

**TOLERANSLARI FARKLI İKİ NOHUT TÜRÜNDE  
KURAKLIK STRESİNİN PROTEİN İFADELERİ  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**SERTAN ÇEVİK**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**MERSİN  
TEMMUZ – 2015**

**TOLERANSLARI FARKLI İKİ NOHUT TÜRÜNDE  
KURAKLIK STRESİNİN PROTEİN İFADELERİ  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**SERTAN ÇEVİK**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**Danışman  
Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR**

**MERSİN  
TEMMUZ – 2015**

Sertan ÇEVİK tarafından Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR danışmanlığında hazırlanan “Toleransları Farklı İki Nohut Türünde Kuraklık Stresinin Protein İfadeleri Üzerine Etkisi” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR



Prof. Dr. Yüksel KELEŞ



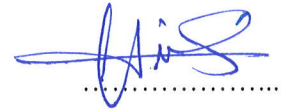
Prof. Dr. Münir TUNCER



Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ



Yrd. Doç. Dr. Gürler AKPINAR



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25./08./2015..tarih ve 2015..21...../..815..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ayla ÇELİK  
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

## TOLERANSLARI FARKLI İKİ NOHUT TÜRÜNDE KURAKLIK STRESİNİN PROTEİN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Sertan ÇEVİK

### ÖZ

Bu çalışmada kuraklığa karşı dirençleri farklı olan kültür nohut *Cicer arietinum* L. ILC482 (kuraklığa hassas) ve yabancı nohut *Cicer reticulatum* AWC611 (kuraklığa dirençli) türlerinde kuraklık stresi sonucu meydana gelen bazı morfolojik ve fizyolojik yanıtlar araştırılmış ve meydana gelen protein ifade farklılıkları belirlenmiştir. Nohut bitkileri 21 gün boyunca bitki yetiştirme kabini içerisinde kontrollü şartlar altında yetiştirilmiş ve süre sonunda 7 gün boyunca su verilmeyerek kuraklık stresine maruz bırakılmışlardır. Yapılan analizler sonucunda kuraklık stresinin her iki türde de sürgün boyunu değiştirmezken, kök boylarını azalttığı bu azalmanın *C. arietinum*'da daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kuraklık stresi her iki türde de yaprak su potansiyellerini ve yaprak oransal su içeriklerini azaltmış, *C. arietinum*'da bu azalışlar çok daha belirgin olmuştur. Bunun yanında prolin miktarının kuraklık stresine her iki türde de yükseldiği ancak *C. reticulatum*'da kuraklık stresi sonucunda meydana gelen prolin miktarındaki artışın *C. arietinum*'a göre 4 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Her iki türde de kuraklık stresi nedeniyle protein profillerinde meydana gelen değişiklikleri belirlemek için izole edilen proteinler iki boyutlu jel elektroforezinde elektroforetik olarak ayrılmış ve ayrımı yapılan proteinlerin kimlik tanımları MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresinde yapılmıştır. *C. arietinum*'da 11 proteinin ifadesi kuraklık stresine birlikte değişmiştir, bu proteinlerden 6 tanesinin ifadesi kuraklık stresine birlikte artarken, 5 tanesinin ifadesi azalmıştır. *C. reticulatum*'da ise 13 proteinin ifadesi kuraklık stresine birlikte değişmiştir, bu proteinlerden 11 tanesinin ifadesi kuraklık stresinde artarken, 2 tanesinin ifadesi azalmıştır. İfadesi değişen proteinler incelendiğinde, bu proteinlerin büyük bir kısmının fotosentez mekanizmasında yer alan proteinler olduğu belirlenmiştir. Her iki türdeki ifade değişiklikleri yorumlandığında, her iki türün de karmaşık stres yanıtında birbirinden farklı yollarla yanıt oluşturdıkları tespit edilmiştir. *C. arietinum*'da daha çok oluşan reaktif oksijen türlerinin yarattığı sinyallerden kaynaklanan bir yanıt oluşurken, *C. reticulatum*'da hücre sel suyun korunması üzerine bir proteom yanıtı oluşturulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Kuraklık, Proteomiks, *C. arietinum*, *C. reticulatum*

**Danışman:** Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR, Mersin Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı.

## THE EFFECTS OF DROUGHT STRESS ON PROTEIN EXPRESSIONS OF TWO CHICKPEA SPECIES WHICH HAVE DIFFERENT TOLERANCE TO DROUGHT

Sertan ÇEVİK

### ABSTRACT

In this study, chickpea species, which have different tolerance to drought stress *Cicer arietinum* ILC482 (drought susceptible) and *Cicer reticulatum* AWC611 (drought tolerant), were exposed to drought stress. And then, morphological, physiological responses and protein expression changes were investigated. Chickpea plants have been grown for 21 days, after that plants have been exposed drought stress for 7 days. As a result, drought stress reduced root length but didn't changed stem length in both species. Leaf water potential and relative water content of leaves were reduced by drought stress in both species, reducing in root length, leaf water potential and relative water content were greater in *C. arietinum* than *C. reticulatum*. Free proline content of leaves were enhanced by drought stress in both species. Proline content of *C. reticulatum* was greater than *C. arietinum* under drought stress. Changes induced in leaf proteins were studied by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF mass analyzer. A total 11 spots showed significant changes under drought stress in *C. arietinum*, the number of up-regulated spots was found to be 6 while 5 spots were down-regulated. On the other hand, a total 13 spots showed regulation under drought stress in *C. reticulatum*, the number of up-regulated spots was found to be 11 while 2 spots were down-regulated. Most of the proteins which were regulated under drought stress in both species were found as member of photosynthesis pathway. Both species developed different defense strategy against drought stress. In *C. arietinum*, signals which generated by reactive oxygen species were used for drought stress response. In *C. reticulatum*, a proteome composition was developed to protect of cellular water content.

**Key words:** Drought, Proteomics, *C. arietinum*, *C. reticulatum*

**Advisor:** Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR, University of Mersin, Faculty of Science and Letters, Department of Biology.

## TEŞEKKÜR

Tüm lisansüstü çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benden hiç esirgemeyen, her zaman destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR (Mersin Üniversitesi, Biyoloji Bölümü)'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarım sırasında görüş ve önerilerini hiç esirgemeyen, bana yol gösteren ve laboratuvarlarını kullanımına açan Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ (Trakya Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü)'ye ve Uzman Biyolog Dilara MAYTALMAN'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarımın proteomik çalışmaları Kocaeli Üniversitesi DEKART Proteom Araştırmaları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir, bu laboratuvarı kullanmama olanak sağlayan, her zaman destek olan Yrd. Doç. Dr. Gürler AKPINAR (Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD / DEKART Proteom Araştırmaları Laboratuvarı)'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince görüş ve önerilerinden yararlandığım tez izleme komitesinde bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Münir TUNCER (Mersin Üniversitesi, Biyoloji Bölümü)'e ve Prof. Dr. Yüksel KELEŞ (Mersin Üniversitesi, Eğitim Fakültesi)'e çok teşekkür ederim. Özellikle protein çalışmalarım sırasında tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Murat KASAP (Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD / DEKART Proteom Araştırmaları Laboratuvarı)'a, bu çalışmalar sırasında bana yardımcı olan Araştırma Görevlisi Kübra KARAOSMANOĞLU (Kocaeli Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü)'na, tüm çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan değerli çalışma arkadaşım Araştırma Görevlisi Aytunç YILDIZLI (Mersin Üniversitesi, Biyoloji Bölümü)'ya çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, desteklerini hiç esirgemeyen sevgili eşim Araştırma Görevlisi Pınar KÜCE ÇEVİK (Mersin Üniversitesi, Biyoloji Bölümü)'e ve çalışmalarım süresince yeterince ilgilenemediğim, oyun süresinden çaldığım güzel oğlum Yiğit Ali ÇEVİK'e sonsuz teşekkür ederim.

Desteklerini her zaman hissettiğim, manevi olarak bana hep güç veren ÇEVİK ve KÜCE ailelerine çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarına maddi destek sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine, ve özellikle de bu birimde çalışan Gökhan KARABIYIK'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Doktoram boyunca beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK-BİDEB'e ayrıca teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>ÖZ</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>5</b>
2.1. NOHUT.....	5
2.2. KURAKLIK.....	6
2.3. PROTEOMİKS.....	9
2.3.1. Protein İzolasyonu.....	10
2.3.2. İzole Edilen Proteinlerin Miktarlarının Belirlenmesi.....	12
2.3.3. İzole Edilen Proteinlerin Ayrılmaları.....	13
2.3.3.1. Sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi.....	13
2.3.3.2. İki boyutlu jel elektroforezi.....	14
2.3.4. Ayrımı Yapılan Protein Lekelerinin Görünür Hale Getirilmesi ve Seçilmesi.....	16
2.3.5. Seçilen Proteinlerin Kütle Spektrometresinde Kütle Parmak İzi ve/veya Aminoasit Dizilerinin Belirlenmesi.....	19
2.3.5.1. Kütle spektrometresi.....	20
<i>İyonizasyon Kaynakları</i> .....	21
<i>Elektrosprey iyonizasyon</i> .....	22
<i>Matriks destekli lazer desorbsiyon iyonizasyon</i> .....	22



<i>Kütle analizörü</i> .....	24
<i>İyon dedektörü</i> .....	25
<b>2.4. LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>27</b>
2.4.1. Yapılan Fizyolojik ve Biyokimyasal Çalışmalar.....	27
2.4.2. Yapılan Proteomiks Çalışmaları.....	29
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>34</b>
3.1. BİTKİ YETİŞTİRME KOŞULLARI ve KURAKLIK UYGULAMASI.....	34
3.2. KÖK VE SÜRGÜN BOYLARININ ÖLÇÜLMESİ.....	34
3.3. YAPRAK SU POTANSİYELİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	34
3.4. YAPRAK ORANSAL SU İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	35
3.5. SERBEST PROLİN MİKTARININ BELİRLENMESİ.....	35
3.6. PROTEİN ANALİZLERİ.....	36
3.6.1. Protein İzolasyonu.....	36
3.6.2. Protein Konsantrasyon Tayini.....	38
3.6.3. İzole Edilen Proteinlerin Elektroforetik Ayırımı.....	38
3.6.3.1. Sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi.....	38
3.6.3.2. İki Boyutlu Jel Elektroforezi.....	39
3.6.3.3. 2D DIGE.....	41
<i>Florasın Cy Boyalarının Hazırlanması</i> .....	42
<i>Proteinlerin Florasın Cy Boyaları İle İşaretlenmesi</i> .....	42
<i>Cy Boyalar ile İşaretlenen Örneklerin IPG Şeritlerine Yüklenmesi</i> .....	42
3.6.4. 2D Jellerinin Görüntülenmesi, Protein Leke Analizi ve Leke Kesimi.....	43
3.6.5. Jel İçi Tripsin Kesimi ve MALDI TOF/TOF MS Analizi.....	43
3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	44

<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>45</b>
4.1 BULGULAR.....	45
4.1.1. Kök ve Sürgün Boylarındaki Değişimler.....	45
4.1.2. Yaprak Su Potansiyelindeki Değişimler.....	45
4.1.3. Yaprak Oransal Su İçeriğindeki Değişimler.....	46
4.1.4. Serbest Prolin Miktarında Meydana Gelen Değişimler .....	46
4.1.5. Protein Analizleri.....	47
4.1.5.1. SDS-PAGE Analizleri.....	47
4.1.5.2. 2D Jel Elektroforezi Analizleri.....	48
4.1.5.3. 2D DIGE Analizleri.....	54
<i>Kuraklık stresinde C. arietinum türünde ifadesi değişen proteinler.....</i>	<i>56</i>
<i>Kuraklık stresinde C. reticulatum türünde ifadesi değişen proteinler.....</i>	<i>60</i>
4.2. TARTIŞMA.....	64
4.2.1. Kuraklık Stresinin Kök ve Sürgün Boylarında Meydana Getirdiği Değişimler.....	64
4.2.2. Kuraklık Stresinin Yaprak Su Potansiyelinde Meydana Getirdiği Değişimler.....	65
4.2.3. Kuraklık Stresinin Yaprak Oransal Su İçeriğinde Meydana Getirdiği Değişimler.....	65
4.2.4. Kuraklık Stresinin Serbest Prolin Miktarında Meydana Getirdiği Değişimler.....	66
4.2.5. Protein Analizleri.....	68
4.2.5.1. Kuraklık stresinin fotosentez mekanizmasının ışık reaksiyonlarında yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri.....	69
4.2.5.2. Kuraklık stresinin fotosentez mekanizmasının Calvin reaksiyonlarında yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri.....	74
4.2.5.3. Kuraklık stresinin biyosentez yolağında yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri.....	78
4.2.5.4. Kuraklık stresinin antioksidan sistemde yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri.....	80

4.2.5.5. Kuraklık stresinin solunum ve enerji metabolizmasında yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri.....	82
4.2.5.6. Kuraklık stresinin diğer proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri..	83
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>86</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>88</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>114</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Dünyada en çok nohut üretimi yapan ilk 10 ülke.....	5
Çizelge 4.1. Kuraklık stresinin kök ve sürgün boyları üzerine etkisi.....	45
Çizelge 4.2. Kuraklık stresinin yaprak su potansiyeli üzerine etkisi.....	46
Çizelge 4.3. Kuraklık stresinin yaprak oransal su içeriği üzerine etkisi.....	46
Çizelge 4.4. Kuraklık stresinin serbest prolin miktarı üzerine etkisi.....	47
Çizelge 4.5. Kütle spektrometresinde analiz edilen <i>C. arietinum</i> 'a ait proteinlerin leke numaraları, adları, buldukları yerler ve ifade durumları.....	58
Çizelge 4.6. Kuraklık stresinde <i>C. arietinum</i> 'da kesilen lekelerdeki proteinlerin kütleleri, skorları, pI değerleri, örtüşen dizi yüzdeleri ve işlevleri.....	59
Çizelge 4.7. Kütle spektrometresinde analiz edilen <i>C. reticulatum</i> 'a ait proteinlerin leke numaraları, adları, buldukları yerler ve ifade durumları.....	62
Çizelge 4.8. Kuraklık stresinde <i>C. reticulatum</i> 'da kesilen lekelerdeki proteinlerin kütleleri, skorları, pI değerleri, örtüşen dizi yüzdeleri ve işlevleri.....	63

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. İki boyutlu jel elektroforez ayırımının şematik görünümü.....	16
Şekil 2.2. DIGE florasan işaretleme yönteminin şematik görünümü .....	18
Şekil 2.3. DIGE yönteminin jel uygulama görüntüsü.....	19
Şekil 2.4. Kütle spektrometresinin şematik görünümü.....	21
Şekil 2.5. Elektrosprey iyonizasyonunun şematik görünümü.....	22
Şekil 2.6. Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonun şematik görünümü.....	23
Şekil 4.1. İzolasyonlar sonrası elde edilen PEG çöktürmesi yapılmış (1-4) ve PEG çöktürmesi yapılmamış (5-8) proteinlerin %12 SDS-PAGE görüntüsü.....	47
Şekil 4.2. <i>C. arietinum</i> kurak grup A) PEG çöktürmesi yapılmış, B) PEG çöktürmesi yapılmamış protein örneklerinin 7 cm (pH 3-10) 2D jel görüntüleri.....	48
Şekil 4.3. <i>C. arietinum</i> A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen proteinlerin 17 cm (pH 3-10) 2D jel görüntüsü.....	49
Şekil 4.4. <i>C. reticulatum</i> A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen proteinlerin 17 cm (pH 3-10) 2D jel görüntüsü.....	49
Şekil 4.5. <i>C. arietinum</i> A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen proteinlerin 11 cm (pH 5-8) 2D jel görüntüsü.....	50
Şekil 4.6. <i>C. reticulatum</i> A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen proteinlerin 11 cm (pH 5-8) 2D jel görüntüsü.....	51
Şekil 4.7. <i>C. arietinum</i> A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen örneklerin 17 cm (pH 5-8) 2D jel görüntüsü.....	52
Şekil 4.8. <i>C. reticulatum</i> A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen örneklerin 17 cm (pH 5-8) 2D jel görüntüsü.....	53
Şekil 4.9. <i>C. arietinum</i> türünden izole edilen proteinlerin A) Kontrol B) Kurak C) Karışım D) Üstüste karşılaştırılmış 2D DIGE jel görüntüleri.....	54
Şekil 4.10. <i>C. reticulatum</i> türünden izole edilen proteinlerin A) Kontrol B) Kurak C) Karışım D) Üstüste karşılaştırılmış 2D DIGE jel görüntüleri.....	55
Şekil 4.11. <i>C. arietinum</i> türüne ait protein lekelerinin sanal jel görüntüleri ve kuraklık stresiyle birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri .....	56
Şekil 4.12. Kuraklık stresinde <i>C. arietinum</i> 'da kesilen lekelerdeki proteinlerin ifade durumlarındaki değişim oranlarının grafikleri.....	57

Şekil 4.13. <i>C. reticulatum</i> türüne ait protein lekelerinin sanal jel görüntüleri ve kuraklık stresiyle birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri.....	60
Şekil 4.14. Kuraklık stresinde <i>C. reticulatum</i> 'da kesilen lekelerdeki proteinlerin ifade durumlarındaki değişim oranlarının grafikleri.....	61
Şekil 4.15. Prolin biyosentez yolağı.....	68
Şekil 4.16. Fotosentez mekanizmasının ışık reaksiyonlarının şematik görünümü.....	70
Şekil 4.17. Calvin döngüsü reaksiyon basamakları.....	75
Şekil 4.18. mRNA'ların 3'-UTR bölgesinde bulunan saplı ilmek yapısı.....	84

## SİMGE ve KISALTMALAR

- ABA: Absisik asit  
CBB: Commasie brillant blue  
BCA: Biçinkonik asit  
CSP41a: Kloroplast saplı-ilmek bağlanma proteini  
DMF: Dimetilformamid  
ESI: Elektrosprey iyonizasyon  
EST: İşaretli ifade edilen diziler  
FBA: Fruktoz bifosfat aldolaz  
FGK: Fosfogliserat kinaz  
FNR: Ferredoksin NADP redüktaz  
GME: GDP mannoz-3,5-epimeraz  
GS: Glutamin sentaz  
IFR: İzoflavonoid redüktaz  
IPG: Sabitlenmiş pH gradienti  
KA: Kuru ağırlık  
LC: Sıvı kromatografisi  
MALDI: Matris destekli lazer desorbsiyon iyonizasyon  
MS: Kütle spektrometresi  
m/z: Kütle/Yük  
OEC: Oksijen oluşturan kompleks  
OEE1: Oksijen oluşumunu arttıran protein 1  
OEE2: Oksijen oluşumunu arttıran protein 2  
OSİ: Oransal su içeriği  
PAGE: Poliakrilamid jel elektroforezi  
pI: İzoelektrik nokta  
PMSF: Fenilmetilsülfonilflorid  
PS2: Fotosistem 2  
ROT: Reaktif oksijen türleri  
SDS: Sodyum dedosil sülfat  
TA: Turgorlu ağırlık  
TOF: Uçuş süresi

YA: Yaş ağırlık

YSP: Yaprak su potansiyeli

2D: İki boyutlu



## 1. GİRİŞ

Baklagiller (*Fabaceae* familyası) gerek tarımsal gerekse ekonomik açıdan oldukça değerli bir bitki grubudur. Beslenme amaçlı olarak kullanılmasının yanında topraktaki serbest azotu özümlemesi bu grubun değerini bir kat daha arttırmaktadır [Pandey ve ark., 2008]. Anavatanının Türkiye'nin güneydoğusu ile Suriye'nin kuzey bölgelerini kapsayan alan olduğu düşünülen [Güneş ve ark., 2008] nohut (*Cicer arietinum* L.), baklagiller arasında önemli bir yere sahiptir [Çevik ve ark., 2014] ve dünyada fasulyeden sonra en çok üretilen ikinci, Türkiye'de ise en çok üretimi yapılan baklagil ürünüdür. Dünyadaki ekim alanları ve üretim miktarları göz önüne alındığında, Türkiye'nin yıllık 506.000 tonluk üretimi ile Hindistan, Avustralya ve Pakistan'ın ardından dünyada en çok üretim yapan dördüncü ülke olduğu görülmektedir [FAO 2013]. Nohutun ürün verme potansiyeli 4.000 kg/hektar oranıyla oldukça yüksektir ancak alınabilen gerçek ürün miktarı bu oranın çok altındadır. Yüksek ürün potansiyeline rağmen, düşük ürün alınmasının nedeni abiyotik ve biyotik streslerdir [Cancı ve Toker, 2009].

Sürdürülebilir üretim tarımsal sistemlerdeki en büyük problemlerden birisidir. Üretim üzerine abiyotik ve biyotik streslerin olumsuz etkileri nedeni ile gelecekte büyüyen dünya nüfusunun yiyecek ihtiyacı karşılanamaz hale gelebilir. Birçok çalışma 2025 yılına kadar tarımsal üretimin %50 oranında arttırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, yılda dünyaya gelen insan sayısının da %50 azalması gerekmektedir. Tüm bu etkenler bir araya getirildiğinde sadece tarımsal üretimi arttırmaya değil, ürün kaybını da en aza indirmeye odaklanılmalıdır [Roy, 2014].

Boyer [1982], çevresel streslerin ürün veriminde %70'e varan kayıplara neden olduğunu vurgulamıştır. Bu bağlamda dünyada nohut üretimi yapılan bölgeler göz önüne alındığında bu bölgelerin yaklaşık olarak %90'nının kurak ya da yarı kurak bölgeler olduğu görülmektedir [Kumar ve Abbo., 2001]. Nohut bu koşullarla başa çıkabilecek mekanizmalar geliştirmiştir [Rao, 2007], fakat yine de bu durum yıllık nohut üretiminde ciddi bir kayba yol açmaktadır. Nohutun beslenme amaçlı olarak

kullanılmasının yanında azot özümlemesinde de görev alması, tarımsal önemini bir kat daha arttırmaktadır [Serraj ve ark., 1999].

Kuraklık stresi birçok tarla bitkisi için tarımsal verimliliği etkileyen en önemli çevresel etkidir. Bitkilerdeki biyokimyasal ve fizyolojik olaylar bu stres nedeni ile önemli derecede hasar görmektedir [Jaiswal ve ark., 2013]. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde turgor basıncında azalma, buna bağlı olarak dokular arasındaki su dengesinin bozulması, hücre boyunda azalma ve büyümenin engellenmesi görülür. Bu etkilerin sonucunda yaprak alanı küçülür, fotosentetik aktivite düşer, sonuç olarak da ürün kalitesinde ve miktarında azalma görülür [Zheng ve ark., 2014]. Ulusal Bilim Kuruluşları küresel ısınma ile birlikte iklim değişikliği nedeniyle önümüzdeki 30 yıl içerisinde özellikle kuraklık stresinin boyutlarının artacağını belirtmektedirler [Roy, 2014]. Bu durum kuraklık stresine karşı mücadelede geliştirilmesi gereken stratejilerin önemini arttırmaktadır. Bitkilerin strese karşı verdikleri yanıtları anlamak, kuraklığa karşı dayanıklılık stratejileri geliştirebilmek adına oldukça kritik ve gereklidir.

Yüzyıllar boyu tarımsal olarak üretilen bitkilerden kuraklığa dayanıklı seçkin bir kültür oluşturabilmek için geleneksel yöntemler kullanılmıştır. Ancak, kuraklık direncinin özgün bileşenlerini klasik seçim teknikleri ile ayırmak oldukça zordur [Jaiswal ve ark., 2013]. Son 10 yılda, kuraklık stresine karşı bitkilerin oluşturdukları fizyolojik ve moleküler tabanlı yanıtlar öncelikli araştırma konuları içerisinde yer almıştır. Yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu bu strese karşı oluşturulan yanıtların gen ifadesi düzeyinde incelendiği çalışmalardır. Bu çalışmalarda stres yanıtını oluşturan genler belirlenebilmiş olsalar da, bu genler genlerin son gen ürünleri ve gerçek dinamikleri olan proteinlerin miktar ve işlevlerini yansıtmazlar [Jaiswal ve ark., 2014].

Bitkiler stres koşullarında yaşamlarını sürdürebilmek için özgün mekanizmalar geliştirmek zorundadırlar. Bu koşullara maruz kalan canlılar için strese karşı direnç ve uyum geliştirmek çok önemlidir. Bu sayede gelişimlerini sürdürebilir, yaşam döngülerini tamamlayabilir ve genetik potansiyellerinin tamamını kullanabilirler [Rejeb ve ark., 2014]. Stresle başa çıkabilmek için bitkilerin geliştirmiş

oldukları iki büyük taktik vardır; bunlardan bir tanesi stresten kaçma, diğeri ise strese tolerans ya da başka bir ifade ile stres koşullarına ayak uydurmadır. Strese tolerans gen ifade düzeyinin hızlı bir şekilde değişmesi yoluyla olur. Bunun sonucu olarak bitkinin transkriptom, proteom ve metabolom bileşenlerinde değişiklikler olur [Kosova ve ark., 2011]. Bitkilerin oluşturduğu stres yanıtını anlayabilmek için birçok transkriptom çalışması yapılmıştır. Ancak yapılan bazı çalışmalar transkript düzeyinde meydana gelen gen ifadesi değişikliklerinin protein seviyesinde meydana gelen değişikliklerle uyumlu olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, bitki proteomunda meydana gelen değişikliklerin araştırılması çok önemlidir. Çünkü proteinler transkriptlerden farklı olarak bitki stres yanıtında doğrudan rol alırlar [Gao ve ark., 2011]. Proteinler sadece metabolit seviyesindeki değişiklikleri katalizleyen enzimlerden oluşmazlar. Proteinlerin ayrıca doğrudan strese uyum işlevleri de vardır. Bu işlevleri hücre zarını, hücre sitozolünü, hücre iskeletini ve hücre sitozolünün suya olan ilgisini değiştirerek yapabilirler.

Stres koşulları altında protein birikimindeki değişiklikler strese karşı oluşturulan bitki fenotipik yanıtı ile yakın ilişkilidir. Bu nedenle, stres koşulları altında protein seviyelerindeki değişimi gösteren çalışmalar bitki stres dayanıklılık mekanizmasının anlaşılmasına önemli katkılarda bulunabilir. Proteomik çalışmaları ile potansiyel protein belirteçleri tespit edilebilir. Bu belirteçlerin miktarlarındaki değişiklikler, genotiplerin stres direncinin seviyesini tanımlayabilmek için kullanılabilir.

Bitki stres yanıtı oldukça dinamik bir işlemdir ve bu yanıt stresin yoğunluğu ve süresine bağlı olarak değişir. Stres yanıtının bölümleri farklılık gösterebilir; başlangıç evresinde stres, bu duruma alışmamış olan bitkilerde şoka neden olur ve bitkinin strese direnç düzeyi düşer. Alışma evresinde (bu bir kaç gün sürer) stres altındaki bitki metabolizmasında yeni bir iç denge kurulur. Bu aşamada bitkinin strese karşı direnci artar. Koruma evresinde, stres koşulları altında yeni bir iç denge kurulur ve bu aşamada bitkinin strese karşı direnci sabit kalır. Tükenme fazında, eğer stres çok uzun süre devam ederse stres ile uyarılmış iç denge sürdürülür ve sonuçta bitkinin strese karşı direnci düşer. Stres uygulamasının kesilmesinden sonra yenilenme evresi

başlar. Bu evrede hücrenin iç dengesi stressiz koşullara göre yeniden kurulur. Bitki stres yanıtının her aşaması kendini eşsiz bir proteom bileşimi ile karakterize eder.

Bitkilerde abiyotik stres araştırmalarının büyük bir kısmının ortak noktası stres altında ve stressiz koşullarda yetiştirilen bitkilerden izole edilen proteomların karşılaştırılmasıdır. Diğer bir yaygın durum ise, iki farklı genotip ya da bitki türünden elde edilen proteom bileşimlerin verilen stres etkeni altında karşılaştırılmalarıdır. Çalışmalarda, genellikle iki boyutlu jel elektroforezi ayırımını kütle spektrometresi ile yapılan protein kimlik tanısı izler. Bunun yanında kütle spektrometresi sadece protein kimlik tanısı için değil, aynı zamanda proteinlerin miktar tayinleri için de kullanılmaktadır [Kosova ve ark., 2011]. Bu yöntemler sayesinde stres koşullarında meydana gelen proteom bileşimlerinin değişimleri karakterize edilmektedir. Bunun sonucunda da karmaşık stres yanıtının anlaşılabilmesi için mühendislik stratejileri geliştirilebilir.

Kuraklık dünya genelinde, özellikle yarı kurak alanlarda bitki gelişimini ve ürün verimini kısıtlayan en önemli abiyotik strestir [Boyer, 1982]. Nohut, genel olarak yarı kurak ve kurak alanlarda yetiştirilen bir bitkidir. Bu nedenle, kuraklık stresinin nohut bitkisi üzerine olan etkilerinin her yönüyle çalışılması, stres etkilerinin anlaşılması ve ürün veriminin artırılması ya da korunması için çok önemlidir. Çalışmamızdaki hipotezimiz kültür nohut (*Cicer arietinum* L.) ve yabani nohut (*Cicer reticulatum* Ladiz.) bitkilerinde kuraklık stresinin etkisiyle dayanıklılıkla ilgili olabilecek protein profillerinin değişebileceği ve bunun sonucunda da hücre su durumları ve büyüme seviyesinin de etkilenebileceğidir. Bu nedenle kuraklığa maruz bırakılan iki farklı nohut türünde protein kimlik tanıları yapılmış ve hücre su durumu, büyüme hızı ve prolin içerikleri belirlenmiştir. Karşılaştırmalı proteomik stratejisi sayesinde kuraklığa dayanıklı olduğu bilinen yabani nohut bitkisinde meydana gelen protein ifade değişikliği ile kültür nohut türünde meydana gelen protein ifade değişikliklerinin karşılaştırılmasıyla, karmaşık kuraklık stres yanıtının protein bileşenleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. NOHUT

*Cicer* (Nohut) cinsi toplamda 43 türden oluşmaktadır, bunlardan 42 yabancı tür iken, yalnızca bir tanesi kültür türüdür [Ladizinsky ve Adler 1976]. Yapılan çalışmalar yabancı *Cicer reticulatum* Ladiz. türünün kültür *Cicer arietinum* L. türünün atası olduğunu göstermektedir [Sharma ve ark., 2005]. *C. reticulatum* Ladiz. türünün birçok abiyotik ve biyotik stres etmenine karşı dayanıklı olduğu bilinmektedir [Singh ve ark., 2008].

Nohut (*Cicer arietinum*, L.) dünyada fasulyeden sonra en çok yetiştirilen ikinci baklagil ürünüdür. Türkiye dünyadaki önemli nohut üreticisi ülkelerden birisidir ve FAO'nun 2013 yılındaki verilerine göre 506.000 ton olan yıllık üretimi ile Hindistan, Avustralya ve Pakistan'ın ardından bu kategoride dördüncü en büyük nohut üreticisi ülke konumundadır (Çizelge 2.1.). Beslenme amaçlı olarak yüksek üretim oranının yanında nohutun köklerinin *Rhizobium spp.* ile bulaşması sonucu toprağa yılda ortalama 60 kg/hektarlık azot katkısı yapması tarımsal önemini bir kat daha arttırmaktadır [Unkovich ve Pate, 2000].

Çizelge 2.1. Dünyada en çok nohut üretimi yapan ilk 10 ülke [FAO, 2013].

	Ülke	Üretim (ton)
1	Hindistan	8.832.500
2	Avustralya	813.300
3	Pakistan	751.000
4	<b>Türkiye</b>	<b>506.000</b>
5	Miyanmar	490.000
6	İran	295.000
7	Etiyopya	249.465
8	Meksika	209.941
9	Kanada	169.400
10	Amerika Birleşik Devletleri	157.351

Nohut tohumları %25,3-28,9 oranları arasında değişen, oldukça yüksek bir protein içeriğine sahiptir [Eyidoğan ve Öz, 2007]. Yüksek ve kaliteli protein içeriği nohutu, özellikle hayvansal protein kaynağı bulmakta sıkıntı çeken bölgeler için gelecekte alternatif bir protein kaynağı yapmaktadır. TÜBİTAK'ın 2014 yılında yayınlamış olduğu 1511-Öncelikli Alanlar Araştırma Teknoloji Geliştirme ve Yenilik Projeleri Destekleme Programı kapsamında nohut bitkisi ile ilgili yapılacak olan çalışmalar öncelikli çalışma alanları içerisinde kendine yer bulmuştur. Bu duyuru kapsamında özellikle biyotik ve abiyotik streslere dayanıklı bitki hatlarının geliştirilmesi konusunda yapılacak olan moleküler çalışmaların destekleneceği duyurulmuştur.

## 2.2. KURAKLIK

Bitkiler yaşamları boyunca çeşitli çevresel streslere maruz kalırlar. Bu stresler hastalık etmenleri (patojenler), böcekler, mikroorganizmalar ve hayvanlar gibi biyotik, kuraklık, tuzluluk, yüksek ya da düşük sıcaklık, radyasyon, mineral besin sıkıntısı, ışık stresi, su baskını, rüzgâr, hava kirliliği, tarımsal ilaçlar, toksinler ve toprak pH'sı gibi abiyotik stres etmenlerinden oluşmaktadırlar [Smirnoff, 1998]. Abiyotik stres olan kuraklık en yaygın çevresel strestir. Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres etkenlerine göre sınıflandırıldığında kuraklık stresi %26'lık payıyla en büyük dilimi oluşturmaktadır [Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2008]. Kuraklık uzun süreli yağışsız dönem olarak tanımlanan meteorolojik bir ifadedir ve terleme ile kaybedilen suyun topraktan alınan sudan daha fazla olduğu durumlarda bitkiler için bir stres etkenine dönüşür [Jones, 1992]. Kuraklığın şiddeti öngörülebilir bir durum değildir. Bu; yağmura, yağmurun yağma sıklığına, topraktan suyun buharlaşma hızına ve toprağın su tutma kapasitesine bağlıdır [Wery ve ark., 1994; Farooq ve ark., 2009]. Kullanılabilir su kaynaklarındaki azalma devam ettiği sürece bir zaman sonra kuraklık dünya besin güvenliğini tehdit eden en ciddi etken haline gelecektir. Geçmiş yıllarda kuraklığın çok büyük kıtlıkların nedeni olduğu bilinmektedir [Farooq ve ark., 2009]. Küresel veriler incelendiğinde 1900-2004 yılları arasında kuraklığın yaklaşık olarak 1,9 milyar insanı dolaylı ya da doğrudan etkilediği ve 80,4 milyar dolarlık ekonomik kayıba neden olduğu belirtilmiştir [Sheffield ve Wood, 2011].

Dünyada nohut üretimi yapılan bölgeler göz önüne alındığında, bu bölgelerin yaklaşık olarak %90'nının kurak ya da yarı kurak bölgeler olduğu görülmektedir. [Kumar ve Abbo, 2001]. Nohut bu koşullarla başa çıkabilecek mekanizmalar geliştirmiştir, fakat yine de bu durum yıllık nohut üretiminde ciddi bir kayba yol açmaktadır [Rao 2007]. Ryan [1997] yayınladığı raporda, kuraklık stresinden dolayı nohutun yılda yaklaşık olarak 3,3 milyon tonluk bir kayba uğradığını ortaya koymuştur. Bu miktar dünyada abiyotik ve biyotik streslerden kaynaklanan toplam nohut kaybının yaklaşık olarak üçte birini ifade etmektedir. Ayrıca, kuraklık stresinin nohutun azotu toprağa bağlama miktarını ortalama 60 kg/hektar'dan ortalama 19-24 kg/hektar'a kadar düşürdüğü belirlenmiştir [Ghanem ve ark., 2012]. Bu nedenle, kuraklık stresinin kendine özgü bileşenlerinin çalışılıp aydınlatılması nohutun tarımsal ve ekonomik değerinin korunması ve arttırılması için çok önemlidir.

Kuraklık dünyada tarımsal üretimi kısıtlayan en önemli etkidir ve bu durumun iklim değişikliği nedeniyle daha da kötüye gideceği öngörülmektedir [Reddy ve ark., 2004]. Disiplinler arası çalışan bilim insanları, bitkilerin kuraklık stresine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmalarını anlamaya çalışmaktadırlar, fakat çok ciddi bir başarı elde edebilmiş değillerdir [Farooq ve ark., 2009; Marwal ve ark., 2014]. Kuraklık stresinin bitki gelişimi üzerine olan etkileri iyi bilinmektedir. Ancak bu stresin temel biyokimyasal ve moleküler seviyedeki etkileri henüz tam olarak anlaşılammıştır ve bunun anlaşılabilmesi çok önemlidir [Lisar ve ark., 2012].

Kuraklık stresi çok yönlü olarak araştırılan bir konudur. Bitki bu stres ile yüzleştğinde stomalar kapanır [Arve ve ark. 2011], bunun sonucu olarak fotosentez sınırlanır [Tezara ve ark. 1999]. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) miktarı artar [Carvalho, 2008]. Bu da antioksidan enzimleri ve askorbat ve glutatyon gibi antioksidanların seviyelerinin artmasına yol açar [Reddy ve ark., 2004; Çevik ve Ünyayar, 2015]. Hücre su potansiyeli ve turgoru düşer ve bu durum sitosol ve hücrelerarası matriksteki çözünmüş maddelerin oranını arttırır [Çevik ve ark., 2014]. Hücre genişlemesi azalır, gelişme yavaşlar ve sonuç olarak da verimlilik azalır [Lisar ve ark., 2012]. Kuraklık stresinin bu etkileri iyi bir şekilde çalışılmıştır.

Tüm bu fizyolojik ve biyokimyasal stres yanıtlarının araştırılmasının yanında kuraklık stres yanıtının genetik temelini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan araştırmalar, bitkilerdeki kuraklık dayanıklılık mekanizmasına moleküler seviyede önemli bilgiler kazandırmıştır. Kuraklık dayanıklılık mekanizmalarının aydınlatılmasında kullanılan geleneksel yetiştirme yöntemleri ile modern genetik uygulamalarının birlikte kullanılmasıyla stres direncinin anlaşılmasına yönelik moleküler çalışmalar yapılmıştır. Ancak tüm bu çalışmalara rağmen, bu karmaşık dayanıklılık yanıtı daha anlaşılma çalışılmaktadır [Farooq ve ark., 2009]. Bu çalışma alanlarından birisi de moleküler belirteçler teknolojisidir. Bu yöntemle tarımsal olarak önemli olan genlerin seçilmesi ve klonlanması mümkün hale gelmiştir ve bu konuda nohutla ilgili yapılmış çok sayıda çalışma vardır [Udupa ve ark., 1999; Sudupak ve ark., 2002; Nguyen ve ark., 2004; Choudhardy ve ark., 2012; Çevik ve ark., 2015]. Yapılan çalışmalar, nohutun sınırlı bir genetik temele sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum moleküler belirteç teknolojisi kullanılarak biyotik ve abiyotik streslere karşı dayanıklı seçkin bir nohut kültürünün elde edilmesini çok zorlaştırmaktadır [Mantri ve ark. 2007].

Bitkilerde yapılan moleküler çalışma alanlarından biri olan gen ifade çalışmaları bitki transkriptomu adı verilen yeni bir olguyu ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmalar kapsamında transkript seviyesi ve çeşitleri ile translasyon durumu karakterize edilmektedir. Bu teknik sayesinde bitkilerin farklı çevresel koşullar altında verdikleri translasyon yanıtı izlenebilir. Bu, hücre özütlerinden elde edilen mRNA seviyelerinin karşılaştırılmasıyla belirlenebilmektedir [Zomeno ve ark., 2014]. Bu tekniğin kullanıldığı ve kuraklık ile ilişkili olabilecek genlerin belirlendiği birçok çalışma vardır [Seki ve ark. 2002; Kreps ve ark., 2002; Mahalingam ve ark., 2003; Rabbani ve ark., 2003; Zhou ve ark., 2007]. Ancak bu çalışmalara paralel olarak bitki proteomunda meydana gelen değişikliklerin araştırılması çok önemlidir. Çünkü proteinler transkriptlerden farklı olarak bitki stres yanıtında doğrudan rol alırlar [Gao ve ark., 2011]. Bitkiler tarafından çevresel streslere karşı geliştirilen moleküler ve hücresel seviyelerdeki stratejilerin büyük bir çoğunluğunu protein düzeyindeki oldukça önemli değişimler oluşturmaktadır [Jedmowski ve ark., 2014]. Ancak, bir organizmada bulunan proteinlerin yapısı, işlevi, miktarı ve çeşidi yalnızca DNA



dizisine bakılarak anlaşılır [Salekdeh ve ark., 2002]. Çünkü mRNA'ların farklı kararlılıkları, translasyondaki etkinlik farklılıkları ve translasyon sonrası gerçekleşen değişiklikler yeni protein oluşumunu etkileyebilir. Oluşan proteinlerin dönüşüm oranları ve kararlılıkları onların işlevlerine ve buldukları yerlere göre değişir. Bunlardan dolayı, yapılan çalışmalar transkript seviyeleri ile protein değişimleri arasındaki bağlantının genellikle çok zayıf olduğunu göstermiştir [Zivy ve Vienne, 2000; Gao ve ark., 2011; Zomeno ve ark., 2014]. Bu nedenle, eğer çevresel bir strese karşı verilen protein yanıtları araştırılmak isteniyorsa, transkript seviyesinin ölçülmesinin yanında, hücrelerdeki işlevsel birimler olan proteinlerin doğrudan çalışılması protein seviyelerindeki gerçek değişimleri ortaya çıkaracaktır [Zivy ve Vienne, 2000; Gao ve ark., 2011].

## 2.3 PROTEOMİK

Marc Wilkins bir organizmanın genomu tarafından kodlanan proteinlerin tamamını **proteom**, proteomun tüm bileşenlerini ya da belirli bir kısmını yapısal ve işlevsel olarak çalışan bilim dalını ise **proteomik** olarak tanımlamıştır [Salekdeh ve ark., 2002]. Proteom ve proteomik kavramları, geniş ölçekli genomik ve cDNA dizileme projelerinin sonucunda ortaya çıkan gen dizilerinin düzenlenmesi ve işlevleri ile ilgili durumu açıklayabilmek için ortaya çıkmıştır [Zivy ve Vienne, 2000]. Son yıllarda, proteomik terimi organel, doku ya da özgün bir stres faktörüne karşı yanıtı tanımlamak için de kullanılmaktadır [Salekdeh ve ark., 2002]. Proteomik analizler stresin algılanması, uyumu ve hücre savunması sırasında protein birikim modellerinin sınıflandırılmasına olanak sağlar. Elde edilen proteinlerin seviyesi post-transkripsiyonel ve post-translasyonel işlevlerin birleşmesini sağlar ki bu son hücre ürünlerinin etkinliğini, yerleşimini ve miktarını ayarlar. Bu bilgi de uygun genin belirlenmesi için kullanılabilir. Bu nedenle, çevresel streslere yanıtın verildiği metabolik yoldaki aday proteinlerin belirlenmesi, gen ifade desenlerinin çıkartılması ve işlevlerinin anlaşılması, stres direncine karşı etkili bir mühendislik stratejisinin geliştirilmesi için bir temel oluşturacaktır [Jaiswal ve ark. 2014].

Proteomik çalışmalarında çalışma-akış şeması genellikle şu şekildedir;

- Protein izolasyonu,
- İzole edilen proteinlerin elektroforetik ayrımı,
- Ayrımı yapılan protein lekelerinin görünür hale getirilmesi ve seçilmesi,
- Seçilen proteinlerin kütle spektrometresinde kütle parmak izi ve/veya aminoasit dizilerinin belirlenmesi ve biyoinformatik analizler.

### 2.3.1. Protein İzolasyonu

Proteomik alanında yapılan çalışmaların başarısı etkili bir izolasyon yöntemine bağlıdır. İdeal bir izolasyon yöntemi; tekrar edilebilir, protein parçalanmasının ve protein olmayan yapıların bulaşmasının en aza indirildiği bir yöntem olmalıdır [Rabilloud ve Lelong, 2011]. İzolasyon aşamasının ilk basamağını protein kaynaklarının parçalanması oluşturmaktadır. Bitki dokularının parçalanması için kimyasal ve fizyolojik birçok yol vardır, ancak sıvı azot içerisinde bitki dokularının parçalanması yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem proteolitik parçalanmayı ve doku parçalanması sırasında oluşabilecek protein değişikliklerini en aza indirir [Xu ve ark., 2014]. Parçalanmış dokularda bulunan proteinler lizis tamponunda özütlenirler. Kullanılacak olan lizis tamponu; tüm proteinleri tek bir yapıya dönüştürmeli, protein oksidasyonu ve çöküntüsünü önlemeli, hidrofobik proteinleri solüsyonda tutmalı, proteazları etkisizleştirmeli ve disülfid ve hidrojen bağlarını kırmalıdır [Lopez, 2007].

Parçalanma sonucu ortaya çıkan hücre ya da doku özütleri genellikle proteinlerle etkileşim halinde olan maddeler içerir ve bu maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Çünkü bu maddeler özellikle izolasyon sonrası aşama olan kromatografik ayırmada proteinlerin ayrılmalarını sınırlamaktadır. Bu problem özellikle bitki dokuları için çok daha fazla söz konusudur. Çünkü bitki dokularında protein olmayan hücresel bileşenlerin sayısı oldukça fazladır. Bitki dokularında bol miktarda fenolik bileşikler, terpenler, pigmentler, organik asitler, lipitler, proteolitik ve oksidatif enzimler, iyonlar, nükleik asitler ve polisakkaritler bulunur. [Xu ve ark., 2014]. Bitkilerde özellikle 8.000 çeşit fenolik bileşik vardır ve bunlar genellikle vakuol

içerisinde çözünür şekilde bulunurlar ve hücre içerisinde yüksek hacimlerde yer alırlar. Bu ikincil metabolitlerin varlığı, türe, dokuya, yaşa ve gelişim evresine göre değişkenlik göstermektedir [Stalikas, 2007]. Fenolik bileşikler, peptid bağlarının oksijen atomlarıyla ya da -SH ve -NH<sub>2</sub> gruplarıyla güçlü hidrojen bağı oluşturarak proteinlerle geri dönüşümsüz bileşikler oluştururlar. Doku özütünün çıkartılması sırasında suda çözünür PVP veya PVPP, DTT ya da 2-merkaptoetanol, sodyum askorbat ve tiyoüre kullanılarak, fenolik bileşiklerin oksidasyonu önlenebilir [Xu ve ark., 2014]. Fenolik bileşiklerin dışında özütlerde bulunan lipitler proteinlere hidrofobik etkileşimle bağlanarak yük ve ağırlıklarını değiştirirler. Polisakkaritler jel porları üzerine set oluştururlar. Nükleik asitler ise elektrostatik etkileşimler ile proteinlere bağlanarak jel üzerinde yürümelerini önlerler. Yüksek molekül ağırlıklı nükleik asitler ayrıca akrilamid matriksini doldurabilirler [Rabilloud ve ark., 1994]. Bu nedenle izolasyon sırasında bu moleküllerin tümünün uzaklaştırılması çok önemlidir. Nükleik asitleri uzaklaştırmak için DNaz ya da RNazlar kullanılabilir, ancak en etkili yol proteinlerin çökeltmesidir (presipitasyon). Çökeltme sonucu lipitler de uzaklaştırılmış olur. Çökeltme işlemi proteinlerin çözündürülmesi izler ve bu sayede tuz, deterjan gibi diğer kirleticiler de ortamdan uzaklaştırılmış olur. Örneklerde çok fazla tuz olması izoelektrik odaklamayı bozar ve bozuk protein profillerinin ortaya çıkmasına neden olur. Örnek hazırlama sırasında proteinlerde yaşanabilecek kimyasal değişikliklere yer vermemek için özel çaba gösterilmelidir. Bu durum, proteinlerin yüklerini değiştirerek tek proteinin birden çok protein lekesinde görülmesine neden olabilir [Lopez, 2007].

Ayrıca, parçalanmış dokulardan elde edilen proteinlerin tamamının uygun bir tamponda çözülmesi gerekmektedir. Uygun olmayan çözündürme protein kaybına neden olur ki, bu deneyin başarısını doğrudan etkileyen bir aşamadır. İzole edilen proteinlerin yükleri çözündürüldüğü tamponda bulunan denatüre edici deterjan ile değişikliğe uğramamalıdır. Bu nedenle sodyum dodesil sülfat (SDS) burada kullanılamaz. Bunun yerine, üre ve son zamanlarda üre ve tiyoüre birlikte kullanılmaktadır [Lopez, 2007]. Özellikle iki boyutlu jel elektroforezinin ilk basamağındaki olası geniş pH ayırımı aralığında bu maddeler tek başlarına proteinleri çözünür durumda tutamazlar. Bu yüzden elektriksel nötr bir deterjanın tampona

eklenmesi gerekmektedir. Bunun için de genellikle NP-40, CHAPS ya da Triton X-100 tercih edilmektedir [Rabilloud ve Lelong, 2011]. Bu maddelerin yanında yükseltgenmeyi (oksidasyonu) önlemek için indirgeyici ajanlar (DTT- 2ME), taşıyıcı amfolitler ve örnek tipine bağlı olarak proteaz inhibitörlerinden oluşan karışımlar kullanılmaktadır [Lopez, 2007; Xu ve ark., 2014]. Ayrıca proteomik analizlerde lizis tamponlarında kullanılan bazı ajanlar çalışmaların sonraki basamaklarındaki diğer kimyasallarla istenmeyen reaksiyonlara girebilir. Örneğin fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) doku parçalanması sırasında protein parçalanmasını önlemek için sıklıkla kullanılan bir proteaz inhibitörüdür. Ancak protein örneklerinde PMSF kalıntısı kalırsa bu proteom analizlerinin bir basamağı olan triptik parçalanmayı engelleyebilir. Bunun dışında kullanılan bazı deterjanlar da hem bazı analitik protein ayırımlarında hem de proteolitik parçalamalarda işlemleri etkileyebilir.

### 2.3.2. İzole Edilen Proteinlerin Miktarlarının Belirlenmesi

Proteomik araştırma projelerinin büyük bir çoğunluğu, bir durum ya da fizyolojik uygulamaya yanıt olarak proteinlerin ifadelerinde meydana gelen farklılıkları araştırmaktadır [Thelen, 2007]. Dolayısıyla, protein ifadelerinde meydana gelen değişikliklerin doğru bir şekilde yorumlanabilmesi, her grup için elde edilen proteinlerin her analizde eşit miktarlarda kullanılmasıyla sağlanabilir. İzole edilen protein miktarının belirlendiği birçok yöntem geliştirilmiştir. Lowry yöntemi [Hartree, 1972], Bradford yöntemi [Bradford, 1976], BCA yöntemi [Smith ve ark., 1985] ve Nano-drop [Thermo scientific, 2010] bu yöntemler içerisinde en çok kullanılan yöntemlerdir. Her yöntemin protein miktarlarını belirleme mekanizmaları ve hassasiyetleri birbirinden farklıdır. Genellikle her çalışmada bu yöntemlerin biri ya da bir kaç birliktedir kullanılmaktadır. Ayrıca lizis tamponunda ve çözündürme tamponunda bulunan bazı kimyasallar (üre, deterjanlar, amfolitler, DTT gibi) spektrometrik okumayı etkileyebilir. Bu nedenle hangi yöntemle olursa olsun protein miktarı belirlenirken örnekler seyreltilmelidir.

### 2.3.3. İzole Edilen Proteinlerin Ayrılmaları

Bir hücre ya da dokunun herhangi bir andaki proteinleri çok karmaşık bir yapıya sahiptir. Kullanılan hiçbir teknik tek basamakta bir protein tanımlama analizi yapamaz [Carpentier ve ark., 2008]. Proteomik çalışmalarında bu karmaşık proteinlerin öncelikle ayrıştırılması gerekmektedir. İzole edilen karmaşık protein ya da peptid karışımlarını ayırmada kullanılan üç tane yöntem vardır. Bunlar sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), iki boyutlu (2D) jel elektroforezi ve sıvı kromatografisidir (LC). SDS-PAGE ve 2D jel tabanlı bir ayırım iken, LC jelden bağımsız bir ayırımdır. Jel tabanlı ayırımlarda proteinler jel üzerinde ayrıldıktan sonra çeşitli boyama teknikleri ile boyanırken, LC genellikle kütle spektrometreleriyle birlikte kullanılarak, MS öncesi bir ayırım görevi görmektedirler [Hunter ve ark., 2002]. Jel-bağımsız proteomik uygulamaların büyük bir çoğunluğunda proteinler bir proteolitik enzim yardımıyla kesilir, elde edilen peptid karışımı ters faz kromatografisiyle ayrılır ve sıralı MS ile analiz edilir [Carpentier ve ark., 2008]. Üç tekniğin de kendi içerisinde yapılacak analize uygun olarak çeşitli yöntemleri vardır [Hunter ve ark., 2002].

#### 2.3.3.1. Sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

Laemmli tarafından 1970 yılında tanıtılmış bu teknik protein çalışmalarında en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde negatif yüklü bir deterjan olan sodyum dedosil sülfat (SDS) kullanılır. SDS proteinlerle bileşik oluşturur, her 1 gram proteine 1,4 gram SDS bağlanır. Sonuç olarak, SDS bağlanan proteinlerin tamamı negatif yüklü olurlar ve moleküler ağırlıklarına göre jelde ayrılırlar. Moleküler ağırlığı küçük olan, moleküler ağırlığı daha büyük olana göre daha hızlı ilerleyerek jel üzerinde leke oluşturular ve çeşitli boyama yöntemleriyle boyanarak belirlenirler. [Lopez, 2007]. Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayıran bu tekniğin kolay uygulanabilir olması, tekrar edilebilirliğinin iyi olması, sarf maddeleri ve araç gereçlerinin uygun fiyatlı olması kullanılmasını yaygınlaştırmıştır. Ancak bu tekniğin ayırım gücü biraz sınırlıdır. SDS-PAGE ile ayırımı yapılan proteinlerin MS'e verilerek tanımlanmalarında sıkıntılar yaşanmaktadır. Çünkü tek basamakta yapılan bu ayırım

sonucu ortaya çıkan proteinler oldukça fazla sayıda olabilir. Bu da proteinlerin tanımlanmalarını zorlaştırır [Phinney ve Thelen, 2005]. Ancak, tek bir SDS-PAGE lekesinde 10'dan daha az sayıda protein varsa o zaman bu ayırım proteinlerin MS'te tanımlanmalarına engel olmayabilir. Ayrıca SDS-PAGE protein lekeleri tek proteinden oluşmaz. Dolayısıyla jeller karşılaştırılırken proteinler arasındaki karşılaştırma bu lekelerle bakılarak yapılmaz. SDS-PAGE daha çok MS öncesinde ön ayırım işlemi olarak kullanılmaktadır [Thelen, 2007].

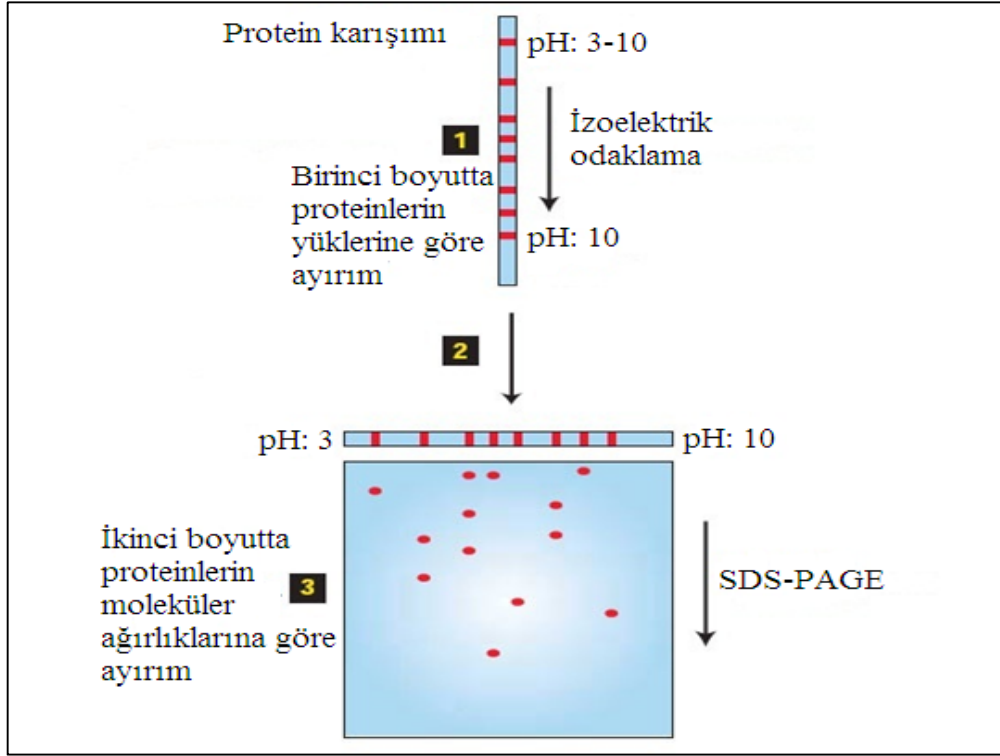
### 2.3.3.2. İki boyutlu jel elektroforezi

O'Farrel tarafından 1975 yılında geliştirilen bu yöntem, izole edilen proteinleri ayırmada, kalitatif ve kantitatif analizlerinde kullanılan en güçlü yöntemlerden bir tanesidir. İki boyutlu jel elektroforezi yönteminde, iki boyutta ayırım yapılır, birinci boyutta proteinler izoelektrik noktalarına (pI) göre ikinci boyutta ise moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar (SDS-PAGE) [Rabilloud ve Lelong, 2011] (Şekil 2.1.). Standart SDS-PAGE yönteminde yığınlama jeli vardır ancak 2D'nin ikinci boyutunda buna gerek yoktur. Çünkü proteinler zaten izoelektrik noktalarına göre ayrılmış ve burada göç bir sıvı fazdan değil, bir jelden bir diğerine olmaktadır [Lopez, 2007].

İki boyutta ayırım sayesinde protein karışımları etkili bir biçimde birbirlerinden ayrılmaktadır. İki boyutlu ayırımın ilk basamağı olan izoelektrik odaklamada proteinler bir pH gradientinde izoelektrik noktalarına göre ayrılırlar. Ayırımın yapılacağı jel üzerinde amfolitler yardımıyla bir pH gradienti oluşturulur. Bu düzenekte elektroforez sistemine asidik ve bazik amfolitler eklenir. Sisteme akım verildiğinde amfolitler izoelektrik noktalarına göre jelde düzenlenirler. Asidik olanlar anoda bazik olanlar ise katoda doğru düzenlenirler. Burada en asidik ve en bazik olanlar en hızlı şekilde göç ederler. Sonuç olarak anot ile katot arasında bir pH farkı oluşur. Proteinler bu jelle uygulandıklarında net yüklerine göre anot ya da katoda doğru ilerlerler ve net yüklerinin sıfır olduğu pH noktasında durduklarında birbirlerinden ayrılmış olurlar [Righetti ve Bossi, 1997]. Proteinler amfoterik moleküllerdir ve asidik ve bazik gruplar içerirler. Bu gruplar pH ortamına bağlı olarak proton alır ya da

kaybeder. Bazik ortamda asidik gruplar negatif olarak yüklenirken, asidik ortamda bazik gruplar pozitif olarak yüklenir. Bir proteinin net yükü aminoasit yan zincirlerinin pozitif ya da negatif tüm yüklerinin toplamıdır. Elektriksel bir alanda proteinler net yüklerinin tersi olan elektroda doğru göç ederler. pI noktasında proteinlerin net yükü yoktur ve göç etmeyi bırakırlar [Lopez, 2007].

Bununla birlikte yöntem ilk geliştirildiğinde ayırım gücü çok iyi olmasına rağmen, yöntemin hemen hemen her aşamasında yaşanabilen tekrarlanabilirlikteki sıkıntılar en önemli engeli oluşturmuştur. Özellikle ayırımın ilk aşamasında kullanılan taşıyıcı amfolitlerle yapılan ayırımlarda tekrarlanabilirlik çok düşüktü. 2D jel elektroforezi sürekli olarak geliştirilen bir teknik olmuştur. Bu gelişmelerden belki de en önemlisi Bjellqvist ve ark. [1982] ve Görg ve ark. [1988] tarafından sabitlenmiş pH gradient (IPG) jellerinin tanıtılması olmuştur [Salekdeh ve ark., 2002]. Bu jellerdeki pH gradienti taşıyıcı amfolitler yerine akrilamid monomerlerinin karboksilik ve amino gruplar içeren akrilamid türevleriyle birlikte polimerize edilmesiyle sağlanır. Bu sayede pH gradienti sürüklenemez [Lopez, 2007]. IPG jelleri sayesinde 2D'deki ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve örnek yükleme kapasitesi artmıştır [Salekdeh ve ark., 2002]. Bu gelişmeler 2D elektroforezi karmaşık proteinleri ayırmada en güçlü yöntem haline getirmiştir. Bu elektroforez yönteminde teorik olarak 10.000'e kadar protein lekesi belirlenebilirken, rutin olarak yapılan çalışmalarda bu sayı 2.000 civarındadır. [Lopez, 2007].



Şekil 2.1. İki boyutlu jel elektroforez ayırımının şematik görünümü [<http://biosiva.50webs.org/proiso.htm>].

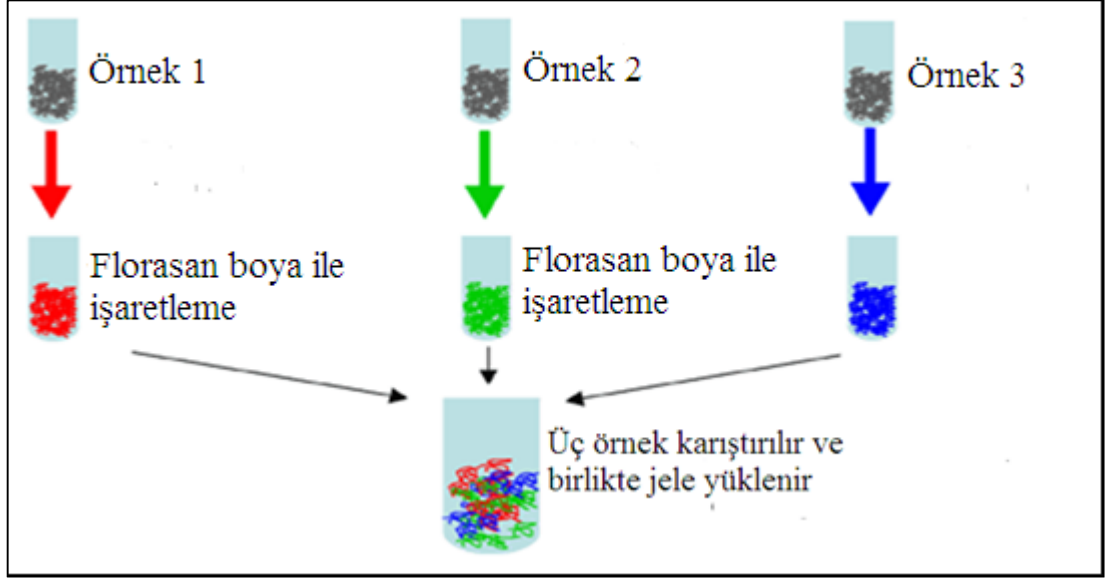
#### 2.3.4. Ayırımı Yapılan Protein Lekelerinin Görünür Hale Getirilmesi ve Seçilmesi

Ayırımı yapılan protein leke sayılarının ve lekelerdeki protein miktarlarının belirlenmesi proteomik çalışmalarının önemli bir alanını oluşturur. Jel üzerindeki proteinleri görünür hale getirebilmek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Burada uygun yöntemi seçmek için yöntemin kullanım kolaylığı, tekrar edilebilirliği, duyarlılığı ve MS ile uyumu göz önünde bulundurulmaktadır. Bu yöntemler içerisinde organik boyaların, gümüş boyaların ve floresan boya kullanıldığı yöntemler en popüler olanlardır. Commasie Brilliant Blue (CBB) boyası kullanım kolaylığı ve protein altbirimlerini belirleyen yöntemlerle uyumluluğu nedeniyle geleneksel olarak kullanılan bir boyadır. CBB'nin duyarlılığı ilk geliştirildiği zamanlarda 200-500 ng arasındaki proteinleri belirleyebilecek kadarken, bu zamanla geliştirilmiş ve günümüzde 1-30 ng'a kadar proteinler bu yöntemle belirlenebilmektedir [Wilson, 1979]. Gümüş boyama ise CBB'ye göre en az 10 kat daha hassas bir boyama yöntemidir ve bu yöntemle 0,1-1 ng kadar protein belirlenebilir. Bununla birlikte,



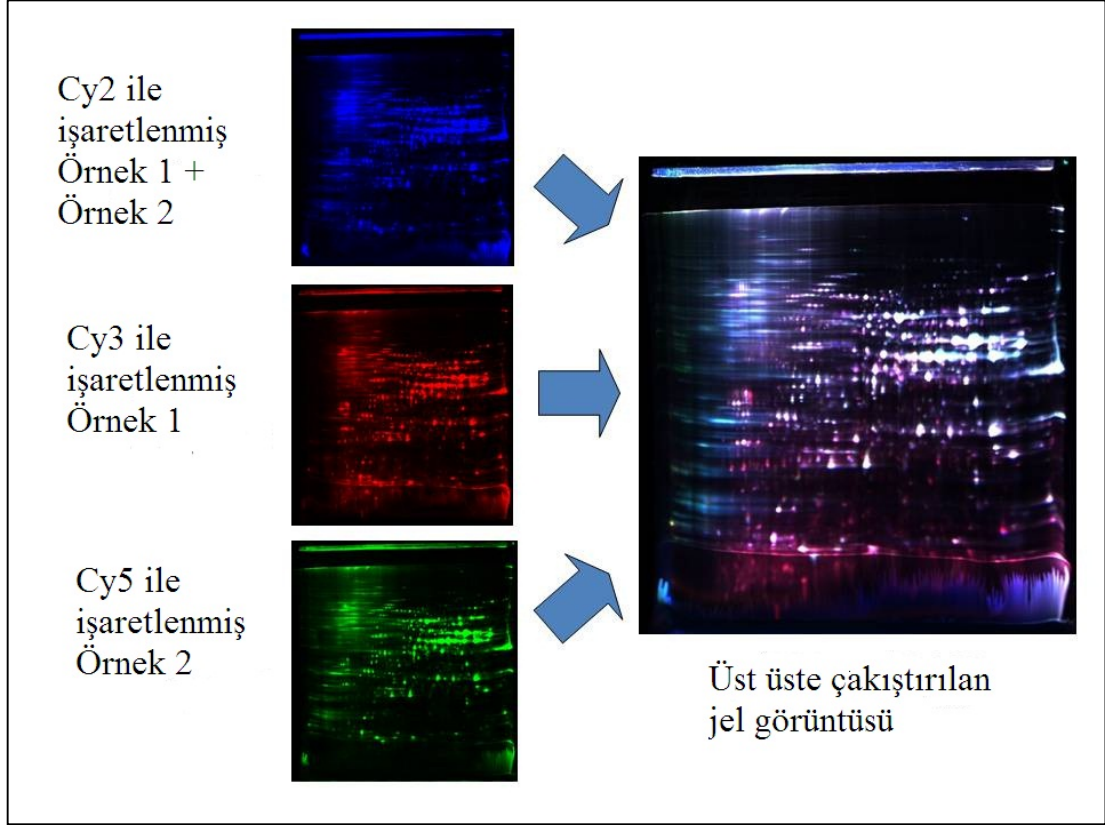
gümüş boyamanın tekrarlanabilirliği düşük, belirleyebildiği protein aralığı dardır ve değişikliğe uğramış bazı proteinleri belirleyememesi bu yöntemin en büyük sıkıntılarından [Westermeier ve Naven, 2002; Wilkins ve Gooley 1998]. Bir proteinin varlığı ya da yokluğu araştırıldığında gümüş boyama, miktar olarak farklılıklar çalışıldığında ise CBB tercih edilebilir. Çünkü CBB ile çalışan bilgisayar programları çok daha güvenilirdir. Ayrıca proteinlerin kimlik tanılarının yapıldığı cihazlar olan kütle spektrometrelerinde (MS) yapılan analizlerde bu boya proteinlerden tamamen uzaklaştırılabildiği için genellikle tercih edilir. Bunun yanında CBB, MS'te tanımlanmaya yetecek kadar proteini belirleyebilir. Gümüş boyamada ise boyanın MS'ten önce uzaklaştırılması çok daha zor ve uğraştırıcıdır. [Lopez, 2007]. Ayrıca, protein lekelerini belirlemek için floresan boyalar da kullanılmaktadır.

2D jel elektroforezi protein miktar çalışmalarında kullanılan güçlü bir yöntemdir ancak 2D elektroforezi zaman alıcı ve laboratuvara hassas bir tekniktir. Bu tekniğin duyarlılığı birçok jelin aynı anda yürütülüp, analiz edilip karşılaştırılmasıyla sağlanabilir. Tekrarlanabilirlikteki eksiklik proteinler arasındaki miktarsal farklılıkların ortaya konulmasını zorlaştıran bir etmendir [Marouga ve ark., 2005]. Bu problem Mustafa Ünlü ve arkadaşlarının 1997 yılında floresan işaretli iki boyutlu jel elektroforezi (2D-DIGE) metodunu geliştirilmesiyle büyük ölçüde çözülmüştür. Bu metoda göre protein örnekleri jele yüklenmeden önce floresan Cy2, Cy3 ve Cy5 boya ile işaretlenir (Şekil 2.2.). Bu boyalar proteinlerdeki lizin kalıntılarının serbest amino gruplarıyla bağ yaparak proteinleri işaretlerler [Amme ve ark., 2006].



Şekil 2.2. DİGE floresan işaretleme yönteminin şematik görünümü [<http://proteo.cnb.csic.es/proteomica/2ddige.jsp>].

İşaretlenen proteinler karıştırılır ve aynı 2D jel üzerinde aynı anda ayrılır (Şekil 2.3.). Farklı örneklerden alınan proteinler farklı boylarla işaretlendikleri için boyalara özgü dalga boylarında her örneğe ait olan jel görüntüsü ayrı ayrı alınarak karşılaştırılabilir. Bunun için geliştirilmiş birçok görüntüleyici cihaz ve yazılım vardır. Bu teknik sayesinde jelden jele olan farklılıkların önüne geçilmiş olunur [Marouga ve ark., 2005]. DİGE işaretleme deneylerinde kullanılan floresan boyların özellikleri dört açıdan uygun hale getirilmiştir; i). Boyalardan her biri aynı amino asit ile reaksiyon vermektedir ii). Boyalar işaretlediği amino asidin yükünü değiştirmemektedir, iii). Boyaların moleküler ağırlıkları birbirine çok yakındır (~500 Da), iv). Boyaların birbirlerinden ayırıcı floresan özellikleri vardır [Ünlü ve ark., 1997]. Ayrıca bu boyların hassasiyetleri çok üst düzeydedir (Cy2 0,075ng, Cy3 0,025ng, Cy5 0,025ng) ve tekrarlanabilirlikte çok sorun yaratmazlar. Ancak bu boyların en büyük sıkıntısı diğer boylarla göre çok pahalı olmalarıdır [Marouga ve ark., 2005; Roy, 2014].



Şekil 2.3. DIGE yönteminin jel uygulama görüntüsü [<http://cgs.hku.hk/portal/index.php/2ddige>].

2D proteomik çalışmalarında hala en çok kullanılan tekniktir ve büyük olasılıkla gelecekte de bu durum çok fazla değişmeyecektir [Lopez, 2007]. Bir jel üzerinde binlerce protein lekesi bulunabilir. Tüm bu lekeleri belirleyebilmek ve analiz edebilmek için geliştirilmiş yazılım programları ve araç gereçleri vardır. Bunlardan bazıları; PD Quest (Biorad Laboratuvarları, Hercules CA,) Kepler (LSB Corp. Rockville, MD), Melanin (GeneBiyo, Cenevre, İsviçre) ve Melanin II programlarıdır [Salekdeh ve ark., 2002].

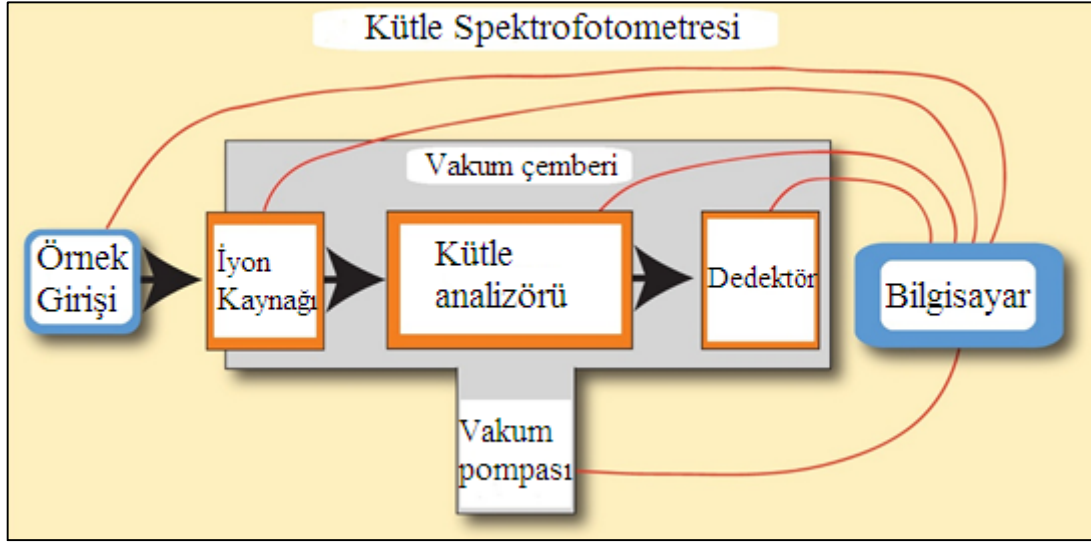
### 2.3.5. Seçilen Proteinlerin Kütle Spektrometresinde Kütle Parmak İzi ve/veya Aminoasit Dizilerinin Belirlenmesi

2 boyutlu jel elektroforezi ile tek bir jel üzerinde yüzlerce proteinin görüntülenmesi sağlanabilir ve bu sayede geniş ölçekli gen ifadesi çalışmalarının yapılmasına olanak verir. Ancak bu tekniğin proteinleri tanımlamada sıkıntıları vardır.

Teknik ilk geliştirildiğinde sadece daha önce saflaştırılıp çalışılan proteinler immüno blotlama yöntemi ile belirlenebiliyordu. Yates [1998] tarafından kütle spektrometresinin geliştirilmesiyle proteinlerin tanımlanma sorunu tamamen olmasa da büyük ölçüde ortadan kaldırılmış oldu [Zivy ve Vienne, 2000]. Proteinlerin kimlik tanımlarının yapılabilmesi ve kovalent yapılarının tanımlanabilmesi çalışmaları yaşam bilimlerinin merkezi haline gelmiştir. Proteinlerin aminoasit dizileri ve onları kodlayan genlerin arasında genetik kod nedeniyle bir bağlantı vardır ve esas olarak bu bağlantı hücre fizyolojisi ile genetiği arasındaki bağlantıdır. Genomikte yaşanan gelişmelerden önce, tek bir proteinin ya da iyi derecede saflaştırılmış proteinlerin kovalent yapılarının incelenmesi için kimyasal ya da enzimatik yöntemler kullanılıyordu ve genellikle reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin UV absorbans ya da floresan absorbans ölçümlerine dayalı analizler yapıyordu. Son 20 yılda kütle spektrometreleri geliştirilerek protein analizlerini yapmaya uygun hale getirildi [Domon ve Aebersold, 2006]. Günümüzde proteinlerin kimlik tanımlamalarını belirlemek için kütle spektrometreleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. [Roy, 2014].

#### 2.3.5.1. Kütle spektrometresi

Proteinlerin kütle spektrometresi (MS) kullanılarak analiz edilmeleri çok karmaşık bir olaydır ve çok özen gerektirir. MS temel olarak Şekil 2.4.'te gösterildiği gibi 3 kısımdan oluşur. Bunlar; molekülleri gaz fazında iyonlaştıran iyonizasyon kaynağı, iyonları kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre ayıran kütle analizörü ve her bir kütle/yük değerini kaydeden iyon dedektörüdür [Yates, 2000].



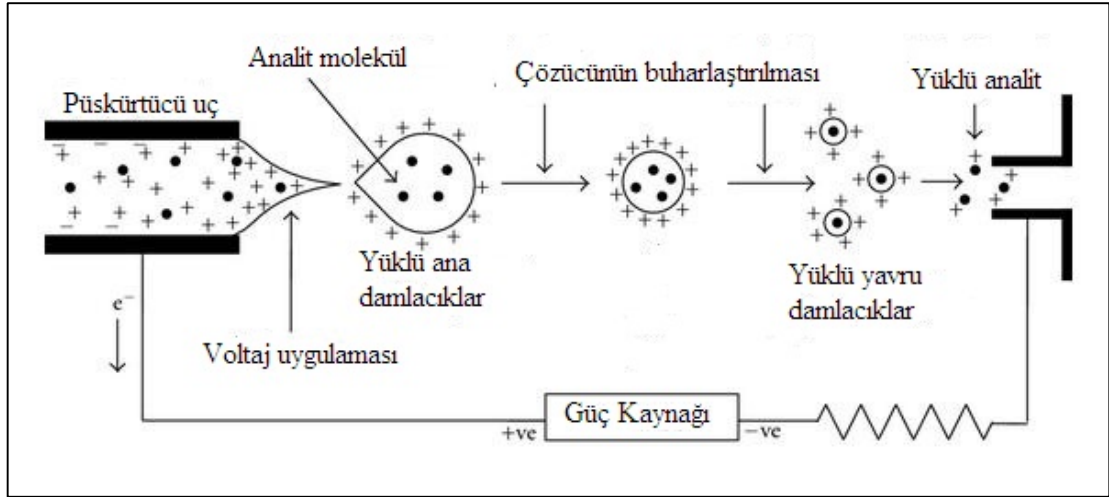
Şekil 2.4. Kütle spektrometresinin şematik görünümü [<http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/massSpectrometry.php>].

#### *İyonizasyon Kaynakları*

Bir molekülün MS’te analiz edilebilmesi için o molekülün öncelikle iyonize edilmesi ve gaz fazına alınması gerekmektedir [Fenn ve ark., 1989]. Yumuşak ve etkili bir iyonizasyon tekniğinin eksikliği ve iyonize edilen bileşiklerin yoğunlaştırılmış fazdan gaz fazına transferi konusundaki eksiklikler nedeniyle MS uzunca bir süre sadece küçük ve sıcaklığa dayanıklı bileşiklerin analizinde kullanılabilmektedir. Ancak 80’li yılların sonlarında geliştirilmiş olan elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve matris destekli lazer desorbsiyon iyonizasyon (MALDI) teknikleri sayesinde protein gibi büyük moleküllerin analizi mümkün hale gelmiştir [Aebersold ve Mann, 2003]. Bu iyonizasyon teknikleri proteomik çalışmalarında çığır açmıştır ve tekniği bulan araştırmacılar John Fenn (ESI) ve Koichi Tanaka (MALDI)’ya 2002 yılında Nobel kimya ödülünü kazandırmıştır [Thelen, 2007]. Bu gelişmelerle yeni MS’lerin geliştirilmesinin önü açılmış, karmaşık çoklu hibrit cihazlar, sıralı cihazlar yapılmış ve protein-proteom analizlerinde çağ atlanılmıştır.

### Elektrosprey İyonizasyon

Elektrosprey iyonizasyon (ESI) tekniğinde analitleri içeren çözücü ince uçlu bir iğneden püskürtülür. Bu püskürtme esnasında iğnenin ucuna yüksek bir voltaj uygulanır ve analiti içeren çözücü yükü yüklenmiş olur. ESI yönteminde çözücü-analit içeren çok küçük damlacıklar oluşur. Çözücü, ısı ya da farklı enerji formlarının gaz halinde püskürtülmesiyle buharlaştırılır ve sonuç olarak çoklu yüklü iyonlar oluşturulur. (Şekil 2.5.) [Yates, 2000; Ho ve ark., 2003] ESI metodu genellikle sıvı kromatografisiyle birleştirilerek kullanılmaktadır [Ho ve ark., 2003].

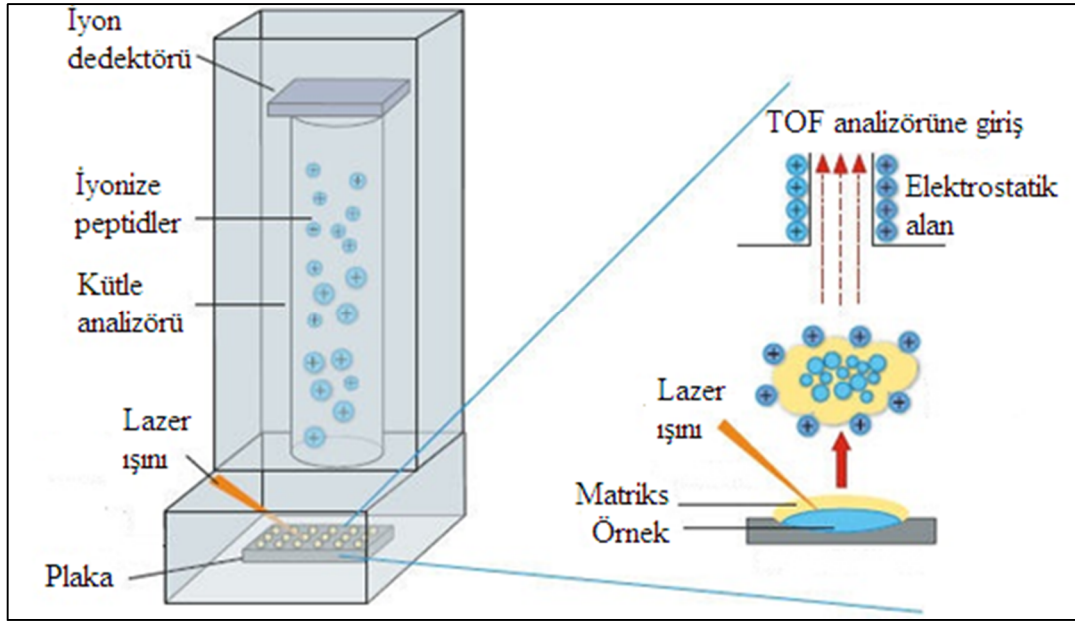


Şekil 2.5. Elektrosprey iyonizasyonunun şematik görünümü [Banerjee ve Mazumdar, 2012].

### Matriks destekli lazer desorbsiyon iyonizasyon

ESI'dan farklı olarak iyonizasyonun lazer enerjisiyle sağlandığı matriks destekli lazer desorbsiyon iyonizasyon (MALDI) yönteminde, ilk olarak analit bir çözücü içerisinde yüksek molariteli genellikle zayıf bir organik asit olan matriks ile karıştırılır [Lewis ve ark., 2000]. Burada kullanılan çözücü analit-matriks karışımının kümeleşmesini önler. Analit-matriks karışımı çelik bir plaka üzerine yerleştirilir ve vakumlu koşullar altında çözücü uzaklaştırılır, kristalize olan analit homojen bir şekilde matriks içinde dağılır [Jagtap ve Ambre, 2005]. Analit-matriks karışımına lazer ışını verildiğinde matriks burada lazer ışını ve dolayısıyla enerjiyi güçlü bir şekilde

soğurarak analitin doğrudan bu enerjiye maruz kalmasını engeller. Matriks ayrıca proton alıcısı ve vericisi olarak analitin pozitif ve negatif olarak iyonize olmasında rol oynar [Lewis ve ark., 2000]. Matriks tarafından soğurulan enerji matriks örnek karışımı içerisinde elektron uyarılması için kullanılır ve katı fazdan gaz fazına geçiş sağlanır ve buharlaşan matriks içerisinde analit de taşınır (Şekil 2.6.) [Jagtap ve Ambre, 2005]. Buharlaşan yapılar yüksek bir vakum altında kütle analizörüne yönlendirilirler [Thelen, 2007]



Şekil 2.6. Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonunun şematik görünümü [Pinto ve ark., 2011]

MALDI MS analizlerinde matriks ve çözücünün doğru bir şekilde seçilmesi analizin hassasiyeti için çok önemlidir. Matriks analit ile kolayca karışabilmeli ve analit ile benzer sudan kaçınan (hidrofobisite) ya da suyu seven (hidrofilisite) özellikte olmalıdır [Jagtap ve Ambre, 2005]. MALDI'de peptid ve proteinler için yaygın olarak kullanılan 3 tane standart matriks vardır; genellikle peptid, glikopeptid ve küçük proteinleri için kullanılan alfa-siyano-4-hidroksisünik asit; peptid ve protein analizlerinde kullanılan sinapinik asit; glikopeptid, glikoprotein, küçük protein ve oligonükleotidler için kullanılan 2,5 dihidroksibenzoik asittir [Lewis ve ark., 2000]. Matriks analit moleküllerinin iyonlaşmasını kolaylaştırmaktadır. MALDI iyonları lazer ışınının soğurulması sonucu doğrudan oluşmazlar. Büyük bir kısmı asidik olan

matriksler, lazer ışını ile parçalanarak bazik işlevsel gruplar içeren analitlerin protonlanması sonucu iyonlaşmasını sağlarlar. Çözücü seçimi de MALDI analizlerinde kilit bir öneme sahiptir. Burada aseton, hekzan, asetonitril, etanol, metilen klorid, tetrahidrofuran ve kloroform yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [Jagtap ve Ambre, 2005].

Kullanım kolaylığı, mükemmel kütle kesinliği, yüksek ayırım gücü ve duyarlılığı, çok hızlı bir şekilde veri elde etmesi, polimerlerin yapısından bağımsız olarak moleküler ağırlıklarını belirlemesi, moleküler ağırlığı 200.000 daltondan çok olan polimerleri belirlemek için bile kullanılabilir olması nedeniyle MALDI-TOF proteinleri tanımlamada kullanılan en güçlü yöntemdir [Jagtap ve Ambre, 2005]. Bu yöntemde deneysel olarak elde edilen peptid kütleleri veritabanlarında bulunan hesaplanmış peptid kütleleri ile karşılaştırılarak proteinlerin kimlikleri belirlenir. Bu teknikte yaygın olarak MS öncesinde proteinler 1D ve/veya 2D ayırma tabi tutulurlar. Protein tanımlamasında kütle bilgileri yetersiz kaldığında dizileme için MALDI MS/MS kullanılır [Aebersold ve Mann, 2003].

### *Kütle analizörü*

Protein analizlerine uygun olarak MS'ler ile birlikte yaygın olarak kullanılan dört temel kütle analizör tipi vardır. Bunlar; iyon-kapanı, uçuş süreli tüp (TOF), quadropol ve FTICR analizörleridir. Bunlarının her birinin çalışma prensibi birbirinden farklıdır [Aebersold ve Mann, 2003]. Bunlar içerisinde MALDI ile en çok kullanılan uçuş zamanlı (TOF) kütle analizörüdür. İyonlar vakumlanmış uçuş tüpü içerisinde kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre aynı mesafeyi katederler [Jagtap ve Ambre, 2005]. TOF analizi iyon setinin bir dedektöre doğru hızlandırılması temelinde çalışmaktadır ve tüm iyonlara eşit miktarda enerji verilir. Bu sayede iyonların tamamı eşit enerjiye sahip ama kütleleri farklı olur. Böylece iyonlar dedektöre farklı zamanda ulaşırlar. Daha küçük iyonlar dedektöre çok daha kısa sürede ulaşırlar. [Lewis ve ark., 2000] Ayrılan iyon parçaları tüpün sonunda bulunan bir kaydedici tarafından algılanır ve her iyon grubu için bir uyarı oluşturulur. Sayısallaştırılmış veriler ile bir kütle spektrumu oluşturulur. Kütle spektrumu zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilir.



İyonların kütlelerinin hesaplanmasıyla kütle spektrumu sayısal kütle verilerine dönüştürülür [Jagtap ve Ambre, 2005]. Son zamanlarda TOF reflektrom ile birlikte kullanılmaktadır. TOF reflektromu TOF teknolojisiyle birleştirilmiş bir elektrostatik analizördür. Reflektrom iyonların tüp içerisinde dedektöre ulaşma zamanını arttırır. Bu durum da daha yüksek bir ayırım gücü sağlar [Lewis ve ark., 2000].

### *İyon dedektörü*

Kütle analizörleri iyon dedektörleri ile birleşik halde bulunurlar. İyon bir iyon dedektörünün yüzeyine çarptığı zaman bir voltaj oluşur ve bu voltaj dedektör tarafından ölçülür. Elde edilen voltaj zamanın fonksiyonu olarak büyütülür, buna bağlı olarak da  $m/z$  ve uyarının yoğunluğu hesaplanır [Şelale, 2010].

Kütle spektrometreleri polipeptidlerin sadece kütlelerini verebildikleri gibi, aminoasit dizileri, bağlanma bölgeleri ve translasyon sonrası değişiklikler gibi yapısal özelliklerinin ortaya konulmasında da kullanılabilir. İlk olarak kullanılan MS'lerde moleküllerin moleküler ağırlıkları ortaya konulmuşken, daha sonra geliştirilen sıralı kütle spektrometreleri sayesinde istenilen iyonların seçilmesi, parçalara ayrılması ve hatta dizilenmesi mümkün hale gelmiştir [Domon ve Aebersold, 2006]. Bir proteinin kimlik tanısının yapılabilmesi için kütle parmak izinin ortaya konması yeterlidir. Bir proteinin kütle parmak izi kullanılarak tanımlanabilmesi için o proteine ait veritabanında yer alan en az 4 proteolitik peptidin kesin kütlelerine ait özgün gen ya da proteinleri içeren tahmini kütlelerinin bilinmesi gerekir [Mann ve ark., 2001]. Buna peptid parmak izi denir ve proteom analizlerinde birçok proteinin kimlik tanısının yapılmasında başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Kütle parmak izi protein tanımlanmasında kullanılan hızlı ve basit bir uygulamadır. Genomu tanımlanmış, proteomun büyük bir kısmı ortaya konmuş ya da tanımlanmış organizmalar için en uygun yöntemdir. Eğer genom bilgisi yok ise işaretli ifade edilen diziler (EST) veritabanları proteom araştırmalarında kullanılabilir. Tüm bunların yanında, eğer MS'e verilen karışımda birden çok (SDS-PAGE lekeleri) protein varsa bunları tanımlamada kütle parmak izi yetersiz kalabilir. Yani elinizde 2D'den sonra elde edilmiş, karmaşık olmayan bir karışım varsa peptid parmak

izi kullanışlı olabilir. Eğer proteinler peptid parmak izi ile tanımlanmazsa, sıralı MS'ler kullanılarak kimlik analizleri yapılır. Sıralı MS proteinlerin kısmi dizi bilgilerini verir. Bu bilgi kütle bilgileri ile birleştirilerek proteinlerin kesin kimlik tanıları yapılır [Thelen, 2007]. Her iki tip bilgi de veritabanlarındaki protein dizi bilgileriyle uygunluk gösterir [Yates, 2000].

## 2.4. LİTERATÜR TARAMASI

Kuraklık stresinin bitkiler üzerine olan etkileri çok uzun zamandan beri çalışılan önemli bir konudur. Bitkiler tarafından oluşturulan stres yanıtının araştırıldığı morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde, bitkilerde kuraklık stresine yanıt olarak meydana gelen; kök ve sürgün boylarındaki değişimler, oransal su içeriklerinin ve yaprak su potansiyelinin durumu ve prolin miktarlarındaki değişimler en çok ilgi gören ve stres durumunu iyi bir şekilde gösteren önemli fizyolojik ve biyokimyasal parametreler olarak ön plana çıkmaktadır.

### 2.4.1. Yapılan Fizyolojik ve Biyokimyasal Çalışmalar

Kuraklık stresinin bitkilerde kök ve sürgün boylarının gelişimi üzerine etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen veriler incelendiğinde araştırmacıların kullandıkları türlere ve genotiplere, stresin şiddeti ve süresine bağlı olarak birbirlerinden farklı sonuçlar buldukları görülmüştür. Sing ve ark. [1994] yaptıkları çalışmada limon otu bitkisini 45 ve 90 gün boyunca kuraklık stresine maruz bırakmış ve stres sonunda bitkilerde sürgün boylarının azaldığını bulmuşlardır. Nedunchezhiyan ve ark. [2012] kuraklık stresinin patates bitkisinde kök boyunu azalttığını bulmuşlardır. Heerden ve Laurie [2008] ve Laurie ve ark. [2015] ise kuraklık stresinin patates bitkisinde sürgün boyunu azalttığını bildirmişlerdir. Ashraf ve O'leary [1996] yaptıkları çalışmada tuz stresıyla birlikte strese karşı dayanıklılığı farklı olan iki ayçiçeği bitkisinde kök ve sürgün boylarının azaldığını, bu azalışın daha duyarlı olan türde çok daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Bu bulguların aksine Pace ve ark. [1999] kuraklık stresinin pamuk bitkisinin kök ve sürgün boylarında önemli bir değişikliğe neden olmadığını vurgulamışlardır.

Yaprak su potansiyeli (YSP) iyi bir stres göstergesi olarak bilinir. Stres altında YSP'deki düşüş oranı stres şiddetinin bir belirteçidir [Leport ve ark., 1999]. Özellikle kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde YSP'nin düştüğü birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. [Jondgee ve ark., 2002; Leport ve ark., 1999; Basu ve ark.,

2007a; Basu ve ark., 2007b]. Bu konuda nohutla ilgili yapılmış çok sayıda çalışma vardır. Basu ve ark. [2007a], Krouma [2010], Katerji ve ark. [2001], Fang ve ark. [2010] yaptıkları çalışmada, kuraklık stresinin nohutta yaprak su potansiyelini azalttığını vurgulamıştır. YSP'nin özellikle kültür türlerinde, yabani türlere göre çok daha fazla düştüğü de araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [Terzi ve ark., 2010; Luquez ve Guiamet, 2002; Leport ve ark., 1999]. Yapılan çalışmalarda elde edilen azalış oranları stresin süresine ve şiddetine göre farklılık göstermiştir.

Yaprak su potansiyeli gibi yapraklardaki oransal su içeriğinin stres durumundaki değişimi de yine birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Talebi ve ark. [2013] kuraklık dayanıklılıkları farklı olan 35 nohut genotipini kuraklık stresine maruz bıraktıklarında tüm genotiplerde oransal su içeriklerinin kuraklık stresiyle birlikte düştüğünü ancak bu düşüşün en çok kuraklığa duyarlı genotiplerde meydana geldiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, farklı bitkilerde de kuraklık stresinin yapraklardaki oransal su içeriklerini düşürdüğü gösterilmiş olup; Keles ve Öncel [2004] çevresel stres dirençleri birbirinden farklı olan 6 buğday kültüründe kuraklık stresinin oransal su içeriğini düşürdüğünü belirtmişlerdir. Sepanlo ve ark. [2014] yaptıkları çalışmada kuraklık stresinin dayanıklılıkları farklı olan 3 soya genotipinde yaprakların oransal su içeriklerini düşürdüğünü, bu düşüşün nispeten duyarlı olan genotipte daha fazla olduğunu vurgulamışlardır. Arjenaki ve ark. [2012] yaptıkları çalışmada, dirençleri farklı olan 6 buğday genotipi kullanmış ve kuraklık stresi sonucunda tüm genotiplerde oransal su içeriğinin düştüğünü belirlemişlerdir. Araştırmanın bulgularına göre duyarlı genotiplerde bu düşüş çok daha fazla olmuştur. Unyayar ve ark. [2005] iki farklı domates türünde yaptıkları çalışmada, kuraklık stresinin yabani domates türünde oransal su içeriğini değiştirmedikini, kültür türünde ise azalttığını bulmuşlardır.

Kuraklık stresinin içsel prolin miktarı üzerine olan etkilerinin farklı bitkilerde araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Unyayar ve ark. [2004] iki ayçiçek genotipinde kuraklık stresi sonucunda prolin miktarının arttığını tespit etmişlerdir. Heidari ve Mohammadkhani [2008] iki mısır genotipinde yaptıkları çalışmada kuraklık stresinin serbest prolin miktarını her iki genotipte de arttırdığını bulmuşlardır. Bu artış oranları her iki genotipte de farklı oranlarda olmuştur. Mafakheri ve ark. [2010] kuraklık

dayanıklılıkları farklı olan 3 nohut kültüründe yaptıkları çalışmada, kuraklık stresinin prolin miktarını arttırdığını, kuraklık direnci yüksek olan kültürlerde bu artışın çok daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Ulemale ve ark. [2013] 14 nohut genotipini kuraklık stresine maruz bırakarak çeşitli fizyolojik parametreleri incelemişlerdir. Kuraklık stresiyile birlikte bütün genotiplerde prolin miktarının arttığını, bu artışın özellikle kuraklığa karşı dayanıklı oldukları bilinen genotiplerde çok daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Lum ve ark. [2014] kuraklık dayanıklılıkları farklı olan 8 pirinç genotipinde yaptıkları çalışmada kuraklık stresiyile birlikte prolin miktarının arttığını bu artışın kuraklığa dayanıklı olan genotiplerde çok daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

#### 2.4.2. Yapılan Proteomik Çalışmaları

Son yıllarda, proteomik birçok bitkide çeşitli abiyotik streslere karşı oluşturulan hücresele yanıtı açıklayabilmek için kullanılmıştır ve karşılaştırmalı proteomik sayesinde protein ifade profillerinde genotipe özgül farklılıklar olduğu belirlenmiştir [Jaiswal, 2013]. Bitkilerde proteomik kapsamında yapılan abiyotik stres araştırmalarının büyük bir kısmının ortak noktası stres altında ve stressiz koşullarda yetiştirilen bitkilerden izole edilen proteomların karşılaştırılmasıdır. Diğer bir yaygın durum ise, iki farklı genotip ya da bitki türünden elde edilen proteom bileşimlerinin verilen stres faktörü altında karşılaştırılmalarıdır. Çalışmalarda genellikle iki boyutlu jel elektroforezi ayırımını kütle spektrometresi ile yapılan protein kimlik tanısı takip eder. Bunun yanında kütle spektrometresi sadece protein kimlik tanısı için değil, ayrıca proteinlerin miktar tayinleri için de kullanılmaktadır [Kosova ve ark., 2011].

Abiyotik stresin bitki proteomu üzerine olan etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmalar 1980'li yılların sonlarında yapılmıştır. Ancak o zamanlarda belirlenen proteinlerin birçoğu anonim olarak kalmış, kimlik tanıları yapılamamıştır [Hurkman ve ark, 1988; Zivy 1987]. Edman mikrodizileme yönteminin tanıtılmasıyla birlikte ise abiyotik stresle ilgili olan ilk protein listeleri oluşturulmuştur [Costa ve ark., 1998]. MS tekniklerinin ortaya çıkması protein tanımlamalarında yeni bir bakış açısı ortaya koymuştur. Chang ve ark. [2000] bu tekniği bitkide abiyotik stres yanıtını anlamak

için kullanan ilk araştırmacı grubu olmuştur. Yaptıkları çalışmada oksijensiz kalan mısır bitki köklerindeki protein değişimini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada MALDI-TOF/MS cihazıyla protein kimlik tanıları yapmışlardır. Bitkilerde yüksek çıktılı cihazla yapılan bu ilk çalışmadan sonra günümüze kadar geçen sürede bu çalışmaların sayısı katlanarak artmış ve artmaya devam etmektedir.

Rey ve ark. [1998] patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkisinin kloroplastlarında şiddetli kuraklık altında CDSP32 proteininin uyarıldığını bulmuşlardır. Yaptıkları küçük mikrodizilemelerle bu protein dizisinin bilinen hiçbir protein ile homoloji göstermediğini belirlemişlerdir. Daha sonra cDNA kütüphanelerini taramış ve ellerindeki dizilerin thioiredoksin geni ile uyuştuğunu belirlemişlerdir. 2005 yılında affinite kromatografi teknikleri ile yaptıkları çalışmada ise bunun tam olarak peroksiredoksin olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma farklı proteomik teknikler kullanılarak gen keşfinin ve analizinin yapıldığı iyi bir örnektir.

Costa ve ark. [1998] çam (*Pinus pinaster* Ait.) bitkisinde orta ve şiddetli kuraklık stresinin etkilerini araştırmışlardır. 38 tane kuraklık ile ilgili protein lekesi belirlemişlerdir ve bunlardan iki tanesinin ifadesinin azaldığını, beş tanesinin ise arttığını belirlemişlerdir.

Salekdeh ve ark. [2002] iki pirinç (*Oryza sativa* L.) kültüründe kuraklık stresini araştırmışlar ve 23 gün boyunca kuraklık stresine maruz bıraktıkları bitkileri 10 gün boyunca tekrar sulamışlardır. Her periyod için bitki yapraklarını hasat etmişler ve analiz edilmişlerdir. Toplamda 42 proteinin ifadesinde değişiklikler olduğunu açıklamışlardır. İki kültürü karşılaştırdıklarında 15 tane proteinin ifadesinin her iki kültürde de benzer şekilde değiştiğini belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada ifadelerinde artış olan proteinlerin kuraklığa daha dirençli olan kültürde, ifadeleri azalan proteinlerin ise daha duyarlı kültürde değişim gösterdiğini bulmuşlardır. Bunun nedenini dirençli olan kültürün duyarlı olana göre daha aktif bir yanıt oluşturması olarak bildirmişlerdir.

Hajheidari ve ark. [2005] iki şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) genotipini kuraklık stresine maruz bırakmışlar ve 45 proteinin ifadesinin azaldığını 35 proteinin ise arttığını belirtmişlerdir. Bu artış ve azalışlardan bazılarının genotipe özgü olduğunu vurgulamışlardır.

Blönder ve ark. [2007] Norveç ladininde (*Picea abies* (Karst.) L.) yaptıkları çalışmada erken kuraklık stresinin oluşturduğu proteom yanıtını incelemişlerdir ve 4 proteinin ifadesinde kuraklık stresiyle birlikte değişiklikler gözlemlemişlerdir.

Jiang ve ark. [2007] *Boea hygrometrica* bitkisinde rehidrasyon ve dehidrasyon stresinin proteom düzeyde meydana getirdiği farklılıkları incelemişlerdir. 2D jel üzerinde 223 protein belirlemişler ve dehidrasyon stresiyle birlikte bu proteinlerin %35'inin ifadesi artarken, %60'ının ifadesi azalmış ya da değişmemiş, %5'inin ise rehidrasyonla birlikte uyarıldığını bulmuşlardır.

Vincent ve ark. [2007] iki üzüm (*Vitis vinifera* L.) genotipini kuraklık stresine maruz bırakmışlardır. 2D jel elektroforezinde belirledikleri 191 protein lekesini kütle spektrometresinde analiz etmişler ve bunların %44'ünün protein izoformları olduğunu belirlemişlerdir.

Zomeno ve ark. [2009] meşe (*Quercus ilex* L.) bitkisinde yaptıkları çalışmada 9 aylık bitkileri kuraklık stresine maruz bırakmış ve tekrar sulayarak proteom düzeyinde meydana gelen değişiklikleri araştırmışlardır. Toplam 23 protein lekesinde stres ve yeniden sulamaya yanıt olarak değişiklikler görmüşler ve bunların 14 tanesini kütle spektrometresinde tanımlamışlardır. İfade değişikliklerinin meydana geldiği proteinlerin özellikle fotosentez, karbonhidrat ve azot metabolizmasında rol oynayan proteinler olduğunu belirtmişlerdir.

Caruso ve ark. [2009] buğday (*Triticum durum* L.) bitkisinde yaptıkları çalışmada kuraklık stresinin 36 proteinin ifadesini değiştirdiğini belirlemişlerdir. Bu proteinlerin 12 tanesinin ifadesi strese yanıt olarak artarken 12 tanesinin ifadesi azalmıştır.

Bogeat ve ark. [2007] yaptıkları çalışmada kavakta (*Populus euphratica* Oliv.) kurak stresine yanıt olarak hem transkript hem de proteom düzeyinde meydana gelen değişiklikleri cDNA microarray ve 2D-DIGE kullanarak belirlemişlerdir. Kuraklık stresinde gen ifade düzeyinde meydana gelen değişikliklerin proteom düzeyinde meydana gelen değişikliklerden farklı olduğunu belirlemişlerdir.

Deeba ve ark. [2012] pamuk (*Gossypium herbaceum* L.) bitkisinde yaptıkları çalışmada kuraklık stresinin 16 proteinin ifadesini arttırdığını, 6 protein ifadesini ise düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Zadraznik ve ark. [2013] kuraklığa dirençleri farklı olan iki fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşidinde kuraklık stres yanıtını proteom düzeyinde incelemişlerdir. Kuraklık stresine yanıt olarak ifadeleri değişen proteinlerin bir kısmının çeşide özgü olduğunu belirlemişlerdir ve her iki çeşitte de protein ifade yanıtları farklılıklar göstermiştir. İfadeleri değişen proteinlerin özellikle fotosentez, enerji ve protein sentez yollarında bulunan proteinler olduğunu belirlemişlerdir.

Budak ve ark. [2013] yabancı (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) ve kültür buğday (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) bitkisinde yaptıkları çalışmada kuraklık stresinin neden olduğu protein ifade değişikliklerini incelemişlerdir. Toplam 75 proteinin ifadesinin kuraklık stresinde değiştiğini, ifadesi değişen proteinlerin büyük bir çoğunluğunun her iki genotipte birden değişim gösterdiğini vurgulamışlardır.

Shi ve ark. [2014] kuraklık dirençleri farklı olan bermuda çimi (*Cynodon dactylon* (Pers.) L.) bitkisinde yaptıkları çalışmada, kuraklık stresıyla birlikte toplam 39 proteinin ifadesinin değiştiğini bildirmişlerdir. Bunlardan 3 tanesinin ifadesi her iki türde de artarken 2 tanesinin ifadesi azalmıştır. İki türde 23 protein ifadesi ise farklılık göstermiştir.

Xiang ve ark. [2014] yaptıkları çalışmada kudret narı (*Momordica charantia* L. var. Hong Kong Green) bitkisinin meyvesinde sıcaklık uygulaması sonucu meydana gelen proteom değişikliklerini 2D-DIGE MS/MS yöntemini kullanarak



araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda 10 proteinin ifadesinde anlamlı değişiklikler olduğunu tespit etmişlerdir.

Jedowski ve ark. [2014] kuraklık dayanıklılıkları farklı olan iki şeker darısı (*Sorghum bicolor* (Moench.) L.) bitkisini yedi gün boyunca kuraklık stresine maruz bırakmış ve stres sonunda tekrar sulamışlardır. Stres sonunda ve sulamanın ardından her iki genotipten aldıkları yapraklarda proteom bileşimlerini 2D-DIGE yöntemiyle karşılaştırmışlardır. İfade farklılığı gösteren protein lekelerini keserek kütle spektrometresinde analiz etmiş ve kuraklık stresinin ve tekrar sulamanın her iki genotipte de proteom bileşimlerini değiştirdiğini belirlemişlerdir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİ YETİŞTİRME KOŞULLARI VE KURAKLIK UYGULAMASI

GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi'nden alınan *Cicer arietinum* (ILC482) ve Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden alınan *Cicer reticulatum* (AWC611) türlerine ait olan tohumlar %2,5'lik sodyumhipoklorid çözeltisinde 10 dk bekletilerek steril edildikten sonra iyice yıkandı ve saf su içinde 1 gün süre ile havalandırılarak şişirildi. Tohumlar içerisinde toprak:gübre:perlit (2:1:1) karışımı bulunan saksılara yüzeyden yaklaşık olarak 2 cm derine olacak şekilde ekildi. Saksılar Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan sıcaklık, ışık ve nem kontrollü bitki yetiştirme kabini içerisinde saatlere bağlı olarak değişen ışık, nem ve sıcaklık ayarı yapılarak 21 gün boyunca kontrollü şartlar altında büyütüldü. Bu sürenin sonunda her iki türe ait fidelerin yarısı 7 gün boyunca sulanmayarak kuraklık stresine maruz kalmaları sağlanırken diğer yarısı kontrol bitkileri olarak sulanmaya devam edildi. Ardından, bitki yaprakları hasat edilerek hızlı bir şekilde sıvı azota alındı ve analiz gününe kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

#### 3.2. KÖK VE SÜRGÜN BOYLARININ ÖLÇÜLMESİ

Her iki türün hem kontrol hem de kurak gruplarına ait 10'ar tane fide saksılardan dikkatlice alınarak kök ve sürgün boyları cm cinsinden ölçüldü.

#### 3.3. YAPRAK SU POTANSİYELİ'NİN ÖLÇÜLMESİ

Her iki türe ait kontrol ve kurak gruplardan 5'er tane fide alınarak basınç hücresinde (PMS Instrument Co. Model 1000) yaprak su potansiyeli ölçüldü ve değerler MPa olarak hesaplandı.

### 3.4. YAPRAK ORANSAL SU İÇERİĞİ'NİN ÖLÇÜLMESİ

Yaprakların oransal su içerikleri (OSİ) Smart ve Bingham [1974]'e göre yapıldı. Bu yönteme göre hasat edilen bitki yaprakları alınarak hassas terazide tartıldı ve yaş ağırlıkları (YA) belirlendi. Ardından bu yapraklar saf su içerisinde 25 °C'de 4 saat tutularak turgorlu hale gelmesi sağlandı ve yaprakların üzerindeki fazla su bir peçete yardımıyla alınarak tekrar tartıldı ve turgorlu ağırlıkları (TA) kaydedildi. Ardından turgorlu yapraklar 24 saat boyunca 85 °C'de etüvde bekletildi ve kuruyan yapraklar tekrar hassas terazide tartılarak kuru ağırlıkları (KA) belirlendi. Elde edilen veriler aşağıdaki formülde yerine yazılarak her gruba ait oransal su içerikleri belirlendi.

$$OSİ = [(YA - KA) / (TA - KA)] \times 100$$

### 3.5. SERBEST PROLİN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Serbest prolin miktarı Bates ve ark. [1973]'na göre belirlendi. 0,5 g yaprak alınarak 10 mL %3'lük sülfosalisilik asitte homojenize edildi. Elde edilen filtrat filtre kağıdında süzüldükten sonra 2 mL'si alınarak üzerine 2 mL ninhidrin ve 2 mL asetik asit tüplere konuldu ve 95 °C'de su banyosu içerisinde 1 saat bekletildi. Süre sonunda tüpler buz üzerine alınarak reaksiyon sonlandırıldı. Karışım 4 mL'lik toluen ile özütlendi ve toluen fazı 520 nm'de spektrometrede ölçüldü. Sonuçlar standart eğri oluşturularak µmol prolin/g cinsinden hesaplandı.

### 3.6. PROTEİN ANALİZLERİ

#### 3.6.1. Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu her grup için 3 biyolojik tekrar olacak şekilde, Kim ve ark. [2001]'na göre bir takım değişikliklerle aşağıdaki basamaklar izlenerek yapıldı. Bu yöntemeye göre;

1. Hasat edilerek sıvı azota alınmış ve -80 °C'de saklanan yaprak örneklerinden 3 g alınarak sıvı azot içerisinde dondurulmuş teflon haznelere konuldu.
2. Yaprak örneklerinin üzerine her 1 g örnek için 100 mg PVP tartılarak eklendi.
3. Yapraklar 90 sn boyunca öğütücüde (Retsch, MM400) öğütüldü.
4. İyice toz haline gelmiş olan yaprak örnekleri bir cam erlen içerisinde alınarak üzerine her 1 g örnek için 7,5 mL MgNP40 lizis tamponu konuldu.
5. Lizis tamponundaki örnekler buz üzerinde 15-20 dk bekletildi.
6. Süre sonunda örnekler 3.000 rpm'de 15 dk +4 °C'de santrifüj (Hettich, Universal 32) edildi.
7. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı yeni bir tüpe alındı ve üzerine %50 PEG çözeltisinden alınarak son konsantrasyonu %15 olacak şekilde eklendi.
8. Tüpler buz üzerinde ara ara vortekslenerek 30 dk bekletildi.
9. Ardından tüpler 12.000 rpm'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
10. Süpernatant kısmı alınarak üzerine soğuk aseton eklendi ve -20 °C'de bir gece bekletildi.
11. Ertesi gün örnekler 14.000 rpm'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi.

12. Pellet kısmı alınarak üzerine 10 mL kadar soğuk aseton eklendi ve 60 dk -20 °C’de bekletildi. Bu işlem pellet tamamen beyazlaşana kadar tekrarlandı.
13. Rengi beyazlaşan protein çökeltisi aseton kokusu gidene kadar oda sıcaklığında steril bir alanda bekletildi.
14. Aseton kokusu tamamen gittikten sonra protein çökeltisi üzerine her 1 g örnek için 500-750 µL kadar çözündürme solüsyonu eklendi ve proteinlerin tamamen çözülmesi sağlandı.
15. Örnekler 14.000 rpm’de 22 °C’de 30 dk santrifüj edildi ve varsa kalıntılar uzaklaştırılarak süpernatant Lo-bind tüplere alınarak sıvı azotta donduruldu ve -80 °C’de analiz gününe kadar saklandı.

Aynı anda aynı örneklerden yapılan ikinci bir izolasyonda kontrol amaçlı olarak PEG çöktürmesi yapılmadan izolasyon basamakları gerçekleştirildi ve her iki izolasyondan elde edilen örnekler jel üzerinde yürütülerek analiz edildi.

### **Protein İzolasyonu Aşamasında Kullanılan Tamponlar:**

#### **MgNP40 Lizis Tamponu**

Tris-HCl (1 M, pH 8,3)

600 µL Igepal CA 630

MgCl<sub>2</sub> (200 mM)

100 mM PMSF

600 µL β-merkaptoetanol

10,5 mL ultra saf su

#### **Çözündürme Solüsyonu**

Tris (30 mM)

Üre (7 M)

Tiyoüre (2 M)

Magnezyum asetat (5 mM)

CHAPS (%4)

### 3.6.2. Protein Konsantrasyon Tayini

İzole edilen protein konsantrasyonu Bradford, BCA (Multiscan FC, Thermo Scientific) ve Lowry (NanoDrop1000, Thermo Scientific) yöntemlerine göre belirlendi. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi protein izolasyonu sonrası, SDS-PAGE öncesi ve 2D öncesi olmak üzere her analiz öncesinde tekrarlandı.

### 3.6.3. İzole Edilen Proteinlerin Elektroforetik Ayırımı

#### 3.6.3.1. Sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

PEG çöktürmesi yapılmış ve yapılmamış protein örnekleri, genel profillerinin ve örnek temizliklerinin incelenmesi için %12'lik SDS poliakrilamid jel elektroforezine (%4'lük yığınlama ve %12'lik ayırma) yüklendi. Her grup için küçük bir tüp alınarak içerisine 1 µL örnek, 10 µL yükleme boyası ve 4 µL ultra saf su konularak karıştırıldı. Ardından tüpler kaynar suda 5 dakika bekletildi ve süre sonunda buz üstüne alındı. Tüpler içerisindeki karışım alınarak toplam 15 µL hacimde kuyucuklara yükleme yapıldı. Örneklerin yürümesi 180 V'ta gerçekleştirildi. Süre sonunda jeller dikkatlice alınarak proteinler metanol/asetik asit/su (40:10:50) karışımında bir saat fikse edildi. Bir saatin ardından jeller Blue Silver Commasie Boya içerisinde boyandı. Boyanan jellerin her biri ayrı temiz bir kap içerisine konularak üzerine tüm jeli kapatacak kadar su konuldu ve kaplar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. 24 saat süre ile jellerin renklerinin açılması beklendi. Bu aşamada su belirli aralıklarla değiştirildi. Jellerin rengi iyice açıldıktan sonra görüntüleme cihazı içerisinde fotoğraflandı ve elde edilen profiller analiz edildi.

#### **Yükleme Boyası**

Tris-HCL (0,5 M, pH 6,8)

Gliserol (%99,7)

SDS (%10)

β-merkaptolanol

Brom fenol mavisi (%0,5)

### 3.6.3.2. İki boyutlu jel elektroforezi

İki boyutlu jel elektroforezinin ilk basamağı olan izoelektrik odaklamada ilk olarak 7 cm'lik IPG (pH 3-10 ReadyStrip, BioRad) şeritleri kullanıldı. Bu aşamada PEG çöktürmesi yapılan ve yapılmamış olan örnekler ayrı ayrı yüklenerek odaklandı ve ikinci boyut ayırımı da yapıldıktan sonra görüntü profilleri incelendi. Elde edilen profillerden sonra analizin geri kalanı için PEG çöktürmesi yapılmış örneklerin kullanılması kararlaştırıldı. Ardından bu örnekler 17 cm'lik IPG (pH 3-10 ReadyStrip, BioRad) şeritlerinde odaklandıktan sonra jel profilleri incelendi ve proteinlerin büyük bir kısmının pH 7 civarında olduğu tespit edildi. Bu aşamadan sonra daha fazla protein lekesi elde edebilmek amacıyla pH 5-8 IPG şeritlerinin kullanılmasına karar verildi. İlk olarak 11 cm'lik IPG (pH 5-8 ReadyStrip, BioRad) şeritlerinden elde edilen profiller incelendi ve ardından 17 cm'lik IPG (pH 5-8 ReadyStrip, BioRad) şeritleri kullanılarak proteinlerin ayrılmaları sağlandı. Analizin geri kalan kısmında bu ayırımlardan elde edilen proteinler kullanıldı. Tüm bu analizler için aşağıdaki basamaklar izlendi.

1. İlk olarak izole edilen protein örneklerinden 7 cm IPG şeritleri için 25µg, 11 cm IPG şeritleri için 150 µg, 17 cm IPG şeritleri için ise 200 µg protein örneği, 2D rehidrasyon tamponu ile karıştırılıp içerisine şeridin pH'sına uygun %1 Amphylote ve %1 TBP eklendi.
2. IPG şeritleri odaklama kaseti içerisine dikkatli bir şekilde yerleştirildi ve hazırlanan karışım cup loading yöntemiyle şeritlerin üzerine yerleştirildi ve 50 µA/IPG şerit akım uygulandı.
3. Akım uygulaması başladıktan 30 dakika sonra şeritler üzerine 2-3 mL mineral yağ ilave edilerek aynı akımda bir gece boyunca rehidrasyona bırakıldı (20 °C) (Protean IEF Cell-Biorad).
4. Ertesi gün şeritler üzerindeki fazla yağ temizlenerek yeni bir odaklama kaseti içerisine yerleştirildi. Şerit üzerine tekrar mineral yağ eklendi ve kaset yeniden PROTEAN IEF (Biorad) içerisine yerleştirildi.

5. Proteinler adım adım akımı yükselten üç aşamalı bir program ile 20°C’de odaklandı (7 cm'lik IPG şeritleri için S1:250V 20 dk, S2: maksimum voltaj artışı hızlı, S3: 4.000 volt/IPG Lineer. 11 cm’lik IPG şeritleri için S1: 250V 20 dk, S2: maksimum voltaj artışı hızlı, S3: 8.000 volt/IPG Lineer. 17 cm'lik IPG şeritleri için S1: 250V 20 dk, S2: maksimum voltaj artışı hızlı, S3: 10.000 volt/IPG Lineer).
6. Odaklama sonrasında şeritler tampon I ve tampon II içerisinde 30 dk’lık sürelerle yıkandı.
7. Şeritler bu aşamadan sonra hazırlanan SDS poliakrilamid jellere (%12) yerleştirilerek elektroforez (35 mA 30 dk, 48 mA 5 saat, 16 °C’de) ile moleküler büyüklüklerine göre ikinci boyutta (2D) ayırma tabii tutuldu.
8. İkinci boyutta ayırım sırasında kullanılacak jeller için jel farklılığını ortadan kaldırmak amacıyla 17 cm’lik şeritler için Dodeca (BioRad) jel dökme, jel yürütme ve boyama sistemi kullanıldı. Bu sistemde her deney düzeneği için hazırlanan tüm jeller aynı anda sistemde yürütüldü. Elektroforez sonrasında jeller %40 metanol, %10 asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edildi ardından SyproRuby (BioRad) boyası içerisinde gece boyu boyandı.

2D Aşamasında Kullanılan Tamponlar:

### **2D Rehidrasyon Tamponu**

Üre (8 M)

Tiyoüre (2 M)

CHAPS (%2)

DTT (50 mM)

Amfolit (%0,2)

Bromfenol mavisi (%0,02)



### **Tampon I**

Üre (6 M)

Tris-HCL (0,375 M, pH 8,8)

SDS (%2)

Gliserol (%20)

DTT (%2 (w/v))

### **Tampon II**

Üre (6 M)

Tris-HCl (0,375 M, pH 8,8)

SDS (%2)

Gliserol (%20 )

İyodoasetamid (%2 (w/v))

#### 3.6.3.3. 2D DIGE

Örnekler 2D jel elektroforezinde IPG şeritlerinde ayırma tutulmadan önce floresan siyanin boyalar Cy2, Cy3 ve Cy5 boylarıyla işaretlendiler. İzole edilen protein örnekleri DIGE işaretlemesine uygun tampon içerisinde çözüldükten sonra CyDye DIGE Flour Cy5 işaretleme kiti (GE Healthcare, ABD) kullanılarak her iki tür için kontrol grupları Cy3, kurak grupları Cy5 ve karışımlar Cy2 ile işaretlendi.

### **DIGE İşaretleme Tamponu (pH 8)**

Üre (7 M)

Tiyüre (2 M)

Tris (10 mM, pH 8)

Magnezyum asetat (5 mM)

CHAPS (%4 )

### *Floresan Cye Boyalarının Hazırlanması*

-20 °C'de saklanan Cye boyaları oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve kristal haldeki boyaların üzerine 5 µL dimetilformamid (DMF) eklendi. Ardından 30 saniye (sn) vorteksledi ve 30 sn 12.000 g'de oda sıcaklığında santrifüj edilerek Cye stok boyası çalışma solüsyonu hazırlandı. 0,5 µL Cye boyası stok solüsyonuna 0,75 µL DMF eklendi, bu karışım 50 µg protein örneğini işaretlemek için yeterlidir. Daha fazla protein işaretlemek için işaretlenecek protein miktarıyla doğru orantılı olarak DMF ve Cye boyalarının miktarları arttırıldı.

### *Proteinlerin Floresan Cye Boyaları İle İşaretlenmesi*

Bir mikrosantrifüj tüpüne yeterince protein ( 7 cm IPG şeritleri için 50 µg, 11 cm IPG şeritleri için 125 µg, 17 cm IPG şeritleri için 200 µg) alındı. Üzerine 1 µL daha önce seyreltilmesi yapılmış cye boyası çalışma solüsyonu ilave edildi. Karışım kısa bir süre santrifüj edildikten sonra buz üzerinde 30 dk karanlıkta bekletildi. Bu karışımın üzerine 10 mM Lizin'den 1 µL ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Karışım pipetlenerek karıştırıldı ve kısa süre santrifüj edildikten sonra 10 dk buz üzerinde karanlıkta bekletildi ve proteinlerin floresan boyalarla işaretlenmesi sağlandı.

### *Cye Boyalar ile İşaretlenen Örneklerin IPG Şeritlerine Yüklenmesi*

Örneklerin üzerine örnek hacmi kadar 2X örnek tamponu eklendi ve buzun üzerinde 10 dk bekletildi. Aynı jel üzerinde yürütülen farklı floresan boyalar ile işaretlenmiş örnekler karıştırıldıktan sonra rutin odaklama ve 2D protokolü takip edildi.

### **2X Örnek Tamponu**

Üre (8 M)

DTT (130 mM)

CHAPS (%4 w/v)

Amfolit (%2 w/w)

#### 3.6.4. 2D Jellerinin Görüntülenmesi, Protein Leke Analizi ve Leke Kesimi

Boyama sonrası elde edilen jeller dikkatli bir şekilde alınarak, aşağıdaki basamakların izlenmesiyle görüntülendi ve protein leke analizleri yapıldı.

1. Boyama işleminden sonra jellerin görüntülenmesi VersaDoc sistemi (BioRad, USA) ile uygun ışık kaynağı ve filtreler kullanılarak yapıldı.
2. Jellerin ilk değerlendirmeleri QuantityOne programı (BioRad, USA) kullanılarak yapıldı. Proteinlerin leke kaliteleri gözlenerek analiz için uygun boyutlarda görüntüler saklandı.
3. Protein lekelerinin analizi ve jellerin karşılaştırması PDQuest Advanced programı (BioRad, USA) ile yapıldı.
4. Bu analiz esnasında jellerdeki lekeler tüm gruplar arasında ve gruplar içerisinde tespit edilerek birbirleri ile karşılaştırıldı, istatistikî açıdan farklılaşan ve tanımlama için uygun olan protein lekelerinin kesimi Lekekesim robotu (BioRad) ile yapıldı. Bu işlem sırasında 1 ve 1,5 mm'lik otomatize uçlar kullanarak lekeler kesildi ve 96 kuyucuklu plaka içerisine örnekler toplandı.

#### 3.6.5. Jel İçi Tripsin Kesimi ve MALDI TOF/TOF MS Analizi

Kesilen her bir protein lekesi jel içi triptik kesime tabii tutuldu (In-Gel Tryptic Digestion Kit, Thermo Scientific). Peptidlerin tanımlamaları Abi Sciex'in MALDI TOF/TOF 5800 serisi cihazını kullanarak yapıldı. Triptik peptidler jel matriksinden 5µL %50 aseto nitril (ACN) ve %0,1 trifluoro asetik asit (TFA) ile özütlendi. Daha sonra C<sub>18</sub> ZipTip pipet uçları kullanarak (Millipore) %0,1 TFA ile 2µL'ye konsantre edildi. Peptidler, 0,8 µL örnek 0,2 µL matriks solüsyonu (%50 ACN ve %0,1 TFA içerisinde 10 mg/mL R-siyano-4-hidroksisünamik asit) ile karıştırılarak doğrudan MALDI plakası üzerine yerleştirildi. MALDI plakası üzerine yerleştirilen örneklerin hava ile kuruması sağlandı. MALDI kalibrasyonu eksternal (dışsal) veya internal

(içsel) kalibrant kullanılarak yapıldı ve her bir spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanıldı. Elde edilen tüm spektrumlar (m/z), MASCOT bilgi bankasında analiz edildi.

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel analizler SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Değerlerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tüm değerlerin normal dağılım gösterdikleri sonucuna ulaşıldı. Değerlerin nohut türleri ve kuraklık stresi bakımından karşılaştırılması amacıyla Student-T analiz testi kullanıldı.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1 BULGULAR

#### 4.1.1. Kök ve Sürgün Boylarında Meydana Gelen Değişimler

Kuraklık stresi her iki türde de sürgün boyunu anlamlı derecede değiştirmezken, kök boylarını azaltmıştır. Kuraklığa maruz bırakılan kültür türünün kök boyu kontrole ve yabancı türe göre kısa bulunmuştur (Tablo 4.1.). Kök boylarında meydana gelen azalmalar her iki tür içerisinde ve türler arasında istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P<0,05$ ).

Çizelge 4.1. Kuraklık stresinin kök ve sürgün boyları üzerine etkisi.

<i>Cicer arietinum</i>		<i>Cicer reticulatum</i>	
<b>Kök Boyu (cm)</b>			
Kontrol	Kurak	Kontrol	Kurak
25,81±2,83	18,57±1,93*	24,43±2,64	21,00±0,87*
<b>Sürgün Boyu (cm)</b>			
27,50±2,22	27,07±2,53	29,71±2,43	28,50±2,19

\*İstatistiksel olarak %5 düzeyinde anlamlıdır (n=10).

#### 4.1.2. Yaprak Su Potansiyelinde Meydana Gelen Değişimler

Yaprak su potansiyeli kuraklık stresiyle birlikte her iki türde de belirgin bir şekilde azalmıştır. Stres altında *C. arietinum*'un yaprak su potansiyelindeki düşüş *C. reticulatum*'a göre çok daha belirgindir (Tablo 4.2.). Meydana gelen azalmalar her iki tür içerisinde ve türler arasında istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P<0,001$ ).

Çizelge 4.2. Kuraklık stresinin yaprak su potansiyeli üzerine etkisi.

<b>Yaprak Su Potansiyeli (MPa)</b>			
<i>Cicer arietinum</i>		<i>Cicer reticulatum</i>	
Kontrol	Kurak	Kontrol	Kurak
-0,69±0,03	-2,01±0,09***	-0,67±0,07	-1,33±0,07***

\*\*\*İstatistiksel olarak %0,1 düzeyinde anlamlıdır (n=5).

#### 4.1.3. Yaprak Oransal Su İçeriğinde Meydana Gelen Değişimler

Her iki türdeki yaprak oransal su içeriği kuraklık stresiyle birlikte kontrollere göre azalmıştır. Bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,001). Yaprak oransal su içeriği *C. arietinum*'da yaklaşık olarak %25 azalırken, *C. reticulatum*'da ise bu azalış %15 civarındadır (Tablo 4.3.). İki tür arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0,01).

Çizelge 4.3. Kuraklık stresinin yaprak oransal su içeriği üzerine etkisi.

<b>Yaprak oransal su içeriği (%)</b>			
<i>Cicer arietinum</i>		<i>Cicer reticulatum</i>	
Kontrol	Kurak	Kontrol	Kurak
82,89±3,13	62,51±3,12***	83,83±2,12	71,03±2,95***

\*\*İstatistiksel olarak %0,1 düzeyinde anlamlıdır (n=5).

#### 4.1.4. Serbest Prolin Miktarında Meydana Gelen Değişimler

Kuraklık stresiyle birlikte her iki türde de prolin miktarı kontrole göre belirgin bir şekilde artmıştır. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,001). Kuraklığa maruz bırakılan *C. reticulatum* türünün prolin miktarı *C. arietinum*'dan yaklaşık dört kat daha yüksektir (Tablo 4.4.). İki tür arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0,01).

Çizelge 4.4. Kuraklık stresinin serbest prolin miktarı üzerine etkisi.

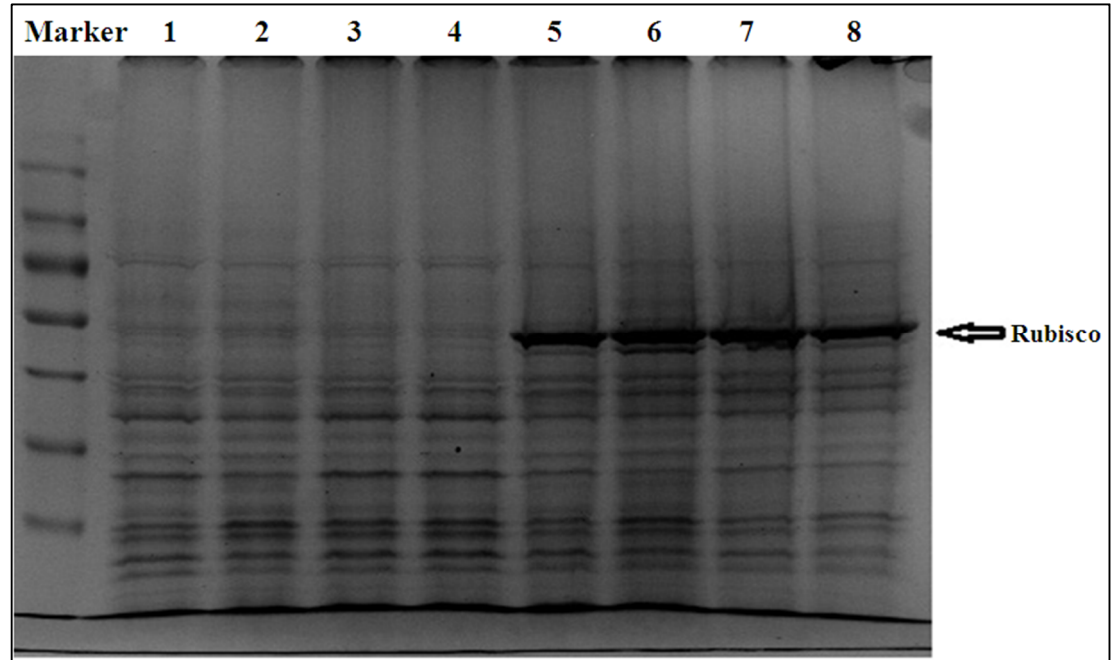
Serbest Prolin ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ TA)			
<i>Cicer arietinum</i>		<i>Cicer reticulatum</i>	
Kontrol	Kurak	Kontrol	Kurak
0,50 $\pm$ 0,07	6,61 $\pm$ 0,78***	0,89 $\pm$ 0,08	23,36 $\pm$ 1,75***

\*\*\*İstatistiksel olarak %0,1 düzeyinde anlamlıdır (n=5).

#### 4.1.5. Protein Analizleri

##### 4.1.5.1. SDS-PAGE analizleri

İzolasyon sonrası elde edilen örneklerin %12'lik SDS-PAGE görüntüleri alınmıştır. Elde edilen profiller incelendiğinde PEG çöktürmesi yapılmamış izolasyon örneklerindeki Rubisko enziminin miktarının oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir. PEG çöktürmesi yapılan grupta ise Rubisko enziminin büyük ölçüde uzaklaştırıldığı, bunun yanında diğer protein lekelerinde ise önemli değişikliklerin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.1.).

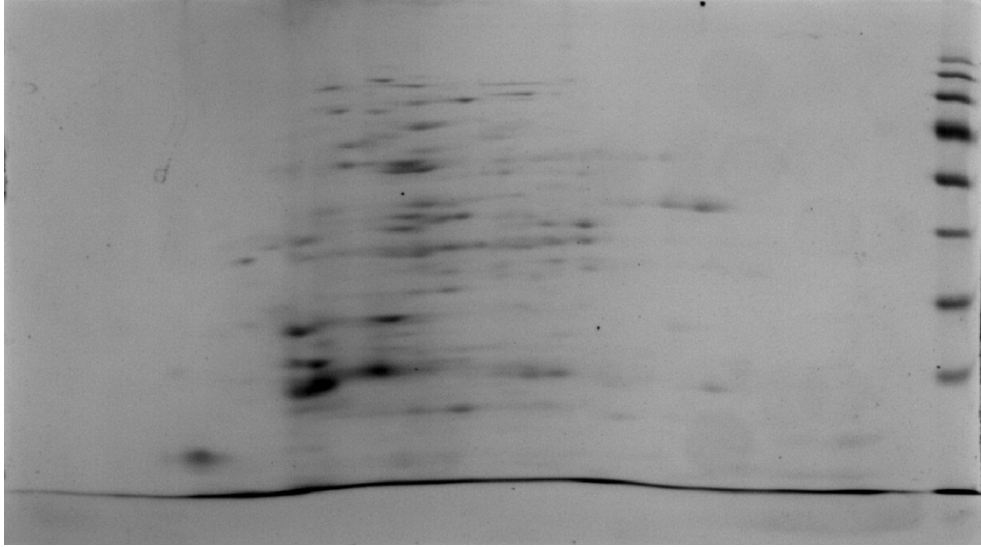


Şekil 4.1. İzolasyonlar sonrası elde edilen PEG çöktürmesi yapılmış (1-4) ve PEG çöktürmesi yapılmamış (5-8) proteinlerin %12 SDS-PAGE görüntüsü.

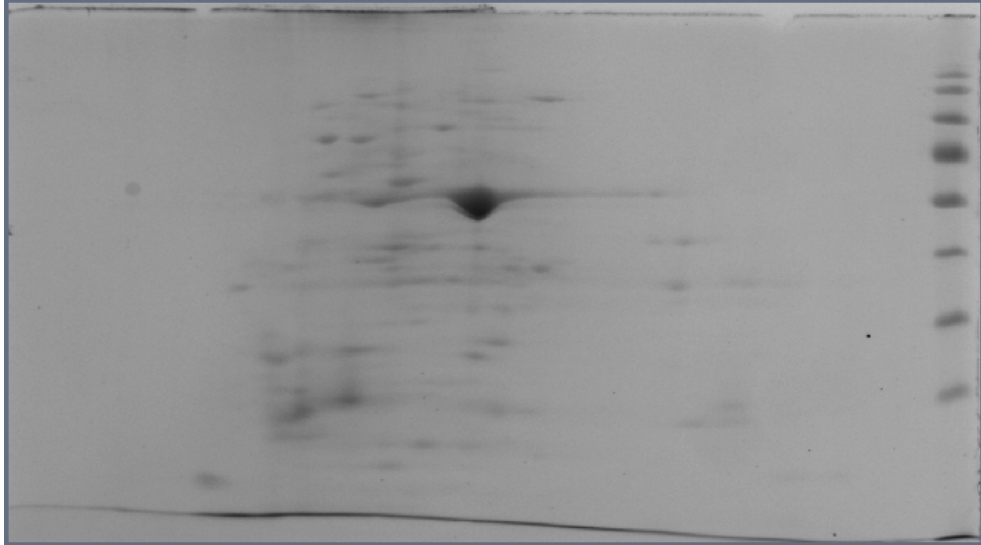
#### 4.1.5.2. 2D Jel elektroforezi analizleri

*C. arietinum*'un kurak grubuna ait protein örneklerinin PEG çöktürmesi yapılmış (Şekil 4.2A.) ve PEG çöktürmesi yapılmamış (Şekil 4.2B.) protein profilleri 2D (7 cm, pH 3-10) jel elektroforezinde de karşılaştırılmıştır. Bu profillerde de SDS-PAGE profilinde olduğu gibi Rubisko enziminin büyük bir alanı kapladığı görülmüştür.

A)



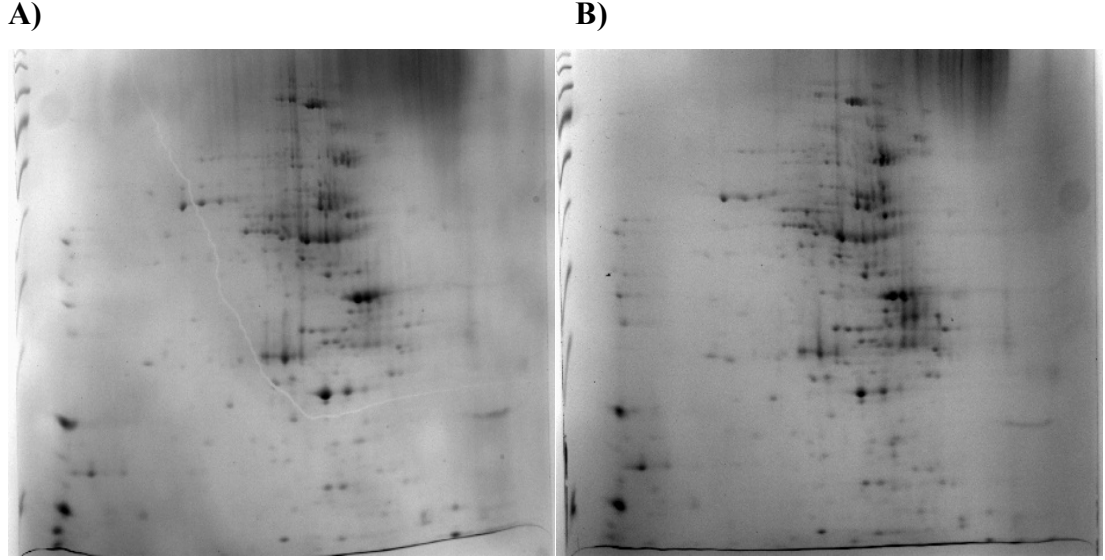
B)



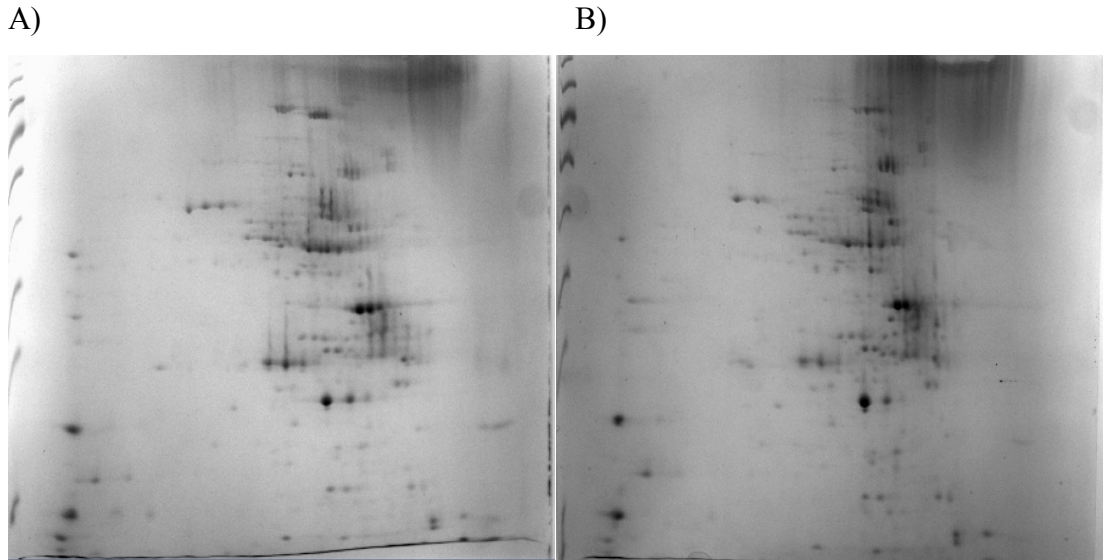
Şekil 4.2. *C. arietinum* kurak grup A) PEG çöktürmesi yapılmış, B) PEG çöktürmesi yapılmamış protein örneklerinin 7 cm (pH 3-10) 2D jel görüntüleri.



*C. arietinum* kontrol ve kurak gruplarından izole edilen proteinlerin 17 cm 2D (pH 3-10) (Şekil 4.3.) ve *C. reticulatum* kontrol ve kurak gruplarından izole edilen proteinlerin 17 cm 2D (pH 3-10) (Şekil 4.4.) jel profilleri incelendiğinde protein lekelerinin büyük bir kısmının pH 6-7 civarında toplandığı belirlendi.



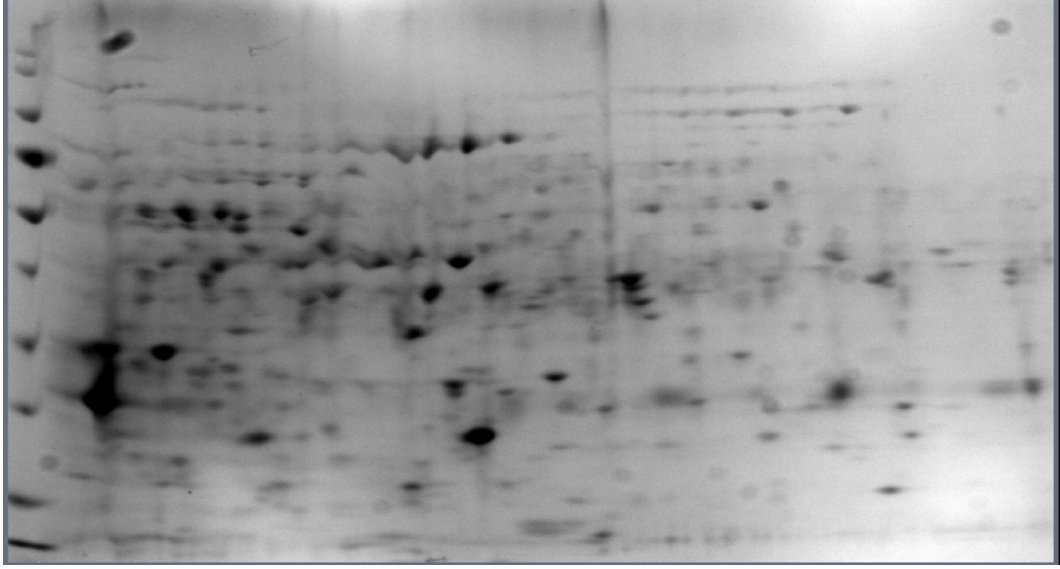
Şekil 4.3. *C. arietinum* **A)** Kontrol grubundan **B)** Kurak grubundan izole edilen proteinlerin 17 cm (pH 3-10) 2D jel görüntüsü.



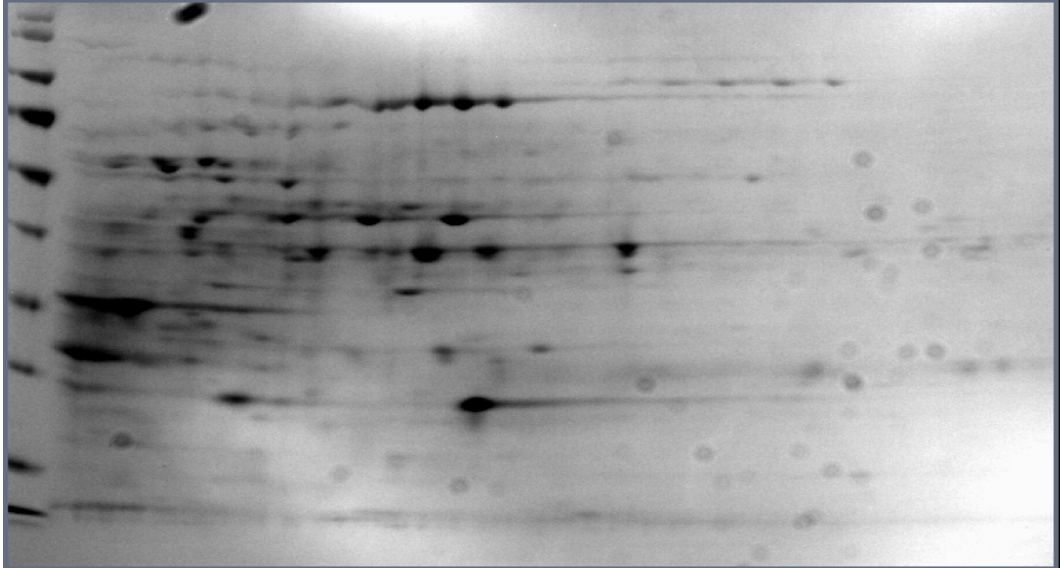
Şekil 4.4. *C. reticulatum* **A)** Kontrol grubundan **B)** Kurak grubundan izole edilen proteinlerin 17 cm (pH 3-10) 2D jel görüntüsü.

*C. arietinum*'a ait 11 cm 2D (pH 5-8) jel profilleri (Şekil 4.5.) ve *C. reticulatum*'a ait 11 cm 2D (pH 5-8) jel profilleri (Şekil 4.6.) incelendiğinde, 17 cm'lik (pH 3-10) IPG şeritlerinde pH 6-7 civarında toplanan protein lekelerinin çok daha iyi ayrıldıkları ve daha fazla protein lekесinin belirlenebildiği görüldü.

A)

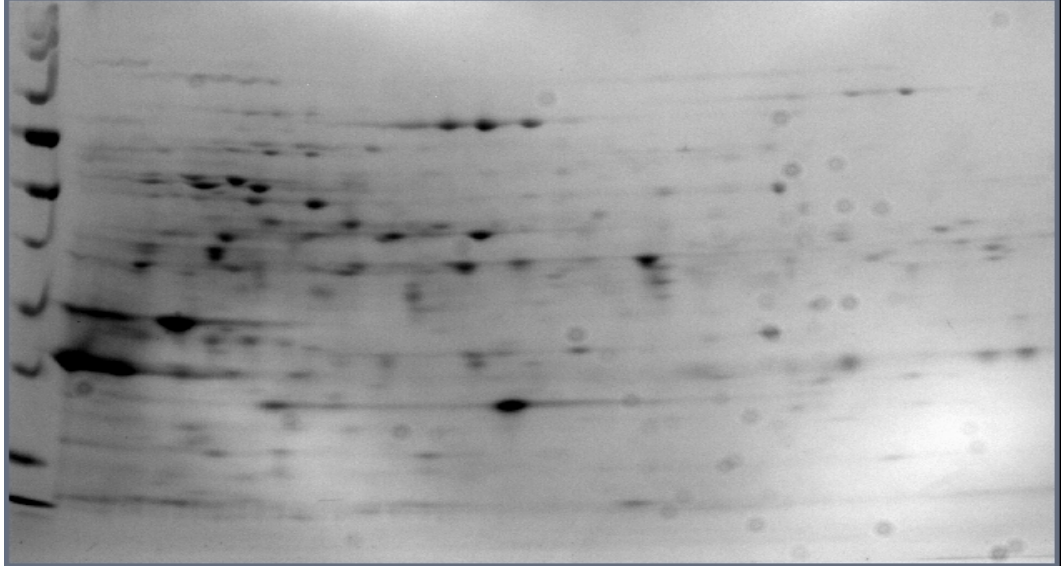


B)

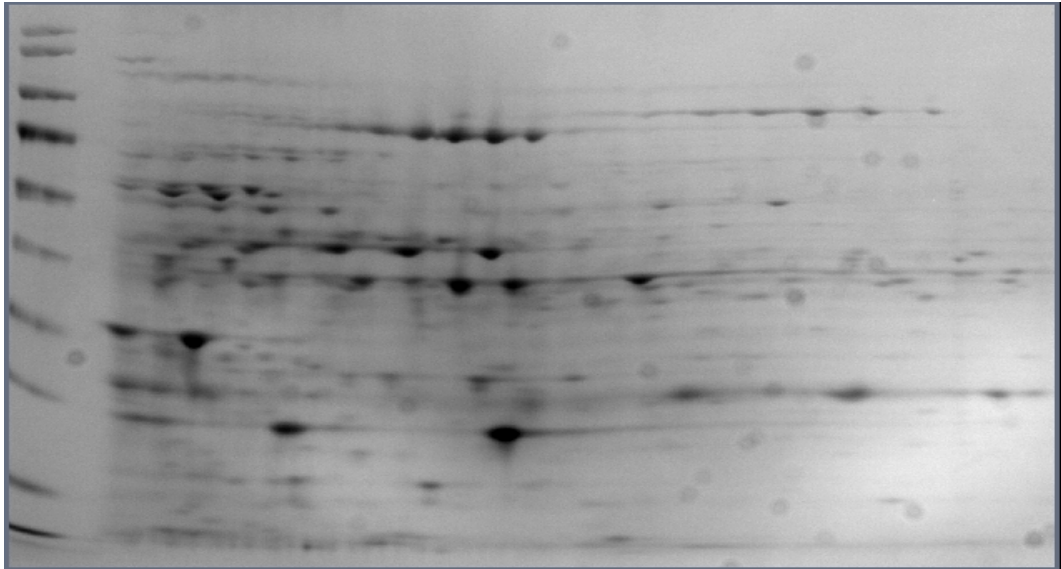


Şekil 4.5. *C. arietinum* A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen proteinlerin 11 cm (pH 5-8) 2D jel görüntüsü.

A)



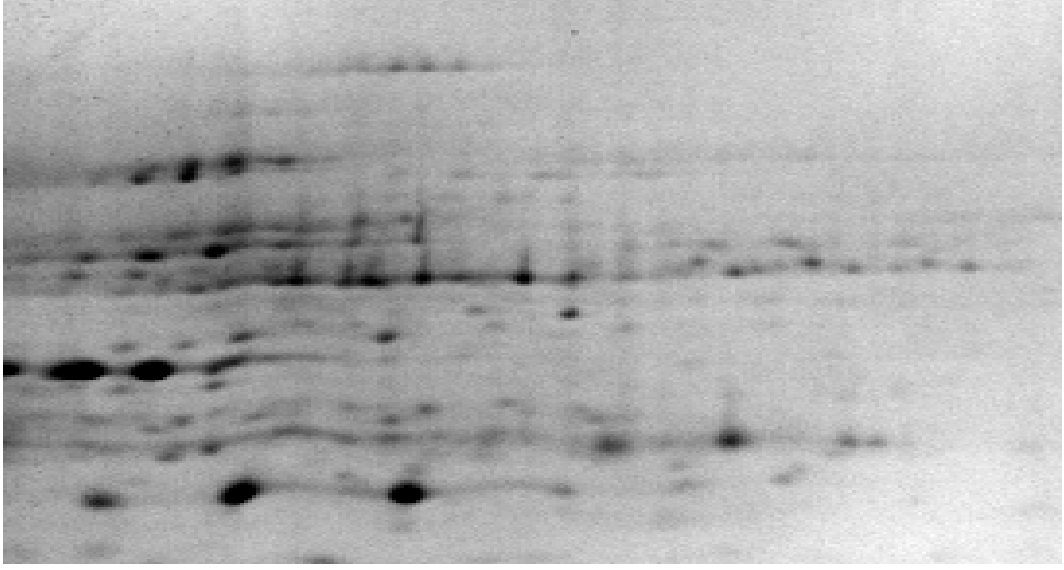
B)



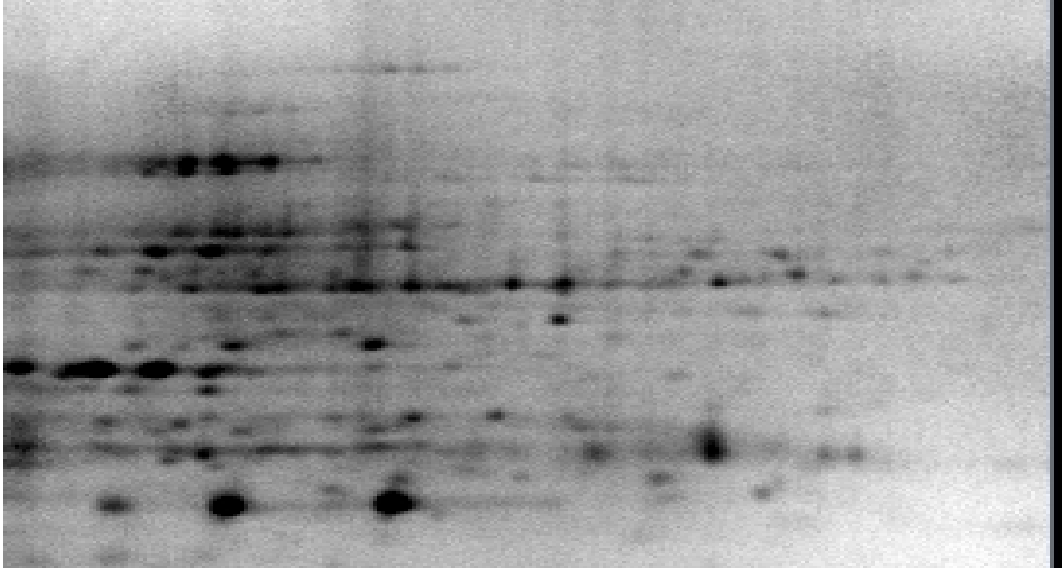
Şekil 4.6. *C. reticulatum* A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen proteinlerin 11 cm (pH 5-8) 2D jel görüntüsü.

2D DIGE analizleri öncesinde *C. arietinum* (Şekil 4.7.) ve *C. reticulatum*'a (Şekil 4.8.) ait örneklerden izole edilen proteinin 17 cm (pH 5-8) jellerindeki protein profilleri incelendi ve protein leke sayılarının ve kalitelerinin oldukça iyi olduğu görüldü.

**A)**

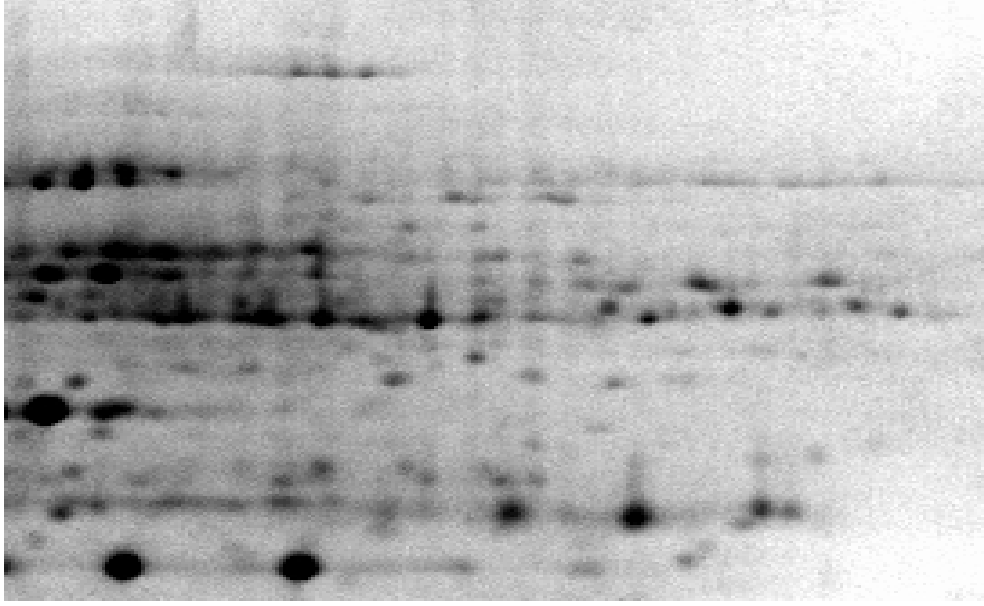


**B)**

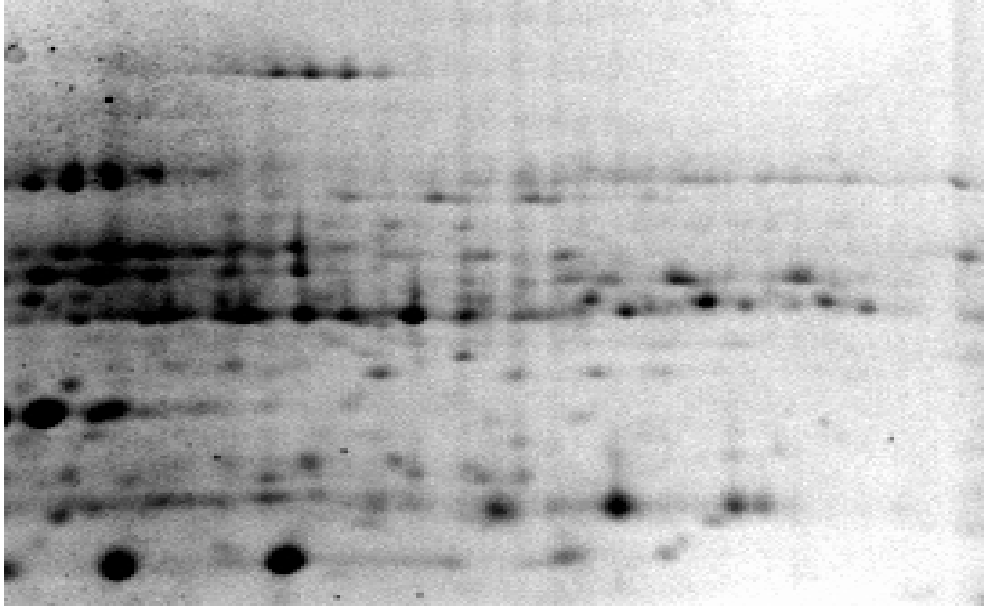


Şekil 4.7. *C. arietinum* A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen örneklerin 17 cm (pH 5-8) 2D jel görüntüsü.

A)



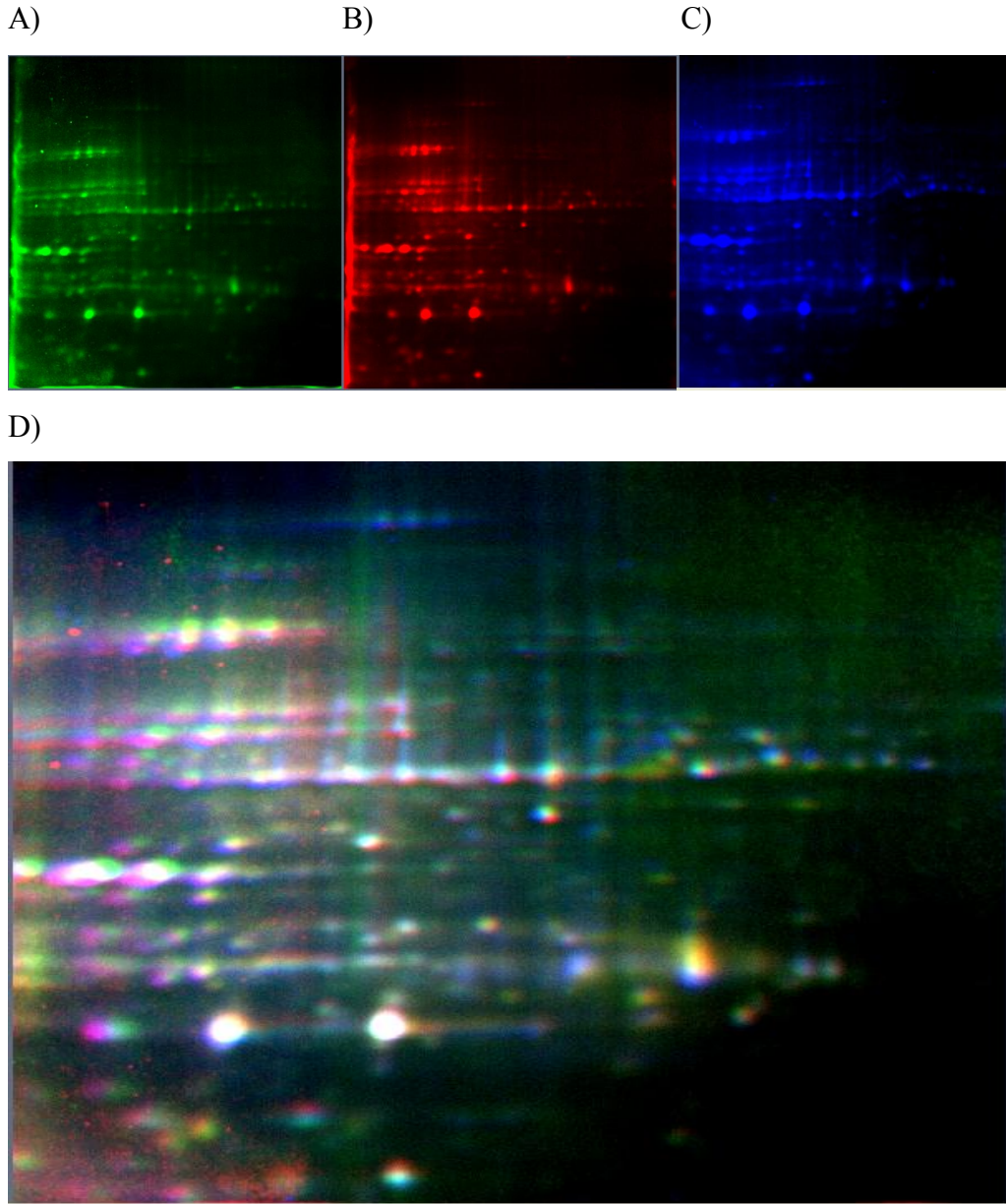
B)



Şekil 4.8. *C. reticulatum* A) Kontrol grubundan B) Kurak grubundan izole edilen örneklerin 17 cm (pH 5-8) 2D jel görüntüsü.

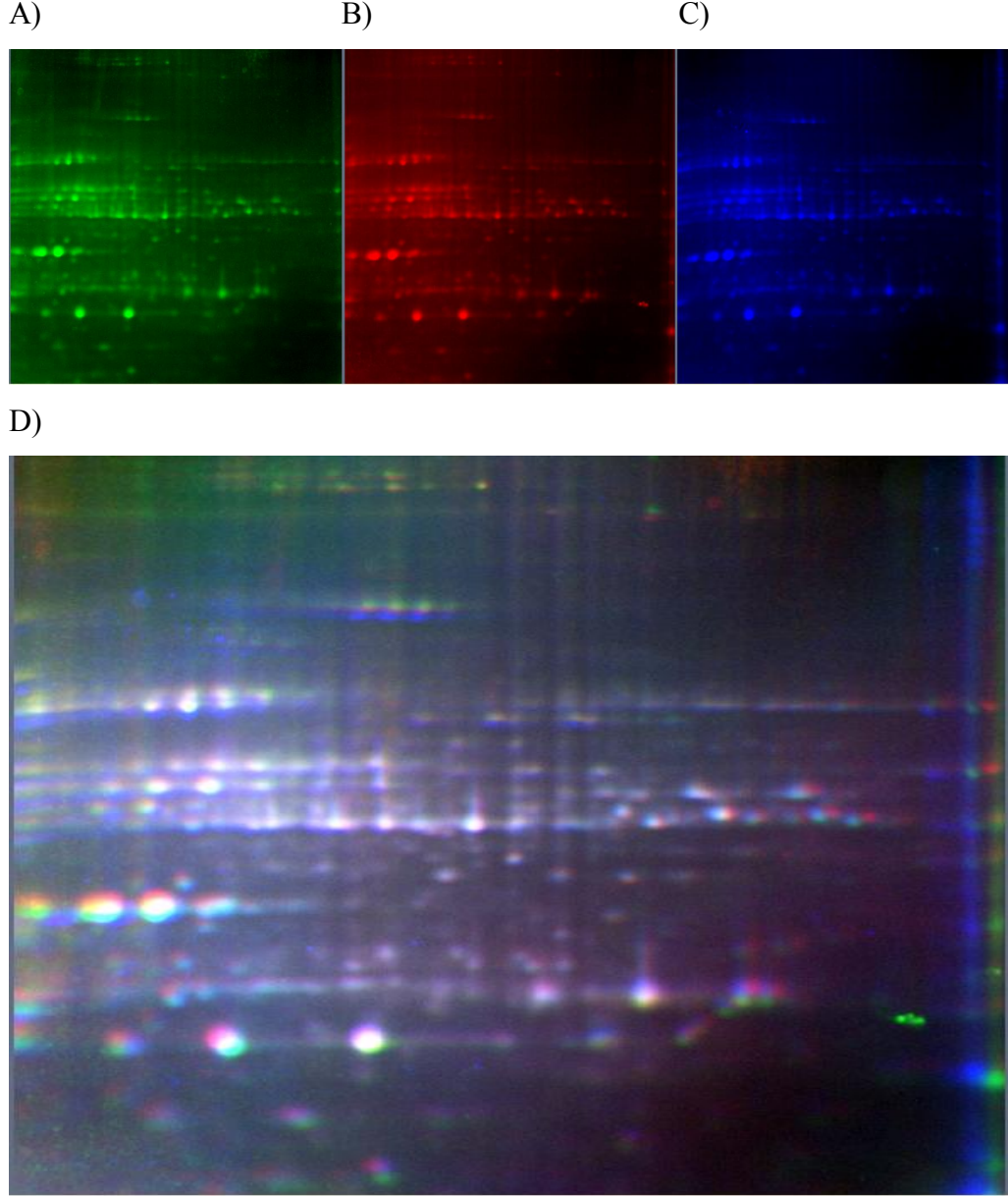
#### 4.1.5.3. 2D DIGE analizleri

17 cm pH 5-8 IPG şeritlerinde odaklanmadan önce Cy2, Cy3 ve Cy5 boylarıyla işaretlenen proteinlerin 2D-DIGE jel analizleri sonucunda sağlıklı değerlendirme yapabilmek için en belirgin protein lekeleri seçilerek analiz edilmiştir. *C. arietinum* kontrol grubunda ortalama  $670 \pm 13$ , kurak grubunda ise ortalama  $675 \pm 15$  protein lekeleri belirlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. *C. arietinum* türünden izole edilen proteinlerin A) Kontrol B) Kurak C) Karışım D) Üstüste çakıştırılmış 2D DIGE jel görüntüleri.

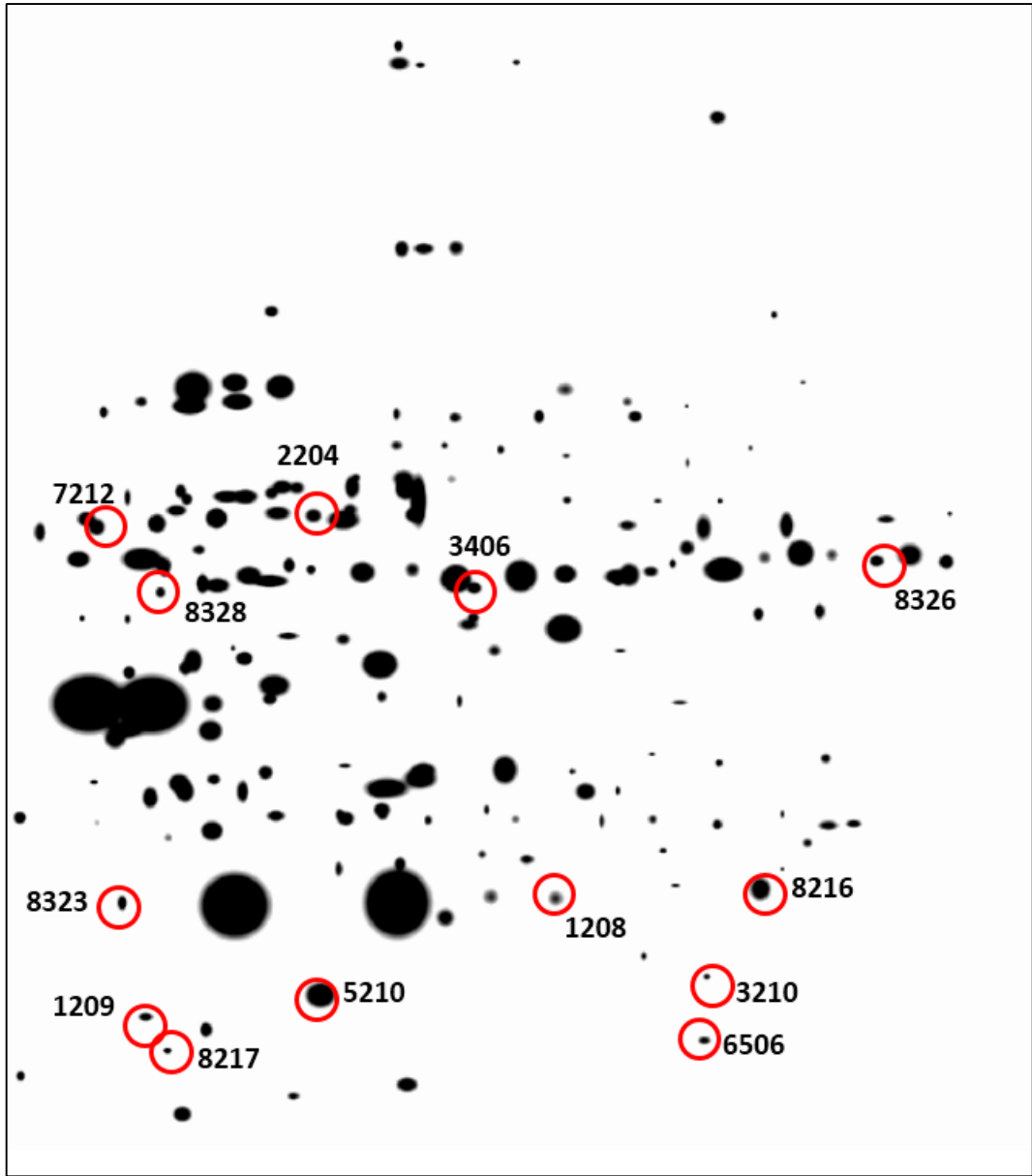
*C. reticulatum* kontrol grubunda ortalama  $685 \pm 10$  ve kurak grubunda ise ortalama  $680 \pm 10$  protein lekesi belirlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. *C. reticulatum* türünden izole edilen proteinlerin A) Kontrol B) Kurak C) Karışım D) Üstüste çakıştırılmış 2D DIGE jel görüntüleri.

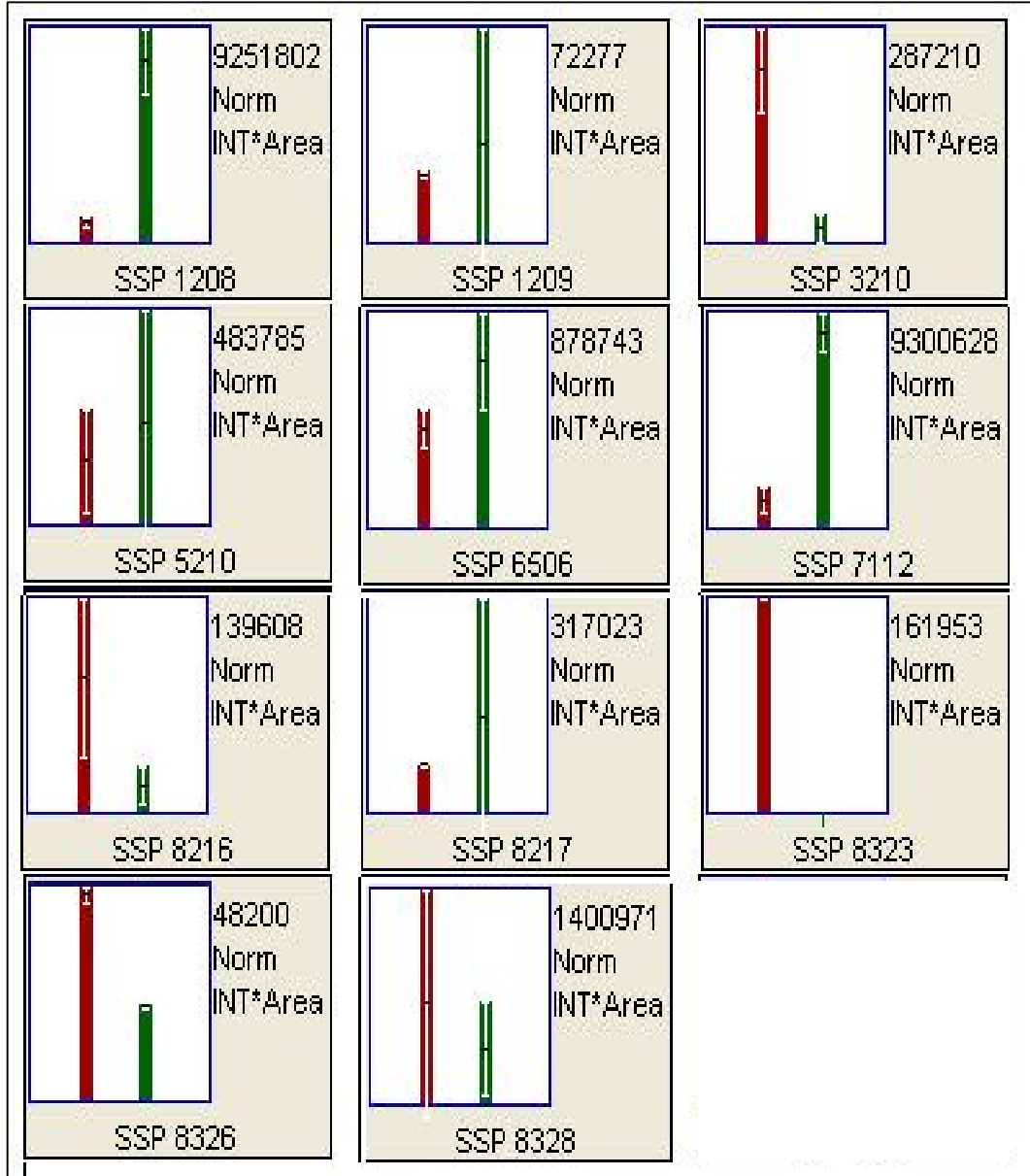
### Kuraklık stresinde *C. arietinum* türünde ifadesi değişen proteinler

2D DIGE profillerine göre ifadesinde belirgin farklar olan protein lekeleri (Şekil 4.11.) kesilerek kütle spektrometresinde analiz edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan 11 proteinin kimlik tanısı yapılmıştır (Çizelge 4.1.). Bu proteinlerden 6 tanesinin ifadesi kuraklık stresıyla birlikte artarken, 5 tanesinin azalmıştır (Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. *C. arietinum* türüne ait protein lekelerinin sanal jel görüntüleri ve kuraklık stresıyla birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri.





Şekil 4.12. Kuraklık stresinde *C. arietinum*'da kesilen lekelerdeki proteinlerin ifade durumlarındaki değişim oranlarının grafikleri (Kontrol grubu kırmızı bar, Kurak grubu yeşil bar).

*C. arietinum*'da kesilen protein lekelerinin analizi sonucunda elde edilen proteinlerin buldukları yerler incelendiğinde bunların 7 tanesinin kloroplastta, 3 tanesinin sitozolde ve 1 tanesinin de mitokondride bulunduğu görüldü (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Kütle spektrometresinde analiz edilen *C. arietinum*'a ait proteinlerin leke numaraları, adları, buldukları yerler ve ifade durumları.

Leke No	Swissprot No	Protein Adı	Bulunduğu Yer	İfadesi
1208	P14226	Oksijen oluşumunu arttıran protein 1	Kloroplast	Arttı
1209	P27490	Klorofil a/b bağlama proteini 8	Kloroplast	Arttı
3210	P16059	Oksijen oluşumunu arttıran protein 2	Kloroplast	Azaldı
5210	Q9LW57	Plastid lipitleriyle ilişkili protein	Kloroplast	Arttı
6506	P84733	Sitokrom c oksidaz altünite 2	Mitokondri	Arttı
7112	P42896	Enolaz	Sitozol	Arttı
8216	P17067	Karbonik anhidraz	Kloroplast	Azaldı
8217	Q9FE01	L-askorbat peroksidaz	Sitozol	Arttı
8323	P52579	İzoflavon redüktaz	Sitozol	Azaldı
8326	P10933	Ferredoksin NADP redüktaz	Kloroplast	Azaldı
8328	Q01516	Fruktoz bifosfat aldolaz	Kloroplast	Azaldı

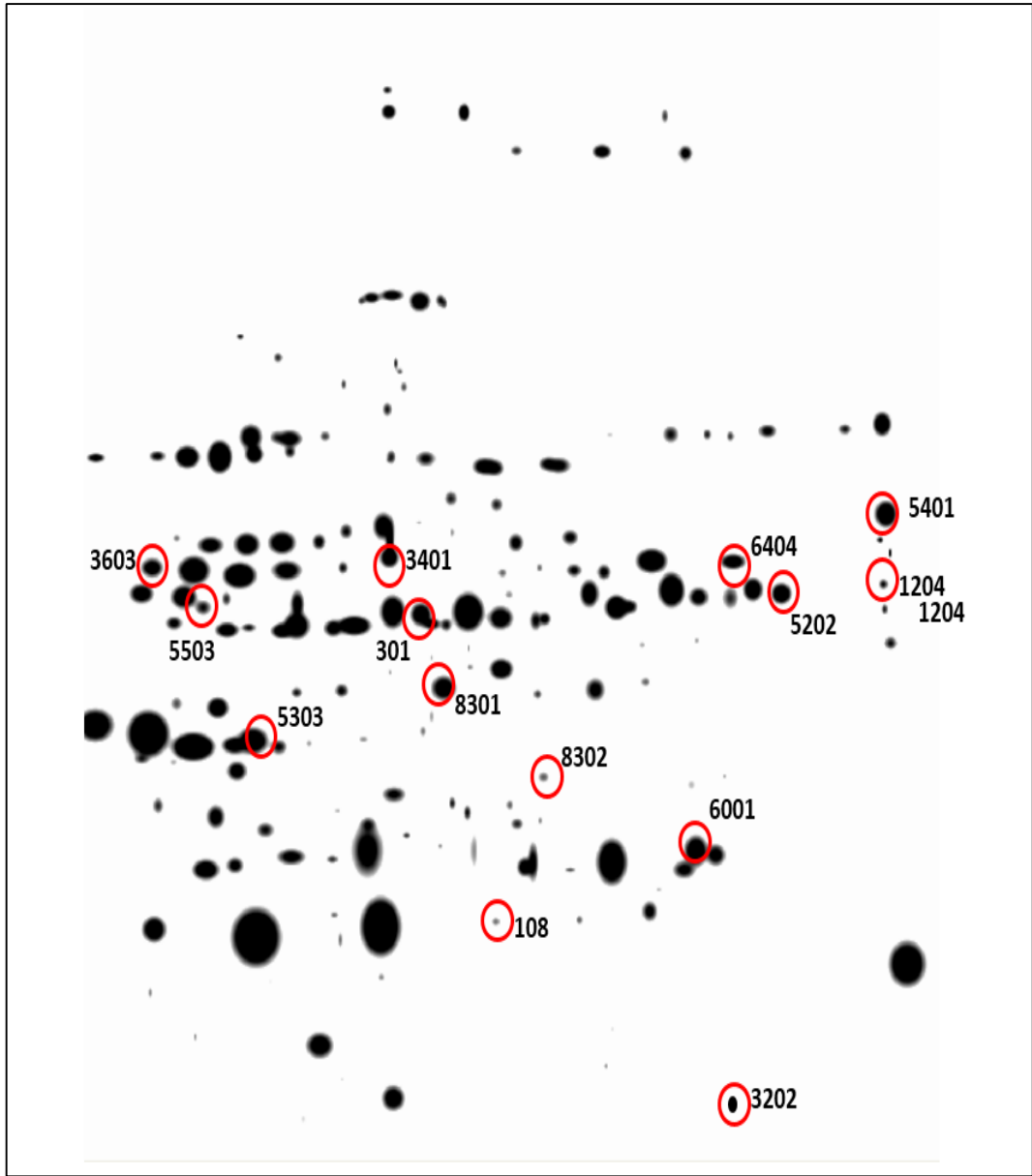
*C. arietinum* türünden elde edilen proteinler işlevlerine göre sınıflandırıldıklarında bunların büyük bir kısmının fotosentez metabolizmasında rol alan proteinler oldukları görüldü (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. Kuraklık stresinde *C. arietinum* 'da kesilen lekelerdeki proteinlerin kütleleri, skorları, pI değerleri, örtüşen dizi yüzdeleri ve işlevleri.

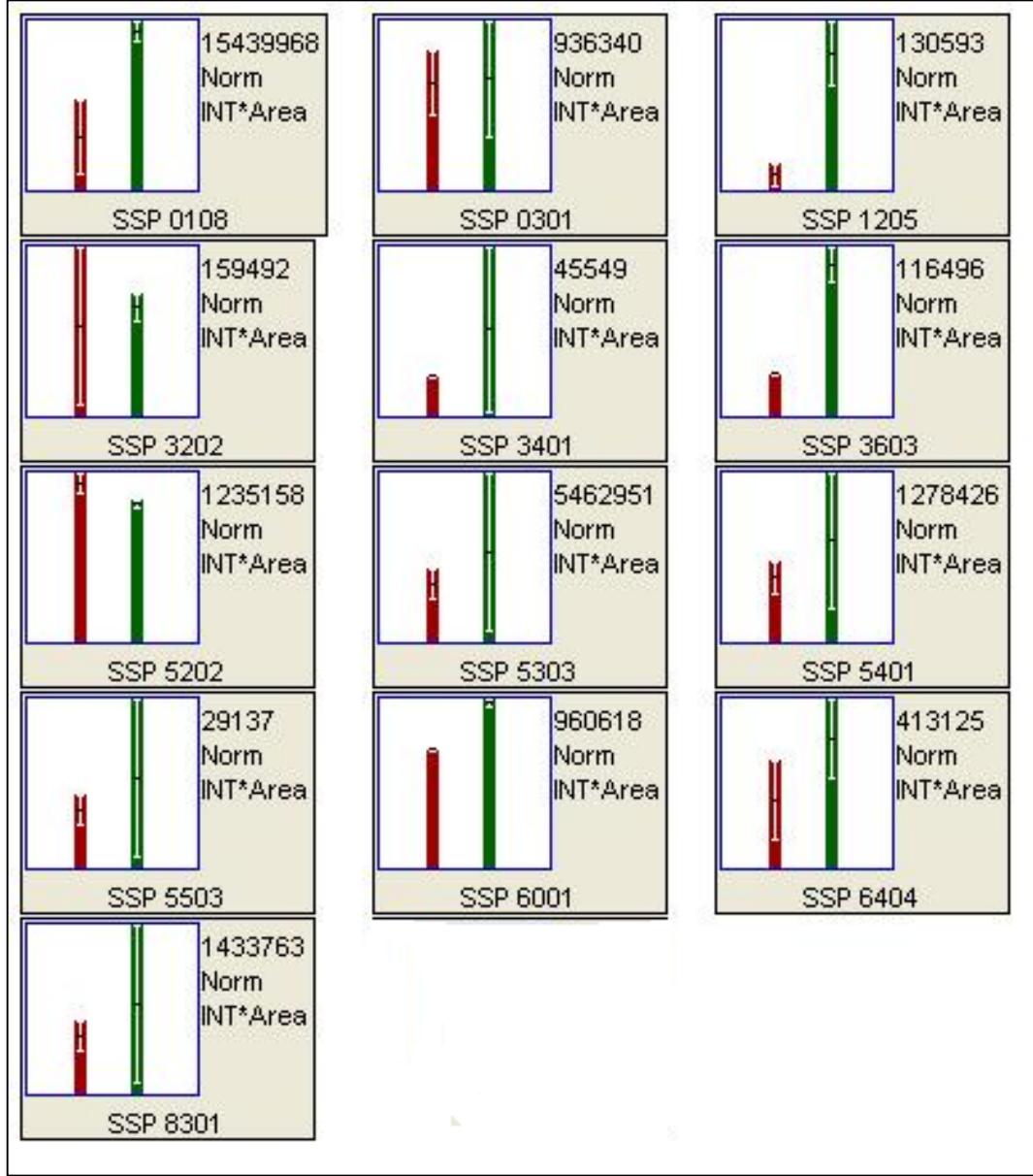
Protein Adı	Kütlesi	Skoru	Eşleşen peptid sayısı	pI değeri	Örtüşen dizi yüzdesi	İşlevi
Oksijen oluşumunu arttıran protein 1	34872	666	16	6,25	30	Işık Reaksiyonları/ Oksijen Oluşturma
Klorofil a/b bağlama proteini 8	28508	113	7	5,16	15	Işık Reaksiyonları/ Işık Enerjisini İletme
Oksijen oluşumunu arttıran protein 2	28030	204	10	8,29	22	Işık Reaksiyonları/ Oksijen Oluşturma
Plastid lipitleriyle ilişkili protein	30436	80	2	5,82	3	Kloroplast gelişimi, Çoklu stres direnci
Sitokrom c oksidaz altünite 2	1707	82	4	9,63	100	Solunum Zinciri, Elektron Transferi
Enolaz	47883	396	16	5,56	23	Glikoliz, Enerji Metabolizması
Karbonik anhidraz	35355	453	15	7,01	25	Karbondioksidin hidratasyonu
L-askorbat peroksidaz	27101	149	3	5,21	11	Sitozol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'nin kaldırılması
İzoflavon redüktaz	34632	93	4	5,57	9	Fitoaleksinin biyosentezi
Ferredoksin NADP redüktaz	40169	455	21	8,56	26	Işık reaksiyonları/ NADP <sup>+</sup> indirgenmesi
Fruktoz bifosfat aldolaz 1	38633	619	18	5,83	33	Fotosentez/Calvin döngüsü

### Kuraklık stresinde *C. reticulatum* türünde ifadesi değişen proteinler

2D DIGE profillerine göre ifadesinde belirgin farklar olan protein lekeleri (Şekil 4.13.) kesilerek kütle spektrometresinde analiz edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan 13 proteinin kimlik tanısı yapılmıştır (Çizelge 4.7.). Bu proteinlerden 11 tanesinin ifadesi kuraklık stresıyla birlikte artarken, 2 tanesinin azalmıştır (Şekil 4.14.).



Şekil 4.13. *C. reticulatum* türüne ait protein lekelerinin sanal jel görüntüleri ve kuraklık stresıyla birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri.



Şekil 4.14. Kuraklık stresinde *C. reticulatum*'da kesilen lekelerdeki proteinlerin ifade durumlarındaki değişim oranlarının grafikleri (Kontrol grubu kırmızı bar, Kurak grubu yeşil bar).

*C. reticulatum*'da kesilen protein lekelerinin analizi sonucunda elde edilen proteinlerin buldukları yerler incelendiğinde bunların 9 tanesinin kloroplastta, 3 tanesinin sitozolde 1 tanesinin ise mitokondride bulunduğu görüldü (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Kütle spektrometresinde analiz edilen *C. reticulatum*'a ait proteinlerin leke numaraları, adları, buldukları yerler ve ifade durumları.

Leke No	Swissprot No	Protein Adı	Bulunduğu Yer	İfadesi
108	P14226	Oksijen oluşumunu arttıran protein 1	Kloroplast	Arttı
301	P46285	Sedoheptuloz-1,7-bifosfataz	Kloroplast	Arttı
1204	Q9YLA9	Saplı ilmek bağlanma proteini	Kloroplast	Arttı
3202	P84733	Sitokrom c oksidaz altünite 2	Mitokondri	Azaldı
3401	Q9XQ94	Glutamin sentaz	Kloroplast	Arttı
3603	P42896	Enolaz	Sitozol	Arttı
5202	P00455	Ferrodoksin NADP redüktaz	Kloroplast	Azaldı
5303	Q01516	Fruktoz bifosfat aldolaz	Kloroplast	Arttı
5401	Q42961	Fosfogliserat kinaz	Kloroplast	Arttı
5503	Q2R1V8	GDP-mannoz 3,5 epimeraz 2	Sitozol	Arttı
6001	P17067	Karbonik anhidraz	Kloroplast	Arttı
6404	P12859	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz	Kloroplast	Arttı
8301	O65735	Fruktoz bifosfat aldolaz	Sitozol	Arttı

*C. reticulatum* türünden elde edilen proteinler işlevlerine göre sınıflandırıldıklarında bunların da yine *C. arietinum* türünde olduğu gibi büyük bir kısmının fotosentez metabolizmasında rol alan proteinler oldukları görüldü (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. Kuraklık stresinde *C. reticulatum* 'da kesilen lekelerdeki proteinlerin kütleleri, skorları, pI değerleri, örtüşen dizi yüzdeleri ve işlevleri.

Protein Adı	Kütlesi	Skoru	Eşleşen peptid sayısı	pI değeri	Örtüşen dizi yüzdesi	İşlevi
Oksijen oluşumunu arttırıcı protein 1	34872	673	22	6,25	40	Işık Reaksiyonları/ Oksijen Oluşturma
Sedoheptuloz-1,7-bisfosfataz	42034	107	13	6,04	26	Fotosentez/Calvin döngüsü
Saplı ilmek bağlanma proteini	43903	166	8	8,54	9	RNA bağlanma ve kesim
Sitokrom c oksidaz altbirim 2	1707	74	4	9,63	100	Solunum Zinciri, Elektron Taşıma
Glutamin sentaz	47086	384	15	6,29	22	Amonyumun özümlemesi
Enolaz	47883	315	13	5,56	22	Glikoliz, Enerji Metabolizması
Ferredoksin NADP redüktaz	41162	207	13	8,67	25	Işık reaksiyonları/ NADP <sup>+</sup> indirgenmesi
Fruktoz bisfosfat aldolaz, Kloroplast	38633	563	16	5,83	30	Fotosentez/Calvin döngüsü
Fosfoglisarat kinaz	50146	704	19	8,48	36	Fotosentez/Calvin döngüsü
GDP-mannoz 3,5-epimeraz 2	42105	186	10	5,75	19	Askorbat biyosentezi
Karbonik anhidraz	35355	482	15	7,01	28	Karbondioksidin hidratasyonu
Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	48067	535	21	7,57	23	Fotosentez/Calvin döngüsü
Fruktoz bisfosfat aldolaz, Sitozol	38428	555	22	6,21	44	Glikoneojenesis/ Sakkaroz biyosentezi

## 4.2. TARTIŞMA

Dünya üzerindeki tarımsal alanların büyük bir kısmı abiyotik ve biyotik çevresel streslere maruz kalmaktadır. Abiyotik stres olan kuraklık dünya genelinde, özellikle yarı kurak alanlarda bitki gelişimini ve ürün verimini kısıtlayan en önemli çevresel faktördür [Boyer, 1982]. Nohut genel olarak yarı kurak ve kurak alanlarda yetiştirilen bir bitkidir. Bundan dolayı kuraklık stresinin nohut bitkisi üzerine olan etkilerinin her yönüyle çalışılması, stres etkilerinin anlaşılması ve ürün veriminin artırılması ya da korunması için çok önemlidir. Çalışmamızda, kuraklık stresinin kültür (*C. arietinum* L.) ve yabani nohut (*C. reticulatum* Ladiz.) türlerinde meydana getirdiği fizyolojik ve proteom düzeydeki moleküler değişiklikler araştırıldı. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizler kapsamında yapılan kök ve sürgün boylarındaki değişimler, oransal su içeriği ve yaprak su potansiyeli durumu ve prolin miktarındaki değişimler bitkilerin stres durumlarını ortaya koyan en önemli parametreler arasında yer almaktadır.

### 4.2.1. Kuraklık Stresinin Kök ve Sürgün Boylarında Meydana Getirdiği Değişimler

Çalışmamızda, kuraklık stresi her iki türde de kök boylarını azaltmıştır ancak sürgün boylarında ciddi bir değişikliğe yol açmamıştır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, kuraklık stresinin farklı bitkilerde sürgün boylarını değişen oranlarda azalttığını belirten çalışmalar yapılmıştır [Singh ve ark., 1994; Heerden ve Laurie, 2008; Laurie ve ark., 2015]. Benzer şekilde kuraklık stresiyle birlikte kök boylarında meydana gelen azalma çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [Ashraf ve O'leary, 1996; Jaleel ve ark., 2009; Nedunchezhiyan ve ark., 2012]. Bu bulguların aksine Pace ve ark., [1999] ise kuraklık stresinin kök ve sürgün boylarında önemli bir değişiklik yaratmadığını vurgulamışlardır. Elde edilen bu farklı sonuçların nedeni olasılıkla stresin süresi ve kullanılan türün strese karşı direnci ile ilgili olabilir. Stres süresinin artmasıyla meydana gelen metabolik zararın onarılamamasının bir sonucu olarak kök ve sürgün büyümesi gerilemiş olabilir. Kök kuraklık stresinin ilk algılandığı bölgedir ve kuraklık stresiyle birlikte gelişiminin baskılandığı bilinmektedir. *C. reticulatum* türünde *C. arietinum* türüne göre kök boyunun daha az baskılanması, stres



koşullarında bu türe bir avantaj sağlayabilir. Çünkü bu durum, stres koşullarında bitkinin daha uzun süre suya ulaşmasına ve bir bakıma stresten kaçmasına olanak sağlanmış olur [Huang ve Nesmith, 1999]. Bu açıdan *C. reticulatum*'un *C. arietinum*'a göre kuraklık stresine daha geç girdiği söylenebilir.

#### 4.2.2. Kuraklık Stresinin Yaprak Su Potansiyelinde Meydana Getirdiği Değişimler

Kuraklık stresi altında bitkiler turgorlu durumlarını yitirirler ve bu durum büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkiler [Jongdee ve ark., 2002]. Bitki su durumunu gösteren yaprak su potansiyelinin oranı stresin iyi bir göstergesi olarak bilinir [Leport ve ark., 1999]. Bulgularımıza göre, YSP her iki türde de kuraklık stresiyile birlikte azalmıştır, ancak *C. arietinum*'da YSP'ndeki azalma *C. reticulatum*'a göre çok daha şiddetli olmuştur. Birçok araştırmacı da nohut bitkisinde verilerimize benzer sonuçlar bulmuşlardır [Leport ve ark., 1999; Katerji ve ark., 2001; Luquez ve Guiamet, 2002; Basu ve ark., 2007a; Fang ve ark., 2009; Krouma, 2010; Terzi ve ark., 2010]. Stres altındaki bitkilerde YSP'nin korunması strese karşı toleransta çok önemlidir. Çünkü bu koşullarda yüksek YSP'nin korunması dehidrasyondan kaçış mekanizması olarak tanımlanır [Jongdee ve ark., 2002]. Ayrıca, nohut bitkisinde yapılan çalışmalarda kuraklık stresi altında YSP'nin düşmesine paralel olarak, fotosentez veriminin de azaldığı gösterilmiştir [Basu ve ark., 2007a, Leport ve ark., 1999]. Yapılan bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, kuraklık stresi altında *C. reticulatum*'da YSP'nin *C. arietinum*'a göre daha yüksek olması, bu bitkinin stres sırasında suyu daha iyi koruduğunun ve dolayısıyla strese daha fazla dayandığının bir göstergesi olabilir.

#### 4.2.3. Kuraklık Stresinin Yaprak Oransal Su İçeriğinde Meydana Getirdiği Değişimler

Yaprak su potansiyeli gibi bitki su durumunu gösteren diğer bir özgün durum da oransal su içeriğidir. Çalışmamızda, kuraklık stresi ile birlikte her iki türde de oransal su içeriği azalmıştır. Bulgularımıza benzer şekilde, Nayyar ve Chander [2004] nohutta, Keyvan [2010] buğdayda kuraklık stresinin oransal su içeriğini azalttığını bulmuşlardır. Bulgularımıza göre, *C. arietinum*'da oransal su içeriği *C. reticulatum*'a

oranla çok daha belirgin azalmıştır. Rahberian ve ark., [2011] ve Talebi ve ark. [2013] nohutta, Arjenaki ve ark. [2012] ise buğdayda, kuraklık stresinin toleransları farklı olan genotiplerde oransal su içeriklerini azalttığını, duyarlı olan genotipte oransal su içeriğinin dirençli genotipe göre çok daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Yaprak oransal su içeriği stres yoğunluğunu gösteren en önemli özelliklerden biridir ve yüksek oransal su içeriği kuraklık direncinin bir göstergesidir [Keles ve Öncel, 2004]. Oransal su içerikleri yüksek olan bitkilerin oransal su içerikleri daha düşük olan bitkilere göre kuraklık stresine karşı daha dirençli olduğu söylenebilir [Arjenaki ve ark. 2012]. Tüm bunlara dayanarak kuraklık stresi altında yabancı *C. reticulatum* türünde suyun daha iyi korunduğunu söyleyebiliriz. Stres altında suyun korunması strese karşı dayanıklılıkta bitkiye avantaj kazandırmaktadır.

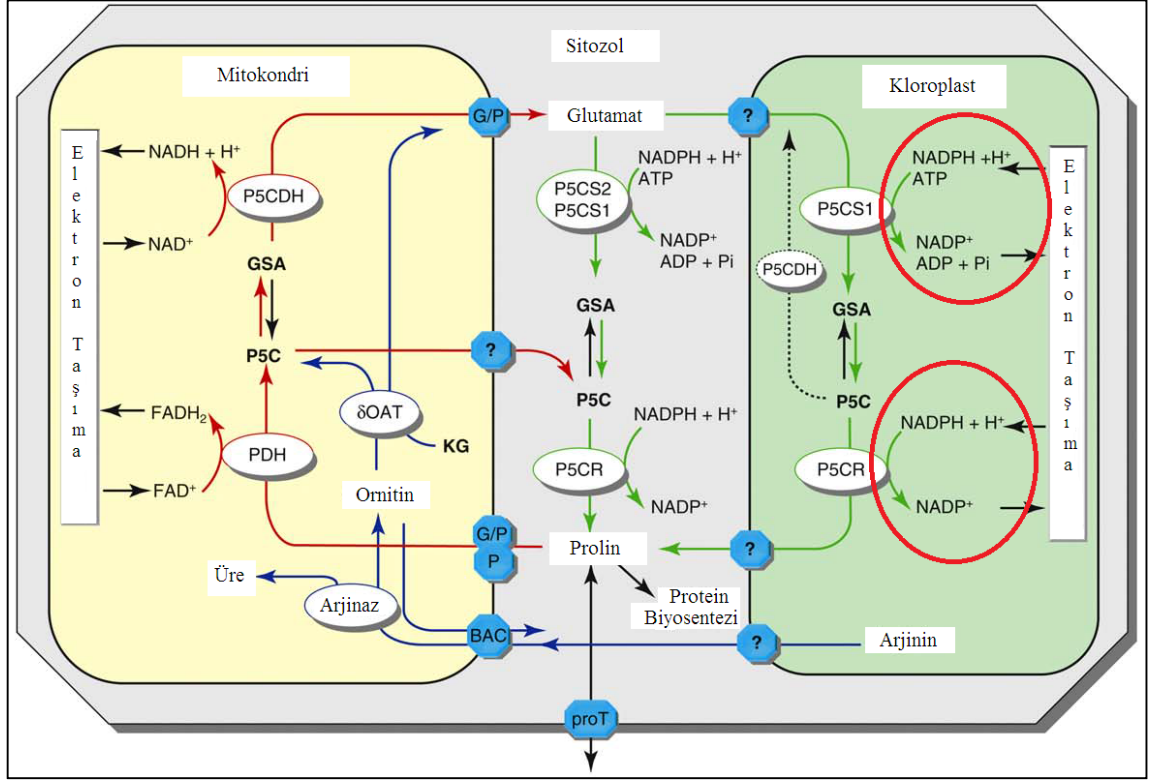
#### 4.2.4. Kuraklık Stresinin Serbest Prolin Miktarında Meydana Getirdiği Değişimler

Yaprak su potansiyelinin ve oransal su içeriğinin yüksek olması, hücre içi çözülmüş madde konsantrasyonu ile bağlantılıdır. Hücre içi çözülmüş maddelerden biri olan prolin miktarının yabancı türde yüksek olması bu duruma katkı sağlamış olabilir. Prolin temel metabolizma için gerekli olan bir aminoasittir. Kuraklık, tuz stresi, yüksek ışık, ağır metal, oksidatif stres ve biyotik stresler gibi çevresel stresler altında prolin miktarının bitkilerde arttığını gösteren birçok çalışma yapılmıştır [Szabados ve Savoure, 2009]. Çalışmamızda, kuraklık stresi nedeniyle her iki türde de prolin miktarı artmıştır. Birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, prolin seviyesindeki artış *C. reticulatum*'da *C. arietinum*'a göre çok daha yüksek gerçekleşmiştir. Bulgularımıza benzer şekilde mısırdaki [Heidari ve Mohammadkhani, 2008], şeker pancarında [Gzik, 1996], petunyada [Yamada ve ark., 2012], pirinçte [Lum ve ark., 2014; Mostarejan ve Eichi, 2009] ve nohutta [Mafakheri ve ark., 2010; Ulemale ve ark. 2013] kuraklık stresinin prolin miktarını arttırdığını gösteren birçok çalışma yapılmıştır.

Prolin iyi bir ozmotik koruyucudur ve stres altındaki bitkilerde prolin birikiminin koruyucu bir işleve sahip olduğu belirtilmiştir [Mostarejan ve Eichi, 2009]. Prolinin osmotik stres altında hücre yapısı ve makromolekülleri koruduğu uzun zamandan beri bilinmektedir [Szabados ve Savoure, 2009]. Bunun yanında prolin

protein yapılarını ve zarları hasara karşı korur ve enzimlerin bozulmasını azaltır. Kuraklık stresi koşullarında buharlaşma ile su kaybını önlemek için bitkiler stomalarını kapatırlar. Bu nedenle karbondioksit alınımı önlenir, bu koşullar altında prolin elektron alıcısı olarak rol alır ve böylece fotoinhibisyon hasarından kaçınılmış olunur [Lhout ve ark., 2001]. Prolinin ayrıca antioksidant özelliği olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir [Vendruscolo ve ark., 2007]. Özellikle tekli oksijenin süpürülmesinde rol aldığı belirtilmiştir. Fotosistem2 (PS2) üzerine tekli oksijenin ve hidroksil radikallerinin etkisini azalttığı da rapor edilmiştir. Bunun tam aksine, prolin birikiminin engellendiği mutantlarla yapılan çalışmalarda da oksidatif stres kaynaklı reaktif oksijen türlerinin birikiminin çok daha yüksek olduğu bulunmuştur [Matysik ve ark., 2002]. Prolinin bu özelliği kuraklık stresi altında olduğu bilinen ROT miktarının azaltılması için çok önemlidir. Özellikle *C. reticulatum*'da kuraklık sırasında prolin seviyesinin belirgin bir şekilde artması bu bitkide ROT'ların zararsızlaştırılması açısından büyük avantaj sağlayabilir.

Koruyucu ve süpürücü özelliklerinin yanında prolinin stres koşullarında hücre içdengesini kararlı hale getirme özelliği de vardır. Stres koşullarında Calvin döngüsü yavaşlarsa, NADPH'ın yükseltgenmesi ve NADP<sup>+</sup>'in yeniden oluşması önlenir. Glutamat ve ornitinden sentezlenen prolinin [Vendruscolo ve ark., 2007] biyosentez yolunda indirgeme basamağında NADPH'a ihtiyaç vardır ve bunun yükseltgenmesi ile NADP<sup>+</sup> oluşur (Şekil 4.15.). Bundan dolayı, stres sırasında kloroplastlarda prolin biyosentezinin artması sonucunda elektron akışı devam eder bu da fotoinhibisyonu ve fotosentetik kısımların radikal kaynaklı hasarını azaltır [Szabados ve Savoure, 2009]. Tüm bu özellikleri nedeniyle, stres altında her iki nohut türünde de prolin miktarının artış göstermesinin kuraklık stresine karşı bitkileri daha dayanıklı hale getirdiğini söyleyebiliriz. Prolin biyosentez yolunda yer alan enzim miktarındaki artış *C. reticulatum* türünde prolin miktarının daha da artmasına sebep olmuş olabilir. Roosens ve ark. [1998] prolin miktarındaki artışın ana sebebinin biyosentez yolağındaki enzim ifadelerindeki artış olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek prolin içeriği çevresel streslere karşı toleransı ifade etmektedir. Kuraklık stresi altında *C. reticulatum*'un prolin miktarının yüksek olması, *C. arietinum*'a göre daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır.



Şekil 4.15. Prolin biyosentez yolağı [Szabados ve Savoure, 2009].

#### 4.2.5. Protein Analizleri

Çalışmamızda, protein izolasyonu sonucunda elde edilen örneklerin SDS-PAGE profilleri incelendiğinde, PEG çöktürmesi yapılmamış örneklerde Rubisko'nun oldukça fazla yer kapladığı görülmüştür. Aynı örneklerin 2D jel profilleri de benzer sonuçlar vermiştir. Dolayısıyla, 2D üzerinde daha fazla protein lekesi görebilmek için Rubisko'nun uzaklaştırıldığı örneklerle analize devam edilmiştir. Benzer şekilde, Kim ve ark. [2001] ve Xi ve ark. [2006] yaptıkları çalışmada, PEG çöktürmesi yöntemiyle Rubisko'nun uzaklaştırılmasıyla birlikte 2D jel üzerinde daha fazla protein lekesi belirlediklerini bildirmişlerdir.

Ayrıca, izole edilen proteinlerin 17 cm'lik pH 3-10 IPG şeritlerinin jel profilleri incelendiğinde, proteinlerin daha çok pH 6-7 civarında toplandıkları görülmüştür. Literatür bilgilerimiz de bu profili doğrulamaktadır [Salekdeh ve ark., 2002; Kim ve ark., 2003; Amme ve ark., 2006; Carpentier ve ark., 2008; Pandey ve ark., 2008]. Bu nedenle pH 3-10 profilleri elde edildikten sonra analizlere pH 5-8

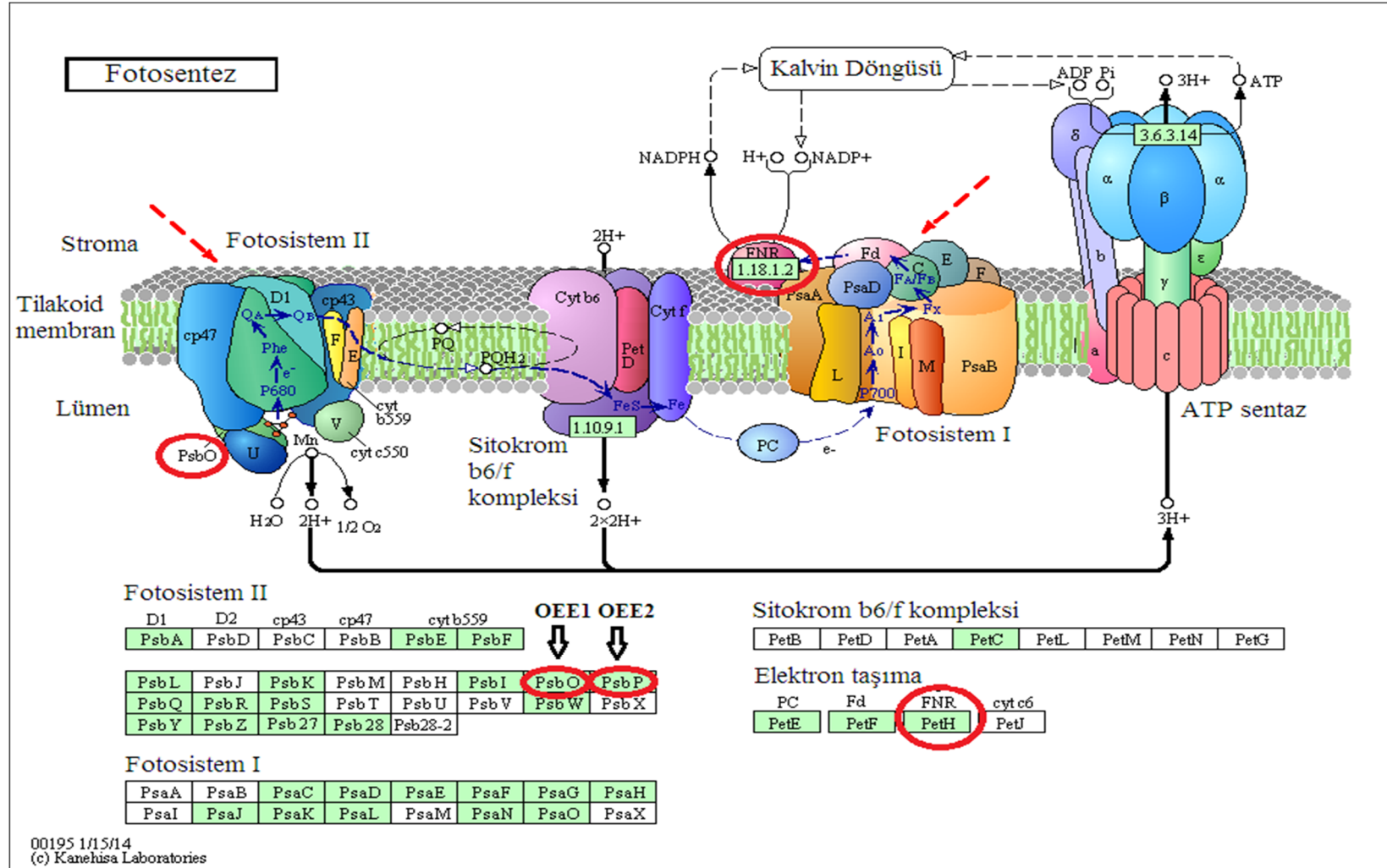
aralığındaki 17 cm'lik IPG şeritleri ile devam edilmiştir. Böylece protein lekeleri daha iyi ayrılabilmiş ve daha çok protein lekesi görülüp analiz edilebilmiştir.

Elektroforetik ayırım sonucunda ifadesinde değişiklik olan protein lekelerinin kütle spektrometresinde analizi sonrasında elde edilen protein kimlikleri incelendiğinde, kuraklık stresiyile birlikte ifadesi değişen proteinlerin büyük bir kısmının fotosentez, enerji, biyosentez, antioksidan savunma sistemi ve solunum metabolizmalarında yer aldıkları görülmüştür. Bu mekanizmalarda yer alan protein ifadelerinde meydana gelen değişiklikler, bu yolların kuraklık stresinden etkilendiğini göstermektedir.

#### 4.2.5.1. Kuraklık stresinin fotosentez mekanizmasının ışık reaksiyonlarında yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri

Bu yollar içerisinde özellikle fotosentezle ilişkili proteinlerin sayısı oldukça fazladır. Fotosentez kuraklık stresinden ciddi derecede etkilenen bir işlemdir. Stomaların kapanması ile birlikte CO<sub>2</sub> alımının sınırlanması, karbon metabolizmasındaki değişim ve oksidatif stresler kuraklığın fotosentez metabolizması üzerine olan doğrudan ve dolaylı etkileridir [Faghani ve ark., 2015].

Çalışmamızda, kuraklık stresiyile birlikte fotosentezin ışık reaksiyonlarında yer alan proteinler olan oksijen oluşumunu arttıran protein 1 ve 2 (OEE1 ve OEE2), ferredoksin NADPH redüktaz (FNR) ve klorofil a/b bağlama proteininin ifadelerinde değişiklikler meydana gelmiştir (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Fotosentez mekanizmasının ışık reaksiyonlarının şematik görünümü [KEGG Pathway website].

Fotosistem2'nin bir parçası olan oksijen oluşturan kompleks (OEC) 30'dan fazla alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimlerin ana elemanları oksijen oluşumunu arttırıcı proteinlerdir (OEE1, OEE2 ve OEE3). OEE1 proteini fotosistem 2'nin lümen kısmında bulunan bir proteindir. Bu protein siyanobakterilerden yeşil algelere ve yüksek bitkilere kadar birçok fototropik organizmada bulunmaktadır. OEE1'in fotosentez sırasında suyun yükseltgenmesi için manganaz enzim kümesini uygun hale getirdiği bilinmektedir. Bunun yanında, reaksiyon merkezinde bulunan D1 proteininin oksijen radikallerine karşı koruduğu da düşünülmektedir [Heide ve ark., 2004]. Çalışmamızda kuraklık stresiyile birlikte OEE1 proteininin ifadesi her iki türde de artmıştır. Bazı araştırmacılar tarafından farklı bitki ve farklı stres koşullarında bu enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir; OEE1 proteininin ifadesinin kavak bitkisinde kuraklık stresinde [Bogeat ve ark., 2007], ve *Kandelia candel* bitkisinde ise tuz stresinde [Wang ve ark., 2015] arttığı gösterilmiştir. Burada enzim ifadesindeki artış suyu oksitleme ve fotosistem 2 (PS 2) kararlılığının devamı için önemli olabilir. Ayrıca, OEE1 proteini enerji metabolizmasında yer alan enzimlerden birisidir. Kuraklık stresiyile birlikte fotosentez kapasitesinin düştüğü bilinmektedir. Bu sırada bitkiler enerji üretimi ve tüketimi arasındaki dengeyi kuracak olan mekanizmalarını etkinleştirmek durumundadır [Zhang ve ark., 2015]. Bu da enzim aktivitesini arttırmış olabilir. Bu durumla ilgili olarak, Xiao ve ark. [2009], stres sırasında azalan içsel CO<sub>2</sub> konsantrasyonunu dengelemek için fotosentezle ilgili olan proteinlerin miktarlarında artış olabileceğini belirtmiştir.

Çalışmamızın bulgularına göre, OEE2 proteininin ifadesi kuraklık stresiyile birlikte *C. arietinum*'da azalırken, yabancı *C. reticulatum*'da herhangi bir değişiklik olmamıştır. Benzer şekilde, Xiao ve ark. [2009] kavak bitkisinde kuraklık stresinin yabancı türde OEE2 proteininin ifadesini değiştirmediğini bulmuşlardır. Zhang ve ark. [2015] tuz stresiyile birlikte domates bitkisinde OEE2 ifadesinin azaldığını belirlemişlerdir. Sanda ve ark. [2011] yabancı karpuz bitkilerinde kuraklık stresi altında fotosentetik elektron taşıma parametrelerini karşılaştırılmış ve en yüksek PS2 aktivitesinin kuraklık stresi ile değişmediğini göstermişlerdir. Bu da özellikle yabancı türlerde PS2'nin kuraklık stresinden kaynaklı olarak daha az hasara uğradığı ya da onarım mekanizmasının daha iyi çalıştığı fikrini vermektedir. Ayrıca, kuraklık stresi

CO<sub>2</sub> fiksasyonunu tamamen sonlandırırsa bile, elektron taşıma aktivitesinin devam ettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, strese maruz bırakılan bitkilerde plastokinon havuzunun indirgendiği ve lümenin pH'sının düştüğü belirlenmiştir. Bu durum PS2'ye elektronların giriş hızını azaltarak hasardan korunmasına neden olabileceği ve buna bağlı olarak da OEE2'nin ifadesinin azalabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca Calvin döngüsündeki enzim ifadelerinin düşmesi CO<sub>2</sub> fiksasyonunun sınırlandırılmasının bir sonucu olabilir. Calvin döngüsünün stres kaynaklı olarak yavaşlaması kloroplastlarda ATP ve NADPH birikmesine yol açabilir. Bu nedenle, bitkilerde fotooksidatif hasardan korunmak için OEE2 gibi PS2 proteinlerinin miktarı azalabilir [Gao ve ark., 2011].

Oksijen oluşturan bileşenlerin birbirleri ile karşılaştırıldıkları çalışmalar yapılmıştır. Araştırmacılar tüm fotosentetik oksijen oluşturma mekanizmaları için OEE1'in gerekli olduğunu göstermişlerdir [Myfield ve ark. 1987]. OEE1'in aksine OEE2 eksikliğinde oksijen oluşturma işlemleri olumsuz etkilense de, bu işlemin durmadığı ve devam ettiğini belirtmişlerdir [Myfield ve ark. 1987]. Ayrıca, Siguhara ve ark. [2000] *Bruguiera gymnorrhiza* bitkisinde tuz stresinin OEE1, OEE2 ve OEE3'ün ifadesini arttırdığını belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, OEE2 ve OEE3 ortamdaki uzaklaştırılmış ve 5 mM kalsiyum ve 30 mM klorür uygulamasıyla oksijen oluşturma işlevinin geri kazanıldığını belirlemişlerdir. Ancak, OEE1'in uzaklaştırılması sonucu oksijen oluşturma işlevi hiçbir şekilde geri çevrilememiştir. Bu sonuçlar, OEE1'in oksijen oluşturan sistemde ve PS2'nin kararlılığında rol oynayan en önemli protein olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, çeşitli araştırmacılar çeşitli stres koşullarında OEE1 ve OEE2'nin ifadelerinde birbirlerinden farklı sonuçlar bulmuşlardır [Jiang ve ark., 2007 Xiao ve ark., 2009]. Alınan farklı sonuçların nedeni, türe ya da genotipe özgü yanıtlar ya da stres yoğunluğu ya da süresiyle ilgili olabilir. Abbasi ve Komatsu [2004] pirinç bitkisinde OEE2'nin ifadesinin tuz stresıyla arttığını, kuraklık stresinde ise değişmediğini bulmuşlardır. Bu durum, aynı proteinlerin farklı stres koşullarında farklı ifade olabildiklerini ve her stres yanıtının karmaşık bileşenlerinin olduğunu gösterir.



Ferredoksin NADP redüktaz (FNR) bir elektronu fotosentetik elektron taşıma sistemi (ETS)'nin son elektron alıcısı olan ferredoksinde NADP'ye aktarır ve NADPH oluşur (Şekil 4.16.). NADPH karbon fiksasyon yolağını da kapsayan birkaç yolakta indirgeyici güç olarak iş görür [Faghani ve ark., 2015]. Ayrıca, FNR bitkilerde önemli bir antioksidan, ROT süpürücü enzimlerden birisidir ve çevresel stresler altında NADPH/NADP<sup>+</sup> arasındaki dengeyi sağlamada kritik bir role sahiptir. Çalışmamızda, *C. arietinum*'da kuraklık stresi sırasında FNR'nin ifadesi azalırken, *C. reticulatum*'da belirgin bir değişiklik olmamıştır. Bulgularımıza benzer şekilde, Sanda ve ark. [2011] kuraklık stresinin yabancı karpuz bitkisinin yapraklarında ferredoksin NADP redüktaz ifadesinin önemli bir değişikliğe uğramadığını belirlemiştir. Michalowski ve ark. [1989] makasotu bitkisinde yaptıkları çalışmada, tuz stresinin FNR transkriptlerinin seviyesinin belirgin bir değişikliğe uğramadığını bulmuştur. Zadraznik ve ark. [2013] kuraklığa duyarlılıkları farklı olan iki fasulye genotipinde, kuraklık stresinin sadece daha duyarlı olan genotipte FNR ifadesini önemli oranda düşürdüğünü, daha dayanıklı olan genotipte ise önemli bir değişikliğe yol açmadığı belirlenmiştir. FNR enzim ifadesinin *C. reticulatum* türünde çok fazla etkilenmemesi fotosentezin karbon reaksiyonlarının devamlılığı için önemlidir. Gharechahi ve ark. [2015] tütünde yaptıkları çalışmada, FNR ifadesinin kuraklık stresiyle birlikte azaldığını belirtmişlerdir. FNR'nin katalizlediği, reaksiyon fotosentez hızını sınırlayan basamak olarak bilinir [Faghani ve ark., 2015]. Hajirezaei ve ark. [2002] FNR'nin bu rolünü araştırmak için FNR aktivitesi azaltılmış genetiği değiştirilmiş tütün bitkisinde fotosentez hızını araştırmışlar ve enzim aktivitesine paralel olarak gelişim hızının ve fotosentez veriminin düştüğünü belirlemiştir. Rodriguez ve ark. [2007] ise yaptıkları çalışmada, FNR aktivitesi yüksek genetiği değiştirilmiş bitkilerde fotosentezin normal hızda devam ettiği ve oksidatif strese karşı dayanıklılık kazanıldığını bulmuşlardır. Sonuç olarak, duyarlı olan türlerde dayanıklı olanlara göre fotosentetik proteinlerin stres koşullarında belirgin bir azalma gösterdiği ve fotosentezin daha erken baskılandığı söylenebilir.

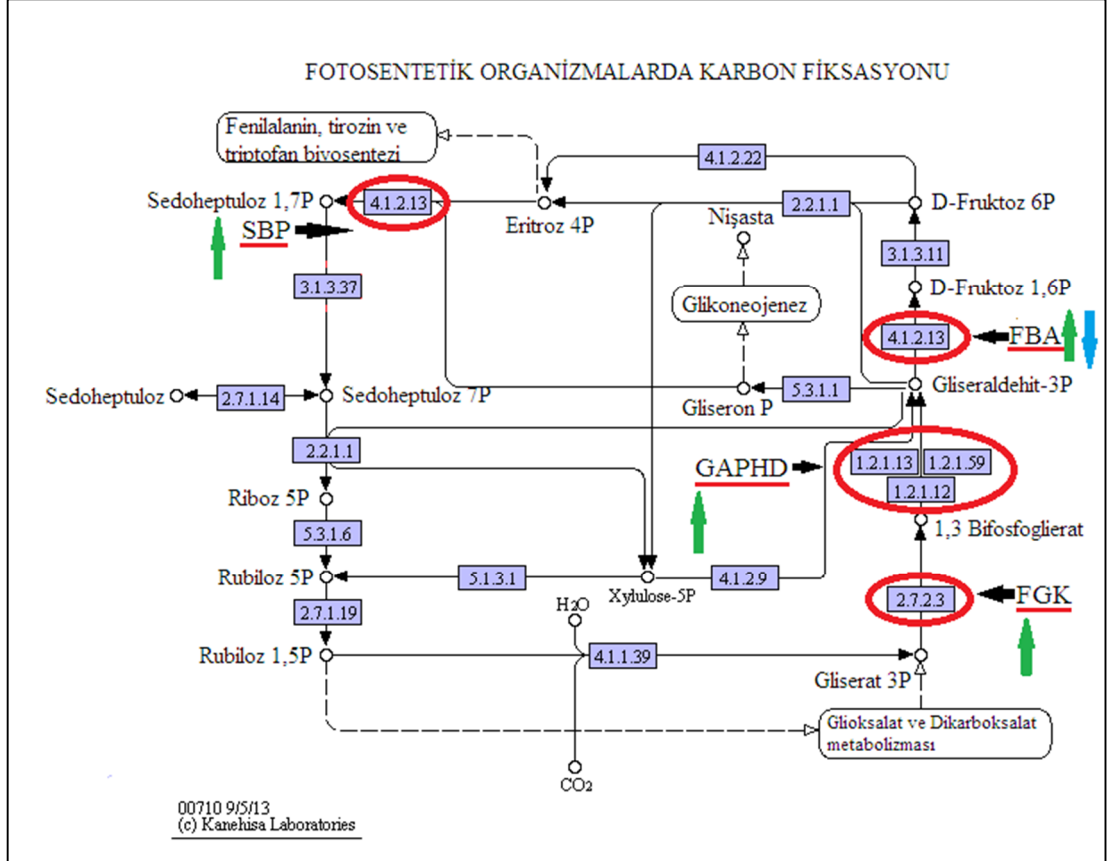
Bitkilerdeki klorofillerin yaklaşık olarak %60'ı LHC gen ailesi tarafından kodlanan ışık toplayıcı anten kompleks proteinlerine bağlıdır. Bu anten kompleksleri güneş ışığını soğurur ve fotosentetik elektron akışının sürmesi için uyarılma enerjisini

PS1 ve PS2'nin çekirdek kompleksine aktarır [Andersson ve ark., 2003]. Klorofil a/b bağlama protein 8 bu gen ailesinin bir üyesidir. LHCB genlerinin ifadeleri çeşitli çevresel etmenler ve gelişim yollarıyla düzenlenmektedir. Yapılan genetik çalışmalar, LHCB protein ailesinin stoma kilit hücrelerindeki absisik asit (ABA) yanıtında pozitif bir rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenle, LHCB üyeleri stoma hareketlerindeki ABA uyarısının yeni üyeleri olarak tanımlanmaktadır [Xu ve ark., 2012]. Ayrıca, içsel ROT miktarının da bu proteinin ifade durumunda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Xu ve ark. [2012] LHCI gen ailesinin üyelerinin susturulduğu ya da ifadesinin azaltıldığı genetiği değiştirilmiş *Arabidopsis* ile yaptıkları çalışmada, ABA hormonuna verilen yanıtın azaldığını ve bu durumda *Arabidopsis*'te kuraklık dayanıklılığını azalttığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar LHCB proteinlerinin içsel ROT miktarının artmasıyla birlikte düzenlenen ABA uyarısında önemli bir rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda, kuraklık stresi sırasında Klorofil a/b bağlama protein 8'in ifadesi *C. arietinum* türünde artarken, *C. reticulatum*'da bir değişiklik olmamıştır. Bu durum, *C. arietinum*'daki bu artış olasılıkla yüksek ROT artışı ile birlikte oluşan yanıtın bir göstergesi olabilir. Bulgularımıza benzer olarak, Zadraznik ve ark. [2013] fasulye bitkisinde bu proteinin ifadesinin kuraklık stresi ile birlikte arttığını belirtmişlerdir. Peng ve ark. [2009] da, buğday bitkisinde kuraklık ve tuz streslerinin klorofil a/b bağlama proteininin miktarını arttırdığını bulmuşlardır. Klorofil bağlama kompleksi hücrelerdeki klorofilleri korur ve fotosentezde önemli bir role sahiptir. Bu proteindeki artış klorofil bozulmasını engelleyerek stres altında koruma sağlıyor olabilir.

#### 4.2.5.2. Kuraklık stresinin fotosentez mekanizmasının Calvin reaksiyonlarında yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri

Fotosentez mekanizmasının Calvin döngüsü proteinleri olan fosfogliserat kinaz (FGK) ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), fruktoz bifosfat aldolaz ve sedoheptuloz-1,7-bisfosfataz gibi proteinlerin ifadelerinde kuraklık stresiyile birlikte değişiklikler meydana gelmiştir (Şekil 4.17.). FGK ATP'yi kullanarak 3-fosfogliseratın 1,3-bisfosfogliserata dönüşümünü katalizler (Şekil 4.17.). Bu reaksiyon Calvin döngüsünün ilk indirgenme basamağıdır ve fotosentetik CO<sub>2</sub> özümlemesinde

3-fosfogliseratın sentezini etkilemektedir. Kloroplastik GAPDH ise 1,3-bifosfogliseratın gliseraldehit-3 fosfata indirgenmesini katalizler [Ma ve ark., 2012]. Bu enzimlerin ifadesindeki değişiklikler fotosentetik karbon özümlemesini doğrudan etkilemektedir [Caruso ve ark., 2008; Wang ve ark., 2015].



Şekil 4.17. Calvin döngüsü reaksiyon basamakları (Yeşil ok: *C. reticulatum*'da meydana gelen protein ifade artışlarını, Mavi ok: *C. arietinum*'da meydana gelen ifade azalışını göstermektedir) [KEGG pathway website].

Çalışmamızda her iki enzimin ifadesi *C. arietinum*'da değişmezken, *C. reticulatum*'da artmıştır. Bu enzimlerin ifadelerinin artması fotosentetik karbon özümlemesinin arttığını gösterebilir. Bulgularımıza benzer olarak, Ghabooli ve ark. [2013] arpa bitkisinde, Oh ve Komatsu [2015] ise soyada kuraklık stresinin FGK ve GAPDH ifadelerini arttırdığını bulmuşlardır. Wang ve ark. [2015] *Kandelia candel* bitkisinde tuz stresi ile birlikte sadece strese dayanıklı olan türde bu enzimlerin aktivitesinin arttığını bulmuşlardır. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ve

fosfogliserat kinaz ayrıca pentoz fosfat döngüsünün enzimleridir [Bogeat ve ark., 2007]. Dolayısıyla bu enzim ifadesinde oluşan değişiklikler sadece Calvin döngüsünü değil, aynı zamanda glikoliz yolağını da etkileyerek, stres sırasında gerekli olan enerjinin korunmasını sağlayabilir. Kuraklık sırasında fotosentezle ilgili olan bu proteinlerin ifadelerinin artmasının nedeni, azalan içsel CO<sub>2</sub> konsantrasyonunu dengelemek ve stresin ilk basamağında fotosentez işlevinin devamlılığını sağlamak için önemli olabilir [Bogeat ve ark., 2007]. Çalışmamızda, kuraklık stresi altında bu enzimlerin ifadelerinin yabancı türde artması karbon reaksiyonları ve enerji metabolizmalarının korunmasının sonucu olarak stresin etkisine karşı bitkiye bir avantaj sağlayabilir.

Fruktoz bifosfat aldolaz (FBA) fruktoz-1,6-bifosfatın, gliserol fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat'a dönüşümünü katalizleyen, kloroplastik ve sitoplazmik olmak üzere iki izoformu olan bir enzimdir. Her iki izoform da aynı reaksiyonu katalizlemesine rağmen, farklı biyolojik yollarda bulunurlar ve birbirlerinden farklı görevleri vardır [Caruso ve ark., 2008]. Stres koşulları altında her iki izoformun da birbirinden ayrı yanıtlar oluşturması, bunların birbirinden farklı işlevlerinin olabileceğini gösterir [Jedmowski ve ark., 2014]. Çalışmamızda, kloroplastik FBA'nın ifadesi *C. arietinum*'da azalırken, *C. reticulatum*'da artmıştır. Bulgularımıza benzer olarak Zhao ve ark. [2011] *Cynodon dactylon* bitkisinin kuraklığa karşı dayanıklılıkları farklı olan çeşitlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, kuraklık stresinde bu enzim ifadesinde artış ve azalışlar belirlemişlerdir. FBA sentezinin kuraklık stresi altında duyarlı türde daha fazla baskılandığını belirtmişlerdir. Caruso ve ark. [2008] kuraklık ve tuz stresinin buğdayda FBA'nın ifadesini azalttığını göstermişlerdir. Kloroplastik FBA ifadesinin azalması fotosentez hızını ve buna bağlı olarak büyümeyi etkilediği çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Genetiği değiştirilmiş domateslerde kloroplastik FBA'daki azalmanın fotosentezi azalttığı gösterilmiştir [Jedmowski ve ark., 2014] Uematsu ve ark. [2012] ise genetiği değiştirilmiş tütün bitkisinde aktivitesi artırılmış FBA enziminin fotosentezi ve büyümeyi az da olsa arttırdığını bulmuşlardır. Bu çalışmalar, bu enzimin fotosentez verimi üzerine etkisi olduğunu gösterir. Kloroplastik FBA enziminin *C. arietinum*'da azalması, fotosentez hızının azalmasına ve bunun sonucu olarak da gelişimin baskılanmasına yol açabilir. *C. reticulatum*'da

ise bu enzimin ifadesinin artması fotosentez verimliliğinin ve büyümenin korunması için önemlidir.

Sedoheptulaz-1,7-bifosfataz ribuloz bifosfatın yeniden oluşum hızını ayarlayan kilit bir enzimdir ve Calvin döngüsünün devamlılığı için önemli bir rolü vardır. [Faghani ve ark., 2015]. Fotosentetik karbon indirgeme döngüsü (Calvin) atmosferik CO<sub>2</sub>'nin özümlemesi için temel yolaktır. Bu döngünün bitki metabolizmasında merkezi bir rolü vardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, antisense teknolojisi kullanılarak bu döngüde yer alan enzimlerin aktiviteleri önlenmiş ve fotosentez veriminde meydana gelen değişiklikler araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda, birçok enzim aktivitesi baskılanmış ancak ilginç bir şekilde stressiz koşullar altında fotosentez veriminde ciddi bir değişiklik olmamıştır. Ancak, sedoheptulaz bifosfataz enziminde meydana gelen küçük azalışlar bile fotosentez verimini etkilemiştir. Bu durum bu enzimi potansiyel bir mühendislik hedefi haline getirmiştir [Lefebvre ve ark., 2005]. Uematsu ve ark. [2012] mutant tütün bitkisiyle yaptıkları çalışmada, sedoheptulaz bifosfatazın ifadesinin artmasıyla fotosentez ve gelişimin arttığını belirlemişlerdir. Raines ve ark. [2003] da sedoheptulaz bifosfatazı olası mühendislik uygulamalarla fotosentetik karbon özümlemesinin artırılması için hedef enzim olarak göstermişlerdir. Miyagawa ve ark. [2001] ve Lefebvre ve ark. [2005] genetiği değiştirilmiş bitkilerle yaptıkları çalışmada, aktivitesi artırılmış SBPaz'ın fotosentez ve gelişim için etkili olduklarını göstermiştir. Ayrıca Feng ve ark. [2007] yüksek sıcaklık stresi altında bu enzim ifadesinin artırılması sonucu stres dayanıklılığının arttığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda, *C. arietinum*'da bu enzim ifadesinde bir değişiklik olmazken, *C. reticulatum*'da artmıştır. *C. reticulatum*'da tıpkı diğer Calvin döngüsü enzimleri gibi bu enzim ifadesindeki artış fotosentez veriminin korunması için çok önemlidir. Bu enzimlerin ifadelerindeki artışlar strese karşı dayanıklılığın artırılmasında çok önemlidir.

Fotosentez mekanizmasının Calvin döngüsünün verimliliğini etkileyen diğer bir protein olan karbonik anhidraz çift yönlü bir reaksiyon olan  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  reaksiyonunu katalizler. Çalışmamızda, karbonik anhidraz enziminin ifadesi kuraklık stresıyla birlikte *C. arietinum*'da azalırken, *C. reticulatum*'da artmıştır.

Çalışmamızın bulgularına benzer olarak Budak ve ark. [2013] kuraklık stresi altındaki yabani ve kültür buğday bitkisinde en yüksek karbonik anhidraz ifadesinin yabani buğday bitkisinde, en düşük enzim ifadesinin ise kültür bitkisinde olduğunu belirtmişlerdir. Yu ve ark. [2007] pirinç bitkisinde kuraklık stresinin karbonik anhidraz ifadesini arttırdığını bulmuşlardır. Karbonik anhidraz CO<sub>2</sub> ve suyun bikarbonat ve H'e dönüşümünü katalizler, böylelikle kloroplastlardaki CO<sub>2</sub> difüzyonu kolaylaştırır ve Rubisko'nun CO<sub>2</sub>'den yararlanma olasılığı artar. Kuraklığa dayanıklı türde karbonik anhidraz miktarının yüksek olması, kuraklık koşulları altında varolan kaynaklardan daha iyi yararlanmayı sağlayacağını gösterir [Budak ve ark., 2013]. Ghabooli ve ark. [2013] kültür arpa bitkisinde karbonik anhidraz aktivitesinin kuraklık stresi ile birlikte azaldığını belirtmişlerdir. Karbonik anhidraz çinko içeren bir enzimdir ve CO<sub>2</sub>'nin geri dönüşümlü hidratasyonunu katalizler ve fotosentezdeki CO<sub>2</sub>'nin difüzyonunun kolaylaştırılmasında önemli bir role sahiptir. Strese maruz kalan bitkilerde CO<sub>2</sub> kullanım etkinliğinin azalmasına paralel olarak, karbonik anhidraz aktivitesinin azalması büyüme ve fotosentezi azaltmış olabilir. Benzer şekilde, Gharechahi ve ark. [2015] tütün bitkisinin yaprak mezofil hücrelerinde bulunan karbonik anhidraz ifadesinin kuraklık stresiyle birlikte azaldığını belirlemişlerdir. Karbonik anhidraz ifadesinin azalması bitkileri kuraklık stresine karşı daha duyarlı hale getirebilir. Hu ve ark. [2010] *Arabidopsis* mutantlarıyla yaptıkları çalışmalarda, stoma hücrelerinde bulunan karbonik anhidraz transkriptlerinin fazla ifade olmalarının su kullanım etkinliğini hızlı bir şekilde arttırdığını belirlemişlerdir. Bu sonuçlar stres koşulları altında karbonik anhidraz enzim aktivitesinin korunmasının fotosentezin sürdürülebilmesi için çok önemli olduğunu gösterir. *C. reticulatum*'da bu enzim ifadesinin stresle birlikte artması Calvin döngüsünün etkinliğinin korunması için önemli olabilir.

#### 4.2.5.3. Kuraklık stresinin biyosentez yolağında yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri

Bitkiler kuraklık stresine maruz kaldıklarında çeşitli içsel maddelerin biyosentezini artırarak strese karşı bir dayanıklılık geliştirebilirler. Glutamin sentaz (GS) aktivitesi bitkilerde aminoasit metabolik kütüphanesinin göstergesidir. GS ayrıca

fotosolunum, proteolizis ve çeşitli streslerden kaynaklı oluşan  $\text{NH}_4$ 'ün yeniden özümlemesi için çok önemli bir enzimdir [Zhang ve ark., 2015]. Glutamin sentazın (GS) bitkilerde yaygın bulunan iki izoformu vardır. Bunlar kloroplastik GS1 ve sitozolik GS2'dir. Sitozolik ve kloroplastik GS farklı yollarla düzenlenirler. GS1 glutamin oluşumundan sorumludur [Nagy ve ark., 2013]. Ayrıca, GS azot metabolizmasında önemli bir role sahiptir ve bitkilerdeki prolin seviyesinin düzenlenmesinde kilit rol oynar [Caruso ve ark., 2009]. Çalışmamızda GS1 ifadesi *C. reticulatum*'da artarken, *C. arietinum*'da değişmemiştir. Farklı stresler altında GS ifadesinin değiştiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Nagy ve ark. [2013] kuraklık stresinin duyarlı buğday genotipinde GS aktivitesini kısmen düşürdüğünü, dayanıklı genotipte ise arttırdığını bulmuşlardır. Shi ve ark. [2014] *Cynodon dactylon* bitkisinde, kuraklık stresinin GS ifadesini arttırdığını bulmuşlardır. Bu artışın özellikle kuraklığa dayanıklı olan genotipte çok daha anlamlı olduğunu bulmuşlardır. Kuraklığa dayanıklı türlerde GS miktarının duyarlı olanlara göre daha yüksek olmasının kuraklığa dayanıklılığın iyi bir göstergesi olabileceğini gösterir. Zadraznik ve ark. [2013] fasulye bitkisinde kuraklık stresıyla birlikte glutamin sentaz miktarının arttığını bulmuşlardır. Wang ve ark. [2015] *Kandelia candel* bitkisinde glutamin sentaz ifadesinin tuz stresinde arttığını bulmuşlardır. Aghael ve ark. [2008] patates bitkisinde tuz stresinin glutamin sentaz ifadesinin duyarlı ve dayanıklı türde azalttığını bulmuştur. Ancak bu azalma duyarlı olan türde daha belirgin bir şekilde gerçekleşmiştir. Araştırmacılar dayanıklı türdeki azalışı açıklayamamışlardır. GS enzim ifadesinin artışı prolin biyosentezini doğrudan etkilemektedir. Çalışmamızda, kuraklık stresıyla birlikte her iki türde prolin miktarı artmıştır ancak yabancı türde bu artış çok daha belirgindir. GS prolin biyosentezinin düzenlenmesi için gerekli bir enzim olduğundan, yabancı türde GS enzim ifadesindeki artış prolin biyosentezinin artmasına yol açmış olabilir. Prolin osmolit olarak proteinlerin bozulmasının önlenmesinde ve ROT süpürülmesinde rol oynamaktadır [Wang ve ark., 2015]. Bu da stres koşulları altında bitkiye dayanıklılık kazandırmaktadır.

Sitoplazmik FBA glikoneogenezis yolunun önemli bir enzimidir ve sakkaroz biyosentezinde rol almaktadır. Çalışmamızda sitoplazmik FBA'nın ifadesi *C. arietinum*'da değişmezken, *C. reticulatum*'da artmıştır. [Lu ve ark., 2012]. Kabman ve

ark. [1994] genetiği değiştirilmiş patatesten fruktoz-1,6-bifosfat aldolaz aktivitesini azalttıklarında yapraklarda daha düşük nişasta ve sakkaroz seviyesi belirlemişlerdir. Sakkaroz hücre metabolizmasında kilit rol oynar. Bitkiler su sıkıntısına maruz kaldıklarında daha fazla suda çözünür karbonhidrat biriktirerek hücre zarlarını korurlar ve protein parçalanmasını önlerler [Fan ve ark., 2009]. *C. reticulatum*'da bu enzimin miktarının artması ile hücre içi çözünür maddelerin miktarı da artarak strese karşı bir koruma sağlanmış olabilir. Bu durum da stres altında yabancı nohutun su durumunu koruyarak su kullanım etkinliğini arttırabilir.

Biyosentez mekanizmasında yer alan diğer bir protein olan izoflavonoid redüktaz (IFR) baklagillerde izoflavonoid fitoaleksinin biyosentezinde rol oynayan kilit bir enzimdir [Tiemann ve ark., 1991]. IFR NADPH bağımlı 2-hidroksiformononetinini vestitona dönüşümünü katalizler. Bu basamak flavonoid biyosentezinde medikarpinin sentezinin sondan bir önceki basamağıdır [Sobhanian ve ark., 2010]. İzoflavonoid olan fitoaleksinin biyotik ve abiyotik streslere maruz kalan baklagillerde arttığı bilinmektedir [Kim ve ark., 2003]. Yapılan çalışmalarda fitoaleksinin daha çok biyotik stres koşullarında arttığı gösterilse de, abiyotik streslerde de bu enzimin ifadesinde değişiklikler olmuştur. Alam ve ark. [2010] yaptıkları çalışmada, soya bitkisinin kökünde IFR protein ifadesinin kuraklık stresıyla birlikte arttığını bulmuşlardır. IFR proteini glutatyondan bağımsız bir yolla hücreleri kuraklığa bağlı oksidatif stresten korudukları bilinmektedir. Çalışmamızda, IFR enzim ifadesi *C. reticulatum*'da değişmezken, *C. arietinum*'da artmıştır. İzoflavonoid fitoaleksinin miktarının artması *C. arietinum* türünü kuraklık stresinin yarattığı oksidatif stresten koruyabilir. *C. reticulatum*'da bu enzimin ifadesinin değişmemesi her iki türün de oksidatif stresten korunmak için birbirinden farklı yolları kullanabileceği fikrini vermektedir.

#### 4.2.5.4. Kuraklık stresinin antioksidan sistemde yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri

Antioksidan savunma sisteminde yer alan proteinlerin ifadesi de kuraklık stresıyla birlikte değişmiştir. GDP mannoz-3,5-epimeraz (GME) GDP-D-mannozun GDP-L-galaktoza dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Bu basamak yüksek



bitkilerde askorbat biyosentezi için çok önemlidir. Bu enzimin ifadesinin stres koşullarında değişmesi askorbat biyosentezinin düzenlenmesinde rol alabileceğini gösterir [Ma ve ark., 2014]. Askorbat bitki hücrelerinde ROT'a karşı koruma sağlayan büyük bir antioksidandır. Düşük askorbat biyosentezi yapan bitkilerin çevresel stres koşullarında büyüme ve gelişmeleri olumsuz etkilenmektedir. Askorbatın kuraklık, tuz stresi, ozon, yüksek/düşük sıcaklık ve yüksek ışık gibi koşullar altında önemli bir koruyucu rol aldığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Mutantlar ve genetiği değiştirilmiş bitkilerle yapılan çalışmalarda, artan içsel askorbat miktarının abiyotik stres dayanıklılığını arttırdığı belirlenmiştir [Venkatesh ve Park, 2014]. Çalışmamızda, GDP mannoz-3,5-epimeraz ifadesi *C. arietinum*'da değişmezken, *C. reticulatum*'da artmıştır. GME enzim ifadesinin artması askorbat biyosentezini arttırabilir. Daha önceki çalışmamızda kuraklık stresinin nohut bitkisinde askorbat içeriğini arttırdığını, bu artışın özellikle *C. reticulatum*'da daha yüksek olduğu belirlenmişti [Çevik ve Ünyayar, 2015]. Yüksek askorbat içeriği güçlü bir antioksidan savunma sisteminin olduğunu gösterir. Venkatesh ve Park [2014] yüksek askorbat içeriğinin ROT'un doğrudan süpürülmesinde görev aldığını ve bu durumun stres dayanıklılık mekanizması için çok önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Diğer taraftan, ROT süpürücü protein olan askorbat peroksidaz enzim ifadesi *C. arietinum*'da artarken, *C. reticulatum*'da değişmemiştir. Askorbat peroksidaz enzimi hidrojen peroksit radikalının su ve oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan savunma sisteminin bir proteindir. Ayrıca, daha önce yaptığımız çalışmada dışsal askorbat uygulamasıyla birlikte içsel askorbat miktarı artmış ve bu artışta askorbat peroksidaz enzim aktivitesini az da olsa azaltmıştır [Çevik ve Ünyayar, 2015]. Askorbat miktarının artması hücre içerisindeki radikallerin doğrudan süpürülmesine yol açarak, antioksidan enzim aktivitelerinin değişmemesine neden olmuş olabilir. GME enzim ifadesinin *C. arietinum*'da kontrolle aynı olması, askorbat biyosentezinin değişmemiş olabileceğini akla getirmektedir. Bu durumda askorbat peroksidaz enzim ifadesinin kuraklık stresine bağlı olarak oluşan radikallere karşı savunma sırasında arttığını söyleyebiliriz.

#### 4.2.5.5. Kuraklık stresinin solunum ve enerji metabolizmasında yer alan proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri

Solunum ve enerji metabolizması da kuraklık stresinden etkilenen diğer mekanizmalardır. Enerji metabolizmasında yer alan bir enzim olan enolaz, glikolizde 2-fosfogliseratın fosfoenol pürüvata dönüşümünden sorumlu olan enzimdir. Enolaz enziminin ifadesi her iki türde de kuraklık stresiyile birlikte artmıştır. Bulgularımıza benzer şekilde, Yang ve ark. [2013] fasulye bitkisinde, Hu ve ark. [2011] mısır bitkisinde, Komatsu ve Oh [2015] soya bitkisinde kuraklık stresinin enolaz enzim aktivitesini arttırdığını bulmuşlardır. Ayrıca, Forsthoefel ve ark. [1995] makasotu bitkisinde, Rabello ve ark. [2008] bitkisinde kuraklık stresinin enolaz transkriptlerinin miktarını arttırdığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar glikoliz yolağının kuraklık stresinden etkilendiğini göstermektedir. Glikoliz, enerji üretimi ve birincil ve ikincil metabolitlerin biyosentezi için gerekli olan karbonu sağlamaktadır. Su stresi ile birlikte glikoliz yolundaki enzimlerin aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir. Böyle değişiklikler, kuraklık stresinde önemli bir hasar oluşmadan önce erken bir yanıt verildiğinin göstergesidir [Oh ve Komatsu, 2015]. Enerji metabolizmasında yer alan enolaz ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz gibi enzimlerin miktarlarındaki artış, hücrelerin stresle başa çıkmak ve onarım mekanizmaları için gerekli olan enerji ihtiyacının artmasından kaynaklanabilir [Zadraznik ve ark., 2013].

Sitokrom c oksidaz birkaç farklı altbirimden oluşan bir komplekstir. Bu altbirimlerin bazıları mitokondri genomu ile kodlanırken, bazıları çekirdek genomuyla kodlanır [Welchen ve ark., 2004]. Sitokrom c oksidaz mitokondriyal solunum zincirinin son enzimidir [Fambuena ve ark., 2013] ve elektronları moleküler oksijene transfer ederek su oluşturur. Sitokrom c oksidaz düzenlenmesi enerji üretim yollarının etkinleştirilmesi için gerekli olabilir [Yan ve ark., 2005]. Çalışmamızda, sitokrom c oksidaz ifadesi kuraklık stresiyile birlikte *C. arietinum* türünde yükselmiştir. Yan ve ark. [2005] yaptıkları çalışmada, tuz stresinin sitokrom c oksidaz enzim ifadesini arttırdığını bulmuşlardır. Bu enzimin ifadesinde oluşan artış, stres koşullarıyla başa çıkmak için gerekli olan enerji üretimi için önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bu enzim ifadesi arttığında glikolizden gelen daha fazla NADH'ı

oksitleyerek daha fazla ATP üretebilecektir. *C. reticulatum*'da ise kuraklık stresiyile birlikte bu enzimin ifadesi düşmüştür. Bulgularımıza benzer şekilde Budak ve ark. [2013] yabani buğdayda sitokrom c oksidaz ifadesinin kuraklık stresiyile birlikte azaldığını bulmuşlardır. Bu araştırmacıların da belirttiği gibi, daha önce yayınlanmış raporlar incelendiğinde bu enzimin miktarındaki düşüş açıklanmayı beklemektedir.

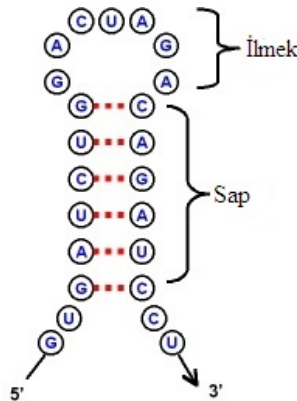
#### 4.2.5.6. Kuraklık stresinin diğer proteinlerde meydana getirdiği ifade değişiklikleri

Plastid lipidleriyle ilişkili protein fibrillin gen ailesinin bir üyesidir. Geniş bir protein grubuna sahip olan fibrillin protein ailesinin birçok fizyolojik görevi vardır. Bu görevlerinin arasında bitkinin fotosentetik kısımlarını koruyarak, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı bitkiyi dayanıklı hale getirmek vardır [Gharechahi ve ark., 2015]. Chen ve ark. [1998] ve Gillet ve ark. [1998] kuraklık stresiyile fibrillin proteinlerinin miktarının belirgin bir şekilde arttığını belirlemişlerdir. Chen ve ark. [1998] yaptıkları çalışmada, transkript seviyesinde bir artış bulmamalarına rağmen protein ifadesinin arttığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar fibrillinin birçok rolünün yanında, kloroplastlarda stresle uyarılan protein grubu olarak tanımlamışlardır. Gillet ve ark. [1998] fibrillin protein ailesinden olan CDSP 34 proteinini de araştırmışlar ve kuraklık stresiyile birlikte bu proteinin transkriptlerinin ve ifadesinin arttığını rapor etmişlerdir. CDSP 34 çevresel stresler altında tilakoidlerin kararlılığını sağlıyor ve osmotik ya da oksidatif stres kaynaklı hasarı engelliyor olabilir. Manac'h ve Kuntz [1999] birçok abiyotik streste fibrillin miktarının arttığı belirlemişler ancak karanlıkta herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu sonuçlar fotooksidasyona neden olan streslerin fibrillin miktarını arttırdığını gösterir. Araştırmacılara göre ROT miktarındaki artış bu proteinin miktarının artmasına neden olabilir. Çevresel streslerden dolayı oluşan ROT'un çekirdekte fibrillin geninin uyarılması için bir uyarı olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda, *C. arietinum*'da fibrillin 4 proteininin miktarı artarken, *C. reticulatum*'da değişmemiştir. Bu sonuç kültür türünde kuraklık stresine bağlı olarak ROT miktarının yabani türe göre çok daha fazla artmış olabileceğini akla getirmektedir. Yabani türler kültür türlerine göre daha güçlü bir antioksidan savunma sistemine sahiptir [Ünyayar ve ark., 2004; Ünyayar ve ark., 2005; Çevik ve Ünyayar, 2015]. Kuraklık stresine bağlı olarak oluşan ROT süpürüldüğünde fibrillin oluşması

için çekirdeğe bir uyarı gönderilemeyecektir. Fibrillin miktarındaki artışın kuraklık stresine karşı bir koruma sağladığı bilinmektedir, fakat bu mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır.

Kuraklık stresinde protein ifadelerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerden biri olan kloroplast saplı-ilmek bağlanma proteini (CSP41a) bir RNA bağlanma proteini. CSP41 birincil metabolizma ile ilişkili olmayan ve kloroplastlarda oldukça bol bulunan proteinlerden birisidir [Qi ve ark., 2012]. İlk olarak monomerik ribonükleaz olarak tanımlanmış, ardından ribozomların olgunlaşmasında da rol oynadığı bulunmuştur. Bu durum bu proteinin çok işlevli bir protein olduğunu gösterir. Bollenbach ve ark. [2009] tütün bitkisinde yaptıkları çalışmada, CSP41a proteininin ifadesini antisense RNA yöntemiyle %90 kadar azaltmışlar ve bunun sonucunda bazı transkriptlerinin bozulma hızının ciddi derecede düştüğünü göstermişlerdir. Bu sonuçlar CSP41a proteininin endonükleolitik kesimlerle mRNA dönüşümünü başlattığı hipotezini desteklemektedir [Bollenbach ve ark. 2003].

CSP41a proteini mRNA'ların 3'-UTR bölgesinde bulunan saplı-ilmek yapısına bağlanmaktadır (Şekil 4.18.). Bu yapı poli-A kuyruğu ile birlikte mRNA'ların kararlılığını sağlayan yapıdır [Beligni ve Mayfield, 2008].



Şekil 4.18. mRNA'ların 3'-UTR bölgesinde bulunan saplı-ilmek yapısı [[http:// www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture21/Lecture21.htm](http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture21/Lecture21.htm)].

Yapılan çalışmalar bu 3' saplı-ilmek yapılarının mRNA'ların 3'-5' yönündeki ekzonükleotik bozulmasını engelleyerek, olgun mRNA'ların kararlılığı için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu kararlı ikincil yapıların yokluğunda mRNA'lar heterojen ve genellikle kararsız bir yapıda olurlar. Bu nedenle 3' saplı-ilmek yapısının kloroplast mRNA'larının düzenlenmesinde merkezi bir rolü vardır [Yang ve Stern, 1997]. CSP41a'nın endoribonükleaz aktivitesi sayesinde saplı-ilmek yapısı kesilir ve 3' serbest uç oluşturulur. 3' serbest uç oluşumunun ardından RNA'lar ekzonükleazlara karşı korunmasız hale gelir ve bozulma gerçekleşir [Yang ve Stern, 1997; Qi ve ark., 2012]. Yapılan diğer çalışmalarda ise bu proteinin endoribonükleolitik aktivitesinin yanında RNA'nın olgunlaşmasında, düzenlenmesinde, kararlılığında ve translasyonunda rol oynadığını göstermiştir [Beligni ve Mayfield, 2008; Bollenbach ve ark. 2009; Qi ve ark., 2012]. Çalışmamızda, CSP41a proteininin ifadesi kuraklık stresıyla birlikte *C. reticulatum*'da artarken, *C. arietinum*'da bir değişiklik olmamıştır. Bu protein ifadesindeki değişiklik kuraklık stresıyla birlikte kloroplastik mRNA'larda bir düzenlenme olduğunu göstergesidir. Bulgularımıza benzer şekilde Vankova ve ark. [2012] tütün bitkisinde yaptıkları çalışmada kuraklık stresıyla birlikte CSP41a gen ifadesinin arttığını belirtmişlerdir. Meydana gelen bu artış ile prolin miktarındaki artış arasında pozitif bir bağlantı olduğu da belirtilmiş ve bu durumun kloroplast işlevinin onarılması için önemli olduğu vurgulanmıştır. *C. reticulatum*'da kuraklık stresinde prolin miktarının belirgin bir artış göstermesi, yukarıda ifade edildiği gibi, kloroplastik bir koruma sağlamış olabilir. Ancak literatür bilgilerimize göre CSP41a proteininin abiyotik stresle olan ilişkisini ortaya koyan bir çalışma yoktur. Yine Falvo ve ark.[2011] yaptıkları çalışmada CSP41a proteinin UV stresıyla birlikte arttığını bulmuşlardır. Fakat araştırmacılar abiyotik streste bu proteinin rolünün henüz açıklanmadığını belirtmişlerdir. Çok işlevli olan bu proteinin kuraklık stresıyla birlikte miktarındaki artışın nedeni araştırılmayı beklemektedir.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Elde ettiğimiz veriler ve bunların değerlendirilmesi ile aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

- Kuraklık stresi gerek kültür nohut *C. arietinum* L. türünde, gerekse yabani nohut *C. reticulatum* Ladiz. türünde morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açmıştır.
- Morfolojik değişiklikler incelendiğinde; kuraklık stresinin *C. arietinum* türünde özellikle kök büyümesini olumsuz etkilediği söylenebilir. Bu durum büyüme ile ilgili proteinlerin ifadelerinin azalmasıyla açıklanabilir.
- Fizyolojik değişiklikler incelendiğinde, kuraklık sırasında yabani *C. reticulatum*'un su kullanım etkinliği kültür *C. arietinum*'a göre daha yüksektir. Bu da suyun korunmasında etkili olan serbest prolin miktarının ve prolin biyosentezinde yer alan protein ifadelerinin artması ile açıklanabilir.
- Kuraklık stresi her iki türde de proteom bileşimini değiştirmiştir. Özellikle fotosentez mekanizmasında yer alan proteinlerin ifadelerinin kuraklık stresıyla birlikte değiştiği belirlenmiştir. Bu durum kuraklık stresinden en çok fotosentez mekanizmasının etkilendiğini gösterir.
- Döngüsel ve doğrusal reaksiyonlarda özellikle hız sınırlayıcı proteinlerde meydana gelen ifade değişiklikleri, bu protein ifadelerinin karmaşık stres yanıtında önemli bir role sahip olduklarını gösterir. Bu proteinlerde meydana gelen ifade değişiklikleri bu proteinleri yapılabilecek mühendislik stratejileri için iyi bir aday haline getirmektedir.
- Kuraklık stresine yanıt olarak meydana gelen protein ifade değişiklikleri, stres yanıtlarının dayanıklı ve kültür türde bazı basamaklarda birbirinden farklı yollarda oluştuğunu gösterir.

- *C. arietinum*'da ifadesi değişen proteinler incelendiğinde, daha çok ROT kaynaklı sinyal yanıtı sonucunda protein ifadelerinin düzenlenmiş olduğu görülür.
- *C. reticulatum*'da ise ifadesi değişen proteinlere bakıldığında, hücre su potansiyelini yükseltecek ya da koruyacak mekanizmalarda yer alan protein ifadelerinde değişiklikler olduğu görüldü.
- *C. reticulatum* türünün kuraklığa karşı dirençli olduğunun bilinmesi göz önüne alındığında, su kullanım etkinliğini arttırmadaki başarısında yer alan saptanamamış proteinlerin üzerine gidilmesi gerekecektir.

Sonuç olarak; nohut Türkiye'de en çok ekilen baklagildir. Nohutun yetiştirildiği alanlar göz önüne alındığında kuraklık stresinin bu bitkide meydana getirdiği karmaşık yanıtın anlaşılması çok önemlidir. Yapılan bu çalışma, kuraklığa dayanıklılıkları farklı olan iki nohut türünü morfolojik, fizyolojik ve özellikle de proteomik yönden karşılaştırması ve bunun sonucu olarak da meydana gelen farklı stres yanıtının anlaşılmasına yönelik sunacağı katkılardan dolayı oldukça özgün bir çalışmadır. Literatür bilgilerimize göre, yabani nohut ve ülkemizde yetiştiriciliği yapılan kültür nohut türünün karşılaştırılarak kuraklık stres yanıtının proteom düzeyinde incelendiği ilk çalışmadır. Yapılan bu çalışmadan elde edilen veriler, bundan sonra yapılacak proteomik çalışmalara ışık tutması açısından da önemlidir. Bu kapsamda yapılacak daha fazla proteomik çalışma, bu karmaşık stres yanıtlarını aydınlatacak ve çözüm üretecek yeni çalışmalara da ışık tutacaktır.

## KAYNAKLAR

Abbasi, F.M. ve Komatsu, S. "A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath", *Proteomics*, 4: 2072-2081, (2004).

Aebersold, R. ve Mann, M. "Mass spectrometry-based proteomics", *Nature* 422, 198-207, (2003).

Aghaei, K. Ehsanpour, A.K. ve Komatsu, S. "Proteome Analysis of Potato under Salt Stress", *Journal of Proteome Research*, 7: 4858-4868, (2008).

Venkatesh, J. ve Park, S.W. "Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants", *Botanical Studies*, 55: 38-47, (2014).

Alam, I. Sharmin, S.A. Kim, K.H. Yang, J.K. Choi, M.S. ve Lee, B.H. "Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress", *Plant Soil*, 333:491-505, (2010).

Amme, S. Matros, A. Schlesier, B. ve Mock, H.P. "Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology", *Journal of Experimental Botany*, 57 (7): 1537-1546, (2006).

Andersson, J. Wentworth, M. Walters, R.G. Howard, C.A. Ruban, A.V. Horton, P. ve Jansson, S. "Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness", *Plant J.* 35(3): 350-61, (2003).

Arjenaki, F.G. Jabbari, R. ve Morsh, A. "Evaluation of Drought Stress on Relative Water Content, Chlorophyll Content and Mineral Elements of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties", *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(11): 726-729, (2012).



Arve, L.E., Torre, S. Olsen, J. E. ve Tanino, K. K., "Stomatal Responses to Drought Stress and Air Humidity, Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations", (Editör: Arun Shanker), ISBN: 978-953-307-394-1, (2011).

Ashraf, M. ve O'leary, J.W. "Effect of Drought Stress on Growth, Water Relations, and Gas Exchange of Two Lines of Sunflower Differing in Degree of Salt Tolerance", Int. J. Plant Sci. 157(6): 729-732. (1996).

Banerjee, S. ve Mazumdar, S. "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte", International Journal of Analytical Chemistry, 1: 1-40, (2012).

Basu, P.S. Berger, J.D. Turner, N.C. Chaturvedi, S.K. Ali, M. ve Siddique, K.H.M. "Osmotic adjustment of chickpea (*Cicer arietinum*) is not associated with changes in carbohydrate composition or leaf gas exchange under drought", Annals of Applied Biology 150: 217-225, (2007).

Basu, P.S. Ali, M. Chaturvedi, S.K. "Osmotic adjustment increases water uptake, remobilization of assimilates and maintains photosynthesis in chickpea under drought", Indian J Exp Biol, 45(3): 261-267, (2007).

Bates, L.S. Waldren, R.P. ve Teare, I.D. "Rapid determination of free proline for water-stress studies", Plant and Soil, 39(1): 205-207, (1973).

Beligni, M.V. ve Mayfield, S.P. "Arabidopsis thaliana mutants reveal a role for CSP41a and CSP41b, two ribosome-associated endonucleases, in chloroplast ribosomal RNA metabolism", Plant Mol Biol 67(4): 389-401, (2008).

Blödner, C. Majcherczyk, A. Kües, U. ve Polle, A. "Early drought-induced changes to the needle proteome of Norway spruce", Tree Physiology 27: 1423-1431 (2007).

Bradford, M.M. "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72: 248-254, (1976).

Bjellqvist, B. Ek, K. Righetti, P. G. Gianazza, E. Görg, A. Westermeier, R. ve Postel, W. "Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications", *J. Biochem. Biophys. Meth.* 6: 317-339, (1982).

Bogeat-Triboulot, M.B. Brosché, M. Renaut, J. Jouve, L. Le, T.D. Fayyaz, P. "Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions", *Plant Physiol*, 143: 876-92, (2007).

Bollenbach, T.J. Tatman, D.A. ve Stern, D.B. "CSP41a, a multifunctional RNA-binding protein, initiates mRNA turnover in tobacco chloroplasts", *Plant J.* 36(6): 842-52, (2003).

Bollenbach, T.J. Sharwood, R.E. Gutierrez, E. Mache, S.L. ve Stern, D.B. "The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in *Arabidopsis*", *Plant Mol Biol* 69: 541-552, (2009).

Boyer, J.S. "Plant productivity and environment", *Science* 218: 443-448, (1982).

Budak, H. Akpinar, B.A. Unver, T. ve Turktas, M. "Proteome changes in wild and modern wheat leaves upon drought stress by two-dimensional electrophoresis and nanoLC-ESI-MS/MS", *Plant Mol Biol*, 83(1-2): 89-103, (2013).

Canci, H. ve Toker, C. "Evaluation of yield criteria for drought and heat resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.)", *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195: 47-54, (2009).

Carpentier, S.C. Panis, B. Vertommen, A. Swennen, R. Sergeant, K. Renaut, J. Laukens, K. Witters, E. Samyn, B. ve Devreese, B. "Proteome analysis of non-model plants: A challenging but powerful approach", *Mass Spectrometry Reviews*, 27: 354-377, (2008).

Carvalho, M.H.C. "Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling", *Plant Signal Behaviour*, 3(3): 156-165, (2008).

Caruso, G. Cavaliere, C. Guarino, C. Gubbiotti, R. Foglia, P. ve Laganà, A. "Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry", *Anal Bioanal Chem*, 391: 381-390, (2008).

Caruso, G. Cavaliere, C. Foglia, P. Gubbiotti, R. Samperi, R. Lagana, A. "Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry", *Plant Science* 177: 570-576, (2009).

Chang, W.W. Huang, L. Shen, M. Webster, C. Burlingame, A.L. ve Roberts, J.K. "Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry", *Plant Physiol*, 122: 295-318, (2000).

Chen, H.C. Klein, A. Xiang, M. Backhaus, R.A. ve Kuntz, M. "Drought- and wound-induced expression in leaves of a gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein", *The Plant Journal* 14(3): 317-326, (1998).

Choudhary, S. Gaur, R. Gupta, S. ve Bhatia, S. "EST-derived genic molecular markers: development and utilization for generating an advanced transcript map of chickpea", *Teor Appl Gen* 124: 1449-1462, (2012).

Costa, P. Bahrman, N. Frigerio, J.M. Kremer, A. ve Plomion, C. "Water-deficit-responsive proteins in maritime pine", *Plant Mol Biol* 38: 587-596, (1998).

Cramer, G. R. Urano, K. Delrot, S. Pezzotti, M. ve Shinozaki, K. "Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective", BMC Plant Biology, 11: 163-177, (2011).

Çevik, S. Yıldızlı, A. Yandım, G. Göksu, H. Gultekin, M.S. Güzel Değer, A. Çelik, A. Şimşek Kuş, N. ve Ünyayar, S. "Some synthetic cyclitol derivatives alleviate the effect of water deficit in cultivated and wild-type chickpea species", Journal of Plant Physiology, 171(10): 807-16, (2014).

Çevik, S. ve Ünyayar, S. "The Effects of Exogenous Application of Ascorbate and Glutathione on Antioxidant System in Cultivated *Cicer arietinum* and Wild Type *C. reticulatum* under Drought Stress", SDU Journal of Natural and Applied Science, 19(1): 91-97, (2015).

Çevik, S. Ünyayar, S. ve Ergül, A. "Genetic Relationships Between Cultivars Of *Cicer Arietinum* And Its Progenitor Grown In Turkey Determined By Using The SSR Markers", Turk J Field Crops, 20(1), 109-114, (2015).

Deeba, F. Ashutosh, K. Pandey, S.R. Ashwarya, Mishra. Singh, R. Sharma, Y.K. Pramod, A. Shirke, V.P. "Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress", Plant Physiology and Biochemistry, 53: 6-18, (2012).

Domon, B. ve Aebersold, R. "Mass Spectrometry and Protein Analysis", Science, 312(5771): 212-217, (2006).

DuPont, F.M. Tanaka, C.K. ve Hurkman, W.J. "Separation and immunological characterization of membrane fractions from barley roots", Plant Physiology, 86: 717-724, (1988).

Eyidogan, F. ve Öz, M.T. "Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings", Acta Physiol Plant, 29: 485-493, (2007).

Faghani, E. Gharechahi, J. Komatsu, S. Mirzaei, M. Khavarinejad, R.A. Najafi, F. Farsad, L.K. Salekdeh, G.H. "Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance", *Journal of proteomics*, 114: 1-15, (2015).

Falvo, S. Acquadro, A. Albo, A.G. Americac, T. ve Lanteri, S. "Proteomic analysis of PEG-fractionated UV-C stress-response proteins in globe artichoke", *Plant Molecular Biology Reporter*, 30: 1-13,(2011).

Fambuena, N.M. Mesejo, C. Reig, C. Agustí, M. Tárraga, S. Lisón, P. Iglesias, D.J. Millo, E.P. ve Mas, M.C.G. "Proteomic study of ‘Moncada’ mandarin buds from on-versus off-crop trees", *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 41-55, (2013).

Fan, W. Zhang, Z. ve Zhang, Y. "Cloning and molecular characterization of fructose1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*", *Plant Cell Rep*, 28: 975-984, (2009).

Fang, X. Turner, N.C. Yan, G. Li, F. ve Siddique, K.H.M. "Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought", *Journal of Experimental Botany*,61(2): 335-45, (2010).

Farooq, M., Wahid, A. Kobayashi, N. Fujita. D. ve Basra, S.M.A. "Plant drought stress: effects, mechanisms and management", *Agronomy for Sustainable Development*, 29(1): 185-212, (2009).

Feng, L. Wang, K. Li, Y. Tan, Y. Kong, J. Li, H. Li, Y. ve Zhu, Y. "Overexpression of SBPase enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic rice plants", *Plant Cell Reports* 26: 1635-1646, (2007).

Fenn, J.B. Mann, M. Meng, C.K. Wong, S.F. ve Whitehouse, C.M. "Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules", *Science*, 246: 64-71, (1989).

Forsthoefel, N.R. Cushman, M.A.F. ve Cushman, J.C. "Posttranscriptional and Posttranslational Control of Enolase Expression in the Facultative Crassulacean Acid Metabolism Plant *Mesembryanthemum crystallinum* L.", *Plant Physiol.* 108(11): 85-95, (1995).

Gao, L. Yan, X. Li, X. Guo, G. Hua, Y. Mac, W. ve Yan, Y. "Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE)", *Phytochemistry* 72: 1180–1191, (2011).

Ghabooli, M, Khatabi, B. Ahmadi, F.S. Sepehri, M. Mirzaei, M. Amirkhani, A. Novo, J.V.J. ve Salekdeh, G.H. "Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley", *Journal of proteomics*, 94: 289-301, (2013).

Ghanem, R. A. Boggs, L. C. Smith, J. L. ve Vandemark, G. J. "Nitrogen Fixation by US and Middle Eastern Chickpeas with Commercial and Wild Middle Eastern Inocula", *ISRN Soil science*, 2012: 1-5, (2012).

Gharechahi, J. Hajirezaei, M.R. Ghasem Hosseini Salekdeh "Comparative proteomic analysis of tobacco expressing cyanobacterial flavodoxin and its wild type under drought stress", *Journal of Plant Physiology* 175: 48-58, (2015).

Gillet, B. Beyly, A. Peltier, G. ve Rey, P. "Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination", *The Plant Journal*, 16(2): 257-262, (1998).

Görg, A. Postel, W. ve Günther, S. "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients", *Electrophoresis*, 9: 531-546, (1988).

Gunes, A. Inal, Adak, M.S. Bağci, E.G. Cicek, N. ve Eraslan, F. "Effect of drought stress implemented at pre- or post-anthesis stage on some physiological parameters as screening criteria in chickpea cultivars", *Russian Journal of Plant Physiology*, 55 (1): 59-67, (2008).

Gzik, A. "Accumulation of proline and pattern of amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress" *Environmental and Experimental Botany*, 36(1): 29-38, (1996).

Hajheidari, M. Abdollahian-Noghabi, M. Askari, H. Heidari, M. Sadeghian, S.Y. Ober, E.S. ve Salekdeh, G.H. "Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress", *Proteomics*, 5: 950-960, (2005).

Hajirezaei, M.R. Peisker, M. Tschiersch, H. Palatnik, J.F. Valle, E.M. Carrillo, N. ve Sonnewald, U. "Small changes in the activity of chloroplastic NADP<sup>+</sup>-dependent ferredoxin oxidoreductase lead to impaired plant growth and restrict photosynthetic activity of transgenic tobacco plants", *The Plant Journal*, 29(3): 281-293, (2002).

Hartree, E.F. "Determination of protein: A modification of Lowry method that gives a linear photometric response", *Analytical Biochemistry*, 48: 422-427, (1972).

Heerden, P.D.R. ve Laurie, R. " Effects of prolonged restriction in water supply on photosynthesis, shoot development and storage root yield in sweet potato", *Physiologia Plantarum*, 134: 99-109, (2008).

Heide, H. Kalisz, H.M. ve Follmann, H. "The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity", *J. Plant Physiol*, 161: 139-149, (2004).

Ho, C.S. Lam, C.W.K. Chan, M.H.M. Cheung, R.C.K. Law, L.K. Lit, L.C.W. Ng, K.F. Suen, M.W.M. ve Tai, H.L. "Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications", Clin Biochem Rev, 24(1): 3-12, (2003).

Hu, H. Dernier, A.B. Nordström, M.I. Böhmer, M. Xue, S. Ries, A. Godoski, J. Kuhn, J.M. ve Schroeder, J.I. "Carbonic Anhydrases are upstream regulators in guard cells of CO<sub>2</sub>-Controlled Stomatal Movements", Nat Cell Biol, 12(1): 87-18, (2010).

Hu, X. Lu, M. Li, C. Liu, T. Wang, W. Wu, J. Tai, F. Li, X. ve Zhang, J. "Differential expression of proteins in maize roots in response to abscisic acid and drought", Acta Physiol Plant, 33: 2437–2446, (2011).

Huang, B.R. ve Nesmith, D.S. "Soil aeration effects on root growth and activity." Acta Horticulturae, 504: 41-49, (1999).

Hunter, T.C. Andon, N.L. Koller, A. Yates, J.R. ve Haynes, P.A. "The functional proteomics toolbox: methods and applications", J Chromatogr B, 782: 165-181, (2002).

Jagtap, R.N. ve Ambre, A.H. "Overview literature on matrix assisted laser desorption ionization mass spectroscopy (MALDI MS): basics and its applications in characterizing polymeric materials", Bull. Mater. Sci, 28(6): 515-528, (2005).

Jaiswal, D. K. Ray, D. Choudhary, M. K. Subba, P. Kumar, A. Verma, J. Kumar, R. Datta, A. Chakraborty, S ve Chakraborty N. "Comparative proteomics of dehydration response in the rice nucleus: New insights into the molecular basis of genotype-specific adaptation", Proteomics, 13: 3478–3497, (2013).

Jaiswal, D. K. Mishra, P. Subba, P. Rathi, D. Chakraborty, S. and Chakraborty, N. "Membrane-associated proteomics of chickpea identifies Sad1/UNC-84 protein (CaSUN1), a novel component of dehydration signaling", Scientific Reports, 4: 4177-4187, (2014).



Jaleel, C.A. Manivannan, P. Wahid, A. Farooq, M. Al-Juburi, M.J. Somasundaram, R. ve Panneerselvam, R. "Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition", *Int. J. Agric. Biol.*, 11: 100-105, (2009).

Jedrowski, C. Ashoub, A. Beckhaus, T. Berberich, T. Karas, M. ve Brüggemann, W. "Comparative analysis of *Sorghum bicolor* proteome in response to drought stress and following recovery", *International Journal of Proteomics*, 2014: 1-10, (2014).

Jiang, G. Wang, Z. Shang, H. Yang, W. Hu, Z. Phillips, J. Deng, X. " Proteome analysis of leaves from the resurrection plant *Boea hygrometrica* in response to dehydration and rehydration", *Planta*, 225: 1405-1420, (2007).

Jones, H.G., "Plants and Microclimate: a Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology", Cambridge University Press, Cambridge, (1992).

Jongdee, B. Fukai, S. ve Cooper, M. "Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice", *Field crops research*, 76: 153-163, (2002).

Kalefetoğlu, T. ve Ekmekçi, Y. "The effects of drought on plants and tolerance mechanisms", *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 18: 723-740, (2005).

Katerji, N. Hoorn, J.W. Hamdy, A.M. Mastroilli, T. Oweis, R.S. Malhotra, "Response to soil salinity of two chickpea varieties differing in drought tolerance", *Agricultural Water Management*, 50: 83-96, (2001).

Keles, Y. ve Öncel, I. "Growth and Solute Composition in Two Wheat Species Experiencing Combined Influence of Stress Conditions", *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(2): 203-208, (2004).

Kim, S.T. Cho, K.S. Jang, Y.S. ve Kang, K.Y. "Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays", *Electrophoresis*, 22: 2103-2109, (2001).

Kim, S.T. Cho, K.S. Yu, S. Kim, S.G. Hong, J.C. Han, C. Bae, D.W. Nam, M.H. ve Kang, K.Y. "Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells", *Proteomics*, 3, 2368-2378, (2003).

KoBmann, J. Sonnewald, U. ve Willmitzer, L. "Reduction of the chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth", *The Plant Journal*, 6(5), 637-650, (1994).

Kosová, K. Vítámvás, P. Prášil, I. T. ve Renaut, J. "Plant proteome changes under abiotic stress-Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response", *Journal of Proteomics*, 74: 1301-1322, (2011).

Krouma, A. "Plant water relations and photosynthetic activity in three Tunisian chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes subjected to drought", *Turk J Agric For*, 34: 257-264, (2010).

Kumar, J. ve Abbo, S. "Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in semiarid environments", *Advances in Agronomy*, 72: 107–138, (2001).

Ladizinsky, G. ve Adler, A. "Genetic relationships among the annual species of *Cicer* L." *Theor. Appl. Genet*, 48: 197-203, (1976).

Lefebvre, S. Lawson, T. Zakhleniuk, O.V. Lloyd, J.C. Raines, C.A. ve Fryer, M. "Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development", *Plant Physiology*, 138: 451-460, (2005).

Leport, L. Turner, N.C. French, R.J. Barr M.D. Duda, R. Davies, S.L. Tennant, D. ve Siddique, K.H.M. "Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a Mediterranean-type environment", *European Journal of Agronomy*, 11: 279–291, (1999).

Lewis, J. K., Wei, J. ve Siuzdak, G. "Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis", *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (Editör: Meyers, R. A.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 5880-5894, (2000).

Lhout, F.A. Zunzunegui, M. Barradas, M.C.D. Tirado, R. Clavijo, A. ve Novo, F.G. "Comparison of proline accumulation in two mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit", *Plant and Soil*, 230: 175-183, (2001).

Lisar, S. Y. S., Motafakkerzad, R. Hossain M. M. ve Rahman, I. M.M. "Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses", *Water Stress* (Editör: Ismail Md. Mofizur Rahman), InTech: Rijeka, Croatia, 1-14, (2012).

Lopez, J.L. "Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis", *Journal of Chromatography B*, 849: 190-202, (2007).

Lu, W. Tang, X. Huo, Y. Xu, R. Qi, S. Huang, J. Zheng, C. ve Wu, C. "Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in Arabidopsis reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses", *Gene*, 503: 65-74, (2012).

Lum, M.S. Hanafi, M.M. Rafii, Y.M. ve Akmar, A.S.N. "Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice", *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(5): 1487-1493, (2014).

Luquez, V.M. ve Guiamét, J.J. "The stay green mutations d1 and d2 increase water stress susceptibility in soybeans" *J Exp Bot*, 53(373): 1421-1428, (2002).

Ma, H. Song, L. Shu, Y. Wang, S. Niu, J. Wang, Z. Yu, T Gu, W. Ma, H. "Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes", *Journal of proteomics*, 75: 1529-1546, (2012).

Ma, L. Wang, Y. Liu, W. ve Liu, Z."Overexpression of an alfalfa GDP-mannose 3, 5-epimerase gene enhances acid, drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis by increasing ascorbate accumulation", *Biotechnol Lett*, 36(11): 2331-2341, (2014).

Mahalingam, R. Buitrago, A.M.G. Eckardt, N. Shah, N. Garcia, A.G. Day, P. Raina, R. Ve Fedoroff, N.V. "Characterizing the stress/defense transcriptome of Arabidopsis", *Genome Biology*, 4: 10-20, (2003).

Mafakheri, A. Siosemardeh, A. Bahramnejad, B. Struik, P.C. ve Sohrabi, Y. "Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars", *AJCS*, 4(8):580-585, (2010).

Manac'h, N. ve Kuntz, M. "Stress induction of a nuclear gene encoding for a plastid protein is mediated by photo-oxidative events", *Plant Physiol. Biochem*, 37(11): 859-868, (1999).

Mann, M. Hendrickson, R.C. ve Pandey, A. "Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry", *Annu. Rev. Biochem*, 70: 437-473 (2001).

Marouga, R. David, S. ve Hawkins, E. "The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology", *Anal Bioanal Chem*, 382: 669-678, (2005).

Mantri, N. L. Ford, R. Coram, T.E. ve Pang, E.C.K. "Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought", *BMC Genomics*, 8: 303-317, (2007).

Marwal, A., Sahu, A. K. ve Gaur, R. K. "New Insights in the Functional Genomics of Plants Responding to Abiotic Stress", Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress, 1st ed. (Editör: Gaur, R. K. ve Sharma, P), Taylor & Francis Group, Florida, 232-247, (2014).

Matysik, J.A. Bhalu, B. ve Mohanty, P. "Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants", Current Science, 82(5): 525-532, (2002).

Mayfield, S.P. Bennoun, P. ve Rochaix, J.D. "Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in *Chlamydomonas reinhardtii*", The EMBO, 6(2): 313-318, (1987).

Michalowski, C.B. Schmitt, J.M. ve Hans, J. Bohnert. "Expression during Salt Stress and Nucleotide Sequence of cDNA for Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Reductase from *Mesembryanthemum crystallinum*", Plant Physiol, 89: 817-822, (1989).

Miyagawa, Y. Tamoi, M. ve Shigeoka, S. "Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth", Nature Biotechnology, 19: 965-969, (2001).

Mohammadkhani, N. ve Heidari, R. "Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties", World Applied Sciences Journal, 3(3): 448-453, (2008).

Mostajeran, A. ve Eichi, V.R. " Effects of Drought Stress on Growth and Yield of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars and Accumulation of Proline and Soluble Sugars in Sheath and Blades of Their Different Ages Leaves", American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci, 5(2): 264-272, (2009).

Nagy, Z. Németh, E. Guóth, A. Bona, L. Wodala, B. ve Pécsváradi, A. "Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco", *Plant Physiology and Biochemistry*, 67: 48-54, (2013).

Nayyar, H. ve Chander, S. "Protective Effects of Polyamines against Oxidative Stress Induced by Water and Cold Stress in Chickpea", *J. Agronomy & Crop Science*, 190: 355-365, (2004).

Nedunchezhiyan, M. Byju, G. ve Ray, R.C. "Effect of Tillage, Irrigation, and Nutrient Levels on Growth and Yield of Sweet Potato in Rice Fallow", *ISRN Agronomy*, 2012: 1-13, (2012).

Nguyen, T.T. Taylor, P.W.J. Redden, R.J. ve Ford, R. "Genetic diversity estimates in Cicer using AFLP analysis", *Plant Breed*, 123: 173-179, (2004).

Oh, M.W. ve Komatsu, S. "Characterization of proteins in soybean roots under flooding and drought stresses", *Journal of proteomics*, 114: 161-181, (2015).

Pace, P.F. Cralle, H.T. El-Halawany, S.H.M. Cothren, J.T. ve Senseman, S.A. "Drought-induced Changes in Shoot and Root Growth of Young Cotton Plants", *The Journal of Cotton Science*, 3: 183-187 (1999).

Pandey, A. Chakraborty, S. Datta, A. ve Chakraborty, N. "Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from Chickpea (*Cicer arietinum* L.)", *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(1):88-107, (2008).

Peng, Z. Wang, M. Li, F. Lv, H. Li, C. ve Xia, G. "A Proteomic Study of the Response to Salinity and Drought Stress in an Introgression Strain of Bread Wheat", *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(12): 2676-86, (2009).

Phinney, B. ve Thelen, J.J. "Proteomic characterization of a Triton X-100 insoluble fraction from chloroplasts defines a novel group of proteins associated with macromolecular structures", J Proteome Res, 4: 497-450, (2005).

Pinto, A. Halliday, C. Zahra, M. Hal, S. Olma, T. Maszewska, K. Iredell, J.R. Meyer, W. Sharon, C. ve Chen, A. "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolate Contingent on Robust Reference Spectra", PLoS ONE, 6(10): 2011.

Rabbani, M.A. Maruyama, K. Abe, H. Khan, M.A. Katsura, K. Ito, Y. Yoshiwara, K. Seki, M. Shinozaki, K. ve Shinozaki, K.Y. "Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses", Plant Physiology, 133: 1755-1767, (2003).

Rabello, A.R. Guimarães, C.M. Rangel, P.H.N. Silva, F.R. Seixas, D. Souza, E. Brasileiro, A.C.M. Spehar, C.R. Ferreira, M.E. ve Mehta, A. "Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L)", BMC Genomics, 9: 485-493, (2008).

Rabilloud, T. Valette, C. ve Lawrence, J.J. "Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of 2-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first-dimension", Electrophoresis, 15: 1552-1558, (1994).

Rabilloud, T. ve Lelong, C. "Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial", Journal of proteomics, 74: 1826-1841, (2011).

Rahbarian, R. Nejad, R.K. Ganjeali, A. Bagheri, A. ve Najafi, F. "Drought Stress Effects On Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and Water Relations In Tolerant and Susceptible Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes", Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 53(1): 47-56, (2011).

Raines, C.A. "The Calvin cycle revisited", *Photosynthesis Research*, 75: 1-10, (2003).

Rao, L.S. Rani, P. U. Deshmukh, P. S. Kumar P. A. ve Panguluri, S. K. "RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 1235-1244, (2007).

Reddy, A. R. Chaitanya, K. V. ve Vivekanandan, M. "Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants", *Journal of Plant Physiology*, 161 (11): 1189-1202, (2004).

Rejeb, I. B., Miranda, L. A. Cordier, M. ve Mauch-Mani, B. "Induced Tolerance and Priming for Abiotic Stress in Plants" *Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress*, 1st ed. (Editör: Gaur, R. K. ve Sharma, P), Taylor & Francis Group, Florida, 232-247, (2014).

Rey, P. Pruvot, G. Becuwe, N. Eymery, F. Rumeau, D. ve Peltier, G. "A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants", *Plant J*, 13: 97-107, (1998).

Righetti, P.G. ve Bossi, A. "Isoelectric Focusing in immobilized pH gradients: an update", *Electrophoresis*, (1-2):77-89, (1997).

Rodriguez, R.E. Lodeyro, A. Poli, H.O. Zurbriggen, M. Peisker, M. Palatnik, J.F. Tognetti, V.B. Tschiersch, H. Hajirezaei, M.R. Valle, E.M. ve Carrillo, N. "Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic Ferredoxin-NADP(H) Reductase display normal rates of photosynthesis and increased tolerance to oxidative stress", *Plant Physiology*, 143: 639-649, (2007).

Roosens, N.H.C.J. Thu, T.T. Iskandar, H.M. ve Jacobs, M. "Isolation of the Ornithine-d-Aminotransferase cDNA and Effect of Salt Stress on its Expression in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Physiol*, 117: 263-271, (1998).



Roy, A., "Proteomic Analyses of Alterations in Plant Proteome Under Drought Stress", Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress, 1st ed. (Editör: Gaur, R. K. ve Sharma, P), Taylor & Francis Group, Florida, 232-247, (2014).

Ryan, J.G., "A global perspective on pigeonpea and chickpea sustainable production systems: present status and future potential", In: Asthana AN, (Editör: Ali, M.) Recent advances in pulses research, Kanpur, 1-30, (1997).

Salekdeh, G. H. Siopongco, J. Wade, L. J. Ghareyazie, B. ve Bennett, J. "A proteomic approach to analyzing drought and salt responsiveness in rice", Field Crops Research, 76: 199-219, (2002).

Sanda, S. Yoshida, K. Kuwano, M. Kawamura, T. Munekage, Y.N. Akashi, K. ve Yokota, A. "Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon", Physiologia Plantarum, 142: 247-264, (2011).

Sangwan, N.S. Farooq, A.H.A. ve Sangwan, R.S.S. "Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses" New phytologist, 128: 173-179, (1994).

Seki, M. Narusaka, M. Ishida, J. Nanjo, T. Fujita, M. Oono, Y. Kamiya, A. Nakajima, M. Enju, A. Sakurai, T. Satou, M. Akiyama, K. Taji, T. Shinozaki, K.Y. Carninci, P. Kawai, J. Hayashizaki, Y. ve Shinozaki, K. "Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray", The Plant Journal, 31(3): 279-292, (2002).

Sepanlo, N. Talebi, R. Rokhzadi, A. Mohammadi, H. "Morphological and physiological behavior in soybean (*Glycine max*) genotypes to drought stress implemented at pre- and post-anthesis stages", Acta Biologica Szegediensis, 58(2): 109-113, (2014).

Serraj, R. Sinclair, T. R. ve Purcell, L. C. "Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought", *Journal of Experimental Botany*, 50 (331): 143–155, (1999).

Sharma, H.C. Pampapathy, G. Lanka, S.K. ve Ridsdill-Smith, T.J. "Exploitation of wild *Cicer reticulatum* germplasm for resistance to *Helicoverpa armigera*" *J Econ Entomol*, 98(6):2246-2253, (2005).

Sheffield, J., ve Wood, E. F., "Drought - past problems and future scenarios", 210 s., (2011).

Shi, H. Ye, T. ve Chan, Z. "Comparative proteomic responses of two bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.) varieties contrasting in drought stress resistance", *Plant Physiology and Biochemistry*, 82: 218-228, (2014).

Singh, N. Farooq, A.H.A. ve Singh, R. "Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses" *New phytol*, 128: 173-179, (1994).

Singh, R. Sharma, P. Varshney, R.K. Sharma, S.K. ve Singh, N.K. "Chickpea Improvement: Role of Wild Species and Genetic Markers", *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25: 267-314, (2008).

Smirnoff, N. "Plant resistance to environmental stress", *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 214-219, (1998).

Smith, P.K. Krohn, R.I. Hermanson, G.T. Mallia, A.K. Gartner, F.H. Provenzano, M.D. Fujimoto, E.K. Goeke, N.M. Olson, B.J. ve Klenk, D.C. "Measurement of protein using bicinchoninic acid", *Analytical Biochemistry*, 150(1): 76-85, (1985).

Sobhanian, H. Razavizadeh, R. Nanjo, Y. Ehsanpour, A.A. Jazii, F.R. Motamed, N. ve Komatsu, S. "Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress", *Proteome Science*, 8: 8-19, (2010).

Stalikas, C.D. "Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids", J. Sep. Sci, 30: 3268-3295, (2007).

Sudupak, M.A. Akkaya, M. ve Kence, A. "Analysis of genetic relationships among perennial and annual Cicer species growing in Turkey using RAPD markers", Theor Appl Gen, 105: 1220-1228, (2002).

Sugihara, K. Hanagata, N. Dubinsky, Z. Baba, S. ve Karube, I. "Molecular Characterization of cDNA Encoding Oxygen Evolving Enhancer Protein 1 Increased by Salt Treatment in the Mangrove Bruguiera gymnorrhiza", Plant Cell Physiol, 41(11): 1279-1285 (2000).

Szabados, L. ve Savoure, A. "Proline: a multifunctional amino acid", Trends Plant Sci, 15(2): 89-97, (2010).

Şelale, H., Proteomics basis of drought tolerance in Chickpea", İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 80 s., (2010).

Talebi, R. Ensafi, M.H. Baghebani, N. Karami, E. ve Mohammadi, K. "Physiological responses of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes to drought stress", Environmental and Experimental Biology, 11: 9-15, (2013).

Terzi, R. Sağlam, A. Kutlu, N. Nar, H. ve Kadioğlu, A. "Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars", Turk J Bot, 34: 1-10, (2010).

Tezara, W. Mitchell, V.J. Driscoll, S.D. ve Lawlor, D.W. "Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP", Nature, 401: 914-917, (1999).

Thelen, J. J., "Introduction to Proteomics: a Brief Historical Perspective on Contemporary Approaches", Plant Proteomics, (Editör: Samaj, J. ve Thelen, J. J.), 1-13, (2007).

Thermo scientific, "Protein Measurement Accuracy and Reproducibility", Performance data, (2010).

Tiemann, K. Inzé, D. Montagu, M. ve Barz, W. "Pterocarpan phytoalexin biosynthesis in elicitor-challenged chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell cultures. Purification, characterization and cDNA cloning of NADPH:isoflavone oxidoreductase", Eur J Biochem, 15: 200(3): 751-257, (1991).

Udupa, S.M. Robertson, L.D. Weigand, F. Baum, M. ve Kahl, G. "Allelic variation at (TAA)<sub>n</sub> microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm", Mol Gen Genet, 261: 354-363, (1999).

Uematsu, K. Suzuki, N. Iwamae, T. Inui, M. ve Yukawa, H. "Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants", Journal of Experimental Botany, 63(8): 3001-3009, (2012).

Ulemale, C.S. Mate, S.N. ve Deshmukh, D.V. "Physiological Indices for Drought Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.)", World Journal of Agricultural Sciences, 9 (2): 123-131, (2013).

Unkovich, M. J. ve Pate, J. S. "An appraisal of recent field measurements of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by annual legumes", Field Crops Research, 65: 211-228, (2000).

Ünlü, M. Morgan, M.E. ve Minden, J.S. "Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts", Electrophoresis, 18(11):2071-2077, (1997).

Ünyayar, S. Keleş, Y. ve Ünal, E. "Proline and ABA levels in two sunflower genotypes subjected to water stress" Bulg J Plant Physiol 30(3-4): 34-47, (2004).

Ünyayar, S. Keleş, Y. ve Çekiç, F.Ö. "The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations", *Plant Soil Environ*, 51 (2): 57-64, (2005).

Vanková, R. Dobrá, J. ve Štorchová, H. "Recovery from drought stress in Tobacco An active process associated with the reversal of senescence in some plant parts and the sacrifice of others", *Plant Signaling & Behavior*, 7: 19–21, (2012).

Vendruscolo, E.C.G. Schuster, I. Pileggi, M. Scapim, C.A. Molinari, H.B.C. Marure, C.J. ve Vieira, L.G.E. "Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat", *Journal of Plant Physiology*, 164: 1367-1376, (2007).

Vincent, D. Ergül, A. Bohlman, M. Tattersall, A. Tillett, R. Wheatley, M. Woolsey, R. Quilici, D. Joets, J. Schlauch, K. Schooley, D. Cushman, J. ve Cramer, G. "Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity", *J Exp Bot*, 58: 1873-1892, (2007).

Yamada, M. Morishita, H. Urano, K. Shiozaki, N. Shinozaki, K.Y. Shinozaki, K. ve Yoshida, Y. "Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress", *Journal of Experimental Botany*, 56(417): 1975-1981, (2005).

Yan, S. Tang, Z. Su, W. ve Sun, W. "Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root", *Proteomics*, 5: 235-244, (2005).

Yang, Z.B. Eticha, D. Führs, H. Heintz, D. Ayoub, D. Dorsselaer, A.V. Schlingmann, B. Rao, I.M. Braun, H.P. ve Horst, W.J. "Proteomic and phosphoproteomic analysis of polyethylene glycol-induced osmotic stress in root tips of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Journal of Experimental Botany*, 64(18): 5569-5586 (2013).

Yang, J ve Stern, D.B. "The Spinach Chloroplast Endoribonuclease CSP41 Cleaves the 3'-Untranslated Region of *petD* mRNA Primarily within Its Terminal Stem-Loop Structure", *J Biol Chem*, 272(19): 12874-12880, (1997).

Yates, J.R. "Mass spectrometry and the age of the proteome", *J. Mass Spectrom*, 33: 1-19, (1998).

Yates, J. R. "Mass spectrometry from genomics to proteomics", *Trends in Genetics*, 16(1): 5-8, (2000).

Yu, S. Zhang, X. Guan, Q. Takano, T. ve Liu, S. "Expression of a carbonic anhydrase gene is induced by environmental stresses in Rice (*Oryza sativa* L.)", *Biotechnol Lett* 29: 89-94, (2007).

Zadražnik, T. Hollung, K. Jacobsen, W.E. Megliča, V. Vozliča, J.S. "Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Journal of proteomics*, 78: 254-272, (2013).

Zhang, Y. Zhang, H. Zou, Z.R. Liu, Y. ve Hua, X.H. "Deciphering the protective role of spermidine against saline–alkaline stress at physiological and proteomic levels in tomato", *Phytochemistry*, 110: 13-21, (2015).

Zhao, Y. Dua, H. Wanga, Z. ve Huang, B. "Identification of proteins associated with water-deficit tolerance in C4 perennial grass species, *Cynodon dactylon* × *Cynodon transvaalensis* and *Cynodon dactylon*", *Physiologia Plantarum*, 141: 40-55, (2011).

Zheng, M. Meng, Y. Yang, C. Zhou, Z. Wang, Y. ve Chen, B. "Protein expression changes during cotton fiber elongation in response to drought stress and recovery", *Proteomics*, 14: 1776–1795, (2014).

Zhou, J. Wang, X. Jiao, Y. Qin, Y. Liu, X. He, K. Chen, C. Ma, L. Wang, J. Xiong, L. Zhang, Q. Fan, L. ve Wang, X. "Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle", *Plant Mol Biol*, 63(5): 591-608, (2007).

Zivy, M. "Genetic variability for heat shock proteins in common wheat", *Theor Appl Genet*, 74: 209-213, (1987).

Zivy, M. ve Vienne, D. "Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology", *Plant Molecular Biology*, 44: 575–580, (2000).

Zomeno, S. Ariza, D. Jorge, I. Lenz, C. Campo, A.D. Jorri'n, J.V. ve Navarro, R.M. "Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery", *Journal of Plant Physiology*, 166: 233-245, (2009).

Zomeno, S. E., Palazón, B. B. Castellano, M. M. ve Ferrando, A., "Regulation of Translation as Response to Abiotic Stress" *Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress*, 1st ed. (Editör: Gaur, R. K. ve Sharma, P), Taylor & Francis Group, Florida, 232-247, (2014).

Qi, Y. Armbruster, U. Linneweber, C.S. Delannoy, E. Longevialle, A.F. Ru, T. Small, I. Jahns, P. ve Leister, D. "Arabidopsis CSP41 proteins form multimeric complexes that bind and stabilize distinct plastid transcripts", *Journal of Experimental Botany*, 63(3): 1251-1270, (2012).

Wang, L. Pana, D. Lia, J. Tane, F. Benningc, S.H. Liangd, W. ve Chen, W. "Proteomic analysis of changes in the *Kandelia candel* chloroplast proteins reveals pathways associated with salt tolerance", *Plant Science*, 231: 159-172, (2015).

Welchen, E. Chan, R.L. ve Gonzalez, D.H. "The promoter of the Arabidopsis nuclear gene COX5b-1, encoding subunit 5b of the mitochondrial cytochrome c oxidase, directs tissue-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements", *Journal of Experimental Botany*, 55 (405): 1997-2004, (2004).

Wery, J. Silim, S.N. Knights, E.J. Malhotra, R.S. ve Cousin, R. "Screening techniques and sources and tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes", *Euphytica*, 73: 73–83, (1993).

Westermeier, R., ve Naven, T., "Proteomics in practice, A laboratory Manual of Proteome Analysis", Wiley-VCH, Weinheim, 223-238, (2002).

Wilkins, M. R. ve Gooley, A. A. "Protein identification in proteome projects", *Proteome research: new frontiers in functional Genomics*, (Editör: Appel, R. D. ve Hochstrasser, D. F.s) Springer, New York, 35-64, (1998).

Wilson, C.M. Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods Enzymol* 91: 236-247, (1979).

Wu, X. Gong, F. ve Wang, W. "Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis" *Proteomics*, 14: 645–658, (2014).

Xi, J. Wang, X. Li, S. Zhou, X. Yue L. Fan, J. ve Hao, D. "Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two dimensional electrophoresis analysis of plant proteome", *Phytochemistry*, 67: 2341-2348, (2006).

Xiang, Z. Chua, K.H. ve Kuppusamy, U.R. "Proteomic analysis of heat treated bitter gourd (*Momordica charantia* L. var. Hong Kong Green) using 2D-DIGE", *Food Chemistry*, 148: 155-161, (2014).



Xiao, X. Yanga, F. Zhanga, S. Korpelainen, H. ve Li, C. "Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress", *Physiologia Plantarum*, 136: 150-168, (2009).

Xu, Y.H. Liu, R. Yan, L. Liu, Z.Q. Jiang, S.C. Shen, Y.Y. Wang, X.F. ve Zhang, D.P. "Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*", *Journal of Experimental Botany*, 63(3): 1095-1106, (2012).

## ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

**Adı Soyadı:** Sertan ÇEVİK

**Doğum Tarihi:** 15/07/1985

### Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise		Refhan Tümer Lisesi	1999-2002
Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2002-2007
Yüksek Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2007-2009
Doktora	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2009-Devam

### Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi	Mersin Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2008-Devam

## ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

### SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Ünyayar, S. Çelik, A., Güzel A., Çekiç, F.Ö. **Çevik, S.**, “Cadmium-induced antioxidant status and sister-chromatid exchanges in *Vicia faba* L.” Turkish Journal of Biology 34:413-422, (2010).

**Çevik S**, Yıldızlı A, Yandım G, Gökso H, Gültekin S, Güzel Değer A, Çelik A, Şimşek Kuş N, Ünyayar S., “Some synthetic cyclitol derivatives alleviate the effect of water deficit in cultivated and wild-type chickpea species” Journal of Plant Physiology 171: 807-816, (2014).

**Çevik S**, Ünyayar S, Ergül A. “Genetic relationships between cultivars of *Cicer arietinum* and its progenitor grown in turkey by using SSR markers” Turkish Journal of Field Crops, 20(1): 109-114, (2015).

## Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

**Çevik S** and Ünyayar S. “The Effects of Exogenous Application of Ascorbate and Glutathione on Antioxidant System in Cultivated *Cicer arietinum* and Wild Type *C. reticulatum* under Drought Stress” SDU Journal of Natural and Applied Science, 19(1): 91-97, (2015).

## Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

### Ulusal

Serpil Ünyayar, Ayla Çelik, Ayşin Güzel Değer, **Sertan Çevik**, F.Özlem Çekiç “Cadmium-induced antioxidant status and sister-chromatid exchanges in *Vicia faba* L” 19.Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiriler Kitabı, S:423, **Poster bildiri**. 23-27 Haziran 2008, Trabzon, Türkiye.

**Sertan Çevik**, Serpil Ünyayar, Ali Ergül, “Kuraklık toleransları farklı olan *Cicer* (Nohut) genotiplerinde askorbat ve glutatyon uygulamalarının antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması ve genomik varyasyonlarının karşılaştırılması” 20.Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiriler Kitabı, S:82-83, **Sözlü sunum**, 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye.

Ayşin Güzel Değer, **Sertan Çevik**, Cemallettin Alp, M.Serdar Gültekin, Nermin Şimşek Kuş, Savaş Zengin, Harika Topal, Serpil Ünyayar, “Sentetik olarak sentezlenen siklitollerin kuraklık stresi altındaki *Cicer arietinum*’un büyümesi üzerine etkisi” 20.Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiriler Kitabı, S:351-352, **Poster bildiri**, 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye.

Serpil Ünyayar, Gurbet Yandım, **Sertan Çevik** Aytunç Yıldızlı, M.Serdar Gültekin, Gizem Kızıgüt, Ayla Çelik, Nermin Ş. Kuş, Ayşin G.Değer, “Kuraklık Stresi Altındaki Nohut Bitkilerinin Malondialdehit (MDA) İçeriği Üzerine Bazı Sentetik Siklitollerin Etkisi” 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiriler Kitabı, S:488-489, **Poster bildiri**, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye.

Cihan İnan, Dilara Maytalman, Zafer Mert, Ahmet Tarık Baykal, **Sertan Çevik**, Aslıhan Günel, Nazlı Arda, Semra Hasaıçebi, “Buğdayda karşılaştırmalı proteomik analizler, bitki patojen etkileşiminde rol oynayan proteinlerin belirlenmesi” II. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Bildiriler Kitabı, S: 66, **Poster bildiri**, 15-18 Kasım 2012, Antalya, Türkiye.

Gökhan Coral, Aslı Sarıışan, Pınar Küce Çevik, **Sertan Çevik**, Esat Avcı, Bülent Gündüz, Mehmet Hakan Gündoğdu “Doğa Eğitimi Ve Bilim Okulları Projelerinin Doğaya Yönelik Olumlu Tutum Geliştirmedeki Etkililiği: Göksu'nun Kanatları Projesi” XI. Ulusal Fen Bilimleri ve Matematik Eğitimi Kongresi, Bildiriler Kitabı, S: 1327, **Poster bildiri**, 11-14 Eylül 2014, Adana, Türkiye

Aytunç Yıldızlı, **Sertan Çevik**, Rıza Binzet, Serpil Ünyayar “Dışsal Uygulanan Myo-Inositoler Kuraklık Stresinin Etkisini Hafifletebilir” Ulusal Botanik Kongresi, Bildiriler Kitabı, S:42, **Poster bildiri**, 25-28 Ekim 2014, Antalya, Türkiye.

### **Uluslararası**

Serpil Ünyayar, **Sertan Çevik**, Gurbet Yandım, Serdar Gültekin, Ayla Çelik, Nermin Şimşek Kuş, Aytunç Yıldızlı, Ayşin Güzel Değer, “Can Synthetic Cyclitols Be Induced On The Growth and Biologically Active?” Plant Biology Congress, Hand book, S:435, **Poster bildiri**, 29 Temmuz 3 Ağustos 2012, Freiburg, Almanya.

Cihan İnan, Dilara Maytalman, Zafer Mert, Ahmet Tarık Baykal, **Sertan Çevik**, Aslıhan Günel, Nazlı Arda, Semra Hasaıçebi, “Proteomic Approach to Investigate Wheat Resistance Response Against Yellow Rust Using Proteomelab PF2D” 15th European Congress of Biotechnology, Hand book, S: 129, **Poster bildiri**, 23-26 Eylül 2012, İstanbul, Türkiye.