 1.000 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.6. Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirilmesi, bitkilerin yetiştirilmesi ve kimyasal ajanların uygulanması

Tohumlar 5 dakika süreyle NaOCl (%1'lik)'de bekletilmiş ve süre sonunda saf su ile durularak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Ardından tohumlar çimlendirme içinde amacıyla perlit bulunan saksılara 15'er adet gelecek şekilde ekilmiş ve 16 saat ışık ($200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$) 8 saat karanlık şartlarda $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 7 gün bekletilmiştir. Kotiledon yaprakları büyüyüp yatay hale gelen ve ilk gerçek yaprakları oluşmaya başlayan fasulye fideleri hidroponik sisteme aktarılmıştır. Ardından Hoaglang besin çözeltisi hidroponik sistemde kap içerisine uygulanmıştır (Kaya ve Daşgan 2013). Ardından fasulyenin 2. üç yaprakları görülene kadar büyütülmüştür. Fideler tuz stresine maruz bırakılmadan 24 saat önce melatoninin farklı konsantrasyonları (0 ve 200 μM) yapraktan homojen olacak şekilde uygulanmıştır. 24 saat sonunda sonra farklı konsantrasyonlarda NaCl (0 ve 150 mM) içeren Hoaglang çözeltisi hidroponik sisteme aktarılmış ve aynı kültür şartlarında 7 gün

3. MATERYAL ve YÖNTEM

boyunca (Stoeva and Kaymakanova 2008) tuz stresine bırakılmıştır. Diğer taraftan farklı bir uygulama olan kuraklık stresi oluşturmak için yine 24 saat önce melatonin uygulanmış fasulye fidelerine farklı konsantrasyonlarda PEG6000 (%0 ve %20) içeren Hoaglang çözeltisi hidroponik sisteme aktarılmış ve aynı kültür şartlarında 24 saatlik süreyle kuraklık stresine bırakılmıştır. Çalışmada oksijen kaynağı sağlamak için hava pompa sisteminden yararlanılmıştır. Aynı zamanda kökleri ışıktan korumak amacıyla kullanılan kaplar alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Araştırma tam şansa bağlı deneme planına göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 5 bitki olacak şekilde kurulmuş olup, uygulama sonunda bitkilerde aşağıda ayrıntılı olarak verilen biyokimyasal ve moleküler incelemeler yapılmıştır. Çalışmada CRED-iPBS çalışmasında kullanılan örneklere ait sıralar Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan örneklerin jel yükleme sırası

Örnek no	Çeşit	Doku tipi	Uygulama	Kesilen enzim
1	Serra	Kök	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	
1H	Serra	Kök	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
1M	Serra	Kök	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
2	Serra	Kök	0 mM NaCl/ 200 µM MEL	
2H	Serra	Kök	0 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
2M	Serra	Kök	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
3	Serra	Kök	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	
3H	Serra	Kök	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
3M	Serra	Kök	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
4	Serra	Kök	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	
4H	Serra	Kök	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
4M	Serra	Kök	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
5	Elkoca 05	Kök	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	
5H	Elkoca 05	Kök	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
5M	Elkoca 05	Kök	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
6	Elkoca 05	Kök	0 mM NaCl/ 200 µM MEL	
6H	Elkoca 05	Kök	0 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
6M	Elkoca 05	Kök	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
7	Elkoca 05	Kök	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	
7H	Elkoca 05	Kök	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
7M	Elkoca 05	Kök	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
8	Elkoca 05	Kök	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.6. (devam)

8H	Elkoca 05	Kök	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
8M	Elkoca 05	Kök	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
9	Serra	Kök	%0 PEG/ 0 µM MEL	
9H	Serra	Kök	%0 PEG/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
9M	Serra	Kök	%0 PEG/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
10	Serra	Kök	%0 PEG/ 200 µM MEL	
10H	Serra	Kök	%0 PEG/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
10M	Serra	Kök	%0 PEG/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
11	Serra	Kök	%20 PEG/ 0 µM MEL	
11H	Serra	Kök	%20 PEG/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
11M	Serra	Kök	%20 PEG/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
12	Serra	Kök	%20 PEG/ 200 µM MEL	
12H	Serra	Kök	%20 PEG/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
12M	Serra	Kök	%20 PEG/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
13	Elkoca 05	Kök	%0 PEG/ 0 µM MEL	
13H	Elkoca 05	Kök	%0 PEG/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
13M	Elkoca 05	Kök	%0 PEG/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
14	Elkoca 05	Kök	%0 PEG/ 200 µM MEL	
14H	Elkoca 05	Kök	%0 PEG/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
14M	Elkoca 05	Kök	%0 PEG/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
15	Elkoca 05	Kök	%20 PEG/ 0 µM MEL	
15H	Elkoca 05	Kök	%20 PEG/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
15M	Elkoca 05	Kök	%20 PEG/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
16	Elkoca 05	Kök	%20 PEG/ 200 µM MEL	
16H	Elkoca 05	Kök	%20 PEG/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
16M	Elkoca 05	Kök	%20 PEG/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
17	Serra	Yaprak	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	
17H	Serra	Yaprak	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
17M	Serra	Yaprak	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
18	Serra	Yaprak	0 mM NaCl/ 200 µM MEL	
18H	Serra	Yaprak	0 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
18M	Serra	Yaprak	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
19	Serra	Yaprak	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	
19H	Serra	Yaprak	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
19M	Serra	Yaprak	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
20	Serra	Yaprak	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	
20H	Serra	Yaprak	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
20M	Serra	Yaprak	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
21	Elkoca 05	Yaprak	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	
21H	Elkoca 05	Yaprak	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
21M	Elkoca 05	Yaprak	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
22	Elkoca 05	Yaprak	0 mM NaCl/ 200 µM MEL	
22H	Elkoca 05	Yaprak	0 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>

Çizelge 3.6. (devam)

22M	Elkoca 05	Yaprak	0 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
23	Elkoca 05	Yaprak	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	
23H	Elkoca 05	Yaprak	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
23M	Elkoca 05	Yaprak	150 mM NaCl/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
24	Elkoca 05	Yaprak	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	
24H	Elkoca 05	Yaprak	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
24M	Elkoca 05	Yaprak	150 mM NaCl/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
25	Serra	Yaprak	%0 PEG/ 0 µM MEL	
25H	Serra	Yaprak	%0 PEG/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
25M	Serra	Yaprak	%0 PEG/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
26	Serra	Yaprak	%0 PEG/ 200 µM MEL	
26H	Serra	Yaprak	%0 PEG/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
26M	Serra	Yaprak	%0 PEG/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
27	Serra	Yaprak	%20 PEG/ 0 µM MEL	
27H	Serra	Yaprak	%20 PEG/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
27M	Serra	Yaprak	%20 PEG/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
28	Serra	Yaprak	%20 PEG/ 200 µM MEL	
28H	Serra	Yaprak	%20 PEG/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
28M	Serra	Yaprak	%20 PEG/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
29	Elkoca 05	Yaprak	%0 PEG/ 0 µM MEL	
29H	Elkoca 05	Yaprak	%0 PEG/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
29M	Elkoca 05	Yaprak	%0 PEG/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
30	Elkoca 05	Yaprak	%0 PEG/ 200 µM MEL	
30H	Elkoca 05	Yaprak	%0 PEG/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
30M	Elkoca 05	Yaprak	%0 PEG/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>
31	Elkoca 05	Yaprak	%20 PEG/ 0 µM MEL	
31H	Elkoca 05	Yaprak	%20 PEG/ 0 µM MEL	<i>HpaII</i>
31M	Elkoca 05	Yaprak	%20 PEG/ 0 µM MEL	<i>MspI</i>
32	Elkoca 05	Yaprak	%20 PEG/ 200 µM MEL	
32H	Elkoca 05	Yaprak	%20 PEG/ 200 µM MEL	<i>HpaII</i>
32M	Elkoca 05	Yaprak	%20 PEG/ 200 µM MEL	<i>MspI</i>

3.3. Araştırmada incelenen konular

3.3.1. Biyokimyasal analizler

Malondialdehid (MDA, Lipid peroksidasyon) ölçümü

MDA ölçümü için her tekerrürden toplam 0,2 g bitki örneği alınarak soğuk havan içinde sıvı azot ile öğütülmüş ve ardından 2 mL TCA (%0,1) kullanılarak homojenize

edilmiştir. Daha sonra homojenize edilen örnekler yeni 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere alınarak 4°C 15.000 rpm'de 15 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüplere 1 mL olacak şekilde TCA (%20) içeren TBA (%0,5) çözeltisi ilave edilmiş ve örnekler 1-2 dk süreyle oda sıcaklığında ve süre bu sonunda 10 dk soğuk su içinde soğutulmuş ve yeni 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır. Örneklerin sırasıyla 450, 532 ve 600 nm olan dalga boylarında ölçülerek absorbans değerleri elde edilmiştir. Bu aşamada blank olarak TBA (%5) + TCA (%20) çözeltisi kullanılmıştır (Shams 2019).

Hidrojen peroksit (H₂O₂) değerinin ölçümü

H₂O₂ ölçümü için her tekrardan toplam 0,2 g bitki örneği alınarak soğuk havan içinde sıvı azot ile öğütülmüş ve ardından 2 mL TCA (%5) çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenize edilen örnekler yeni 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere alınarak 4°C 15.000 rpm'de 15 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üst faz yeni 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere aktarılarak +4°C'de birkaç dk bekletilmiştir. Daha sonra plate kuyularına 150 µL H₂O₂ ve 50 µL süpernatant eklenmiştir. Blank olarak hazırlanan H₂O₂ çözeltilerinin 290, 580, 870 µM olan farklı konsantrasyonları 3 tekrar halinde plate 200 µL yüklenmiş ve 390 nm'de absorbans değeri elde edilmiştir (Shams 2019).

SOD, POD ve CAT antioksidan enzimlerinin ekstraksiyonu

SOD, POD, CAT analizinde 0,1 M KH₂PO₄ tampon olarak kullanılmıştır. 0,2 g bitki örneklerinden alınarak sıvı azot yardımıyla havan içinde öğütülmüştür. Öğütülen örneklerin her birine 2 mL olacak şekilde homojenat tamponu eklenip homojenize edilmiştir. Ardından 4°C 15.000 rpm'de 15 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonunda elde edilen ekstraktlardan SOD, POD ve CAT aktiviteleri belirlenmiştir (Shams 2019).

SOD enzim aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmada SOD enzim aktivitesini belirlemek için 100 µM riboflavin ve reaksiyon çözeltileri kullanılmıştır. Plate kuyularına ilk olarak 20 µL örnek ardından, 170 µL SOD

reaksiyon çözeltisi, en son 10 µL riboflavin yüklenmiştir. Bu aşamada 10 µL riboflavin ve 190 µL SOD reaksiyon çözeltisi blank olarak yüklenmiştir. Hazırlanan plate 10 dk süreyle dakika 40 W beyaz ışığa (fluoresan lamba kaynağı) maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda belli dalga boyunda (560 nm) absorbans değerleri elde edilmiştir. Bu dalga boyunda elde edilen enzim değerleri, 1 enzim ünitesi olarak değerlendirilmiş ve enzim ünitesi (U/g) olarak hesaplanmıştır (Shams 2019).

POD enziminin aktivitesinin belirlenmesi

POD analizinde ilk olarak 0,1 M Na₂HPO₄ çözeltisine 30 µL gayakol ve 21 µL H₂O₂ (%35) eklenmiş ve 470 nm'de absorbans değeri 1 dk süreyle 15 sn aralıklı olacak şekilde ölçülmüştür. Daha sonra önceden hazırlanmış olan 145 µL POD reaksiyon çözeltisi ve 5 µL örnek palete 3 tekerrürlü yüklenmiş ve ölçülmüştür. Elde edilen enzim değerleri, 1 enzim ünitesi olarak değerlendirilmiş ve enzim ünitesi (U/g) olarak hesaplanmıştır (Shams 2019).

Biyokimyasal parametrelere ait olan verilerin analizi

Biyokimyasal parametrelere ait veriler tam şansa bağlı deneme planına göre 2 (genotip) x 2 (stres şiddeti) x 2 (melatonin konsantrasyonu) faktöriyel düzende varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Tukey testi ile belirlenmiştir. İstatistik analizler Minitab (Minitab Inc., v19, USA) programı ile yapılmıştır.

3.3.2. CRED-iPBS PCR analizleri

DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulanmıştır;

3. MATERYAL ve YÖNTEM

- Uygulamadan sonra elde edilen bitki örneklerinden 0,3 g porselen havan içinde sıvı azot ile toz haline gelinceye kadar öğütülmüş ve steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere alınmıştır.
- Ardından, çalışmadan önce hazırlanmış olan DNA ekstraksiyon tamponundan (su banyosunda (65°C'de) bekletilmiş) her bir örneğe 1 mL eklenerek örnekler 65°C'de su banyosunda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır (her 10 dk bir alt üst edilmiştir).
- Süre sonunda tüpler oda sıcaklığına alınarak 10 dk süreyle bekletilmiştir. Ardından her bir tüpe 750 µL kloroform izoamil alkol eklenmiş 15 dakika süreyle yavaşça alt üst edilmiş ve 24°C'de 14.000 rpm'de ve 20 dakika süreyle santrifüjlenmiştir.
- Daha sonra oluşan üst faz steril yeni bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine tekrardan kloroform izoamil alkol'den 750 µL eklenerek 4°C'de 14.000 rpm'de ve 20 dakika süreyle santrifüjlenmiştir.
- Yine santrifüj sonunda üst faz yeni tüpe alınarak üzerine, 8 µL proteinaz K ve 5 µL RNaz eklenerek 45 dakika süreyle 37°C'de bekletilmiştir. Süre sonunda her tüpe 100 µL sodyum asetat ve 100 µL amonyum asetat, 750 izopropanol µL eklenerek 4°C'de 14.000 rpm'de ve 20 dakika süreyle santrifüje tabi tutulmuştur.
- Santrifüj işleminden sonra üst kısım uzaklaştırılmış ve 37°C'de 15 dakika boyunca kurumaya bırakılmış ve süre sonunda kurutulduktan 100 µL 1× TE tamponu eklenerek çözdürülmüştür.
- DNA örnekleri kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.
- DNA'ların konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre de A_{260/280} dalga boylarında absorbans değerleri belirlenmiş ve Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Örneklerden elde edilen DNA'ların nanodrop spektrofotometre ölçümleri

Örnek No	Konsantrasyon ng/ µL
1	141,1
2	126,1
3	62,05
4	56,55
5	99,05
6	180,6
7	142,6

Çizelge 3.7. (devam)

8	104,9
9	63,93
10	102,3
11	92,15
12	63,67
13	152,8
14	93,58
15	68,92
16	67,48
17	170,1
18	122,6
19	153,9
20	182,7
21	106,6
22	105,6
23	136,4
24	122,5
25	96,63
26	122,8
27	58,15
28	70,38
29	188,1
30	88,93
31	79,48
32	43,15

3.4. CRED-iPBS yönteminin uygulanması

CRED-RA yöntemi ile metilasyonun belirlenmesinde *HpaII* (R0171S) ve *MspI* (R0106S) kesim enzimleri kullanılmıştır. 43 µL steril saf su, 5 µL RE 10X NEBuffer, 1µL DNA (1µg/µL), 0,5 µL *MspI* ve 0,5µL *HpaII* restriksiyon enzimleri 1,5 mL tüplere eklenerek 37°C’de 15 dk süreyle inkübe edilmiş ve bu süre sonunda enzim aktivitesi devam etmemesi için 80°C’de 20 dk bekletilmiştir.

3.4.1. CRED-iPBS PCR Analizi

CRED-iPBS çalışmasında kullanılan primerler ve bu primerlere ait bağlanma sıcaklığı ve baz dizisi Çizelge 3.8’de gösterilmiştir. CRED-iPBS analizi, *MspI* ve *HpaII* enzimleriyle kesilen DNA örnekleri kullanılarak Çizelge 3.8’te gösterildiği gibi PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.8. PCR bileşenleri, miktarları ve PCR şartları

PCR bileşeni		Miktar	
Taq DNA Master Mix (2X)	:	8,0 µl	
Primer (10 µM/µL)	:	1,0 µl	
Ultra Saf Su	:	5,0 µl	
Kalıp DNA (10 ng/µL)	:	1,0 µl	
Toplam	:	15 µl	
PCR Şartları			
Ön Ayrışma	:	95 °C	5 dk.
Ayrışma	:	94 °C	1 dk.
Bağlanma	:	54-63 °C	1 dk.
Uzama	:	72 °C	1 dk.
Final Uzama	:	72 °C	10 dk.
Bekletme	:	+4 °C	∞

40 Döngü

3.4.2. Elektroforez işlemi

150 mL 1X TBE içeren erlene 1,5 g agaroz eklenmiş mikrodalgada 4 dakika boyunca çözdürülmüştür. Ardından 5 µl EtBr (etidyum bromür) eklenerek karıştırılmış ve önceden hazırlanan jel tankına dökülmüştür. Jelin donmasının ardından elde edilen PCR ürünlerinden 10 µl alınarak 3 µl yükleme tamponu karıştırılıp kuyucuklara yüklenmiştir. İlk kuyucuğa DNA ladder 70 voltta 1,5 saat süreyle yürütülmüştür.

3.4.3. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi

PCR ürünlerinin incelenmesi ve değerlendirilmesi her bir uygulamada her primer için bant varlığı (1) ve yokluğu (0) şeklinde nitelendirilmiştir. Oluşan bantlara göre primerlerin bağlanıp bağlanmadığı belirlenmiştir. Jel görüntüsünde bant varlığı primerin hibridize olup incelenen uygulamada bulunduğu bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Elde edilen jel görüntülerinin bant profillerinin nitelendirilmesi için TotalLab TL120 programından faydalanılmıştır. Her bir deney grubu için ortalamalar

3. MATERYAL ve YÖNTEM

hesaplanmıştır. Bu değerlerdeki her bir parametre ve değişimlerin hassasiyetini karşılaştırmak için, kontrollerinin yüzdesi olarak hesaplanmıştır. DNA metilasyon sınıfları Zhang et al. (2016)'ya göre değerlendirilmiştir. Sınıfların gösterimi ve metilasyon durumları Çizelge 3.9'da verilmiştir. Tüm metilasyon (FMO) (%), yarı metilasyon (HMO) (%) ve toplam metilasyon (TMO) (%) oranları Orhan et al. (2020)'ye göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.9. *HpaII* ve *MspI* enzimlerinin kesim durumunu göstermektedir. 0: bant yok, 1: bant mevcut demektir. Altı çizili sitozin metillenmiştir (Zhang et al. 2016).

Tipler	Metilasyon durumları	Restriksiyon enzimlerinin kesme durumları			
		<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
Sınıf 1	CCGG <u>CCGG</u> GGCC GGCC	Aktif	Aktif	0	0
Sınıf 2	<u>CCGG</u> GGCC	Aktif	İnaktif	0	1
Sınıf 3	<u>CCGG</u> GGCC	İnaktif	Aktif	1	0
Sınıf 4	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	İnaktif	İnaktif	1	1

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada Elkoca 05 ve Serra çeşitlerinde tuz (0 ve 150 mM NaCl) ve kuraklık (%0 ve %20 PEG6000) stresleri altında püskürtme yöntemiyle ekzojen olarak uygulanan melatoninin (0 ve 200 µM) iyileştirici etkisinin kök ve yaprak dokularında biyokimyasal ve epigenetik değişimleri incelenmiştir. Elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

4.1. Biyokimyasal Analizler

Abiyotik stresler genel olarak ROT'ların ($O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , OH^{\cdot} ve H_2O_2) üretimini artırıp hücre yapısını bozmaktadır (Caverzan et al. 2012). Artan ROT üretimi hücrede nükleik asitlere, proteinlere, membran lipidlerine ve hidrolitik enzimlere zarar vererek büyük hasara yol açmaktadır (Bistgani et al. 2017). Meydana gelen bu hasar sonucunda, membran lipidlerinin oksitlenmiş türü olan MDA üretilmektedir. Bu nedenle MDA miktarındaki artış lipid peroksidasyonu ve buna bağlı olarak hücre membran hasarının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Godoy 2021). Araştırmamızda tuz stresi altında MDA miktarına ait varyans analizi Çizelge 4.1'de verilmiştir. İlgili çizelge incelediğinde MDA miktarına genotip, tuz stresi ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde MDA miktarı Elkoca 05 genotipinde 1,415 µmol/g, Serra genotipinde 2,244 µmol/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Melatonin uygulamasının ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA miktarı azalmıştır. Tuz stresinin ana etkisine bakıldığında ise konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA miktarı artmıştır.

Araştırmada, genotiplerin MDA içeriği NaCl konsantrasyonu artışına bağlı artmış ancak bu artış Serra genotipinde daha belirgin olmuş ve bu durum GxN interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olmasına neden olmuştur. Her iki genotipte de melatonin uygulamasına bağlı olarak azalmış ancak bu azalışın genotiplere göre farklılık göstermesi GxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.1). Diğer taraftan, MDA miktarı üzerine tuz stresinin etkisi melatoninin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiş ve NxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir. 0 mM NaCl uygulamasında melatonin uygulaması MDA miktarında artışa neden olurken,

150 mM NaCl'de azalışa neden olmuş ve NxM interaksyonu önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir.

Genotiplerin MDA miktarı tuz stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.1). Her iki genotipte en yüksek MDA miktarı 150 mM NaCl+0 μ M melatonin uygulamasında elde edilmiştir. Bu uygulamalarda MDA miktarı Elkoca 05 genotipinde 3,557 μ mol/g, Serra genotipinde ise 4,700 μ mol/g olduğu belirlenmiştir. Farhangi-Abriz and Torabian (2017) aynı bitkide tuz stresinde MDA içeriğinin farklı tuz konsantrasyonlarında arttığını tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.1. Tuz stresi altında MDA miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	4,1226	1.453,09	0,000
NaCl (N)	1	57,5153	20.272,54	0,000
Melatonin (M)	1	3,1314	1103,74	0,000
G x N	1	2,7571	971,78	0,000
G x M	1	0,1352	47,64	0,000
N x M	1	3,6423	1.283,80	0,000
G x N x M	1	0,2733	96,32	0,000
Hata	16	0,0028		
Toplam	23			

Tuz stresi altında H₂O₂ miktarına ait varyans analizi Çizelge 4.3'te verilmiştir. İlgili çizelge incelediğinde H₂O₂ miktarına genotipin, tuz stresinin ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde H₂O₂ miktarı Elkoca 05 genotipinde 3.717,69 μ mol/g, Serra genotipinde 2.010,10 μ mol/g olarak belirlenmiştir. Genotiplerin ortalamasına göre tuz stresinin ve melatoninin ana etkileri ayrı ayrı değerlendirildiğinde konsantrasyon artışına paralel olarak H₂O₂ miktarı azalmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.2. NaCl ve melatonin uygulamalarına göre genotiplerin MDA, H₂O₂, SOD, POD ve CAT miktarları¹.

VK	Genotip	NaCl (mM)	Melatonin (mM)	MDA (µmol/g TA)	H ₂ O ₂ (µmol/g TA)	SOD (U/g TA)	POD (U/g TA)	CAT (U/g TA)	
G x N x M	Elkoca 05	0	0	0,146 ^E	4.190,48 ^B	84,008 ^C	20,429 ^F	0,0179 ^B	
			200	0,266 ^{DE}	2.907,96 ^E	89,323 ^A	18,285 ^G	0,0085 ^D	
		150	0	3,557 ^B	6.895,37 ^A	79,111 ^E	82,171 ^B	0,0069 ^E	
			200	1,692 ^C	876,97 ^G	80,897 ^{DE}	53,606 ^D	0,0185 ^B	
	Serra	0	0	0,361 ^D	957,50 ^F	87,055 ^B	22,881 ^E	0,0140 ^C	
			200	0,354 ^D	879,81 ^G	88,119 ^{AB}	23,585 ^E	0,0384 ^A	
		150	0	4,700 ^A	3.143,72 ^C	82,548 ^{CD}	55,934 ^C	0,0025 ^F	
			200	3,562 ^B	3.059,39 ^D	82,874 ^C	89,900 ^A	0,0094 ^D	
G x N	Elkoca 05	0	-	0,206 ^D	3.549,22 ^B	86,666 ^A	19,357 ^D	0,0132 ^B	
			150	-	2,625 ^B	3.886,17 ^A	80,004 ^C	67,888 ^B	0,0127 ^B
	Serra	0	-	0,357 ^C	918,65 ^D	87,587 ^A	23,233 ^C	0,0262 ^A	
			150	-	4,131 ^A	3.101,55 ^C	82,711 ^B	72,917 ^A	0,0059 ^C
G x M	Elkoca 05	-	0	1,852 ^C	5.542,92 ^A	81,560 ^B	51,300 ^B	0,0124 ^C	
			200	0,979 ^D	1.892,46 ^D	85,110 ^A	35,945 ^D	0,0135 ^B	
	Serra	-	0	2,531 ^A	2.050,61 ^B	84,801 ^A	39,408 ^C	0,0082 ^D	
			200	1,958 ^B	1.969,60 ^C	85,497 ^A	56,743 ^A	0,0239 ^A	
N x M	-	0	0	0,254 ^C	3.667,10 ^B	85,531 ^B	21,655 ^C	0,0159 ^B	
			200	0,310 ^C	2.983,67 ^C	88,721 ^A	20,935 ^D	0,0234 ^A	
			150	0	4,129 ^A	3.926,43 ^A	80,830 ^C	69,052 ^B	0,0047 ^D
			200	2,627 ^B	878,39 ^D	81,885 ^C	71,753 ^A	0,0140 ^C	
N	-	0	-	0,282 ^B	3.325,39 ^A	87,126 ^A	21,295 ^B	0,0197 ^A	
			150	-	3,378 ^A	2.402,41 ^B	81,358 ^B	70,403 ^A	0,0093 ^B
M	-	-	0	2,191 ^A	3.796,77 ^A	83,180 ^B	45,354 ^B	0,0103 ^B	
			200	1,469 ^B	1.931,03 ^B	85,303 ^A	46,344 ^A	0,0187 ^A	
G	Elkoca 05	-	-	1,415 ^B	3.717,69 ^A	83,335 ^B	43,623 ^B	0,0129 ^B	
				2,244 ^A	2.010,10 ^B	85,149 ^A	48,075 ^A	0,0161 ^A	
GENEL ORTALAMA				1,830	2863,90	84,242	45,849	0,0145	
Varyasyon Katsayısı (%)				2,89	0,68	0,67	0,68	2,92	

¹ Aynı varyasyon kaynağı içinde aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

Araştırmada genotiplerin H₂O₂ miktarı NaCl konsantrasyonlarının artışına bağlı artmış ancak bu artış Serra genotipinde daha belirgin olmuş ve bu durum GxN

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olmasına neden olmuştur. Her iki genotipte de melatonin uygulamasına bağlı olarak azalmış ancak bu azalışın genotiplere göre farklılık göstermesi GxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur. Diğer taraftan H₂O₂ üzerine tuz stresinin etkisi melatoninin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiş ve NxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir. 0 mM ve 150 mM NaCl uygulamasında melatonin uygulaması H₂O₂ miktarında azalışa neden olmuş ve NxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımızla benzer olarak, melatonin uygulaması tuzluluk koşullarında bakla, *P. vulgaris* ve arpada H₂O₂ içeriğinin azalmasına neden olmuştur (Al-Shammari et al. 2023). Genotiplerin H₂O₂ miktarı tuz stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.2). Her iki genotipte en yüksek H₂O₂ miktarı 150 mM NaCl+0 µM melatonin uygulamasında elde edilmiştir. Elkoca-05 genotipinde en yüksek H₂O₂ miktarı 150 mM NaCl+0 µM melatonin uygulamasında 6.895,37 µmol/g olarak belirlenirken Serra genotipinde ise 150 mM NaCl+0 µM melatonininde 3143,72 µmol/g belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Tuz stresi altında H₂O₂ miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	17495195	45.205,79	0,000
NaCl (N)	1	5111308	13.207,10	0,000
Melatonin (M)	1	20885869	53.966,95	0,000
G x N	1	9524495	24.610,32	0,000
G x M	1	19111436	49.381,99	0,000
N x M	1	8387118	21.671,46	0,000
G x N x M	1	8434321	21.793,42	0,000
Hata	16	387		
Toplam	23			

Bitkiler strese maruz kaldıklarında oksidatif hasara karşı enzimatik (POD, SOD, CAT, APX,) antioksidan savunma sistemleri mevcuttur (Ahmad et al. 2008). Bu nedenle tüm bitki türleri gerek tuz ve gerekse kuraklık stresleri karşısında meydana gelebilecek olan hasarı enzimatik antioksidan miktarının artmasıyla en aza indirmektedir (Alam et al. 2021).

Tuz stresi altında SOD miktarına ait varyans analizi Çizelge 4.4'te verilmiş ve SOD miktarına genotip, tuz stresi ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde SOD miktarı Elkoca 05 genotipinde 83,335 U/g, Serra genotipinde 85,149 U/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Melatonin uygulamasının ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak SOD miktarı artmıştır. Tuz stresinin ana etkisine bakıldığında ise konsantrasyon artışına bağlı olarak SOD miktarı azalmıştır. Araştırmada, genotiplerin SOD içeriği NaCl konsantrasyonu artışına bağlı azalmış ve GxN interaksyonunun önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.4). Melatonin uygulamasına bağlı olarak her iki genotipte de arttığı belirlenmiş ve GxM interaksyonunun önemli ($p<0,01$) olmuştur (Çizelge 4.2 ve 4.4). Diğer taraftan, SOD miktarı üzerine tuz stresinin etkisi melatoninin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiş ve NxM interaksyonunun önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). 0 mM NaCl uygulamasında melatonin uygulaması SOD miktarında artışa neden olurken, 150 mM NaCl'de azalışa neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Genotiplerin SOD miktarı tuz stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksyonunun önemli ($p<0,05$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek SOD miktarı Elkoca 05 genotipinde 0 mM NaCl+200 μ M melatonin uygulamasında 89,323 U/g olarak ölçülmüştür. Serra genotipinde ise en yüksek SOD miktarı yine aynı uygulamada 88,119 U/g olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.2). *Salvadora persica*, hurma ağacı, kanola ve *Brassica juncea*'da NaCl'nin neden olduğu stres sonucunda SOD aktivitesinde azalma gözlenmiştir (Trifunović-Momčilov et al. 2023).

Çizelge 4.4. Tuz stresi altında SOD miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	19,754	43,88	0,000
NaCl (N)	1	199,679	443,54	0,000
Melatonin (M)	1	27,030	60,04	0,000
G x N	1	4,780	10,62	0,005
G x M	1	12,231	27,17	0,000
N x M	1	6,831	15,17	0,001
G x N x M	1	2,923	6,49	0,021
Hata	16	0,450		
Toplam	23			

Tuz stresi altında POD miktarına genotip, tuz stresi ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli ($p<0,01$) olduğunu gösteren varyans analizi Çizelge 4.5’de verilmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde POD miktarı Elkoca 05 genotipinde 43,623 U/g, Serra genotipinde 48,075 U/g olarak belirlenmiştir. Melatonin uygulamasının ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak POD miktarı artmıştır. Yine, tuz stresinin ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak POD miktarı artmıştır. Araştırmada, genotiplerin POD içeriği NaCl konsantrasyonu artışına bağlı artmış ancak bu artış Serra genotipinde daha belirgin olmuş ve bu durum GxN interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.5). Melatonin uygulamasına bağlı olarak Elkoca 05 genotipinde azaldığı, Serra genotipinde ise arttığı belirlenmiş bu durumun GxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.5). Diğer taraftan, POD miktarı üzerine tuz stresinin etkisi melatoninin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiş ve NxM interaksiyonun önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir. 0 mM NaCl uygulamasında melatonin uygulaması POD miktarında azalışa neden olurken, 150 mM NaCl’de artışa neden olmuş ve NxM interaksiyonu önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Genotiplerin POD miktarı tuz stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek POD miktarı Elkoca 05 genotipinde 150 mM NaCl+0 µM melatonin uygulamasında 82,171 U/g olarak belirlenmiştir. Serra genotipinde ise en yüksek POD miktarı 150 mM NaCl+200 µM melatonin uygulamasında 89,900 U/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Marulda yapılan bir çalışmada tuz stresinin POD aktivitesini önemli ölçüde artırdığı rapor edilmiştir (Sardar et al. 2023).

Çizelge 4.5. Tuz stresi altında POD miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	119,0	1.000,32	0,000
NaCl (N)	1	14.469,3	121.676,31	0,000
Melatonin (M)	1	5,9	49,49	0,000
G x N	1	2,0	16,73	0,001
G x M	1	1.602,9	13.479,26	0,000
N x M	1	17,6	147,59	0,000
G x N x M	1	1.335,8	11.233,02	0,000
Hata	16	0,1		
Toplam	23			

Tuz stresi altında CAT miktarlarını gösteren varyans analizi Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge incelendiğinde CAT miktarına genotip, tuz stresi ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde CAT miktarı Elkoca 05 genotipinde 0,0161 U/g, Serra genotipinde 0,0129 U/g olarak belirlenmiştir. Melatonin uygulamasının ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak CAT miktarı artmıştır. Tuz stresinin ana etkisine bakıldığında ise konsantrasyon artışına bağlı olarak CAT miktarı azalmıştır. Araştırmada, genotiplerin CAT miktarı NaCl konsantrasyonu artışına bağlı olarak azalmış ancak bu azalış Serra genotipinde daha belirgin olmuş ve bu durum GxN interaksyonunun önemli ($p<0,01$) olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.6). Melatonin uygulamasına bağlı olarak her iki genotipte de arttığı belirlenmiş bu durumun GxM interaksyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur. Diğer taraftan, CAT miktarı 0 mM NaCl ve 150 mM NaCl uygulamasında melatonin uygulaması CAT miktarında artışa neden olduğu belirlenmiş ve NxM interaksyonu önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Genotiplerin CAT miktarı tuz stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.6). En yüksek CAT miktarı Elkoca 05 genotipinde 150 mM NaCl+200 µM melatonin uygulamasında 0,0185 U/g, Serra genotipinde ise 0 mM NaCl+200 µM melatonin uygulamasında 0,0384 U/g olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.6. Tuz stresi altında CAT miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	0,000058	328,37	0,000
NaCl (N)	1	0,000644	3.653,96	0,000
Melatonin (M)	1	0,000422	2.396,18	0,000
G x N	1	0,000590	3.345,83	0,000
G x M	1	0,000317	1.801,05	0,000
N x M	1	0,000005	25,98	0,000
G x N x M	1	0,000555	3.148,76	0,000
Hata	16	0,00000018		
Toplam	23			

Kuraklık stresi altında MDA miktarına ait varyans analizi Çizelge 4.7’de verilmiştir. İlgili çizelge incelediğinde MDA miktarına genotip, kuraklık stresi ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde MDA miktarı Elkoca 05 genotipinde 0,490 $\mu\text{mol/g}$, Serra genotipinde 0,679 $\mu\text{mol/g}$ olarak belirlenmiştir. Melatonin uygulamasının ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA miktarı artmıştır. Yine, kuraklık stresinin ana etkisine bakıldığında ise konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA miktarı artmıştır. Svetleva et al. (2012) yaptıkları çalışmada, 20 farklı fasulye genotipinin kuraklık toleransını tespit etmek için, biyokimyasal aktivitelerini (malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve prolin) ölçmüş ve bu ölçümler sonucunda MDA ve H_2O_2 seviyesi düşük olan genotipleri toleranslı olarak değerlendirmişlerdir.

Araştırmada, genotiplerin MDA içeriği PEG6000 konsantrasyonu artışına bağlı artmış ancak bu artış Serra genotipinde daha belirgin olmuş ve bu durum GxP interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.7). Her iki genotipte de melatonin uygulamasına bağlı olarak artmış ancak bu artışın genotiplere göre farklılık göstermesi GxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur. Diğer taraftan, MDA miktarı üzerine kuraklık stresinin etkisi melatoninin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiş ve PxM interaksiyonun önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir. %0 PEG6000 uygulamasında melatonin uygulaması MDA miktarında azalışa neden olurken, %20 PEG6000 uygulamasında artışa neden olmuş ve PxM interaksiyonu önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Genotiplerin MDA miktarı kuraklık stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.7). Genotip, kuraklık stresi ve melatonin uygulamasının ana etkileri değerlendirildiğinde her iki genotipte de melatonin uygulaması (0 mM NaCl+200 μM melatonin) MDA miktarını azaltırken, kuraklık stresi şiddetinin artışıyla MDA miktarı artmaktadır. Kiran (2019), kuraklık stresi altında MDA miktarında kontrole göre artış olduğunu belirlemiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.7. Kuraklık stresi altında MDA miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	0,214497	161,62	0,000
PEG 6000 (P)	1	0,718862	541,64	0,000
Melatonin (M)	1	0,268025	201,95	0,000
G x P	1	0,184014	138,65	0,000
G x M	1	0,026804	20,20	0,000
P x M	1	0,596204	449,22	0,000
G x P x M	1	0,057212	43,11	0,000
Hata	16	0,001327		
Toplam	23			

Çizelge 4.8. PEG6000 ve melatonin uygulamalarına göre genotiplerin MDA, H₂O₂, SOD, POD ve CAT miktarları¹.

VK	Genotip	PEG 6000 (%)	Melatonin (mM)	MDA (µmol/g TA)	H ₂ O ₂ (µmol/g TA)	SOD (U/g TA)	POD (U/g TA)	CAT (U/g TA)
G x P x M	Elkoca 05	0	0	0,441 ^{DE}	1664,23 ^F	87,468 ^{AB}	21,713 ^D	0,0679 ^A
		200	0,368 ^E	1831,07 ^E	87,991 ^A	18,815 ^E	0,0277 ^C	
	Serra	20	0	0,757 ^B	2898,66 ^B	86,229 ^{BCD}	29,961 ^A	0,0054 ^F
		200	0,394 ^{DE}	2153,87 ^C	86,503 ^{BC}	25,684 ^C	0,0123 ^D	
		0	0	0,486 ^D	1937,72 ^D	78,879 ^F	26,153 ^C	0,0085 ^E
		200	0,351 ^E	1291,15 ^G	83,077 ^E	14,745 ^F	0,0310 ^B	
20	0	1,285 ^A	3401,13 ^A	84,979 ^D	27,524 ^B	0,0029 ^G		
200	0,594 ^C	2918,03 ^B	85,252 ^{CB}	25,665 ^C	0,0270 ^C			
G x P	Elkoca 05	0	-	0,404 ^C	1747,65 ^B	87,730 ^A	20,264 ^C	0,0478 ^A
		20	-	0,575 ^B	2526,26 ^C	86,366 ^B	27,823 ^A	0,0088 ^D
	Serra	0	-	0,418 ^C	1614,44 ^A	80,978 ^D	20,449 ^C	0,0198 ^B
		20	-	0,940 ^A	3159,58 ^C	85,116 ^C	26,594 ^B	0,0150 ^C
G x M	Elkoca 05	-	0	0,418 ^C	2281,44 ^B	86,849 ^A	25,837 ^B	0,0366 ^A
		200	0,562 ^B	1992,47 ^D	87,247 ^A	22,250 ^C	0,0200 ^C	
	Serra	-	0	0,540 ^B	2669,42 ^A	81,929 ^C	26,838 ^A	0,0057 ^D
		200	0,818 ^A	2104,59 ^C	84,165 ^B	20,205 ^D	0,0290 ^B	
P x M	-	0	0	0,463 ^B	3149,89 ^A	83,173 ^B	23,933 ^C	0,0382 ^A
		200	0,359 ^C	2535,95 ^B	85,534 ^A	16,780 ^D	0,0294 ^B	
		20	0	0,494 ^B	1800,97 ^C	85,604 ^A	28,742 ^A	0,0041 ^D
P	-	200	0	1,021 ^A	1561,11 ^D	85,878 ^A	25,675 ^B	0,0196 ^C
		0	-	0,411 ^B	2842,92 ^A	84,354 ^B	20,357 ^B	0,0338 ^A
		20	-	0,758 ^A	1681,04 ^B	85,741 ^A	27,208 ^A	0,0119 ^B
M	-	-	0	0,479 ^B	2475,43 ^A	84,389 ^B	26,338 ^A	0,0211 ^B
		200	0,690 ^A	2048,53 ^B	85,706 ^A	21,227 ^B	0,0245 ^A	
G	Elkoca 05	-	-	0,490 ^B	2136,96 ^B	87,048 ^A	24,043 ^A	0,0283 ^A
	Serra	-	-	0,679 ^A	2387,01 ^A	83,047 ^B	23,522 ^B	0,0174 ^B
GENEL ORTALAMA				0,584	2261,98	85,047	23,783	0,0228
Varyasyon Katsayısı (%)				6,2	1,67	0,60	1,41	1,39

¹ Aynı varyasyon kaynağı içinde aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

Kuraklık stresi altında H₂O₂ miktarına ait varyans analizi Çizelge 4.9'da verilmiştir. Çizelge incelediğinde H₂O₂ miktarına genotipin, tuz stresinin ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli (p<0,01) olduğu tespit edilmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde H₂O₂ miktarı Elkoca 05 genotipinde 2136,96 µmol/g, Serra genotipinde 2387,01 µmol/g olarak belirlenmiştir. Melatonin uygulamasının ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak H₂O₂ miktarı azalmıştır. Yine, kuraklık stresinin ana etkisine bakıldığında ise konsantrasyon artışına bağlı olarak H₂O₂ miktarı azalmıştır.

Araştırmada, genotiplerin H₂O₂ içeriği PEG6000 konsantrasyonu artışına bağlı artmış ancak bu artış Serra genotipinde daha belirgin olmuş ve bu durum GxP interaksiyonunun önemli (p<0,01) olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.8). Her iki genotipte de melatonin uygulamasına bağlı olarak azalmış ve bu durumun GxM interaksiyonunun önemli (p<0,01) çıkmasına neden olmuştur. Diğer taraftan, H₂O₂ miktarı üzerine kuraklık stresinin etkisi melatoninin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiş ve PxM interaksiyonunun önemli (p<0,01) olduğu belirlenmiştir. %0 PEG6000 ve %20 PEG6000 uygulamasında melatonin uygulaması H₂O₂ miktarında azalışa neden olmuş ve PxM interaksiyonu önemli (p<0,01) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Genotiplerin H₂O₂ miktarı kuraklık stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksiyonunun önemli (p<0,01) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.8). Her iki genotipte de en yüksek H₂O₂ miktarı 20 mM NaCl+ 0 µM melatonin uygulamasında Elkoca-05 genotipinde 2898,66 µmol/g Serra genotipinde 3401,13 µmol/g belirlenmiştir. Bu sonuçlar GxNxM üçlü interaksiyonunun önemli (p<0,01) olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.8). Soya fasulyesi üzerine yapılan bir çalışmada (Guler and Pehlivan 2016), kuraklık stresinin H₂O₂ miktarını artırdığı rapor edilmiş ve bu çalışmanın bulgularımıza benzer olduğu görülmüştür. Yine yapılan farklı bir çalışmada buğdayda kuraklık stresinin özellikle artan konsantrasyonlarının H₂O₂ miktarını önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (İnan 2022).

Çizelge 4.9. Kuraklık stresi altında H₂O₂ miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	375157	264,88	0,000
PEG 6000 (P)	1	8099784	5.718,96	0,000
Melatonin (M)	1	1093470	772,06	0,000
G x P	1	881352	622,29	0,000
G x M	1	114149	80,60	0,000
P x M	1	209898	148,20	0,000
G x P x M	1	433445	306,04	0,000
Hata	16	1416		
Toplam	23			

Kuraklık stresi altında SOD miktarına ait varyans analizi Çizelge 4.10'da verilmiştir. İlgili çizelge incelediğinde SOD miktarına genotip, kuraklık stresi ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli ($p < 0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde SOD miktarı Elkoca 05 genotipinde 87,048 U/g, Serra genotipinde 83,047 U/g olarak belirlenmiştir. Melatonin uygulamasının ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak SOD miktarı artmıştır. Yine, kuraklık stresinin ana etkisine bakıldığında ise konsantrasyon artışına bağlı olarak SOD miktarı artmıştır. Araştırmada, genotiplerin SOD içeriği PEG6000 konsantrasyonu artışına bağlı artmış ancak bu artış Serra genotipinde daha belirgin olmuş ve bu durum GxP interaksiyonunun önemli ($p < 0,01$) olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.9). Her iki genotipte de melatonin uygulamasına bağlı olarak SOD miktarı artmış ve bu artış Serra genotipinde daha belirgin olmuş, bu durumun GxM interaksiyonunun önemli ($p < 0,01$) çıkmasına neden olmuştur. Diğer taraftan, SOD miktarı üzerine kuraklık stresinin etkisi melatoninin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiş ve PxM interaksiyonun önemli ($p < 0,01$) olduğu belirlenmiştir. %0 PEG6000 ve %20 PEG6000 uygulamasında melatonin uygulaması SOD miktarında artışa neden olmuş ve PxM interaksiyonu önemli ($p < 0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). Genotiplerin SOD miktarı kuraklık stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksiyonunun önemli ($p < 0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.9). En yüksek SOD miktarı Elkoca 05 genotipinde %0 PEG6000 + 200 µM melatonin uygulamasında 87,991 U/g belirlenirken, Serra genotipinde %20 PEG6000 + 200 µM melatonin uygulamasında 85,252 U/g belirlenmiştir. Bulgularımıza paralel olarak Kusvuran and Dasgan (2017) kuraklık stresi altında fasulyede SOD aktivitesinin toleranslı genotiplerde hassas olanlara göre daha büyük bir artışa sahip olduğunu bildirmiştir. Qayyum et al. (2018) buğday

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

genotiplerinde SOD aktivitelerinin kuraklık şiddetinin artmasına eş zamanlı olarak artış gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Kuraklık stresi altında POD miktarına ait varyans analizi Çizelge 4.11’de verilmiştir. Bu çizelgeye göre POD miktarına genotip, kuraklık stresi ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde POD miktarı Elkoca-05 genotipinde 24,043 U/g, Serra genotipinde 23,522 U/g olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Kuraklık stresi altında SOD miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	96,0447	377,21	0,000
PEG 6000 (P)	1	11,5418	45,33	0,000
Melatonin (M)	1	10,4096	40,88	0,000
G x P	1	45,3961	178,29	0,000
G x M	1	5,0654	19,89	0,000
P x M	1	6,5377	25,68	0,000
G x P x M	1	5,0654	19,89	0,000
Hata	16	0,2546		
Toplam	23			

Melatonin uygulamasının ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak POD miktarı azalmıştır. Yine, kuraklık stresinin ana etkisine bakıldığında ise konsantrasyon artışına bağlı olarak POD miktarı artmıştır. Araştırmada, genotiplerin POD içeriği PEG6000 konsantrasyonu artışına bağlı artmış ancak bu artış Elkoca 05 genotipinde daha belirgin olmuş ve bu durum GxP interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.11). Her iki genotipte de melatonin uygulamasına bağlı olarak POD miktarı azalmış ve bu azalış Serra genotipinde daha belirgin olmuş, bu durumun GxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur. Diğer taraftan, POD miktarı üzerine kuraklık stresinin etkisi melatoninin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiş ve PxM interaksiyonun önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir. %0 PEG6000 ve %20 PEG6000 uygulamasında melatonin uygulaması POD miktarında artışa neden olmuş ve PxM interaksiyonu önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). Genotiplerin POD miktarı kuraklık stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.11). En yüksek POD miktarı Elkoca 05

genotipinde %20 PEG6000 + 0 µM melatonin uygulamasında 29,961 U/g belirlenirken, Serra genotipinde %20 PEG6000 + 0 µM melatonin uygulamasında 27,524 U/g belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Fasulye çeşitlerinde kuraklığa dayanıklılık düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada (Terzi et al. 2010) fasulye çeşitleri kuraklığa maruz bırakılmış ve genel olarak tüm çeşitlerde kuraklık artında POD miktarının arttığı rapor edilmiştir.

Çizelge 4.11. Kuraklık stresi altında POD miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	1,633	14,39	0,002
PEG 6000 (P)	1	281,681	2.482,54	0,000
Melatonin (M)	1	156,698	1.381,03	0,000
G x P	1	2,996	26,40	0,000
G x M	1	13,919	122,67	0,000
P x M	1	25,036	220,65	0,000
G x P x M	1	44,776	394,63	0,000
Hata	16	0,113		
Toplam	23			

Çizelge 4.12’de kuraklık stresi altında CAT miktarlarını gösteren varyans analiz verilmiştir. Bu çizelgeye göre CAT miktarına genotip, tuz stresi ve melatonin konsantrasyonlarının ana etkilerinin önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde CAT miktarı Elkoca 05 genotipinde 0,0283 U/g, Serra genotipinde 0,0174 U/g olarak belirlenmiştir. Melatonin uygulamasının ana etkisine bakıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak CAT miktarı artmıştır. Kuraklık stresinin ana etkisine bakıldığında ise konsantrasyon artışına bağlı olarak CAT miktarı azalmıştır. Araştırmada, genotiplerin CAT içeriği PEG6000 konsantrasyonu artışına bağlı azalmış ancak bu azalış Elkoca 05 genotipinde daha belirgin olmuş ve bu durum GxP interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.12). Melatonin uygulamasına bağlı olarak CAT miktarı Elkoca 05 genotipinde azalırken Serra genotipinde arttığı belirlenmiş ve bu durumun GxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.12). Diğer taraftan, CAT miktarı üzerine kuraklık stresinin etkisi melatoninin konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiş ve PxM interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir. %0 PEG6000 ve %20 PEG6000 uygulamasında melatonin uygulaması CAT miktarında azalışa neden olmuş ve PxM interaksiyonu önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). Genotiplerin CAT

miktarı kuraklık stresi ve melatonin konsantrasyonuna göre değişim göstermesi GxNxM üçlü interaksiyonunun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.12). En yüksek CAT miktarı Elkoca 05 genotipinde %0 PEG6000 + 0 µM melatonin uygulamasında 0,0679 U/g belirlenirken, Serra genotipinde %0 PEG6000 + 200 µM melatonin uygulamasında 0,0310 U/g belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Fasulyede kuraklık stresi üzerine yapılan çalışmalarda şiddetli kuraklık altında CAT miktarının arttığı bildirilmiştir (Saglam et al. 2011; Siddiqui et al. 2015).

Çizelge 4.12. Kuraklık stresi altında CAT miktarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F Değeri	P Değeri
Genotip (G)	1	0,000718	5.627,93	0,000
PEG 6000 (P)	1	0,002871	22.511,77	0,000
Melatonin (M)	1	0,000067	527,39	0,000
G x P	1	0,001750	13.717,64	0,000
G x M	1	0,002395	18.776,00	0,000
P x M	1	0,000888	6.962,27	0,000
G x P x M	1	0,000778	6.096,72	0,000
Hata	16	0,0000001		
Toplam	23			

4.2. CRED-ipBS Analizleri

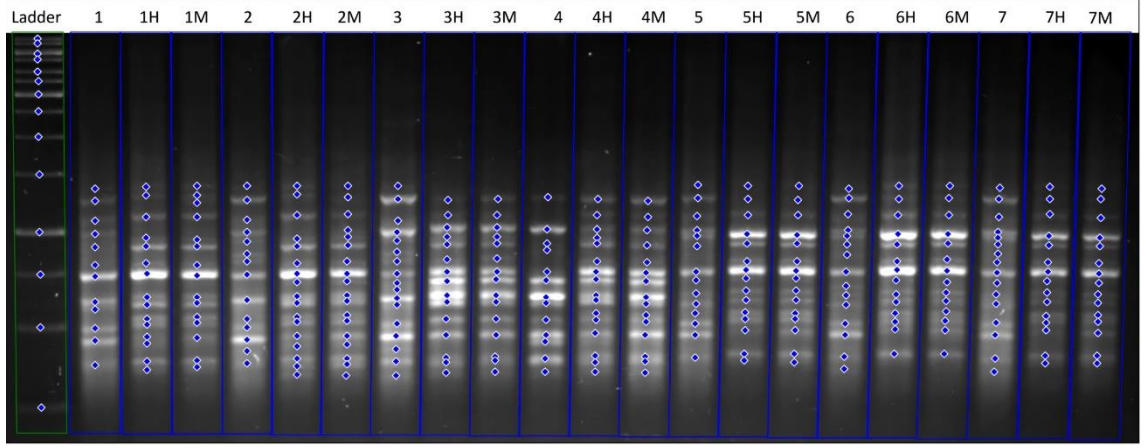
Bitkilerdeki epigenetik olayların en kapsamlı çalışılmış türü DNA metilasyonudur (Feng and Jacobsen 2011; Vanyushin and Ashapkin 2011). Sitozinlerin 5' pozisyonundaki metilasyon, nükleer DNA'nın evrimsel olarak korunmuş bir epigenetik modifikasyonudur. Spesifik bölgelerdeki metilasyon paterni, çevresel uyaranlara yanıtta diferansiyel olarak modüle edilebilen bakım mekanizmaları, de novo metilasyon ve demetilasyon süreçleri ile oluşur. Bu nedenle, abiyotik stresler ile DNA metilasyon kalıplarındaki değişiklikler arasındaki ilişkilerin araştırılması, epigenetiğin çevresel zorluklara verilen yanıtındaki rolünü anlamak için önemlidir (Kuhlmann et al. 2023).

Hayvanlarda olduğu gibi bitkilerde de metillenmiş sitozin kalıntılarının (m5C) büyük bir kısmı simetrik CG bölgelerinde meydana gelir. Hayvanlardan farklı olarak, bitkiler simetrik CHG bölgelerinde ve asimetric CHH bölgelerinde de önemli metilasyon gösterirler (H, G hariç herhangi bir nükleotiddir). Her üç metilasyon bağlamı da tekrar ve transposable element (TE) dizilerinde bulunurken, protein kodlayan gen dizileri

çoğunlukla CG bölgelerinde metillenir (Woo et al. 2008). Omurgalılarda sitozin metilasyonunun derecesi %3 ila 8, bitkilerde ise %6 ila 30 arasında değişmektedir (Chen and Li 2004). Sitozin metilasyonunun ökaryotlardaki ana rolünün, organizmaların genom bütünlüğünü çeşitli stres faktörlerine karşı korumak için kullandıkları bir stres yanıtı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada metilasyonun belirlenmesinde kullanılan teknik ise CRED-RA tekniğidir. Bu teknik için *HpaII* ve *MspI* enzimleri kullanılmıştır. Bu enzimlerin her ikisi de CCGG dizisini tanır. *HpaII* enzimi sitozinlerin her ikisini de metillenmemiş halde keserken, *MspI* sadece iç sitozin metillendiğinde aktiftir. *HpaII* ve *MspI* enzimleri inaktif olduğunda amplifikasyon ürünü elde edilir. DNA metilasyonu, 5-metilsitozin oluşturmak üzere sitozine bir metil grubunun eklenmesini ifade eder. Kısaca DNA metilasyonu, DNA bütünlüğünü ve işlevini etkileyen birçok biyolojik süreçte yer alan önemli bir epigenetik olay/modifikasyondur (Yoder et al. 1997; Zilberman 2008).

Tuz, kuraklık ve melatonin konsantrasyonlarının *P. vulgaris* cv. “Elkoca-05” ve “Serra” çeşitlerinin genomları üzerindeki epigenetiksel etkilerini incelemek için CRED analiz yöntemi ile 10 iPBS primeri değerlendirilmeye alınmıştır. iPBS primerlerinin uygulamalarda üretmiş olduğu bantlara ait görüntüler Şekil 4.1’de verilmiştir. Her doz için % polimorfizm değerleri hesaplanmış ve ortalamaları alınmıştır. % polimorfizm değerini hesaplamak için; $100 \cdot a/n$ formülü kullanılmıştır. Bu oranlar üzerine tuz, kuraklık ve melatonin uygulamaların tümünde DNA metilasyonunun meydana geldiği gözlemlenmiştir. *MspI* enziminin metilasyonun görüldüğü yerden kesim yapması ve *HpaII* enziminin metilasyon görülmediği zaman kesim yapması bilgisinden hareketle alınan sonuçlara göre;

Serra çeşidinin yaprak dokusunda tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS polimorfizm yüzdeleri; tek başına tuz stresi uygulandığında %41,51, tek başına melatonin uygulandığında %29,06 ve tuz/melatonin birlikte uygulandığında %35,05 olarak belirlenmiştir. Kök dokusundaki CRED-iPBS polimorfizm yüzdeleri ise sırasıyla; %36,72, %24,89 ve %47,18 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13).



Şekil 4.1. iPBS 2395 primerine ait jel görüntüsü



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.13. Serra çeşidinin kök ve yaprak dokularındaki tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri.

PRİMER ADI	KÖK																		YAPRAK																	
	Kontrol toplam bant sayısı			Hpall toplam bant sayısı			MspI toplam bant sayısı			Toplam Polimorfik Bant sayısı						Polimorfizm Yüzdesi																				
	Hpall	MspI		M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	T												
İPBS-2075	9	4	3	3	5	8	3	3	5	4	4	4	3	1	100	100	80	50	100	100	80	50	100	33,33												
İPBS-2081	9	10	8	7	10	10	13	10	1	2	3	2	7	4	12,5	28,57	30	20	53,85	40	12,5	57,14	0	12,5	11,11											
İPBS-2083	3	8	5	8	7	8	8	9	2	5	4	0	1	1	40	62,5	57,14	0	12,5	11,11	0	12,5	11,11	40												
İPBS-2226	9	10	15	7	11	12	6	15	8	4	8	4	4	7	53,33	57,14	72,73	33,33	66,67	46,67	53,33	57,14	72,73	33,33	66,67											
İPBS-2374	18	18	17	11	11	15	11	11	1	7	7	3	6	7	5,88	63,64	63,64	20	54,55	63,64	63,64	63,64	20	54,55	63,64											
İPBS-2377	11	12	11	11	14	12	15	11	0	2	5	0	3	1	0	18,18	35,71	0	20	9,09	18,18	35,71	0	20	9,09											
İPBS-2387	11	11	17	10	17	16	11	12	8	1	6	5	2	3	47,06	10	35,29	31,25	18,18	25	47,06	10	35,29	31,25	18,18	25										
İPBS-2394	5	8	6	5	7	5	7	7	3	4	4	3	4	3	50	80	57,14	60	57,14	42,86	50	80	57,14	60	57,14	42,86										
İPBS-2395	13	12	14	11	12	14	12	11	1	6	5	2	4	5	7,14	54,55	41,67	14,29	33,33	45,45	7,14	54,55	41,67	14,29	33,33	45,45										
İPBS-2400	10	10	9	6	14	10	9	8	3	4	4	2	5	4	33,33	66,67	28,57	20	55,56	50	33,33	66,67	28,57	20	55,56	50										
Ortalama	9,8	10,3	10,5	7,9	10,8	11	9,5	9,7	3,2	4	5	2,5	3,9	3,6	34,93	54,12	50,19	24,89	47,18	36,72	34,93	54,12	50,19	24,89	47,18	36,72										
İPBS-2075	7	8	7	11	11	8	11	8	0	4	4	0	3	4	0	36,36	36,36	0	27,27	50	36,36	36,36	0	27,27	50											
İPBS-2081	6	6	7	9	8	8	11	6	1	3	2	2	5	0	14,29	33,33	25	25	45,45	0	14,29	33,33	25	25	45,45	0										
İPBS-2083	9	8	8	10	7	8	11	8	1	3	2	2	5	2	12,5	30	28,57	25	45,45	25	12,5	30	28,57	25	45,45	25										
İPBS-2226	10	7	6	13	11	10	6	11	4	3	3	3	1	6	66,67	23,08	27,27	30	16,67	54,55	66,67	23,08	27,27	30	16,67	54,55										
İPBS-2374	8	15	13	10	9	9	13	9	5	2	1	6	2	6	38,46	20	11,11	66,67	15,38	66,67	38,46	20	11,11	66,67	15,38	66,67										
İPBS-2377	11	13	12	13	13	13	14	9	3	2	2	2	1	6	25	15,38	15,38	15,38	7,14	66,67	25	15,38	15,38	15,38	7,14	66,67										
İPBS-2387	6	10	11	14	6	13	4	7	5	8	0	4	8	5	45,45	57,14	0	30,77	100	71,43	45,45	57,14	0	30,77	100	71,43										
İPBS-2394	6	6	6	8	6	4	4	8	4	6	0	2	2	4	66,67	75	0	50	50	50	66,67	75	0	50	50	50										
İPBS-2395	11	11	15	13	14	14	13	13	4	2	5	3	2	2	26,67	15,38	35,71	21,43	15,38	15,38	26,67	15,38	35,71	21,43	15,38	15,38										
İPBS-2400	15	13	14	16	15	19	18	13	5	7	5	5	5	2	35,71	43,75	33,33	26,32	27,78	15,38	35,71	43,75	33,33	26,32	27,78	15,38										
Ortalama	8,9	9,7	9,9	11,7	10	10,6	10,5	9,2	3,2	4	2,4	2,9	3,4	3,7	33,14	34,94	21,28	29,06	35,05	41,51	33,14	34,94	21,28	29,06	35,05	41,51										

*T: 150 mM NaCl, M: 200 µM Melatonin; T+M: 150 mM NaCl + 200 µM Melatonin

Elkoca 05 çeşidinin yaprak dokusunda tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS polimorfizm yüzdeleri; tek başına tuz stresi uygulandığında %43,34, tek başına melatonin uygulandığında %37,5 ve tuz/melatonin birlikte uygulandığında %30,28 olarak belirlenmiştir. Kök dokusundaki CRED-iPBS polimorfizm yüzdeleri ise sırasıyla; %42,81, %46,63 ve %40,56 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Serra çeşidinin yaprak dokusunda kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS polimorfizm yüzdeleri; tek başına kuraklık stresi uygulandığında %65,01, tek başına melatonin uygulandığında %37,26 ve kuraklık/melatonin birlikte uygulandığında %54,90 olarak belirlenmiştir. Kök dokusundaki CRED-iPBS polimorfizm yüzdeleri ise sırasıyla; %44,33, %53,68 ve %49,99 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15).

Elkoca 05 çeşidinin yaprak dokusunda kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS polimorfizm yüzdeleri; tek başına kuraklık stresi uygulandığında %41,31, tek başına melatonin uygulandığında %47,63 ve kuraklık/melatonin birlikte uygulandığında %46,95 olarak belirlenmiştir. Kök dokusundaki CRED-iPBS polimorfizm yüzdeleri ise sırasıyla; %56,84, %56,29 ve %58,19 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

Son zamanlarda, epigenetik değişiklikler abiyotik stres ile ilişkilendirilmiştir. Stres koşulları altında, gen ifadesinde değişiklikler indüklenebilir. Stresle karşılaşan bitkiler, metilasyon ve demetilasyon yoluyla gen ifadelerini yeniden programlayabilirler. Mısırın köklerinde, soğuk stresi nükleozom çekirdeğinin metilasyonunu azaltmıştır (Steward et al. 2002). Tütünde, ozmotik strese yanıt olarak metilasyon durumundaki değişiklikler rapor edilmiştir (Kovarik et al. 1997). Düşük sıcaklık gibi abiyotik stres faktörleri hindiba kök uçlarının (Demeulemeester et al. 1999) ve *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.'nın (Finnegan et al. 1998) metilasyon durumunu değiştirmiştir. Aina et al. (2004) ağır metallerin *Trifolium repens* L. ve *Cannabis sativa* L.'da metilasyon durumunu değiştirebileceğini göstermiştir. Daha yakın zamanlarda, tütünde kuraklık ve tuzluluğa (Choi and Sano 2007) ve pamukta alkali stresine (Cao et al. 2011) yanıt olarak metilasyon durumundaki değişiklikler bildirilmiştir.

Erturk et al. (2014) yaptıkları çalışmada, analizlerin krom (Cr) konsantrasyonlarının DNA polimorfizmlerini indükleyebildiğini göstermiştir. RAPD profillerinin analizine dayanarak, Cr tarafından indüklenen polimorfizmlerin tek ve çift iplik kırılmaları, modifiye bazlar, oksitlenmiş bazlar, DNA-protein çapraz bağları nokta mutasyonları, karmaşık kromozomal yeniden düzenlemeler, bazı oligonükleotid priming bölgelerindeki mutasyonlar, büyük delesyonlar ve homolog rekombinasyonunun sonucu olduğunu gözlemlemiştir.

Aygün Ertürk (2013) yaptığı çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda toksik etkileri olduğu bilinen ağır metallerin (Zn, Pb, Cu, Ni, Co, Mn, Cr) *Zea mays* L. bitkisinde genetik ve epigenetik değişikliklere neden olduğunu gözlemlemiştir. Bu değişiklikleri mitotik indeks, protein, RAPD ve CRED-RA analizleri ile belirlemiştir. Ağır metallerin mısır tohumları üzerindeki genotoksik etkilerini araŐtırmak için yaptığı çalışmada kullanılan RAPD analizleri, kontrol grubuyla karşılaŐtırıldıđında RAPD profillerinde değişiklikler (polimorfizm) olduğunu tespit etmiştir. Bu değişiklikler yeni bant oluŐumu, bant kaybolması veya bant yoğunluğu şeklinde olduğunu aktarmıştır. Doz artışına bağlı olarak, RAPD profillerinde ağır metallerin neden olduğu polimorfizmin GTS (Genomik kalıp stabilitesi) oranlarını azalttığını gözlemlemiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.14. Elkoca 05 çeşidinin kök ve yaprak dokularındaki tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarının CRED-iPBS bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri.

PRİMER ADI	KÖK												YAPRAK											
	Kontrol toplam bant sayısı			HpII toplam bant sayısı			MspI toplam bant sayısı			Toplam Polimorfik Bant sayısı						Polimorfizm Yüzdeleri								
	HpaII	MspI		M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	T	M	T+M	
İPBS-2075	5	4	4	4	1	1	4	4	1	1	4	3	0	4	4	25	25	100	100	100	0	100	0	100
İPBS-2081	10	12	11	11	12	9	11	11	3	4	6	4	6	6	27,27	36,36	50	33,33	66,67	66,67	54,55	100	50	55,56
İPBS-2083	9	10	7	7	8	5	6	2	2	1	5	5	5	3	28,57	28,57	12,5	100	100	100	100	50	50	55,56
İPBS-2226	6	4	5	11	5	5	9	1	1	5	3	1	1	5	20	45,45	60	20	20	20	20	20	20	55,56
İPBS-2374	9	15	14	9	8	17	14	5	2	1	4	4	5	1	35,71	22,22	12,5	23,53	31,25	31,25	16,67	16,67	0	7,14
İPBS-2377	12	12	11	11	10	12	12	3	1	2	2	2	2	0	27,27	9,09	20	16,67	16,67	16,67	0	0	0	0
İPBS-2387	11	4	12	9	10	3	10	5	7	6	1	1	6	1	58,33	66,67	10	33,33	60	60	20	20	20	20
İPBS-2394	7	7	5	8	5	5	7	6	2	3	4	4	4	1	40	37,5	80	80	57,14	57,14	16,67	16,67	0	16,67
İPBS-2395	14	14	13	13	13	13	13	3	3	3	3	3	3	5	23,08	23,08	23,08	23,08	23,08	23,08	23,08	23,08	23,08	38,46
İPBS-2400	8	13	11	11	8	11	13	7	3	5	2	4	4	6	27,27	45,45	25	36,36	30,77	85,71	85,71	85,71	85,71	
Ortalama	9,1	9,5	9,3	9,4	8	8,4	9,4	8,7	3	3,2	2,7	3,1	3,6	3,2	31,25	33,94	39,31	46,63	40,56	42,81	42,81	42,81	42,81	
İPBS-2075	9	7	10	6	6	10	7	7	3	5	7	5	2	4	30	83,33	100	50	28,57	57,14	28,57	57,14	57,14	
İPBS-2081	5	6	5	6	6	6	6	6	0	1	1	2	2	2	0	16,67	16,67	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	
İPBS-2083	8	8	9	5	5	5	7	10	1	3	3	3	1	2	11,11	60	60	60	14,29	20	14,29	20	20	
İPBS-2226	11	5	9	8	10	4	5	4	2	3	3	1	2	1	22,22	37,5	30	25	40	25	40	25	25	
İPBS-2374	17	17	17	16	11	17	14	14	4	3	6	4	4	3	23,53	18,75	54,55	23,53	23,53	21,43	23,53	21,43	21,43	
İPBS-2377	13	13	7	12	6	10	12	9	6	1	5	3	1	4	85,71	83,33	83,33	30	8,33	44,44	8,33	44,44	44,44	
İPBS-2387	9	4	15	10	14	4	4	8	8	8	0	0	0	4	53,33	80	0	0	0	0	0	0	50	
İPBS-2394	4	4	5	6	8	5	1	3	1	2	4	3	3	2	20	33,33	50	60	100	66,67	66,67	66,67	66,67	
İPBS-2395	12	13	14	13	12	13	14	13	3	2	2	2	3	2	21,43	15,38	16,67	15,38	21,43	15,38	21,43	15,38	15,38	
İPBS-2400	14	14	11	17	16	9	12	7	3	3	0	7	4	7	27,27	17,65	0	77,78	33,33	100	33,33	100	100	
Ortalama	10,2	9,1	10,2	9,9	9,4	8,3	8,5	8,1	3,1	3,1	3,1	3	2,2	3,1	29,46	37,09	41,12	37,5	30,28	43,34	30,28	43,34	43,34	

*T: 150 mM NaCl, M: 200 µM Melatonin; T+M: 150 mM NaCl + 200 µM Melatonin

Sınıf I, her iki enzim için bant yokluğu ile tanımlanır ve metilasyon gerçekleşmediğinde ya da tek bir iplikçikte sadece iç metilasyon gerçekleştiğinde görülür; Sınıf II, *HpaII* bandının yokluğu ve *MspI* bandının varlığı ile tanımlanır ve tek bir iplikçiğin dış sisteini metillendiğinde ortaya çıkar; Sınıf III, *MspI* bandının yokluğu ve *HpaII* bandının varlığı ile tanımlanır ve her iki ipliğin iç sitozininin metilasyonunu gösterir; Sınıf IV, her iki enzim için bantların ortaya çıkmasıyla tanımlanır ve her iki DNA ipliği de dış sitozinlerde metillendiğinde ortaya çıkar (Yang et al. 2011; Lu et al. 2008).

Tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarında Serra çeşidinin kök dokularında 10 farklı primer ile yapılan CRED-iPBS analizi ile elde edilen tüm metilasyon tiplerinin ortalama değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.17), Sınıf III metilasyon tipinin tüm uygulamalarda düşük oranlarda olduğu tespit edilmiştir. Sınıf I metilasyonun en yüksek değerinin 150 mM NaCl + 200 µM Melatonin (T+M) uygulamasında 45 adet, en düşük değerinin ise 200 µM Melatonin (M) uygulamasında 25 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf II metilasyonun en yüksek değerinin T+M uygulamasında 2 adet, en düşük değerinin ise 150 mM NaCl (T) uygulamasında 11 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf IV metilasyonun en yüksek değerinin M uygulamasında 95 adet, en düşük değerinin ise T+M uygulamasında 74 adet olduğu gözlemlenmiştir.

Aynı çeşidin yaprak dokularında yapılan analizlerde ise elde edilen tüm metilasyon tiplerinin değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.17), Sınıf II metilasyon tipinin tüm uygulamalarda ortalama olarak düşük olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf I metilasyonun en yüksek değerinin T uygulamasında 30 adet, en düşük ise T+M uygulamasında 10 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf III metilasyonun en yüksek değerinin T+M uygulamasında 27 adet, en düşük ise M uygulamasında 11 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf IV metilasyonun en yüksek değerinin T+M uygulamasında 89 adet, en düşük ise T uygulamasında 79 adet olduğu gözlemlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.17. Serra çeşidinin kök ve yaprak dokularında tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarında CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve (%) HMO, FMO ve TMO değerleri.

	KÖK				YAPRAK			
	Kontrol	M	T	T+M	Kontrol	M	T	T+M
Sınıf I	33	25	26	45	32	25	30	10
Sınıf II	14	15	11	21	20	18	12	15
Sınıf III	8	10	22	5	12	11	20	27
Sınıf IV	90	95	86	74	77	87	79	89
Toplam	145	145	145	145	141	141	141	141
% HMO	9,66	10,34	7,59	14,48	14,18	12,77	8,51	10,64
% FMO	67,59	72,41	74,48	54,48	63,12	69,50	70,21	82,27
% TMO	77,24	82,76	82,07	68,97	77,30	82,27	78,72	92,91

*T: 150 mM NaCl, M: 200 µM Melatonin; T+M: 150 mM NaCl + 200 µM Melatonin

Çizelge 4.18. Elkoca 05 çeşidinin kök ve yaprak dokularında tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarında CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve (%) HMO, FMO ve TMO değerleri.

	KÖK				YAPRAK			
	Kontrol	M	T	T+M	Kontrol	M	T	T+M
Sınıf I	29	37	37	27	29	29	31	31
Sınıf II	17	7	20	16	9	9	15	10
Sınıf III	13	16	13	18	20	28	28	24
Sınıf IV	78	77	67	76	82	74	66	75
Toplam	137	137	137	137	140	140	140	140
% HMO	12,41	5,11	14,6	11,68	6,43	6,43	10,71	7,14
% FMO	66,42	67,88	58,39	68,61	72,86	72,86	67,14	70,71
% TMO	78,83	72,99	72,99	80,29	79,29	79,29	77,86	77,86

*T: 150 mM NaCl, M: 200 µM Melatonin; T+M: 150 mM NaCl + 200 µM Melatonin

Çizelge 4.19. Serra çeşidinin kök ve yaprak dokularında kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarında CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve (%) HMO, FMO ve TMO değerleri.

	KÖK				YAPRAK			
	Kontrol	M	K	K+M	Kontrol	M	K	K+M
Sınıf I	30	24	19	21	27	19	44	38
Sınıf II	26	4	9	11	14	26	11	9
Sınıf III	8	18	21	20	18	11	11	24
Sınıf IV	61	79	76	73	66	69	59	54
Toplam	125	125	125	125	125	125	125	125
% HMO	20,80	3,20	7,20	8,80	11,20	20,80	8,80	7,20
% FMO	55,20	77,60	77,60	74,40	67,20	64,00	56,00	62,40
% TMO	76,00	80,80	84,80	83,20	78,40	84,80	64,80	69,60

*K: %20 PEG6000, M: 200 µM Melatonin; K+M: %20 PEG6000+ 200 µM Melatonin

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.20. Elkoca 05 çeşidinin kök ve yaprak dokularında kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarında CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve (%) HMO, FMO ve TMO değerleri.

	KÖK				YAPRAK			
	Kontrol	M	K	K+M	Kontrol	M	K	K+M
Sınıf I	17	32	41	42	20	18	33	42
Sınıf II	16	16	6	10	12	4	9	9
Sınıf III	17	13	11	1	5	28	7	4
Sınıf IV	72	61	64	69	79	66	67	61
Toplam	122	122	122	122	116	116	116	116
% HMO	13,11	13,11	4,92	8,20	10,34	3,45	7,76	7,76
% FMO	72,95	60,66	61,48	57,38	72,41	81,03	63,79	56,03
% TMO	86,07	73,77	66,39	65,57	82,76	84,48	71,55	63,79

*K: %20 PEG6000, M: 200 µM Melatonin; K+M: %20 PEG6000+ 200 µM Melatonin

Tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarında Elkoca 05 çeşidinin kök dokularında yapılan CRED-iPBS analizi ile elde edilen tüm metilasyon tiplerinin ortalama değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.18), Sınıf II metilasyon tipinin tüm uygulamalarda ortalama olarak düşük olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf I metilasyonun en yüksek değeri T ve M uygulamalarında 37 adet, en düşük ise T+M uygulamasında 27 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf III metilasyonun en yüksek değeri T+M uygulamasında 18 adet, en düşük ise T uygulamasında 13 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf IV metilasyonun en yüksek değeri M uygulamasında 77 adet, en düşük ise T uygulamasında 67 adet olduğu gözlemlenmiştir.

Aynı çeşidin yaprak dokularında yapılan analizlerde ise elde edilen tüm metilasyon tiplerinin değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.18), yine Sınıf II metilasyon tipinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf I metilasyon tipinin en yüksek değeri T ve T+M uygulamalarında 31 adet, en düşük ise M uygulamasında 29 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf III metilasyon tipinin en yüksek değeri T ve M uygulamalarında 28 adet, en düşük ise T+M uygulamasında 24 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf IV metilasyon tipinin en yüksek değeri T+M uygulamasında 75 adet, en düşük ise T uygulamasında 66 adet olduğu gözlemlenmiştir.

Kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarında Serra çeşidinin kök dokularında yapılan CRED-iPBS analizi ile elde edilen tüm metilasyon tiplerinin

ortalama değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.19), Sınıf II metilasyon tipinin tüm uygulamalarda ortalama olarak en düşük adet değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf I metilasyonun en yüksek değeri M uygulamasında 24 adet, en düşük ise K uygulamasında 19 adet olduğu tespit edilmiştir. Sınıf III metilasyonun en yüksek değeri K uygulamasında 21 adet, en düşük ise M uygulamasında 18 adet olduğu tespit edilmiştir. Sınıf IV metilasyonun en yüksek değeri M uygulamasında 79 adet, en düşük ise K+M uygulamasında 73 adet olduğu tespit edilmiştir.

Aynı çeşidin yaprak dokusunda yapılan analizlerde (Çizelge 4.19) ise Sınıf II ve III birlikte ortalama olarak diğer sınıflara göre düşük adet gösterdiği gözlemlenmiştir. Sınıf I metilasyonun en yüksek değeri K uygulamasında 44 adet, en düşük ise M uygulamasında 19 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf IV metilasyonun en yüksek değeri M uygulamasında 69 adet, en düşük ise K+M uygulamasında 54 adet olduğu gözlemlenmiştir.

Kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarında Elkoca 05 çeşidinin kök dokularında yapılan CRED-iPBS analizi ile elde edilen tüm metilasyon tiplerinin ortalama değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.20), Sınıf III metilasyon tipini tüm uygulamalarda ortalama olarak düşük adet değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf I metilasyonun en yüksek değeri K+M uygulamasında 42 adet, en düşük ise M uygulamasında 32 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf II metilasyonun en yüksek değeri M uygulamasında 16 adet, en düşük ise K uygulamasında 10 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf IV metilasyonun en yüksek değeri K+M uygulamasında 69 adet, en düşük ise M uygulamasında 61 adet olduğu gözlemlenmiştir.

Aynı çeşidin yaprak dokusunda yapılan analizlerde (Çizelge 4.20) ise Sınıf II metilasyon tipini tüm uygulamalarda en düşük adet değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf I metilasyonun en yüksek değeri K+M uygulamasında 42 adet, en düşük ise M uygulamasında 18 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf III metilasyonun en yüksek değeri M uygulamasında 27 adet, en düşük ise K+M uygulamasında 4 adet olduğu gözlemlenmiştir. Sınıf IV metilasyonun en yüksek değeri K uygulamasında 67 adet, en düşük ise K+M uygulamasında 61 adet olduğu gözlemlenmiştir.

DNA metilasyon sınıfları Zhang et al. (2016) göre değerlendirilmiştir. Tüm metilasyon oranı (FMO) (%), yarı metilasyon oranı (HMO) (%) ve toplam metilasyon oranı (TMO) (%) Lu et al. (2008) ve Yang et al. (2011) temel alınarak hesaplanmıştır.

Serra çeşidinin kök ve yaprak dokularında tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarında (%) HMO, FMO ve TMO değerleri incelendiğinde, kök dokusundaki %HMO değeri %7,59 ile %14,48 arasında, %FMO değeri %54,58 ile %74,48 arasında, %TMO değeri ise %68,97 ile %82,76 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Yaprak dokusunda ise bu değerler sırasıyla (%HMO, FMO, TMO) %8,51 ile %10,64 arasında, %63,12 ile %82,27 arasında, %77,30 ile %92,91 arasında gözlemlenmiştir.

Serra çeşidinin kök ve yaprak dokularında kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarında (%) HMO, FMO ve TMO değerleri incelendiğinde, kök dokusundaki %HMO değeri %3,20 ile %20,80 arasında, %FMO değeri %55,20 ile %77,60 arasında, %TMO değeri %76,00 ile %84,80 arasında değerler aldığı gözlemlenmiştir. Yaprak dokusunda ise bu değerler sırasıyla, %7,20 ile %20,80 arasında, %56,00 ile %62,40 arasında, %64,80 ile %84,80 arasında değerler aldığı gözlemlenmiştir.

Elkoca 05 çeşidinin kök ve yaprak dokularında tuz, melatonin ve tuz/melatonin uygulamalarında (%) HMO, FMO ve TMO değerleri incelendiğinde, kök dokusundaki %HMO değeri %5,11 ile %14,60 arasında, %FMO değeri %58,39 ile %68,61 arasında, %TMO değeri %72,99 ile %80,29 arasında değerler aldığı gözlemlenmiştir. Yaprak dokusunda ise bu değerler sırasıyla, %6,43 ile %10,71 arasında, %67,14 ile %72,86 arasında, %77,86 ile %79,29 arasında değerler aldığı gözlemlenmiştir.

Bitkiler, genellikle elverişsiz ve hatta tehlikeli olan ve sürekli değişen bir ortamda yaşarlar. Sesil organizmalar olarak bitkiler çoklu agresif karşılaşmalardan aktif olarak kaçamazlar. Bunun yerine, agresif çevresel faktörlere hızlı yanıtlar ve değişen ortamlara adaptasyonlar içeren yüksek fenotipik esneklik geliştirmişlerdir. Bu fenotipik esnekliğin altında gen ifadesindeki değişiklikler yatmaktadır. Gen ifadesi epigenetik işaretler tarafından kontrol edildiğinden, epigenetik varyasyon stres faktörlerine ve çevresel adaptasyona karşı bitki tepkilerinde kilit bir rol alabilir. Na⁺ iyonu toksisitesi, hiperosmotik stres ve oksidatif hasar nedeniyle, yüksek tuzluluk bitki büyümesini ve

gelişimini büyük ölçüde etkiler. Tuz toleransında büyük ölçüde farklılık gösteren çeltik çeşitlerinde global DNA metilasyon seviyelerinin değerlendirilmesi, tuz stresine maruz kaldıktan sonra DNA metilasyonunun azaldığını göstermiştir (Ferreira et al. 2015). Tuza toleranslı Pokkali çeşidinin yapraklarında, DNA metilasyonundaki azalma hızlı olmuş ve %70 hipometilasyona ulaşmıştır. Buna karşılık, tuza duyarlı IR29 çeşidinde metilasyon kaybı sadece %14'tür ve istatistiksel olarak anlamlı değildir. Köklerde, tuz stresinin DNA metilasyonu üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. Tuza toleranslı Pokkali ve tuza duyarlı IR29 arasındaki DNA metilasyonundaki bu çarpıcı farklılıklar, IR29'da tuz stresi altında yukarı regüle olan ancak Pokkali'de olmayan DRM2 geninin farklı ifadesi ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık, iki DNA demetilaz geninin ifadesindeki değişiklikler her iki çeşitte de benzer olmuştur; DNG701 geni 1 saatlik tuz stresinden sonra bir azalma ve 24 saatlik tuz stresinden sonra bir artış gösterirken, DNG710 geni tuz stresi boyunca kademeli bir artış gösterdiği rapor edilmiştir (Ashapkin et al. 2020).

Orhan et al. (2020) lahanada bitkisinde yaptığı çalışmada TMO (%) %59,0 ile %71,8 arasında değişimi gözlemlemişlerdir. Tüm uygulamalarda FMO'nin (%) HMO'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. En yüksek % TMO oranını 0 mM NaCl + 0 mM Putresin uygulamasında gözlenmiştir. 50 mM ve 100 mM NaCl uygulamalarının %TMO oranı 0 mM NaCl uygulamasından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 150 mM NaCl'deki metilasyon oranı 0 mM NaCl uygulamasıyla aynı olduğu gözlemlemişlerdir. Tüm NaCl konsantrasyonlarına uygulanan Putresin konsantrasyonunun artışına paralel olarak TMO'da belirgin bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre hem NaCl stresinde hem de stressiz koşullarda uygulanan Put'un demetilasyona neden olduğu belirlenmiştir.

AFLP, SRAP ve MSAP yaklaşımlarını kullanan Lu et al. (2007) yaptıkları çalışmada kanola bitkilerine püskürtülen NaCl'nin neden olduğu genetik ve epigenetik değişiklikleri incelemiştir. Çalışmanın bulguları, 500 mM NaCl konsantrasyonunda genetik varyasyonun mevcut olduğunu, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda genetik varyasyonun azaldığını ve bunun da bitkinin nihai ölümüyle açıklandığını göstermiştir. CCGG bölgelerindeki metilasyon oranı kontrol grubunda %26,6 iken, NaCl varlığında %44,2'ye yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Bu bulgu, tuz stresinin hipermetilasyona yol

açarken, düşük NaCl uygulamalarının hipometilasyona yol açtığını tespit etmişlerdir. Na⁺ ve Cl⁻ iyonları bitkinin normal gelişimi için gerekli olsa da fazlalıkları lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin bozulmasına yol açar ve bitkide bir stres tepkisini tetiklediğini ayrıca tuz stresinin bitkide su eksikliğine neden olduğunu, bu da bazlara bağlanan ve çift sarmallı DNA'daki şeker fosfat bağlarını kırarak mutasyonlara yol açan ROT'ları serbest bıraktığını açıklamışlardır.

Elkoca 05 çeşidinin kök ve yaprak dokularında kuraklık, melatonin ve kuraklık/melatonin uygulamalarında (%) HMO, FMO ve TMO değerleri incelendiğinde, kök dokusundaki %HMO değeri %4,92 ile %13,11 arasında, %FMO değeri %57,38 ile %72,95 arasında, %TMO değeri %65,57 ile %86,07 arasında değerler aldığı gözlemlenmiştir. Yaprak dokusunda ise bu değerler sırasıyla, %3,45 ile %10,34, %59,03 ile %81,03 arasında, %63,79 ile %84,48 arasında değerler aldığı gözlemlenmiştir.

Yapılan tez çalışmasında %TMO oranlarına bakıldığında strese ve uygulanan dokuya bağlı olarak değişen metilasyon değerlerinin olduğu gözlemlenmektedir. Uygulanan tuz stresinde Serra çeşidinde yaprak dokusunda, Elkoca 05 çeşidinde ise kök dokusunda toplam metilasyon oranının diğer metilasyon oranlarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Uygulanan kuraklık stresinde ise, Serra çeşidinde kök dokusunda, Elkoca 05 çeşidinde ise yaprak dokusunda toplam metilasyon oranının diğer metilasyon oranlarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Arslan (2012) buğdayda yaptığı çalışmada RAPD sonuçlarına göre, artan PEG6000 uygulama dozu ile RAPD bantlarındaki değişiklikler ve GTS indeksindeki azalma, genomik instabilitenin artmasına neden olduğunu ve bunun da stresin DNA yapısına zarar verdiğini gözlemlemiştir. Ek olarak, CRED-RA sonuçları, PEG6000 uygulamasının metilasyon hızında bir artışla sonuçlandığını tespit etmiştir. Elde ettiği sonuçlar ışığında, stres kaynaklı DNA hasarının, ABA'nın su kaybını önlemek için stomaları kapatmasıyla başlayan, daha sonra ROT seviyesinde bir artışa neden olan ve nokta mutasyonları, genetik ve kromozomal yeniden düzenlemeler, eksilmeler ve eklemeler gibi genomik DNA hasarıyla sonuçlanan bir dizi eylemden kaynaklandığı aktarmıştır.

Histon modifikasyonlarına ek olarak, DNA metilasyonu da bitkilerde kuraklığa dirence katkıda bulunur. Tek yıllık, otsu bitkilerde kuraklık stresinin neden olduğu DNA metilasyon seviyelerindeki değişiklikler hakkında birçok çalışma mevcuttur (Wang et al. 2011; Labra et al. 2002; Colaneri and Jones 2013) ancak çok yıllık odunsu bitkiler için çok az rapor mevcuttur. *Populus trichocarpa* Torr. A. Gray'yı inceleyen Liang et al. (2014) kuraklık stresinin DNA metilasyon seviyelerini değiştirdiğini ve bu nedenle kuraklık stresine yanıt veren birçok genin ifade modellerini değiştirdiğini bildirmiştir. Metillenmiş sitozinlerin genom çapında metilasyon seviyeleri, kontrol bitkilerine kıyasla kuraklık stresi altında önemli ölçüde daha yükseldiği ve bu da gen ifadesiyle pozitif olarak ilişkili olduğu ve yoğun metilasyon gen susturma ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Bazı TF'leri kodlayan genlerde kuraklık uygulamasından sonra DNA metilasyonunda ve transkriptom ifadesinde azalma, diğer TF'lerini kodlayan genlerde ise DNA metilasyonunda ve gen ifadesinde artış bulunmuştur. Bu nedenle, DNA metilasyonundaki değişiklikler genom çapında kuraklığa yanıt veren genlerin ifadesini düzenleyebilir. Başka bir çalışmada, kuraklık stresi kavakta DNA metilasyon modellerinin kapsamlı bir şekilde yeniden şekillendiğini göstermiştir ve tekrarlayan elementlerdeki DNA metilasyonunun komşu genlerin ifadesini kontrol etmede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Liang et al. 2014). Bu durum, TE'lerin strese duyarlı genlerin arttırıcıları olduğu mısırdaki da rapor edilmiştir (Makarevitch et al. 2015).

DNA metilasyon modelleri ve bunların abiyotik stresle ilişkisi ağaç bitkisi *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.) Müll.Arg.'te de gösterilmiştir (Uthup et al 2011). *Quercus ilex* L. ağaçları için, kuraklığa maruz kaldıklarında hipermetillenmiş lokusların yüzdesinin arttığı ve tam metillenmiş lokusların yüzdesinin azaldığı bildirilmiştir (Rico et al. 2014). Xu et al. (2018) elmada (*Malus domestica* Borkh.) kuraklık stresi altında TE'lerin demetilasyonunu rapor etmiştir. Kavakta yapılan bir başka çalışmada, kuraklık stresi altında gen gövdelerinde hipometilasyon gözlenmiş, bunu kuraklık stresi çekildikten sonra hipermetilasyon izlemiştir. TE'ler için ise tam tersi bir etki gözlenmiştir (Lafon-Placette et al. 2018).

Kültürü yapılan elma ağacının, yabani akrabasına (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.) kıyasla kuraklığa karşı daha az toleranslı olduğu tespit edilmiştir. *M. prunifolia*'nın daha yüksek kuraklık toleransının, bitki direnci ve ısı ve kuraklık stresiyle

bağlantılı bir transkripsiyon ailesi üyesi olan DREB2A geninin daha düşük promotör metilasyonundan ve daha yüksek ifadesinden kaynaklandığı öne sürölmektedir. Bu nedenle, bu promotör bölgesinin metilasyonu *M. prunifolia*'da kuraklığa dirençte bir rol oynayabilir (Sakuma et al. 2006).

Wang et al. (2011) çeltikte kuraklığa bağlı DNA metilasyon bölgelerinin genotipik spesifik modellerini tespit etmiş, bölgelerin %70'inde epigenetik değişikliklerin iyileşmeden sonra ön baskı durumuna geri döndüğünü ve bölgelerin %29'unda kuraklığa bağlı DNA demetilasyon/metilasyon değişikliklerinin iyileşmeden sonra bile kaldığını tespit etmiştir. Ayrıca, DNA metilasyon varyasyonunun önemli düzeyde gelişimsel ve doku spesifikliği bulmuşlar ve çeltik genomundaki kuraklığa bağlı DNA metilasyon varyasyonlarının çeltik bitkilerinde adaptasyon için çok önemli bir düzenleyici mekanizma olarak kabul edilebileceğini öne sürmüşlerdir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Değişen çevresel koşullar ve iklimde meydana gelen ciddi değişimler sonucunda bitkisel üretimde azalmalar meydana gelmiştir. Bu nedenle bitkilerin hem değişen çevresel koşullara hem de iklimde meydana gelen değişikliklere dayanıklı olmaları gerekmektedir. Modern biyoteknolojik yöntemlerin bitki ıslahında kullanılmasıyla yeni çeşitlerin geliştirilmesi günümüzde artık daha kolay hale gelmiştir. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde kuraklık ve tuz stresi koşulları altında fasulye genotiplerine ekzojen olarak uygulanan melatoninin kök ve yaprak dokularında biyokimyasal ve epigenetik değişimler meydana getirdiği tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan genotiplerin stres koşullarına karşı olan yanıt düzeyleri için MDA analizine göre kuraklık ve tuz stresleri koşulları altında Elkoca 05 genotipinin Serra genotipine göre daha dayanıklı söylenebilir. Diğer taraftan DNA metilasyonuna dayalı çalışmalar sonucunda hem stres koşullarının hem de melatonin uygulamasının DNA metilasyon değişimine neden olduğu belirlenmiştir. Dahası araştırmada melatoninin stres toleransında incelenen parametreler bakımından iyileştirici bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Fasulyede tuz ve kuraklık şartları altında melatoninin bu etkisinin genomik ve transkriptomik seviyelerde belirlenmesi bu çalışmadaki bulguları destekler nitelikte olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel Latef, A. A. H., Tahjib-Ul-Arif, M., Rhaman, M. S. 2021. Exogenous auxin-mediated salt stress alleviation in faba bean (*Vicia faba* L.). *Agronomy*, 11(3), 547.
- Ahmad, P., Sarwat, M., Sharma, S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51, 167-173.
- Aina, R., Sgorbati, S., Santagostino, A., Labra, M., Ghiani, A., Citterio, S. 2004. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiologia Plantarum*, 121(3), 472-480.
- Akhter, Z., Bi, Z., Ali, K., Sun, C., Fiaz, S., Haider, F. U., Bai, J. 2021. In response to abiotic stress, DNA methylation confers epigenetic changes in plants. *Plants*, 10(6), 1096.
- Alam, H., Khattak, J. Z., Ksiksi, T. S., Saleem, M. H., Fahad, S., Sohail, H., Alkahtani, J. 2021. Negative impact of long-term exposure of salinity and drought stress on native *Tetraena mandavillei* L. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1336-1351.
- Alexandratos, N., Bruinsma, J. 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. (L.) R. Br. genotypes. *Current Plant Biology*, 100131.
- Al-huraby, A. I., Bafeel, S. O. 2022. The effect of salinity stress on the *Phaseolus vulgaris* L. plant. *African Journal of Biological Sciences*, 4(1), 94-107.
- Ali, E. F., El-Shehawi, A. M., Ibrahim, O. H. M., Abdul-Hafeez, E. Y., Moussa, M. M., Hassan, F. 2021. A vital role of chitosan nanoparticles in improvisation the drought stress tolerance in *Catharanthus roseus* (L.) through biochemical and gene expression modulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161, 166-175.
- Alinia, M., Kazemeini, S. A., Sepehri, M., Dadkhodaie, A. 2022. Simultaneous application of rhizobium strain and melatonin improves the photosynthetic capacity and induces antioxidant defense system in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(3), 1367-1381.
- Al-Shammari, W. B., Altamimi, H. R., Abdelaal, K. 2023. Improvement in Physiobiochemical and Yield Characteristics of Pea Plants with Nano Silica and Melatonin under Salinity Stress Conditions. *Horticulturae*, 9(6), 711.
- Altunkaynak, E., Büyük, I., Aydın, S. S., Aras, S. 2016. New insight into evaluation of DNA methylation levels with CRED-RA technique in the genome of *Lycopersicon esculentum* subjected to NaCl and PEG. *Biol Divers Conserv*, 9, 163-171.

- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., Lei, W. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032.
- Anonim, 2023. Web Sitesi: <http://www.tuik.gov.tr>, Erişim Tarihi: 03.06.2020.
- Anonymous, 2021. Web Sitesi: <http://www.fao.org>, Erişim Tarihi: 03.06.2023.
- Anonymous, 2023. Web Sitesi: <https://www.chemodex.com>, Erişim Tarihi: 03.06.2023.
- Arnao, M. B., Hernández-Ruiz, J. 2019. Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator?. *Trends in Plant Science*, 24(1), 38-48.
- Arslan, E. 2012. Kuraklık stresine maruz kalan buğdayda (*Triticum aestivum*) genetik ve epigenetik değişiklikler üzerine putresinin etkisinin moleküler yöntemler ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 85, Erzurum.
- Arslan, E., Açar, G., Aydın, M. 2019. Putrescine as a protective molecule on DNA damage and DNA methylation changes in wheat under drought. *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology*, 28(2), 170-187.
- Arteaga, S., Yabor, L., Díez, M. J., Prohens, J., Boscaiu, M., Vicente, O. 2020. The use of proline in screening for tolerance to drought and salinity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Agronomy*, 10(6), 817.
- Asan, İ. 2022. Fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) melatoninin tuz stresindeki etkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 92, Erzurum.
- Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., Aleksandrushkina, N. I., Vanyushin, B. F. 2020. Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7457.
- Aydın, M., Yağcı, S., Açar, G., Taşpınar, M. S. 2020. Effects of β -Estradiol on DNA methylation changes and genomic stability in *Triticum aestivum* L. exposed salt. *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology*, 29(1), 161-175.
- Aydin, M., Arslan, E., Yigider, E., Taspınar, M. S., Agar, G. 2021. Protection of *Phaseolus vulgaris* L. from Herbicide 2, 4-D results from exposing seeds to humic acid. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46, 163-173.
- Aygören, A. S., Güneş, E., Muslu, S., Kasapoğlu, A. G., Yiğider, E., Aydın, M., Büyük, İ., İlhan, E. 2022. Genome-Wide analysis and characterization of SABATH gene family in *Phaseolus vulgaris* genotypes subject to melatonin under drought and salinity stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1-18.
- Aygün Ertürk, F. 2013. Ağır metallerin neden olduğu genetik ve epigenetik değişikliklerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 143, Erzurum

- Azizi, F., Amiri, H., Ismaili, A. 2022. Melatonin improves salinity stress tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. cv. "Pak" by changing antioxidant enzymes and photosynthetic parameters. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(4), 40.
- Bal, S. K., Sarath Chandran, M. A. 2021. Minimizing Weather-Related risks in agriculture through agromet advisory services in India. *Climate Change and Resilient Food Systems: Issues, Challenges, and Way Forward*, 245-260.
- Banks, J. M. 2018. Chlorophyll fluorescence as a tool to identify drought stress in *Acer* genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 155, 118-127.
- Bannister, A. J., Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381-395.
- Bashir, T., Naz, S., Bano, A. 2020. Plant growth promoting rhizobacteria in combination with plant growth regulators attenuate the effect of drought stress. *Pakistan Journal of Botany*, 52(3), 783-792.
- Baweja, P., Kumar, G. 2020. Abiotic stress in plants: an overview. *Plant stress biology: Strategies and trends*, 1-15. 38-245.
- Beebe, S. E., Rao, I. M., Mukankusi, C. M., Buruchara, R. A. 2012. Improving resource use efficiency and reducing risk of common bean production in Africa, Latin America, and the Caribbean. In C. H. Hershey (Ed.), *Eco-Efficiency: From vision to reality*, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 117–134, Colombia.
- Bewley, J. D., Bradford, K., Hilhorst, H. 2012. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springer New York, 392, New York.
- Bistgani, Z. E., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A. G., Hashemi, M. 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *The Crop Journal*, 5(5), 407-415.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stress. *Biochemistry & molecular biology of plants*. In: Gruissem, W. and Jones, R., Eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1158-1203.
- Bressani, R. 1993. Grain quality of common beans. *Food Reviews International*, 9(2), 237-297.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J., 2003. Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55-128.
- Cai, Q., Guy, C. L., Moore, G. A. 1996. Detection of cytosine methylation and mapping of a gene influencing cytosine methylation in the genome of *Citrus*. *Genome*, 39(2), 235-242.
- Cao, D., Gao, X., Liu, J., Kimatu, J. N., Geng, S., Wang, X., Zhao, J., Shi, D. 2011. Methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) reveals that alkali stress

- triggers more DNA hypomethylation levels in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) roots than salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(82), 18971-18980.
- Cao, L., Jin, X. J., Zhang, Y. X. 2019. Melatonin confers drought stress tolerance in soybean (*Glycine max* L.) by modulating photosynthesis, osmolytes, and reactive oxygen metabolism. *Photosynthetica*, 57(3), 812-819.
- Caverzan, A., Casassola, A., Brammer, S. P. 2016. Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and Molecular Biology*, 39(1), 1-6.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosaa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. 2012. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1011-1019.
- Chen, T., Li, E. 2004. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Current Topics in Developmental Biology*, 60, 55-89.
- Choi, C. S., Sano, H. 2007. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 589-600.
- Chung, H. J., Liu, Q., Pauls, K. P., Fan, M. Z., Yada, R. 2008. In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. *Food Research International*, 41(9), 869-875.
- Colaneri, A. C., Jones, A. M. 2013. Genome-wide quantitative identification of DNA differentially methylated sites in *Arabidopsis* seedlings growing at different water potential. *PloS One*, 8(4), e59878.
- Covelo-Molares, H., Bartosovic, M., Vanacova, S. 2018. RNA methylation in nuclear pre-mRNA processing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(6), e1489.
- de Almeida Costa, G. E., da Silva Queiroz-Monici, K., Reis, S. M. P. M., de Oliveira, A. C. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, 94(3), 327-330.
- Decker, E. A. 1995. The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutrition Reviews*, 53(3), 49-58.
- Delgado-Salinas, A., Bibler, R., Lavin, M. 2006. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, 31(4), 779-791.
- Demeulemeester, M. A. C., Van Stallen, N., De Proft, M. P. 1999. Degree of DNA methylation in chicory (*Cichorium intybus* L.): influence of plant age and vernalization. *Plant Science*, 142(1), 101-108.
- Doğru, A. 2019. Bitkilerde antioksidan sistemler ve tuz stresine verdikleri yanıtlar. *Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi*, 1(2), 164-185.

- Elemike, E. E., Uzoh, I. M., Onwudiwe, D. C., Babalola, O. O. 2019. The role of nanotechnology in the fortification of plant nutrients and improvement of crop production. *Applied Sciences*, 9(3), 499.
- ElSayed, A. I., Rafudeen, M. S., Gomaa, A. M., Hasanuzzaman, M. 2021. Exogenous melatonin enhances the reactive oxygen species metabolism, antioxidant defense-related gene expression, and photosynthetic capacity of *Phaseolus vulgaris* L. to confer salt stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, 173(4), 1369-1381.
- Erturk, F. A., Agar, G., Arslan, E., Nardemir, G., Sahin, Z. 2014. Determination of genomic instability and DNA methylation effects of Cr on maize (*Zea mays* L.) using RAPD and CRED-RA analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 1529-1537.
- Farhangi-Abriz, S., Torabian, S. 2017. Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 64-70.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., Basra, S. M. A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable agriculture*, 153-188.
- Feng, S., Jacobsen, S. E. 2011. Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(2), 179-186.
- Ferreira, L. J., Azevedo, V., Maroco, J., Oliveira, M. M., Santos, A. P. 2015. Salt tolerant and sensitive rice varieties display differential methylome flexibility under salt stress. *PLoS One*, 10(5), e0124060.
- Finnegan, E. J., Genger, R. K., Peacock, W. J., Dennis, E. S. 1998. DNA methylation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 223-247.
- Fischer, R. A., Edmeades, G. O. 2010. Breeding and cereal yield progress. *Crop Science*, 50, 85.
- Fulneček, J., Kovařík, A. 2014. How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles?. *BMC Genetics*, 15(1), 1-9.
- Gama, P. B. S., Inanaga, S., Tanaka, K., Nakazawa, R. 2007. Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *African Journal of Biotechnology*, 6(2), 079-088.
- García-Lafuente, A., Moro, C., Manchón, N., Gonzalo-Ruiz, A., Villares, A., Guillamón, E., Rostagno, M., Mateo-Vivaracho, L. 2014. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chemistry*, 161, 216-223.
- Gepts, P., Debouck, D., Schoonhoven, A. V., Voysest, O. 1991. Common beans: research for crop improvement. *Origin, Domestication, and Evolution of the Common Bean*, 7-53.

- Gill, S. S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Godoy, F., Olivos-Hernández, K., Stange, C., Handford, M. 2021. Abiotic stress in crop species: improving tolerance by applying plant metabolites. *Plants*, 10(2), 186.
- Graham, P. H., Ranalli, P. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1-3), 131-146.
- Granito, M., Frias, J., Doblado, R., Guerra, M., Champ, M., Vidal-Valverde, C. 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *European Food Research and Technology*, 214(3), 226-231.
- Guler, N. S., Pehlivan, N. 2016. Exogenous low-dose hydrogen peroxide enhances drought tolerance of soybean (*Glycine max* L.) through inducing antioxidant system. *Acta Biologica Hungarica*, 67, 169-183.
- Gull, A., Lone, A. A., Wani, N. U. I. 2019. Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants*, 1-19.
- Gupta, K., Garg, R. 2023. Unravelling differential DNA methylation patterns in genotype dependent manner under salinity stress response in chickpea. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1863.
- Hassan, M. U., Mahmood, A., Awan, M. I., Maqbool, R., Aamer, M., Alhaithloul, H. A., Huang, G., Skalicky, M., Brestic, M., Pandey, S., Sabagh, A., Qari, S. H. 2022. Melatonin-induced protection against plant abiotic stress: mechanisms and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 13, 902694.
- Heidari, M., Jamshid, P. 2010. Interaction between salinity and potassium on grain yield, carbohydrate content and nutrient uptake in pearl millet. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 5(6), 39-46.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. 1938. Growing plants without soil by the water-culture method. *Growing plants without soil by the water-culture method. California Agricultural Experiment Station Circulation*, 347, 32.
- Hosseinpour, A., Ilhan, E., Özkan, G., Öztürk, H. İ., Haliloglu, K., Cinisli, K. T. 2022. Plant growth-promoting bacteria (PGPBs) and copper (II) oxide (CuO) nanoparticle ameliorates DNA damage and DNA methylation in wheat (*Triticum aestivum* L.) exposed to NaCl stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 31(4), 751-764.
- Hosseinpour, A., Özkan, G., Nalcı, Ö., Haliloğlu, K. 2019. Estimation of genomic instability and DNA methylation due to aluminum (Al) stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) using iPBS and CRED-iPBS analyses. *Turkish Journal of Botany*, 43(1), 27-37.
- Hussain, S., Shaukat, M., Ashraf, M., Zhu, C., Jin, Q., Zhang, J. 2019. Salinity stress in arid and semi-arid climates: Effects and management in field crops. *Climate Change and Agriculture*, 13, 201-226.

- Iwuala, E., Odjegba, V., Sharma, V., Alam, A. 2020. Drought stress modulates expression of aquaporin gene and photosynthetic efficiency in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. genotypes. *Current Plant Biology*, 21, 100131.
- İnan, A. 2022. Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) kuraklık stresine toleransta kitosan etkisinin fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 103, Erzurum.
- Jenkins, A. L. 2007. The glycemic index: Looking back 25 years. *Cereal Foods World*, 52(2), 50.
- Jeydar, F., Asghari Zakaria, R., Zare, N., Hassanpanah, D., Namazi, L. G. 2023. β -estradiol improves response of potato genotypes to salt stress and enhances microtuber Production Under in vitro conditions. *Potato Research*, 1-19.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P., Schulman, A. H. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 1419-1430.
- Karagoz, H., Cakmakci, R., Hosseinpour, A., Ozkan, G., Haliloglu, K. 2020. Analysis of genetic variation and population structure among of oregano (*Origanum acutidens* L.) accessions revealed by agro-morphological traits, oil constituents and retrotransposon-based inter-primer binding sites (iPBS) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67, 1367-1384.
- Karık, Ü., Nadeem, M. A., Habyarimana, E., Ercişli, S., Yildiz, M., Yılmaz, A., Yang, S. H., Chung, G., Yılmaz, A., Baloch, F. S. 2019. Exploring the genetic diversity and population structure of Turkish laurel germplasm by the iPBS-retrotransposon marker system. *Agronomy*, 9(10), 647.
- Kashkush, K., Feldman, M., Levy, A. A. 2003. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics*, 33(1), 102-106.
- Kaushal, M., Wani, S. P. 2016. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Annals of Microbiology*, 66, 35-42.
- Kaya, E., Daşgan, H. Y. 2011. Erken bitki gelişme aşamasında kuraklık ve tuzluluk streslerine tolerans bakımından fasulye genotiplerinin taranması. *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 22, 2.
- Keshavarz, H., Khodabin, G. 2019. The role of uniconazole in improving physiological and biochemical attributes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) subjected to drought stress. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 22, 161-168.
- Khripach, V., Zhabinskii, V., de Groot, A. 2000. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany*, 86(3), 441-447.

- Kiran, S. 2019. Effects of vermicompost on some morphological, physiological and biochemical parameters of lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*) under drought stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 352-358.
- Korkmaz, H., Durmaz, A. 2017. Bitkilerin abiyotik stres faktörlerine karşı geliştirilen cevaplar. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2), 192-207.
- Kovarik, A., Koukalova, B., Bezdek, M., Opatrn, Z. 1997. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 301-306.
- Koyro, H. W., Ahmad, P., Geissler, N. 2012. Abiotic stress responses in plants: an overview. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*, 1-28.
- Kuhlmann, M., Jiang, H., Catoni, M., Johannes, F. 2023. DNA methylation in plants associated with abiotic stress, volume II. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1203806.
- Kul, R., Ekinci, M., Turan, M., Yildirim, E. 2021. Impact of biochar on growth, physiology and antioxidant activity of common bean subjected to salinity stress. *Global Journal of Botanical Science*, 9, 8-13.
- Kusvuran, S., Dasgan, H. Y. 2017. Effects of drought stress on physiological and biochemical changes in *Phaseolus vulgaris* L. *Legume Research-An International Journal*, 40(1), 55-62.
- Labra, M., Ghiani, A., Citterio, S., Sgorbati, S., Sala, F., Vannini, C., Bracale, M. 2002. Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips. *Plant Biology*, 4(06), 694-699.
- Lafon-Placette, C., Le Gac, A. L., Chauveau, D., Segura, V., Delaunay, A., Lesage-Descauses, M. C., Hummel, I., Cohen, D., Jesson, B., Maury, S. 2018. Changes in the epigenome and transcriptome of the poplar shoot apical meristem in response to water availability affect preferentially hormone pathways. *Journal of Experimental Botany*, 69(3), 537-551.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., Dietz, K. J. 2019. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8(4), 94.
- Li, J., Zeng, L., Cheng, Y., Lu, G., Fu, G., Ma, H., Liu, Q., Zhang, X., Zou, X., Li, C. 2018. Exogenous melatonin alleviates damage from drought stress in *Brassica napus* L.(rapeseed) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 1-11.
- Liang, D., Zhang, Z., Wu, H., Huang, C., Shuai, P., Ye, C. Y., Tang, S., Wang, Y., Yang L., Wang, J., Xia, X. 2014. Single-base-resolution methylomes of *Populus trichocarpa* reveal the association between DNA methylation and drought stress. *In BMC Genetics* 15(1), 1-11.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S., Luthria, D. L. 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107(1), 399-410.

- Linowiecka, K., Slominski, A. T., Reiter, R. J., Böhm, M., Steinbrink, K., Paus, R., Kleszczyński, K. 2023. Melatonin: A potential regulator of DNA methylation. *Antioxidants*, 12(6), 1155.
- Liu, J., He, Z. 2020. Small DNA methylation, big player in plant abiotic stress responses and memory. *Frontiers in Plant Science*, 11, 595603.
- Liu, L., Yang, X., Zhou, H., Liu, S., Zhou, L., Li, X., Yang, J., Han, X., Wu, J. 2018. Evaluating the utility of solar-induced chlorophyll fluorescence for drought monitoring by comparison with NDVI derived from wheat canopy. *Science of the Total Environment*, 625, 1208-1217.
- Long, S. P., Marshall-Colon, A., Zhu, X. G. 2015. Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell*, 161(1), 56-sm
- Lu, G., Wu, X., Chen, B., Gao, G., Xu, K., 2007. Evaluation of genetic and epigenetic modification in rapeseed (*Brassica napus*) induced by salt stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (11), 1599-1607.
- Lu, Y., Rong T, Cao M. 2008. Analysis of DNA methylation in different maize tissues. *J Genet Genomics*. 35(1), 41–48.
- Ma, Y., Dias, M. C., Freitas, H. 2020. Drought and salinity stress responses and microbe-induced tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 591911.
- Makarevitch, I., Waters, A. J., West, P. T., Stitzer, M., Hirsch, C. N., Ross-Ibarra, J., Springer, N. M. 2015. Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. *PLoS Genetics*, 11(1), e1004915.
- Mandal, C., Halder, D., Jung, K. H., Chai, Y. G. 2017. Gestational alcohol exposure altered DNA methylation status in the developing fetus. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1386.
- Mansour, A. 2007. Epigenetic activation of genomic retrotransposons. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6(2), 99-107.
- Mansour, M. M. F. 2013. Plasma membrane permeability as an indicator of salt tolerance in plants. *Biologia Plantarum*, 57, 1-10.
- Mittler, R. 2017. ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.
- Moustafa-Farag, M., Mahmoud, A., Arnao, M. B., Sheteiwy, M. S., Dafea, M., Soltan, M., Elkelish, A., Hasanuzzaman, M., Ai, S. 2020. Melatonin-induced water stress tolerance in plants: Recent advances. *Antioxidants*, 9(9), 809.
- Munns, R., Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651.
- Nabi, R. B. S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K. P., Imran, Q. M., Mun, B. G., Yun, B. W. 2019. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 120-133.

- Nadarajah, K. K. 2020. ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5208.
- Nagesh Babu, R., Devaraj, V. R. 2008. High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science*, 2(2), 40-48.
- Nandal, M., Hooda, R., 2013. Salt tolerance and physiological response of plants to salinity: A Review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 4(10), 44-67.
- Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H., Ullah, N. 2020. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56.
- Nemli, S., Kianoosh, T., Tanyolac, M. B. 2015. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions through retrotransposon-based interprimer binding sites (iPBSs) markers. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(6), 940-948.
- Odabaşı, E. 2021. Farklı fasulye çeşitlerini Kahramanmaraş koşullarında ikinci ürün performanslarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 104, Kahramanmaraş.
- Orhan, E., Uzundumlu, F., Yiğider, E., Aydın, M. 2020. The effect of putrescine on DNA methylation on cabbage plant under salt stress conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44(3), 301-311.
- Posmyk, M. M., Kuran, H., Marciniak, K., Janas, K. M. 2008. Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper ion concentrations. *Journal of Pineal Research*, 45(1), 24-31.
- Purty, R. S., Kumar, G., Singla-Pareek, S. L., Pareek, A. 2008. Towards salinity tolerance in Brassica: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14, 39-49.
- Qayyum, A., Razzaq, A., Bibi, Y., Khan, S. U., Abbasi, K. S., Sher, A., Mehmood, A., Ahmed, W., Mahmood, I., Manaf, A., Jenks, M. A. 2018. Water stress effects on biochemical traits and antioxidant activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) under In vitro conditions. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil Plant Science*, 68(4), 283-290.
- Rai, K. K., Rai, N., Rai, S. P. 2018. Salicylic acid and nitric oxide alleviate high temperature induced oxidative damage in *Lablab purpureus* L. plants by regulating bio-physical processes and DNA methylation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 72-88.
- Rawat, N., Singla-Pareek, S. L., Pareek, A. 2021. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same. *Physiologia Plantarum*, 171(4), 653-676.

- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., Foley, J. A. 2013. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PloS One*, 8(6), e66428.
- Renau-Morata, B., Nebauer, S. G., Arrillaga, I., Segura, J. 2005. Assessments of somaclonal variation in micropropagated shoots of *Cedrus*: consequences of axillary bud breaking. *Tree Genetics Genomes*, 1, 3-10.
- Reppert, S. M. 1997. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 12(6), 528-531.
- Rico, L., Ogaya, R., Barbeta, A., Penuelas, J. 2014. Changes in DNA methylation fingerprint of *Quercus ilex* trees in response to experimental field drought simulating projected climate change. *Plant Biology*, 16(2), 419-427.
- Rocha-Guzmán, N. E., Herzog, A., González-Laredo, R. F., Ibarra-Pérez, F. J., Zambrano-Galván, G., Gallegos-Infante, J. A. 2007. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*, 103(2), 521-527.
- Roy, S. 2016. Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant Signaling Behavior*, 11(1), e1117723.
- Rozema, J., Flowers, T. 2008. Crops for a salinized world. *Science*, 322(5907), 1478-1480.
- Sadeghipour, O., Aghaei, P. 2012. Biochemical changes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to pretreatment with salicylic acid (SA) under water stress conditions. *International Journal of Biosciences*, 2(8), 14-22.
- Saeidi-Sar, S., Abbaspour, H., Afshari, H., Yaghoobi, S. R. 2013. Effects of ascorbic acid and gibberellin A3 on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3), 667-677.
- Saglam, A., Saruhan, N., Terzi, R., Kadioglu, A. 2011. The relations between antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters in common bean cultivars differing in sensitivity to drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58, 60-68.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, 18(5), 1292-1309.
- Sardar, H., Khalid, Z., Ahsan, M., Naz, S., Nawaz, A., Ahmad, R., Razzaq, K., Wabaidur, S., Jacquard, C., Siric, I., Kumar, P., Abou Fayssal, S. 2023. Enhancement of salinity stress tolerance in lettuce (*Lactuca sativa* L.) via foliar application of nitric oxide. *Plants*, 12(5), 1115.
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H., Battaglia, M. L. 2021. Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10(2), 259.

- Shams, M., Ekinci, M., Ors, S., Turan, M., Agar, G., Kul, R., Yildirim, E. 2019. Nitric oxide mitigates salt stress effects of pepper seedlings by altering nutrient uptake, enzyme activity and osmolyte accumulation. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, 1149-1161.
- Shan, S., Wang, Z., Pu, H., Duan, W., Song, H., Li, J., Zhang, Z., Xbu, X. 2022. DNA methylation mediated by melatonin was involved in ethylene signal transmission and ripening of tomato fruit. *Scientia Horticulturae*, 291, 110566.
- Siddiqui, M. H., Al-Khaishany, M. Y., Al-Qutami, M. A., Al-Whaibi, M. H., Grover, A., Ali, H. M., Bukhari, N. A. 2015. Response of different genotypes of faba bean plant to drought stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 10214-10227.
- Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Yamamoto, M., Winterbourn, C. 2022. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(7), 499-515.
- Simkin, A. J., López-Calcagno, P. E., Raines, C. A. 2019. Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1119-1140.
- Singh, V. K., Singh, A. K., Singh, P. P., Kumar, A. 2018. Interaction of plant growth promoting bacteria with tomato under abiotic stress: a review. *Agriculture, Ecosystems Environment*, 267, 129-140.
- Sitohy, M. Z., Desoky, E. S. M., Osman, A., Rady, M. M. 2020. Pumpkin seed protein hydrolysate treatment alleviates salt stress effects on *Phaseolus vulgaris* by elevating antioxidant capacity and recovering ion homeostasis. *Scientia Horticulturae*, 271, 109495.
- Smýkal, P., Valledor, L., Rodriguez, R., Griga, M. 2007. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 26, 1985-1998.
- Sreenivasulu, N., Harshvardhan, V. T., Govind, G., Seiler, C., Kohli, A. 2012. Contrapuntal role of ABA: does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress?. *Gene*, 506(2), 265-273.
- Steward, N., Ito, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H. 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37741-37746.
- Stoeva, N., Kaymakanova, M. 2008. Effect of salt stress on the growth and photosynthesis rate of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Central European Agriculture*, 9(3), 385-391.
- Sun, M., Yang, Z., Liu, L., Duan, L. 2022. DNA Methylation in plant responses and adaption to abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 6910.

- Svetleva, D., Krastev, V., Dimova, D., Mitrovska, Z., Miteva, D., Parvanova, P., Chankova, S. 2012. Drought tolerance of Bulgarian common bean genotypes, characterised by some biochemical markers for oxidative stress. *Journal of Central European Agriculture*, 13(2), 349-361.
- Şahin, Z. 2014. Kuraklık stresinin buğdayda (*Triticum aestivum*) In Vitro şartlarda meydana getirmiş olduğu genetik ve epigenetik değişiklikler üzerine selenyumun etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 88, Erzurum.
- Terzi, R., Sağlam, A., Kutlu, N., Nar, H., Kadioğlu, A. 2010. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Turkish Journal of Botany*, 34(1), 1-10.
- Tharanathan, R. N., Mahadevamma, S. 2003. Grain legumes—a boon to human nutrition. *Trends in Food Science Technology*, 14(12), 507-518.
- Trenberth, K. E., Dai, A., Van Der Schrier, G., Jones, P. D., Barichivich, J., Briffa, K. R., Sheffield, J. 2014. Global warming and changes in drought. *Nature Climate Change*, 4(1), 17-22.
- Trifunović-Momčilov, M., Stamenković, N., Đurić, M., Milošević, S., Marković, M., Giba, Z., Subotić, A. 2023. Role of Sodium Nitroprusside on potential mitigation of salt stress in Centaury (*Centaureum erythraea* Rafn.) shoots grown in Vitro. *Life*, 13(1), 154.
- Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Balpınar, Ö., Öztürk, H. I., Özkan, G., Poczai, P. 2022. The effect of mammalian sex hormones on polymorphism and genomic instability in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plants*, 11(15), 2071.
- Uthup, T. K., Ravindran, M., Bini, K., Thakurdas, S. 2011. Divergent DNA methylation patterns associated with abiotic stress in *Hevea brasiliensis*. *Molecular Plant*, 4(6), 996-1013.
- Vanyushin, B. F., Ashapkin, V. V. 2011. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(8), 360-368.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R., Pandey, M., Sharma, S. 2017. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8, 161.
- Vitte, C., Panaud, O. 2005. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1-4), 91-107.
- Wang, H. W., Zhang, Y., Tan, P. P., Jia, L. S., Chen, Y., Zhou, B. H. 2019. Mitochondrial respiratory chain dysfunction mediated by ROS is a primary point of fluoride-induced damage in Hepa1-6 cells. *Environmental Pollution*, 255, 113359.

- Wang, W. S., Pan, Y. J., Zhao, X. Q., Dwivedi, D., Zhu, L. H., Ali, J., Fu, B., Li, Z. K. 2011. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1951-1960.
- Wicke, B., Smeets, E., Dornburg, V., Vashev, B., Gaiser, T., Turkenburg, W., Faaij, A. 2011. The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy Environmental Science*, 4(8), 2669-2681.
- Woo, H. R., Dittmer, T. A., Richards, E. J. 2008. Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 4(8), e1000156.
- Xu, J., Zhou, S., Gong, X., Song, Y., van Nocker, S., Ma, F., Ma, F., Guan, Q. 2018. Single-base methylome analysis reveals dynamic epigenomic differences associated with water deficit in apple. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2), 672-687.
- Yan, F., Wei, H., Ding, Y., Li, W., Liu, Z., Chen, L., Tang, S., Ding, C., Jiang, Y., Li, G. 2021. Melatonin regulates antioxidant strategy in response to continuous salt stress in rice seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 165, 239-250.
- Yang, C., Zhang, M., Niu, W., Yang, R., Zhang, Y., Qiu, Z., Zhao, Z., Sun, B. 2011. Analysis of DNA methylation in various swine tissues. *Plos One*, 6(1), e16229.
- Yang, Z. B., Eticha, D., Rao, I. M., Horst, W. J. 2010. Alteration of cell-wall porosity is involved in osmotic stress-induced enhancement of aluminium resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3245-3258.
- Yildiz, M., Poyraz, İ., Çavdar, A., Özgen, Y., Beyaz, R., 2020. Plant responses to salt stress, In: *Plant Breeding-Current and Future Views*. Abdurakhmonov, I. Y. (ed), IntechOpen Limited, 1-19, London.
- Yildiztugay, E., Ozfidan-Konakci, C., Kucukoduk, M., Turkan, I. 2020. Flavonoid naringenin alleviates short-term osmotic and salinity stresses through regulating photosynthetic machinery and chloroplastic antioxidant metabolism in *Phaseolus vulgaris*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 682.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P., Bestor, T. H. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics*, 13(8), 335-340.
- Zeng, W., Mostafa, S., Lu, Z., Jin, B. 2022. Melatonin-mediated abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 847175.
- Zhang, C., Shi, W., Ma, K., Li, H., Zhang, F. 2016. EGTA, a calcium chelator, affects cell cycle and increases DNA methylation in root tips of *Triticum aestivum* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 85(3), 3502.
- Zhang, M., Cui, W. K., Zhang, Y. J., Xu, Y. H. 2021. Research on world food production efficiency and environmental sustainability based on entropy-DEA model. *Complexity*, 2021, 1-11.

- Zhao, D., Yu, Y., Shen, Y., Liu, Q., Zhao, Z., Sharma, R., Reiter, R. J. 2019. Melatonin synthesis and function: evolutionary history in animals and plants. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 249.
- Zilberman, D. 2008. The evolving functions of DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5), 554-559.
- Zou, Y. P., Chang, S. K. C. 2014. Antioxidant and antiproliferative properties of extract and fractions from small red bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal Food Nutrition*, 1(105), 1-11.
- Zulfiqar, F., Nafees, M., Chen, J., Darras, A., Ferrante, A., Hancock, J. T., Siddique, K. H., Ashraf, M., Zaid, A., Latif, N., Corpas, F. 2022. Chemical priming enhances plant tolerance to salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 946922.

