

Atıf İçin: İnal B, Bektaş H, Mirzapour M, Altıntaş S, Cığ F, Cengiz M, Sonkurt M, 2021. Bitki Gelişimini Tetikleyen Rizobakterilerin Uygulandığı Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Kuraklık Stresi ile İlişkili Bazı Genlerin İfade Seviyesinin Ölçülmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(3): 2357-2370.

To Cite: İnal B, Bektaş H, Mirzapour M, Altıntaş S, Cığ F, Cengiz M, Sonkurt M, 2021. Quantification of The Expression Level of Some Drought Stress-Related Genes in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Treated With Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(3): 2357-2370.

Bitki Gelişimini Tetikleyen Rizobakterilerin Uygulandığı Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Kuraklık Stresi ile İlişkili Bazı Genlerin İfade Seviyesinin Ölçülmesi

Behcet İNAL¹, Harun BEKTAŞ¹, Mohsen MİRZAPOUR¹, Serdar ALTINTAŞ¹, Fatih CİĞ², Mustafa CENGİZ³, Mehmet SONKURT⁴

ÖZET: Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) temel besin kaynağı olması ve tüm dünyada üretimi yapılabilen bir ürün olması nedeniyle sürdürülebilir tarım açısından en önemli bitki türlerinden biridir. Buğday bitkisinin genetik yapı olarak mısır, çeltik ve diğer tüm tarımsal ürünlerden daha kompleks bir yapıya sahip olması bu türün ıslahını zor ve uzun zaman alan bir süreç haline getirmektedir. Diğer taraftan verim değerlerinin istenilen noktalara getirilebilmesi buğdayın çevresel faktörlere verdiği tepkilerin anlaşılması ile mümkün olabilmektedir. Bu çalışmada da buğday ıslahında en sık karşılaşılan sorunlardan kuraklık ve hastalıklara karşı direncin ACC deaminaz etkisi gösteren PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) ile ilişkisi incelenmiştir. Çalışmamızda ACC deaminaz sentezleyen bakterilerin iki farklı ekmeklik buğday çeşidinde (Gerek 79, Bezostaja 1) ve kuraklık koşullarındaki etkisi incelenmiştir. Çalışma ile ACC deaminaz etkisi ile kuraklığa karşı dayanıklılık mekanizmasında rol alan bazı transkripsiyon faktörlerin ifade seviyeleri q-RT PCR ile ölçülmüştür. Ayrıca her iki buğday genotipinde glutatyon redüktaz seviyesi ölçülerek genler ile olan ilişkisi ortaya konulmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen veriler değişen etkinlik derecesine sahip olmakla birlikte PGPB bakterilerinin kuraklık stresinin olumsuz etkilerini azaltıcı etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kuraklık, buğday, ACC deaminaz, gen ifadesi, transkripsiyon faktör, glutatyon

Quantification of The Expression Level of Some Drought Stress-Related Genes in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Treated With Plant Growth Promoting Rhizobacteria

ABSTRACT: Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important plant species in terms of sustainable agriculture, as it is a basic food source and a product that can be produced all over the world. The fact that the wheat plant has a more complex genetic structure than corn, paddy and all other agricultural products makes the breeding of this species a difficult and time-consuming process. On the other hand, it is possible to bring the yield values to the desired points by understanding the reactions of wheat to environmental factors. In this study, the relationship of resistance to drought and diseases, which are the most common problems in wheat breeding, with PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), which has ACC deaminase effect, was investigated. In our study, the effect of ACC deaminase-synthesizing bacteria on two different bread wheat varieties (Need 79, Bezostaja 1) and in drought conditions was investigated. In this study, expression levels of some transcription factors involved in drought resistance mechanism with ACC deaminase effect were measured by q-RT PCR. In addition, the glutathione reductase level was measured in both wheat genotypes and its relationship with the genes was revealed. Although the data obtained as a result of the study have varying degrees of activity, it has been found that PGPB bacteria have a reducing effect on the negative effects of drought stress.

Keywords: Rhizobacteria, wheat, ACC deaminase, gene expression, transcription factor, glutathion

¹Behcet İNAL ([Orcid ID: 0000-0003-2215-2710](https://orcid.org/0000-0003-2215-2710)), Harun BEKTAŞ ([Orcid ID: 0000-0002-4397-4089](https://orcid.org/0000-0002-4397-4089)), Mohsen MİRZAPOUR¹ ([Orcid ID: 0000-0002-2898-6903](https://orcid.org/0000-0002-2898-6903)), Serdar ALTINTAŞ¹ ([Orcid ID: 0000-0001-6324-5265](https://orcid.org/0000-0001-6324-5265)), Siirt Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Siirt, Türkiye

²Fatih CİĞ ([Orcid ID: 0000-0002-4042-0566](https://orcid.org/0000-0002-4042-0566)), Siirt Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Siirt, Türkiye

³Mustafa CENGİZ ([Orcid ID: 0000-0002-6925-8371](https://orcid.org/0000-0002-6925-8371)), Siirt Üniversitesi Eğitim Fakültesi Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü

⁴Mehmet SONKURT ([Orcid ID: 0000-0002-3926-2847](https://orcid.org/0000-0002-3926-2847)), Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu, Mardin, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Behcet İNAL, e-mail: behcetinal@siirt.edu.tr

GİRİŞ

Son elli yılda modern tarım tekniklerinde görülen ilerlemeler sayesinde tarımsal veriminde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu gelişmelerin temelinde ise çoğunlukla tarımda gübrenin kullanımı, yabancı ot mücadelesinde pestisit kullanımı, sulama tekniklerinde meydana gelen değişimler ve hibrit çeşitlerin kullanımı gibi faktörler yer almaktadır. Tarımda kimyasal gübrelerin ve pestisitlerin aşırı kullanımı sonucu, yüzey su kontaminasyonu, toprak kalitesinde bozulmalar ve biyoçeşitliliğin azalması gibi sorunlar ortaya çıkmıştır (Diaz ve Rosenberg, 2008). Bunlarla birlikte küresel iklim değişikliği sonucu sera gazlarında gözlemlenen artış ve diğer stres faktörleri tarımsal üretimi olumsuz yönde etkilemektedir (Ahuja ve ark., 2010). Dünya geneli tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen abiyotik stres faktörlerinin başında ise kuraklık ve tuzluluk gelmektedir. Bu yüzden bu faktörlere karşı dayanıklılığı sağlamak amacıyla sürdürülebilir stratejiler geliştirmek önem arz etmektedir. Diğer taraftan 2050 yılında 9 milyara ulaşması beklenen dünya nüfusunu beslemek için gerekli olan gıda maddelerine yönelik ihtiyaç artmaktadır. Tarımsal üretimde mevcut yaklaşımların çevre ve sağlık üzerindeki olumsuz etkilerine yönelik artan farkındalık tarımsal üretimde sürdürülebilir ve çevre dostu yaklaşımların kullanımını mecburi hale getirmektedir. Bütün bunlar bir arada düşünüldüğünde bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin (PGPB, Plant Growth-Promoting Bacteria) kullanımı alternatif bir strateji olarak ön plana çıkmaktadır.

Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler (PGPB, Plant Growth-Promoting Bacteria), tahıllar başta olmak üzere çeşitli tarımsal ürünlerin gelişimini önemli ölçüde hızlandırabilirler (Santoyo ve ark., 2016). Rizosfer kısmında yer alan farklı türdeki bakteriler azot fiksasyonu yaparak, topraktaki yapısal bileşenleri iyileştirerek, patojenik mikroorganizmaları bastırarak ya da bitkinin çeşitli biyotik ve abiyotik streslere verdiği yanıtları modifiye ederek bitki gelişiminde önemli roller üstlenebilir (Singh ve ark., 2015; Shameer ve Prasad, 2018). Yapılan çeşitli çalışmalarda bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin topraktaki besin elementleri üzerine etkisi, besin elementlerinin alımında, çeşitli patojenlere karşı savunma mekanizmasında, stres durumunun yönetilmesinde ve çeşitli fizyolojik aktivitelerde oynadığı rollerden dolayı verim üzerine olan etkileri ortaya konulmuştur (Pérez-de-Luque ve ark., 2017; Zipfel ve Oldroyd, 2017; Berendsen ve ark., 2018; Etesami, 2018; Gouda ve ark., 2018).

Her ne kadar klasik ıslah, su yönetimi ve genetik mühendisliği gibi yaklaşımlar kuraklık stresi ile başa çıkmada etkili yöntemler olsa da pratikte bu uygulamalar çeşitli zorlukları da içinde barındırmaktadır. Bu yöntemlere ilaveten bitki büyümesini teşvik eden bakteriler de kuraklık stresiyle başa çıkmada alternatif bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda kuraklık stresi koşullarında bitki büyümesini teşvik eden birçok rizosfer bakterisi tanımlanmıştır (Niu ve ark., 2018). Kuraklık stresi sırasında etilen biyosentezi söz konusu olduğunda, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC-deaminase) üreten bakterilerin kullanımının oldukça etkili bir yöntem olduğu belirtilmektedir (Ngumbi ve Kloepper, 2016; Vurukonda ve ark., 2016). PGP bakterilerinin kuraklık stresindeki rolü ACC deaminaz enzimi vasıtasıyla 1-aminocyclopropane-1-carboxylic asidi (ACC) hidrolize ederek etilen seviyesini düşürmesinden ileri gelmektedir. ACC bitki hormonlarından biri olan etilenin öncülüdür. PGP bakterilerinin etilen biyosentezinin düzenlenmesinin yanı sıra kök gelişiminde (Belimov ve ark., 2001), büyüme hormonlarının salgılanmasında (Glick ve ark., 1999), ve bazı hareketsiz besin elementlerinin çözünebilir hale gelmesinde de görev aldığı bilinmektedir (Glick ve ark., 1999; Basak ve Biswas, 2010).

Bitkiler strese maruz bırakıldıklarında çok sayıda moleküler biyolojik, biyokimyasal ve fizyolojik döngüler düzeyinde cevap oluşturmaktadırlar. Glutatyon (GSH) molekülü de stres altındaki bitkide savunmayı güçlendiren önemli etkenlerden bir tanesidir. Glutatyon γ - l - glutamil - l - sisteinil - glisinden

oluşan ve düşük moleküler ağırlığa sahip bir tripeptit tiyoldür. Bitkilerde abiyotik stres yanıtlarını düzenleyen en önemli antioksidan olarak bilinmektedir (Banerjee ve Roychoudhury, 2017, 2018a). Ayrıca hücre içi redoks homeostazisini düzenler, stres kaynaklı sinyal mekanizmasında rol oynar ve ksenobiyotikler zararlı hale getirir ve böylelikle stres koşullarında hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur (Schmitt ve ark., 2014). GSH proteinleri oksidatif stresin zararlarından korumak için bazı posttranslasyonel modifikasyonları da indükler (Banerjee ve Roychoudhury, 2018b). Farklı hücre kısımlarındaki GSH içeriği çeşitli stres koşullarına karşı oluşan yanıtlara göre değişiklik göstermektedir. Bu yüzden GSH içeriği nekrotik semptomların belirlenmesi için bir markır olarak kullanılabilir (Banerjee ve Roychoudhury, 2017).

Bir diğer önemli etken olan moleküler biyolojik aktörler olan, Transkripsiyon faktörleri (TF), tüm ökaryotlarda strese karşı verilecek yanıtlar da dahil olmak üzere önemli süreçleri kontrol etmektedirler (Johnson ve ark., 2002). Transkripsiyon faktörleri bu fonksiyonlarını stres yollarında yer alan genlerin ifadelerini düzenleyerek yerine getirmektedir. Bu süreci ise stres ilişkili genlerin promotör bölgelerine cis etkili düzenleyici faktörleri bağlayarak gerçekleştirmektedirler (Franco-Zorrilla ve ark., 2014). Böylelikle düzenleyici genlerin ifadelerinde meydana gelen modifikasyonlar bitkinin strese karşı dayanımını önemli ölçüde etkilemektedir (Wang ve ark., 2016). Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle kuraklık stresi ile ilgili birçok TF ailesi tanımlanmıştır (Anbazhagan ve ark., 2015). Sinyal iletimi sırasında TF'ler adeta bir şalter gibi hareket ederek ilgili yolaktaki genin ifadesine doğrudan müdahale edebilir. Bitkilerde genomun yaklaşık %10'luk bir kısmının TF kodladığı düşünülmektedir (Franco-Zorrilla ve ark., 2014). Bu gen aileleri DNA bağlayıcı motiflerine göre AREB, DREB, WRKY, MYB, NAC ve bZIP gibi kategorilere ayrılmaktadır (Golldack ve ark., 2011). Son yıllarda, buğday bitkisinin farklı dokularında da abiyotik stres ile ilişkili birçok transkripsiyon faktörü belirlenmiştir. Yao ve ark. (2010) buğdayda soğuk, sıcak, tuz ve kuraklık stresleri altında farklı ifade seviyesine sahip TF olduğunu göstermiştir.

Sıcak ve soğuk, kuraklık streslerine cevap veren TF'ler farklı buğday dokularında belirlenmesine rağmen, ACC sentezleyen bakterilerin inoküle edildiği buğday bitkisinde, bazı TF'lerin nasıl bir profil sergilediği bulunmamıştır. Bu çalışmada daha önceki çalışmalar ışığında PGPB bakterilerinin farklı stres koşullarında ki etkisi göz önünde bulundurularak kuraklık stresinin olumsuz etkilerini hafifletici etkisi olabileceği varsayılmıştır. Bu çalışmanın amacı; dünya genelinde buğday üretiminde karşılaşılan en önemli abiyotik stres faktörlerinden olan kuraklık stresini azaltmada ACCD (1- amino-cyclopropone-1-carboxylic acid deaminase) özelliği gösterebilen bitki gelişimini teşvik edici bakteri (PGPB) uygulamalarının kuraklık stresi altındaki buğday bitkisinde yol açtığı moleküler ve biyokimyasal değişimleri ortaya koymaktır. Moleküler olarak bitkiden alınan dokularda WRKY, NAC, DREB1, DREB2, bZIP ve NAC TF ifade seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüş olup ayrıca aynı örneklerde glutatyon redüktaz seviyesine bakılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışma Materyali

Bu çalışmada; kuraklığa karşı hassas olduğu bilinen Bezostaja-1 çeşidi ve dayanıklı olduğu bilinen Gerek-79 buğday çeşitleri (Çekiç ve Güneş; Ayrancı ve ark., 2017) ile ACC deaminaz etkisi gösteren 3 farklı bakteri suşu (TV126C *Pseudoalteromonas tetraodonis*(N), TV24C *Pseudomonas agarici*(N) ve TV53D *Brevibacillus choshinensis* (NP)) materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada öncelikli olarak ACC deaminaz etkisi gösteren bakterilerin kuraklık koşullarında iki buğday çeşidinde etkisi tespit edilmiştir.

Kuraklık uygulaması

Çalışmada saksılarda kullanılacak tarla toprağı uniform bir şekilde karıştırılarak elekten geçirilmiştir. Kuraklık düzeyinin belirlenmesinde toprağın su tutma kapasitesi sonuçta tarla kapasitesinden yararlanılmıştır. Toprağın su tutma kapasitesi için Avrupa Birliğince standart olarak kabul edilen ve Verdonck and Gabriels (1992), tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. 18x18 cm çaplı 5.5 kg'lık 4 saksı iyice sulanmış ve bu saksıların 24 saat suyu süzöldükten sonra ağırlığı tartılmıştır. Daha sonra bu saksılardaki topraklar 24 saat 105 °C de kurutularak kuru toprak ağırlığı belirlenmiştir. Ardından ortalamaları alınmıştır. Yaş toprak ağırlığı ile fırın kuru toprak ağırlığı arasındaki fark toprakta tutulan su miktarı olarak hesaplanmıştır (tarla kapasitesi). Her bir saksıya verilecek su, tarla kapasitesi miktarı kullanılarak hesaplanmıştır. Uygulanan kuraklık düzeyleri; % 80 (S0), % 50 (S1) ve % 25 (S2) şeklinde olmuştur. Bitkiler serada kontrollü şartlarda yetiştirilmiş, sulama aralığı % 80, % 50 ve % 25 kuraklık düzeyinde haftada bir yapılmıştır. Deneme 20-24 °C sıcaklık ve %50-70 nemli koşullarda ve 16/8 aydınlık/ karanlık periyodunun sağlandığı koşullarda yürütölmüştür.

Gübre Uygulaması

Kontrol uygulaması olarak 18x18 cm çaplı 5.5 kg'lık saksılara standart gübreleme için doz olarak 200 mg N kg⁻¹, 60 mg P₂O₅ kg⁻¹ uygulanmıştır (Alpaslan ve ark., 1998).

Bakteri uygulaması

Bakteriler sıvı besi yerinde çoğaltılarak tohumlara kodlanmıştır. Sıvı besi yeri olarak bakteri kültürleri için NB ve ASHBY kullanılmıştır. Hazırlanan besi yerleri otoklavda 121 °C'de steril edilmiş ve steril kabinde öze ile katı besi yerinden sıvı besin yerine aktarılmıştır. Sıvı besi yerine aktarılan bakteriler 26±2 °C'de 24 saat süre ile çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Çoğaltılan bakteriler 10⁸ cfu/ml⁻¹ konsantrasyona ayarlanarak tohuma uygulanmıştır (Clark, 1965).

Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi

Örneklerde glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi Cakmak and Marschner (1992)'e göre 340 nm'de (E=6.2 mM cm⁻¹) NADPH'nın oksidasyonu temel alınarak belirlenmiştir. Buna göre, son hacmi 1 ml olacak şekilde ayarlanan reaksiyon ortamına 0.1 mM EDTA içeren 50 mM'lık fosfor tamponu (pH=7.6), 0.1 ml 0.5 mM okside glutasyon (GSSG), 0.1 ml 0.12 mM NADPH ve enzim ekstraktı ilave edilerek 340 nm'de ki absorbans okunmuştur.

RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi yapılması

Bakterilen kuraklık stresi altındaki buğdayda gen düzeyindeki oluşturduğu değişimleri ortaya koymak için WRKY, NAC, DREB1, DREB2, bZIP ve NAC TF'lerin ifade düzeyleri q-RT PZR ile belirlenmiştir. Bu analiz için örneklere ait yaprak dokularından total RNA izolasyonları Trizol (Invitrogen) kimyasalı kullanılarak yapılmıştır. Bunun için 100 mg bitki örnekleri sıvı azot kullanılarak öğütöldükten sonra, 1 ml TRIZOL reaktifi içeren steril tüplerde homojenize edilmiştir. Daha sonra örnekler 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra 1 ml TRIZOL reaktifi için 0.2 ml kloroform eklenmiştir. Tüplerin kapakları iyice kapatılıp 15 sn. boyunca elle kuvvetlice çalkalayarak karıştırılmıştır ve 2-3 dk. oda sıcaklıkta bekletilip 20 dk. 4 °C'de 15000 rpm de santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve TRIZOL reaktifinin yarısı kadar isopropil alkolle eklenerek ve karıştırarak RNA'ların çöktürölmesi sağlanmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 10 dk. bekletilip daha sonra 14000 rpm de 4 °C de 10 dk. santrifüj edilerek ve üst faz dikkatli şekilde uzaklaştırılmıştır. Sonra Kullanılan TRIZOL reaktifinin eşit hacmi kadar %70'lik etanol pelletin üzerine ilave edilip ve pelletin yüzmesi sağlanmış ve ardından 5 dk. 10000 rpm de 4 °C de santrifüj edilmiştir. Sonra RNA çöktölmesi 5-10 dk. kurumaya bırakılmış ve RNA 30 µL steril su ile çözüölüp ve 8-10 dk. 55°C de bekletilip daha sonra Elde edilen RNA'ların kalite ve miktarları %2'lik agaroz jel ve nano-drop spektrofotometre kontrol edilip ve -80°C de saklanmıştır.

İzole edilmiş total RNA örneklerinden cDNA elde etmek için İnal ve ark., (2014)'göre yapılmıştır. Buna göre: Fermentas kiti kullanılmıştır. Eşit miktarda RNA ile çalışmaya başlamak amacıyla, her bir dokuya ait total RNA'lardan 1000 ng olacak şekilde, ayarlanarak RNA kullanılmıştır. 1X için 1 µl Oligo dT, 1000 ng RNA olacak şekilde üzerine su eklenerek toplam hacim 11 µL ye tamamlanmıştır. Tüpler PZR cihazında 65°C'de 5 dk tutulduktan sonra hemen buza gömülmüş ve en az 2 dk. buzda bekletilmiştir. Ardından herbir tüpe 4 µL 5X Buffer, 2 µL 10 mM dNTP, 1 µL RNase out, 2 µL Revers Transkriptaz enzimi eklenerek toplam hacim 20 µL ye tamamlanmıştır. 37 °C'de 60 dk PZR cihazına konulmuş ve 70°C'de 5 dk. bekletilmiş ve +4 °C'de reaksiyon sona erdirilmiştir. Ardından oluşturulan tüm cDNA lar, 18S rRNA primerleriyle PZR optimizasyonu yapılmış ve cDNA ların oluşup oluşmadığının kontrolü %1'lik jel yürütülerek tespit edilmiştir.

qRT-PCR ile Gen İfade Analizinin Yapılması

Total RNA'yı cDNA'ya çevirdikten sonra kuraklık stresi uygulanmış genotiplerine ait yaprak dokuları arasında ifade seviyesinin farklı olduğu düşünülen, transpozonların ifade seviyeleri q-RT-PCR ile ortaya konulmuştur. Transpozon genlerine ait primerler primer 3 (Untergrasser ve ark., 2012) kullanılmıştır. Verilerin analizi için 'threshold' (Ct) değeri alınmış olup Pfaffl's modeli kullanılmıştır. Thermo piko-real cihazı kullanılmıştır.. qRT-PCR deneyleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Öncelikle her bir örnekteki RNA miktarı 18S rRNA primerleri kullanılarak normalize edilmiştir. Bu primerlerin dizileri; 18S rRNA İleri 5'-TTTGACTCAACACGGGGAAA-3' ve 18S rRNA Geri 5'-CAGACAA ATCGCTCCACCAA-3'dir. Hazırlanan karışımdan deney planına göre belirlenen kuyucuklara 18'er µl dağıtılmıştır. 'Plate' in üzeri özel yapıştırma jelatiniyle kapatılıp, q-RT-PCR cihazına yerleştirilen örneklere ait q-RT-PCR sonucu çıkan datalar 2 - ΔΔCt metodu ile analiz edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada bulguları elde etmek ve çalışmanın amacını gerçekleştirmek için; Bezostaja 1 ve Gerek-79 ekmeçlik buğday çeşitleri ile ACC deaminaz etkisi gösteren 3 farklı bakteri suşu kullanılmıştır. Kuraklık stresi oluşturmak için iki farklı buğday çeşidine de kontrollü şartlarda sulama aralığı S1-%80, ve S3-%25 olacak şekilde iki farklı sulama rejimi uygulanmıştır.

Çalışmada öncelikli olarak ACC deaminaz etkisi gösteren bakterilerin kuraklık koşullarında iki buğday çeşidinde gen ve enzim düzeyinde bazı analizler yapılmıştır. Ayrıca bu bakterilerin azot bağlama ve fosfat çözme etkisini 'de bulmak için % 50 ve % 100 (8 kg N da⁻¹ ve 6 kg P da⁻¹) gübreleme olacak şekilde her bir saksıya hesaplanarak verilmiştir. ACC deaminaz etkisinin belirlenmesinde kullanılacak buğday çeşitlerinden Gerek-79 (Ç1) kuraklığa dayanımı iyi, Bezostaja 1 (Ç2) ise dayanımı azdır. Moleküler olarak bitkiden alınan dokularda WRKY, NAC, DREB1A, DREB2A, bZIP ve NAC TF ifade seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüş olup Ayrıca aynı örneklerde glutatyon redüktaz seviyesine bakılmıştır. WRKY geni için sonuçlara bakıldığında, her iki buğday çeşidinde 'de su kısıtlamasının olduğu ve tam sulanan örneklerde özellikle B1 bakteri hattının inoküle edildiği örneklerde ilgili genin (WRKY) ifade seviyesinin arttığı bulunmuştur (Şekil 1). Bu sonuçtan da tahmin edileceği gibi, ACC-Deaminaz sentezleyen B1 bakteri hattının diğer B2 ve B3 bakteri hattına göre daha etkili olduğu WRKY geninin ifade profiline bakılarak anlaşılabilir. Bitkilerde tanımlanan en geniş TF ailelelerinden biri olan WRKY gen ailesi üyelerinin sahip olduğu korunmuş motiflerinden dolayı hedef genlerin promotörlerinde yer alan W-box elementlerini tanıdığı ve bu sayede transkripsiyonel düzenlemede önemli roller üstlendiği bilinmektedir (Eulgem ve ark., 2000). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise bu gen ailesinin çeşitli abiyotik stres koşullarındaki kilit öneme sahip düzenleyici fonksiyonları ortaya konulmuştur (Chen ve ark., 2017; Jiang ve ark., 2017). Örneğin model bitki *Arabidopsis*'te AtWRKY25, AtWRKY33,

AtWRKY46, AtWRKY57 ve AtWRKY63 (Qiu ve Yu, 2009; Wu ve ark., 2009a; Song ve ark., 2010; Ding ve ark., 2014), pirinçte OsWRKY11, OsWRKY45 ve OsWRK72 (Qin ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015) ve diğer türlerde HvWRKY38, TaWRKY1, TaWRKY93, TaWRKY44 ve TaWRKY33 (Qin ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015). gibi genlerin kuraklık yanıtlarında yer aldığı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da sulama rejimi ve kullanılan bakteri çeşidinin aynı olduğu durumlarda kuraklığa dayanıklı olduğu bilinen Gerek-79 çeşidinde TaWRKY33 gen ifadesinde meydana gelen artışın diğer çeşide göre daha fazla olması bu genin kuraklık stresinde pozitif düzenleyici olduğunu göstermektedir.

TaWRKY33 için elde edilen ifade profilinin bazı nüanslarla NAC geni için de geçerli olduğu söylenebilir (Şekil 1). Bitkilere özgü bir transkripsiyon faktör ailesi olan NAC (NAM, ATAF_{1,2} ve CUC₂) ailesi kuraklık, tuzluluk ve soğuk stresine karşı oluşturulan yanıtlarda çeşitli roller oynamaktadır (Borrill ve ark., 2017; Saidi ve ark., 2017). Örneğin *A. thaliana* türünde *ATAF1* geninin ABA ve kuraklık uygulaması ile indüklendiği ve bu genin aşırı ifade olduğu mutant hatlarda kuraklığa dayanıklılığın arttığı bildirilmiştir (Wu ve ark., 2009b). Benzer şekilde transgenik buğdayda aşırı ifade olan *TaNAC69* transkripsiyon faktörünün dehidrasyon toleransını artırdığı ve stres koşullarında yukarı yönlü ifade olan genlerin ifadesinde artış sağladığı belirtilmektedir (Xue ve ark., 2011). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da artan kuraklık şiddetine bağlı olarak her iki çeşitte de ilgili transkripsiyon faktörünün ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Ancak kullanılan bakteri çeşidinden bağımsız olarak dayanıklı buğday çeşidinde ifade profilinin daha yüksek seyretmesi bu genin de kuraklık koşullarında pozitif bir düzenleyici olduğunu göstermektedir.

Dehydration Responsive Element-Binding (DREB1A) geni için sonuçlara bakıldığında, ACC-Deaminaz sentezleyen B3 bakteri hattının bu defa ön plana çıktığı görülmektedir. Çalışmada kullanılan her iki buğday çeşidi için de stresin şiddetine orantılı şekilde DREB1A ifadesinde artış gözlemlenmiştir.

Dehydration Responsive Element-Binding (DREB) faktörleri kuraklık ve soğuk stresini yanıtlarında yer alan genleri hedeflemekte ve absisik asitten bağımsız fonksiyon göstermektedir (Geda ve ark., 2019). Ayrıca bilinen bütün DREB gen ailesi üyeleri AP2/ERF olarak bilinen, bitkilere özgü ve stres yanıtlarında rol oynayan bir motif taşımaktadır. (Agarwal ve ark., 2006). Aslında, AP2/ERF motifi oldukça korunmuş olan ve transkripsiyon faktörü bağlayan bir motif olarak tanımlanmış ve etilen yanıtları ile çiçek gelişiminde görev aldığı belirtilmiştir (Jofuku ve ark., 1994). Bu bağlamda çeşit ve sulama rejiminden bağımsız düşünüldüğünde DREB 1A ifadesinde görülen farklılıklar PGP bakterilerinin etilen seviyesini düşürmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

DREB1A ile benzer şekilde DREB2A'da ethylene-responsive element-binding factor/APETALA2-tip DNA bağlayıcı motif içermekte ve aşağı yönlü genlerin promotör bölgesindeki DRE cis-elementleri ile etkileşerek transkripsiyonel düzenleyici olarak görev almaktadır (Liu ve ark., 1998).

DREB2A geninin ifade seviyesine bakıldığında, özellikle Ç1 için kuraklığa dayanıklılığı arttıran herhangi bir bakteri hattı seçilememektedir. Çünkü nerede ise her üç bakteri hattının da DREB2A gen ifadesini aynı oranda etkilediği bulunmuştur. Aynı durum Ç2 için değerlendirildiğinde B2 ve B3 bakteri hattının gen ifadesini daha fazla arttırdığı görülmektedir. DREB1A ve DREB2A gen ifadeleri karşılaştırıldığında ifade profillerinin farklılık gösterdiği görülmektedir. Yapılan çalışmalarda DREB2A geninin 136 ve 165. Aminoasit rezidüleri arasındaki bölgenin negatif düzenleyici bir motif içerdiği ve bu bölgenin delesyonu sonucu DREB2A'nı aktif forma dönüştüğü, ayrıca bu formun aşırı ifade edilmesinin stres yanıtlarında yer alan birçok geni indüklediği bulunmuştur (Sakuma ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda da dayanıklı çeşitte bu özelliğin muhtemelen bazı baskılayıcı etkenlerle inhibe

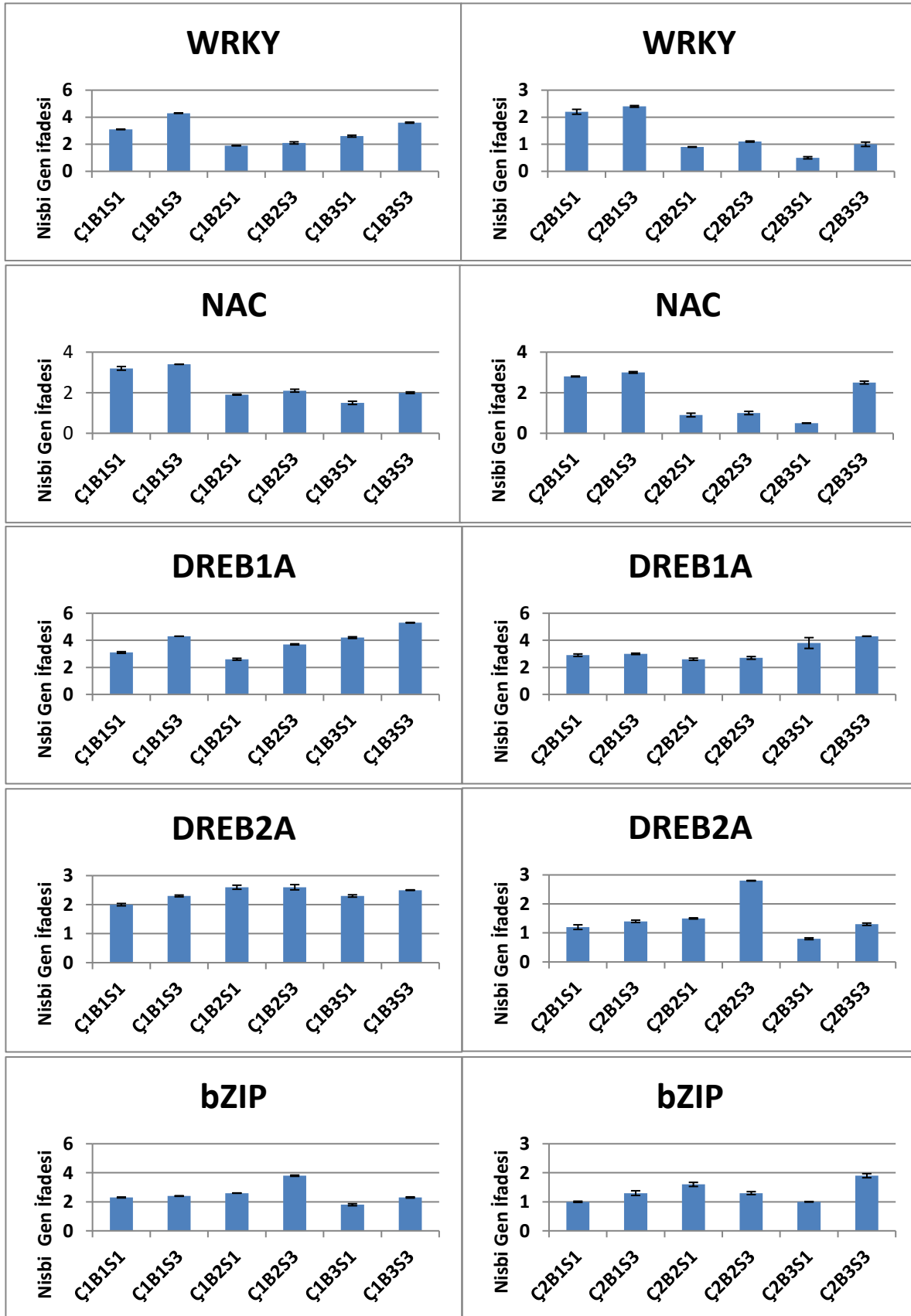
edildiği hassas çeşitte ise özellikle B2 ve B3 hattının uygulandığı örneklerde anlamlı bir artışın olduğu ortaya çıkmıştır.

Son olarak bZIP genine bakılacak olursak, yine çeşitler arasında bakterilerin etkileri farklı olmuştur. Ç1 için ilgili genin ifade seviyesinin artmasında B2 hattı etkili olurken, Ç2’de ise B3 hattının etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 1).

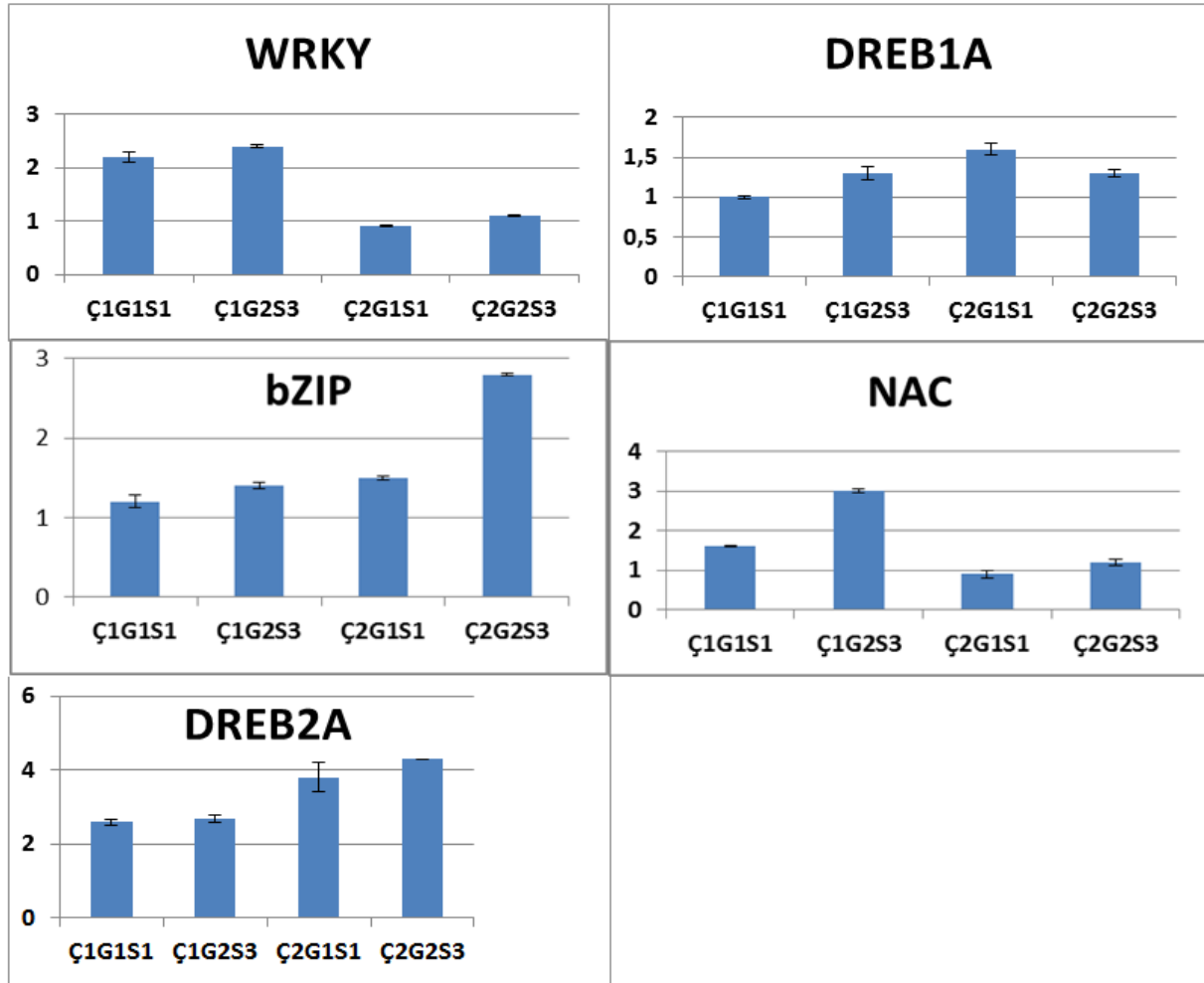
Bitkilerde yer alan en geniş TF ailelerinden biri olan bZIP ailesinin üyeleri sahip oldukları bZIP motiflerine göre çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bZIP ailesinde yer alan TF’lerinin çeşitli stres koşullarında dayanıklılığı sağladığı belirtilmiştir (Hobo ve ark., 1999; Gaguancela ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2017). *A. thaliana*’da *ABI5* ifadesi tuzluluğa karşı dayanıklılığı sağlarken (Chang ve ark., 2019), pirinçte *OsABF1*; *COR413-TM1* aktivasyonunu sağlayarak kuraklık koşullarında dayanıklılığa katkıda bulunmuştur (Zhang ve ark., 2017), ayrıca tatlı patatesten (*Ipomoea batatas*); bir TF olan *IbABF4* geninin aşırı ifade olması ABA’ya olan hassasiyeti ve kuraklık ile tuzluluk stresine karşı dayanıklılığı artırmıştır (Wang ve ark., 2019). Ayrıca, son zamanlarda yapılan bir çalışmada buğday bitkisinden izole edilen bir transkripsiyon faktörü olan *TabZIP1*’in ET/MeJA (Etilen/Metil Jasmonat) bağımlı sinyal iletim yolağında rol oynadığı belirtilmiştir (Wang ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda da çeşit ve sulama rejiminden bağımsız olarak ilgili gen ifadesindeki değişiklik bakteri suşlarının etkinliğine bağlanabilir. Bu duruma göre B3 bakteri hattının daha fazla etkinlik gösterdiği söylenebilir.

Gen ifade seviyeleri değerlendirildiğinde sonuç olarak: genlerin ifade seviyelerinin kuraklığa dayanıklı ve hasas çeşitlerine bağlı olarak değiştiği aynı zamanda bu değişikliğe bakteri suşlarının ve farklı sulama rejimlerinin’de etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ancak genel olarak B3 bakteri suşunun ACC deaminaz aktivitesi açısından ön plana çıktığı bulunmuştur.

Çalışmada ayrıca, farklı gübre dozlarının kuraklık stresi altındaki buğday çeşitlerinde etkisini gen düzeyinde incelemek için WRKY, NAC, DREB1A, DREB2A, bZIP ve NAC gibi kuraklıkta etkili olduğu bilinen genlerin ifade seviyesine bakılmıştır. Şekil 2.’ye bakıldığında, Ç1’ de WRKY, NAC, DREB1A, DREB2A, bZIP ve NAC genlerinin tamamının %100 gübre verilmiş örneklerde ifade seviyesinin yükseldiği bulunmuştur. Bu artan gen ifadeleri genelde kuraklık stresi oluşturulmuş S3 sulama rejiminde görülmüştür (Şekil 2). Ç2 dediğimiz kuraklığa hassas buğday çeşidinde DREB1A geni hariç, WRKY, NAC, DREB2A, bZIP genlerinin ifade seviyeleri, %100 gübre verilmiş ve aynı zamanda S3 rejimi ile kuraklık oluşturulmuş örneklerde yükseldiği bulunmuştur (Şekil 2). Elde edilen sonuç birlikte değerlendirildiğinde, çeşitlere tam gübre verip kuraklık sulama rejimi uygulandıktan sonra gen seviyelerinin genelde arttığı bulunmuştur. Bu durumda yüksek gübre dozunun aslında kuraklığa karşı bir dayanım mekanizması oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Kuraklık stresi azot ve fosfor alımı, iletimi ve dağıtımını azaltarak bitki büyümesi ve gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (Rouphael ve ark., 2012). Bitkiler tarafından azot ve fosfor alımı azalan toprak nemine paralel olarak azalmaktadır (Sardans ve Peñuelas, 2012). Uzun süreli kuraklık stresinde genel olarak büyüme ve gelişmeyi önleyen etken kuraklığın azot ve fosfor alımını kısıtlayıcı etkisinden ziyade suyun kısıtlı olmasıdır (He ve Dijkstra, 2014). Çalışmamızda kullandığımız azot dozları arasındaki bariz farka rağmen gen ifadesinin sınırlı bir aralıkta değişmiş olması bu ifadeyi destekler niteliktedir.



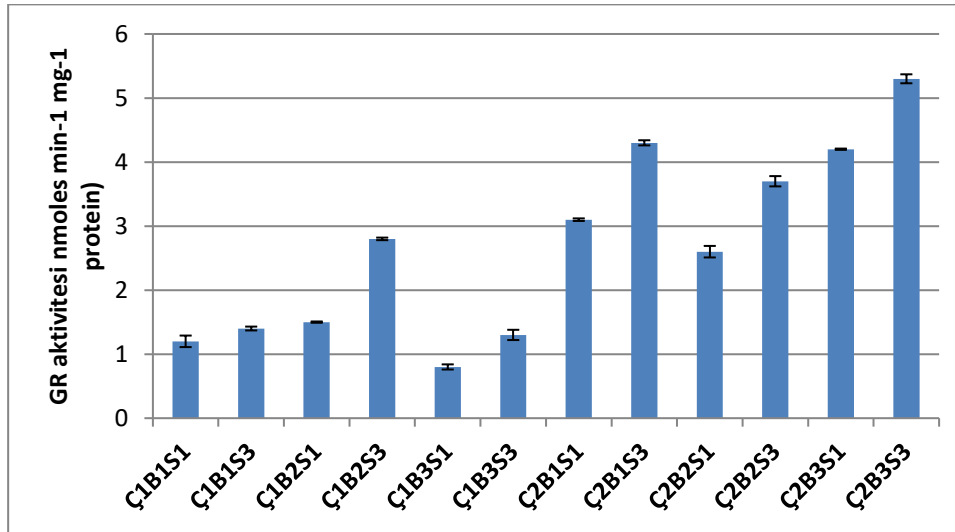
Şekil 1. Üç farklı bakteri bulaştırılmış ve farklı sulama rejimi uygulanmış İki farklı buğday çeşitlerinde meydana gelen gen ifade seviyeleri (Ç:çeşit, B: bakteri, S: sulama)



Şekil 2. Farklı gübre dozları uygulanmış İki farklı buğday çeşitlerinde meydana gelen gen ifade seviyeleri (Ç: çeşit, G: gübre, S: sulama)

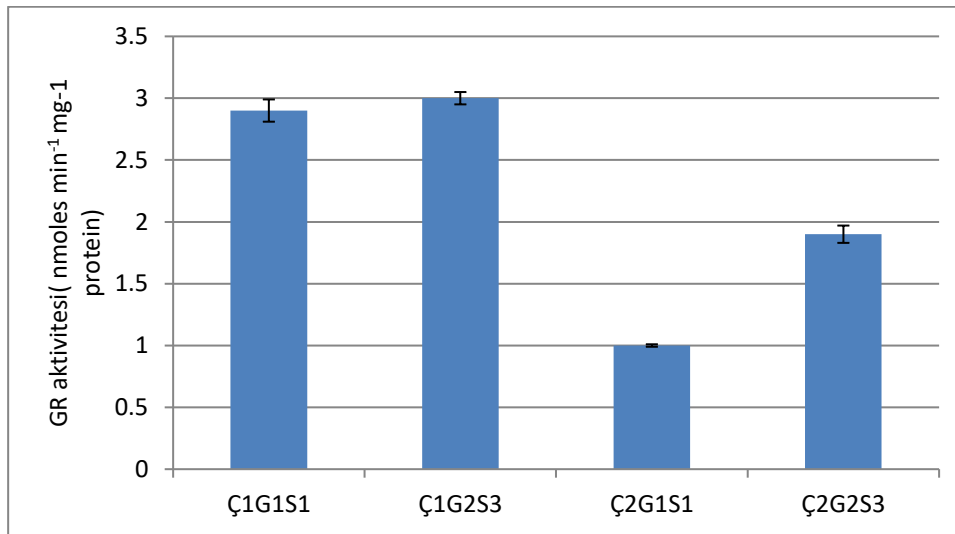
Stres koşullarında hidroksil radikali (OH), süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve singlet oksijen (1O₂) gibi reaktif oksijen türleri oluşması, düşük moleküler ağırlığa sahip glutasyon, askorbat ve karotenoidlerin oluşması ve son olarak süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi serbest radikalleri süpüren antioksidan enzimlerin oluşması bitkilerin strese verdiği fitokimyasal yanıtları oluşturmaktadır. Genel olarak serbest oksijen türlerinin canlı hücre üzerine zararları; DNA zararı, lipitlerdeki yağ asitlerinin oksidasyonu, proteinlerdeki aminoasitlerin oksidasyonu, kofaktörlerin oksidasyonu ile belirli enzimlerin inaktif hale getirilmesi şeklinde olmaktadır. Kuraklık stresi sırasında antioksidanlar ve reaktif oksijen türleri arasındaki hassas denge hücresel zararın ya da savunma fonksiyonunun yerine getirilmesinde belirleyici rol oynamaktadır.

Askorbat-glutasyon (AsA-GSH) döngüsü, bitkilerde reaktif oksijen bileşiklerini süpüren sistemin önemli bir bileşenidir. Bu yolağın üyeleri, askorbat ve glutasyon gibi bileşenleri ve askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDAsAR), dehidroaskorbat redüktaz (DAsAR) ve glutasyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimleri içerir. Askorbat peroksidaz ve glutasyon redüktaz bu döngünün anahtar enzimleridir. Genel olarak bu enzimlerin aktivitesinin farklı stres koşulları altındaki farklı bitki türlerinde arttığı gözlemlenmiştir (Pang ve Wang, 2010). Bu çalışmada da kuraklık stresi verilmiş ve farklı ACC-deaminase bakteri suçları ile inoküle edilmiş iki farklı buğday çeşidinde glutasyon redüktaz enzimin aktivitesi ölçülmüştür (Şekil 3).



Şekil 3. Üç farklı bakteri bulaştırılmış ve farklı sulama rejimi uygulanmış İki farklı buğday çeşidinde meydana gelen Glutasyon redüktaz aktivitesi (Ç:çeşit, B: bakteri, S: sulama)

Sonuçlara bakıldığında, çeşitler arasında, glutasyon redüktaz aktivitesi en çok Ç2’de yani kuraklığa hassas olan bezostaja-1’ S3 sulama rejimine maruz bırakılmış ve B3 bakteri suşu ile muamele edilmiş örneklerde görülmüştür. Ancak Ç1 (Gerek-73)’de Ç2’de görülen durumun tam tersi olarak, Glutasyon redüktaz aktivitesi en düşük B3 bakteri suşunun bulaştırıldığı örneklerde görülmüştür (Şekil 3) Görüldüğü üzere enzim aktivitesi üzerine; çeşit, sulama rejimi ve bakteri suşunun etkisi oldukça fazladır.



Şekil 4. Farklı gübre dozları uygulanmış İki farklı buğday çeşitlerinde meydana gelen Glutasyon redüktaz aktivitesi (Ç: çeşit, G: gübre, S: sulama)

Çalışmada bakılan diğer bir parametre ise kuraklık stresi verilmiş ve farklı gübre dozları verilmiş iki farklı buğday çeşidinde glutasyon redüktaz enziminin aktivitesinde meydana gelen değişimlerdir (Şekil 4). Sonuçlara bakıldığında, çeşitler arasında, glutasyon redüktaz aktivitesi en çok tam gübre uygulaması yapılmış Ç2’de yani kuraklığa hassas olan bezostaja-1’ S3 sulama rejimine maruz bırakılmış örneklerde görülmüştür. Diğer taraftan en düşük enzim aktivitesi de, Ç2 (Bezostaja-1)’de %50 gübre uygulaması yapılmış örneklerde görülmüştür (Şekil 4). GR aktivitesine yönelik bütün parametreler bir arada düşünüldüğünde bakteri uygulamasının kuraklık stresini azaltarak ROS birikimini dolaylı olarak azalttığı söylenebilir.

SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile; dünya genelinde iklim değişikliğinin sonucu olarak etkisi gittikçe artan ve buğday tarımında verimi ve kaliteyi önemli ölçüde sınırlayan kuraklık stresinin azaltılmasında kullanılabilecek bakteri suşlarının bitki gelişimi üzerinde etkisinin belirlenmesi ve bu etkileşim sonucu meydana gelen gen ve enzim düzeyinde değişikliklerin nasıl olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Elde edilmiş olan sonuçlar ile buğday tarımında önemli bir sorun olan kuraklık stresinin bitki üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılması bitkilerin kurak alanlara adaptasyonunun daha iyi bir şekilde sağlanması ve bu süreçte moleküler düzeyde değişimlerin nasıl olduğu noktasında literature yeni bilgiler kazandırılmıştır.

Bu yönüyle söz konusu bu çalışma ile, gittikçe artan kurak alanlarda kuraklık stresinin buğday bitkisi üzerindeki etkisinin azaltılması ve bunun sonucu olarak verim ve kalite parametrelerinde iyi sonuçların alınması beklenmektedir. Bu çalışmada kullanılan Acc-deaminaz sentezleyen bakterilerin tarımda kullanımının artması, bunun uygun formülasyonlarda ülke ve dünya genelinde yetiştiricilere ulaştırılmasıyla bitkisel üretimde artış olacağı, kuraklık nedeniyle terkedilen alanların tekrar kullanılabileceği ve bu sonuçların bilim dünyasında yapılacak sonraki çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje (BAP) birimi tarafından 2017-SİÜZİR-63 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazar Katkısı

Behcet İNAL, Harun BEKTAŞ, Fatih CİĞ, Mustafa CENGİZ çalışmanın yönlendirilmesi, deneylerin yapılması ve makalenin yazılmasında katkıda bulunmuşlardır. Serdar ALTINTAŞ ve Mehmet SONKURT arazi çalışmalarında ve deneylerinin yapılması noktasında katkıda bulunmuşlardır.

KAYNAKLAR

- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy M, Sopory SK, 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant cell reports*, 25:1263-1274.
- Ahuja I, de Vos RC, Bones AM, Hall RD, 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in plant science*, 15:664-674.
- Alpaslan M, Gunes A, Inal A, 1998. Deneme Tekniği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1501, Ders Kitabı, 423.
- Anbazhagan K, Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Dumbala SR, Kishor PK, Sharma KK, 2015. DREB1A overexpression in transgenic chickpea alters key traits influencing plant water budget across water regimes. *Plant cell reports*, 34:199-210.
- AYRANCI R, Bayram S, Soyulu S, 2017. Ekmeklik buğday genotiplerinin verim ve fenolojik özelliklerinin tane doldurma dönemindeki kuraklık stresine tepkileri. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 26:112-118.
- Banerjee A, Roychoudhury A. 2017. Effect of salinity stress on growth and physiology of medicinal plants. In: *Medicinal Plants and Environmental Challenges: Springer*. p 177-188.
- Banerjee A, Roychoudhury A, 2018a. Abiotic stress, generation of reactive oxygen species, and their consequences: an overview. *Revisiting the role of reactive oxygen species (ROS) in plants: ROS Boon or bane for plants*:23-50.

- Banerjee A, Roychoudhury A, 2018b. The gymnastics of epigenomics in rice. *Plant cell reports*, 37:25-49.
- Basak BB, Biswas DR, 2010. Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop. *Biology and Fertility of Soils*, 46:641-648.
- Belimov AA, Safronova VI, Sergeeva TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA, Kluge C, Preisfeld A, 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*, 47:642-652.
- Berendsen RL, Vismans G, Yu K, Song Y, de Jonge R, Burgman WP, Burmølle M, Herschend J, Bakker PA, Pieterse CM, 2018. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *The ISME journal*, 12:1496-1507.
- Borrill P, Harrington SA, Uauy C, 2017. Genome-wide sequence and expression analysis of the NAC transcription factor family in polyploid wheat. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7:3019-3029.
- Cakmak I, Marschner H, 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant physiology*, 98:1222-1227.
- Chang H-C, Tsai M-C, Wu S-S, Chang F, 2019. Regulation of ABI5 expression by ABF3 during salt stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Botanical studies*, 60:1-14.
- Chen J, Nolan TM, Ye H, Zhang M, Tong H, Xin P, Chu J, Chu C, Li Z, Yin Y, 2017. *Arabidopsis* WRKY46, WRKY54, and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses. *The Plant Cell*, 29:1425-1439.
- Clark FE, 1965. Aerobic Spore-Forming Bacteria. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9:1473-1476.
- Çekiç CY, Güneş ATD, Kurağa Dayanikli Buğday (*Triticum Aestivum* L.) İslahında Seleksiyon Kriteri Olabilecek Fizyolojik Parametrelerin Araştırılması. In: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Toprak Anabilim Dalı.
- Diaz RJ, Rosenberg R, 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321:926-929.
- Ding ZJ, Yan JY, Xu XY, Yu DQ, Li GX, Zhang SQ, Zheng SJ, 2014. Transcription factor WRKY 46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 79:13-27.
- Etesami H, 2018. Can interaction between silicon and plant growth promoting rhizobacteria benefit in alleviating abiotic and biotic stresses in crop plants?. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 253:98-112.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE, 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5:199-206.
- Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R, 2014. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111:2367-2372.
- Gaguancela OA, Zúñiga LP, Arias AV, Halterman D, Flores FJ, Johansen IE, Wang A, Yamaji Y, Verchot J, 2016. The IRE1/bZIP60 pathway and bax inhibitor 1 suppress systemic accumulation of potyviruses and potexviruses in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* plants. *Molecular plant-microbe interactions*, 29:750-766.
- Geda C, Repalli S, Dash G, Swain P, Rao G, 2019. Enhancement of Drought Tolerance in Rice through Introgression of *Arabidopsis* DREB1A through Transgenic Approach. *Journal of Rice Research and Developments*, 7:2.
- Glick B, Li J, Shah S, Penrose D, Moffatt B. 1999. ACC deaminase is central to the functioning of plant growth promoting rhizobacteria. In: *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II*: Springer. p 293-298.

- Golldack D, Lüking I, Yang O, 2011. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, 30:1383-1391.
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin H-S, Patra JK, 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206:131-140.
- He M, Dijkstra FA, 2014. Drought effect on plant nitrogen and phosphorus: a meta-analysis. *New Phytologist*, 204:924-931.
- Hobo T, Kowyama Y, Hattori T, 1999. A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proceedings of the national academy of sciences*, 96:15348-15353.
- Jiang J, Ma S, Ye N, Jiang M, Cao J, Zhang J, 2017. WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 59:86-101.
- Jofuku KD, Den Boer B, Van Montagu M, Okamoto JK, 1994. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *The Plant Cell*, 6:1211-1225.
- Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK, 2002. The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiology*, 130:837-846.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10:1391-1406.
- Ngumbi E, Kloepper J, 2016. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, 105:109-125.
- Niu X, Song L, Xiao Y, Ge W, 2018. Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress. *Frontiers in microbiology*, 8:2580.
- Pang C-H, Wang B-S, 2010. Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate–glutathione cycle and stress tolerance in plants. *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*, 91-113.
- Pérez-de-Luque A, Tille S, Johnson I, Pascual-Pardo D, Ton J, Cameron DD, 2017. The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens. *Scientific Reports*, 7:1-10.
- Qin Y, Tian Y, Liu X, 2015. A wheat salinity-induced WRKY transcription factor TaWRKY93 confers multiple abiotic stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464:428-433.
- Qiu Y, Yu D, 2009. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis. *Environmental and Experimental Botany*, 65:35-47.
- Rouphael Y, Cardarelli M, Schwarz D, Franken P, Colla G, Aroca R, 2012. Plant responses to drought stress, *Plant Responses to Drought: From Morphological to Molecular Features* Berlin (Germany): Springer:171-198.
- Saidi MN, Mergby D, Brini F, 2017. Identification and expression analysis of the NAC transcription factor family in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum). *Plant Physiology and Biochemistry*, 112:117-128.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, 2006. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:18822-18827.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR, 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183:92-99.
- Sardans J, Peñuelas J, 2012. The role of plants in the effects of global change on nutrient availability and stoichiometry in the plant-soil system. *Plant Physiology*, 160:1741-1761.

- Schmitt F-J, Renger G, Friedrich T, Kreslavski VD, Zharmukhamedov SK, Los DA, Kuznetsov VV, Allakhverdiev SI, 2014. Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837:835-848.
- Shameer S, Prasad T, 2018. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84:603-615.
- Singh M, Awasthi A, Soni SK, Singh R, Verma RK, Kalra A, 2015. Complementarity among plant growth promoting traits in rhizospheric bacterial communities promotes plant growth. *Scientific reports*, 5:1-8.
- Song Y, Chen L, Zhang L, Yu D, 2010. Overexpression of OsWRKY72 gene interferes in the abscisic acid signal and auxin transport pathway of Arabidopsis. *Journal of Biosciences*, 35:459-471.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth B, Remm M, Rozen S. 2012. Primer3–new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. In.
- Verdonck O, Gabriels R, 1992. Reference method for the determination of physical properties of plant substrates. II. Reference method for the determination of chemical properties of plant substrates. *Acta Horticulturae*, 302:169-179.
- Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A, 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184:13-24.
- Wang H, Wang H, Shao H, Tang X, 2016. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Frontiers in Plant Science*, 7:67.
- Wang W, Qiu X, Yang Y, Kim HS, Jia X, Yu H, Kwak S-S, 2019. Sweetpotato bZIP transcription factor IbABF4 confers tolerance to multiple abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10:630.
- Wang X, Zeng J, Li Y, Rong X, Sun J, Sun T, Li M, Wang L, Feng Y, Chai R, 2015. Expression of TaWRKY44, a wheat WRKY gene, in transgenic tobacco confers multiple abiotic stress tolerances. *Frontiers in Plant Science*, 6:615.
- Wu X, Shiroto Y, Kishitani S, Ito Y, Toriyama K, 2009a. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Reports*, 28:21-30.
- Wu Y, Deng Z, Lai J, Zhang Y, Yang C, Yin B, Zhao Q, Zhang L, Li Y, Yang C, 2009b. Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Research*, 19:1279-1290.
- Xue G-P, Way HM, Richardson T, Drenth J, Joyce PA, McIntyre CL, 2011. Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. *Molecular Plant*, 4:697-712.
- Yao Y, Ni Z, Peng H, Sun F, Xin M, Sunkar R, Zhu J-K, Sun Q, 2010. Non-coding small RNAs responsive to abiotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional & Integrative Genomics*, 10:187-190.
- Zhang C, Li C, Liu J, Lv Y, Yu C, Li H, Zhao T, Liu B, 2017. The OsABF1 transcription factor improves drought tolerance by activating the transcription of COR413-TM1 in rice. *Journal of Experimental Botany*, 68:4695-4707.
- Zipfel C, Oldroyd GE, 2017. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543:328-336.