

**KURAKLIK STRESİ ALTINDAKİ *CLEOME SPINOSA* (C3) VE
CLEOME GYNANDRA (C4) BİTKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fadimana KAYA

Danışman
Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
Haziran, 2019

Bu tez çalışması, 17.KARİYER.222 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KURAKLIK STRESİ ALTINDAKİ *CLEOME SPINOSA* (C3) VE *CLEOME GYNANDRA* (C4) BİTKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK ANALİZLERİ

Fadimana KAYA

Danışman
Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran, 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Fadimana KAYA tarafından hazırlanan “Kuraklık Stresi Altındaki *Cleome spinosa* (C3) ve *Cleome gynandra* (C4) Bitkilerinin Karşılaştırmalı Proteomik Analizleri” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 13/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İmza

Başkan : Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ
Hacettepe Üniversitesi,
Fen Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Murat KASAP
Kocaeli Üniversitesi,
Tıp Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. İbrahim EROL

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

13/06/2019

Fadimana KAYA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KURAKLIK STRESİ ALTINDAKİ *CLEOME SPINOSA* (C3) ve *CLEOME GYNANDRA* (C4) BİTKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK ANALİZLERİ

Fadimana KAYA

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Toprak ve atmosferik su eksikliğinden kaynaklanan kuraklık stresi dünyadaki bitki büyümesini ve verimliliğini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Karboksilasyon yoluna bağlı olarak bitkilerin kuraklık stresine toleranslarında önemli farklılıklar vardır. C4 bitkilerinin, C3 bitkilerinin aksine, su stresine daha iyi adapte olduğu bildirilmektedir. Bitkilerin kuraklık stresine adaptasyon mekanizmaları proteom düzeyinde yoğun bir şekilde çalışılmış olmasına rağmen, kuraklık stresi altında büyüyen C3 ve C4 bitkilerinin adaptasyon stratejileri tanımlanmamıştır. Kuraklık stresinin proteom değişiklikleri üzerindeki etkilerini belirlemek için iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2-DE) ve MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/time-of-flight) kütle spektrometresi *Cleome spinosa* (C3) ve *C. gynandra* (C4) bitkilerinin yapraklarında kullanılmıştır. 2-DE jellerinde toplam 96 farklı şekilde ifade olan protein beneği tespit edilmiş ve bunlardan 65'i MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır. Her iki türde de fotosentez ve enerji metabolizması ile ilgili proteinler, kuraklık stresi altında büyük ölçüde etkilenmiştir. RuBisCO küçük alt birimlerinin seviyesi *C. spinosa*'da artmış olmasına rağmen, RuBisCO aktivaz proteinlerinin seviyesi azalmıştır. Ayrıca, oksijen çıkışı arttırıcı (OEE) ve ferredoksin-NADP redüktaz (FNR) proteinleri gibi fotosentezin ışık reaksiyonları ile ilgili proteinlerin seviyesi *C. spinosa*'da azalmıştır. Kuraklık stresi altında, triosfosfat izomeraz ve fruktoz-bifosfat aldolaz gibi glikoliz ile ilişkili proteinlerin seviyesi *C. spinosa*'da azalmıştır;

ancak, enolaz proteini *C. gynandra*'da artmıştır. Kuraklık stresi altında kloroplastik ATP sentaz enziminin ifade seviyesi her iki türde de azalan yönde düzenlenirken, mitokondriyal ATP sentaz artan yönde düzenlenmiştir. Annexin ve 14-3-3 proteinleri gibi sinyal iletimi ile ilgili proteinlerin seviyesi *C. spinosa*'da artmıştır. Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu ile ilişkili proteinlerin seviyesi genellikle her iki türde artmıştır. Bu bulgular, karboksilasyon yolunda farklılık gösteren türlerin kuraklık stresi altındaki proteomik cevaplarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: *Cleome spinosa*, *Cleome gynandra*, Fotosentez, Kuraklık stresi, Proteomik

2019, xii + 78 sayfa

ABSTRACT
M.Sc. Thesis

COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS of *CLEOME SPINOSA* (C3) and *CLEOME GYNANDRA* (C4) PLANTS UNDER DROUGHT STRESS

Fadimana KAYA

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Mustafa YILDIZ

Drought stress caused by soil and atmospheric water deficiency is one of the most significant environmental factors affecting plant growth and productivity in the world. There are significant differences in the tolerance of plants to drought stress depending upon the carboxylation pathway. C4 plants, in contrast to C3 plants, are known to be better adapted to water stress. Although the mechanisms by which plants adapt to drought stress has been studied extensively at proteome level, the adaptive strategies of C3 and C4 plants grown under drought stress remain undefined. To determine the effects of drought stress on proteome changes, we used two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in the leaves of *Cleome spinosa* (C3) and *C. gynandra* (C4) plants. Totally 96 expressed differently protein spots were detected on 2-DE gels, of which 65 were identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. In both species, proteins related to photosynthesis and energy metabolism were predominantly affected under drought stress. Although the abundance of RuBisCO small subunits was increased in *C. spinosa*, the abundance of RuBisCO activase proteins was decreased. Furthermore the abundance of proteins related to light reactions of photosynthesis such as oxygen-evolving enhancer (OEE) and ferredoxin-NADP reductase (FNR) proteins was decreased in *C. spinosa*. Under drought stress, the abundance of glycolysis-related proteins such as triosephosphate

isomerase and fructose-bisphosphate aldolase was decreased in *C. spinosa*; however, enolase protein increased in *C. gynandra*. The chloroplastic ATP synthase enzyme was down-regulated also in both species under drought stress, while the mitochondrial ATP synthase up-regulated. The abundance of signal transduction-related proteins such as annexin and 14-3-3 proteins were increased in *C. spinosa*. The abundance of reactive oxygen species detoxification related proteins was generally increased in both species. These findings would lead to an improved understanding of the proteomic responses of the species differing in carboxylation pathway under drought stress.

Keywords: *Cleome spinosa*, *Cleome gynandra*, Drought stress, Photosynthesis, Proteomics

2019, xii + 78 pages

TEŞEKKÜR

Lisansüstü tez çalışmam süresince değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, deneysel çalışmalar ve tezin tamamlanması basamaklarının her aşamasında yapmış olduğu önemli katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmaların her basamağında göstermiş olduğu katkılardan dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ'ye teşekkür ederim.

Kütle spektrometresi analizlerinde bilgi ve tecrübelerini paylaşan Sayın Prof. Dr. Murat KASAP (Kocaeli Üniversitesi)'a teşekkür ederim.

Tez materyali olan bitki türlerine ait tohumların temini ve bitki yetiştirme koşullarının optimizasyonu sırasında vermiş olduğu katkılardan dolayı Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN (Ege Üniversitesi) ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Barış UZİLDAY (Ege Üniversitesi)'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 17.KARİYER.222 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında sabırla bana destek olan, her türlü konuda maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana olan inançlarını ve sevgilerini her zaman hissettiren en büyük motivasyon kaynağım canım annem Güldane KAYA ve sevgili babam Mustafa KAYA'ya, biricik ablam ve çok sevgili kardeşlerime, güzel aileme sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak hayatımda her zaman özel olan, paylaşımlarla hayatı daha yaşanabilir ve keyifli kılan, beni motive eden, birlikte güzel zamanlar geçirebildiğim tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Sevgi ve saygılarımla,

Fadimana KAYA

AFYONKARAHİSAR, 2019

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Cleome Cinsi Sistematığı, Morfolojisi ve Anatomisi	4
2.2 C3 ve C4 Fotosentez Mekanizmaları	6
2.3 Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri	9
2.4 Kuraklık Stresi Altındaki Bitkilerde Proteom Değişimleri.....	12
2.4.1 Kuraklık Stresi ve Fotosentez İle İlişkili Proteinler.....	14
2.4.2 Karbohidrat ve Enerji Metabolizması İle İlişkili Proteinler	16
2.4.3 Stres Savunma İle İlişkili Proteinler	17
2.4.4 Protein Metabolizması İle İlişkili Proteinler	18
2.4.5 Sinyal İletimi İle İlişkili Proteinler	19
2.4.6 Kuraklık Stresi İle İlişkili Diğer Proteinler.....	20
3. MATERYAL ve METOT	23
3.1 Bitki Yetiştirme Koşulları ve Stres Uygulaması.....	23
3.2 Protein Ekstraksiyonu	23
3.3 İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	24

3.4 Jellerin Boyanması ve Görüntü Analizleri	25
3.5 Jelde Triptik Kesim	26
3.6 Kütle Spektrometrisi Analizleri	27
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	43
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
HCl	Hidroklorik asit
μM	Mikromolar
mA	Miliamper
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar

IEF	İzoelektrik fokuslama
IPG	İmmobilize pH gradiyenti
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
SDS	Sodyum dodesil sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 <i>C. spinosa</i> (C3), <i>C. gynandra</i> (C4) ve <i>C. paradoxa</i> (C3-C4) türlerinin yaprak anatomisi.	5
Şekil 2.2 Bazı <i>Cleome</i> türlerinin yaprak dokularında C4 enzimleri ve RuBisCO'nun immunoblot analizleri	7
Şekil 2.3 Bitkilerde C4 fotosentezi ile ilişkili reaksiyonların şematik gösterimi	8
Şekil 2.4 Kuraklığa duyarlı proteinlerin sinyalleme, gen ifadesinin düzenlenmesi, protein sentezi ve parçalanması ile ilgili şematik gösterimi.....	13
Şekil 4.1 Kuraklık stresine maruz bırakılan <i>Cleome spinosa</i> (C3) fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri.	30
Şekil 4.2 Kuraklık stresi altındaki <i>Cleome spinosa</i> 'da fotosentez ile ilişkili farklı şekilde ifade olan proteinlerin büyütülmüş görüntüleri.	31
Şekil 4.3 Kuraklık stresine maruz bırakılan <i>Cleome gynandra</i> (C4) fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri.	38
Şekil 4.4 Kuraklık stresi altındaki <i>Cleome gynandra</i> 'da fotosentez ile ilişkili farklı şekilde ifade olan proteinlerin büyütülmüş görüntüleri.	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Cleome cinsinin taksonomik hiyerarşisi	4
Çizelge 2.2 Bazı Cleome türlerinde CO ₂ kompensasyon noktaları ve karboksilasyon etkinlikleri.....	6
Çizelge 3.1 Protein tanımlamada kullanılan parametreler	28
Çizelge 4.1 Kuraklık stresine maruz bırakılan <i>Cleome spinosa</i> (C3) fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanan proteinler	31
Çizelge 4.2 Kuraklık stresine maruz bırakılan <i>Cleome gynandra</i> (C4) fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanan proteinler	39

1. GİRİŞ

Kuraklık ve yüksek sıcaklık gibi abiyotik stresler, ürün verimliliğini ve tarımsal sürdürülebilirliği ciddi biçimde engellemektedir. Dünya genelinde su kaynaklarının azlığı dikkate alındığında, kuraklık tarımsal üretkenlik açısından en kritik tehditlerden biridir (Ashraf *et al.* 2011). Sıcak iklimler ve giderek daha az görülen yaz yağışları kuraklık stresinin etkilerini arttırmaktadır (Stuart *et al.* 2011). Bununla birlikte, atmosferik karbondioksit (CO₂) seviyelerindeki artıştan kaynaklanan küresel iklim değişikliklerinin etkisiyle, tarımsal arazilerin kalitesindeki düşüş yıllar içerisinde daha da artmaktadır (Peters *et al.* 2011). Bazı çalışmalarda, kuraklık stresinin bitki büyümesi ve gelişimini nasıl etkilediği ve bitkilerin bu strese nasıl tepki verdiği incelenmiştir (Urban *et al.* 2017, Li *et al.* 2018, Xin *et al.* 2018). Bitkiler, artan stoma direnci ile nispi su içeriğinin kontrolü (Yoo *et al.* 2009), geniş ve derin kök sistemleri ile su alımının artırılması (Gowda *et al.* 2011) ve prolin gibi osmolitlerin birikimi (Rampino *et al.* 2006) gibi karmaşık fizyolojik mekanizmalar geliştirmişlerdir.

Kuraklık stresine karşı bitki toleransını arttırmada, su stresine karşı verilen bitki yanıtlarının moleküler temellerinin anlaşılması gerekmektedir (Faghani *et al.* 2015). Kuraklığa duyarlı proteinleri ve genleri tanımlamak için çeltik (Chamnanmanoontham *et al.* 2015, Chintakovid *et al.* 2017), buğday (Alvarez *et al.* 2014, Michaletti *et al.* 2018), mısır (Xin *et al.* 2018), arpa (Chmielewska *et al.* 2016), kolza (Urban *et al.* 2017) ve soya fasulyesi (Oh and Komatsu 2015) gibi birçok tarımsal bitki türü kullanılmıştır. Bitki ıslahı çalışmaları kapsamında, biyotik veya abiyotik streslere karşı dayanıklı ve yüksek besin değerine sahip tarımsal bitki türlerinin üretimi genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi “omik” teknolojileri ile sağlanabilecektir (Roy *et al.* 2011, Weckwerth 2011, Parry and Hawkesford 2012, Boggess *et al.* 2013). Omik analizleri genler, proteinler ve metabolitler arasındaki karmaşık etkileşimleri anlamak için sistem biyolojisi yaklaşımının bir parçasıdır (Weckwerth 2011). Proteinler, canlı organizmada tüm hücresel işlevlerden sorumlu olan merkezi biyomoleküllerdir (Ghatak *et al.* 2017). Proteomik analizler, kontrol ve stres koşullarında bir hücredeki

proteinlerin tanımlanması, ifade seviyelerinin belirlenmesi, translasyon sonrası modifikasyonların ortaya konulması ve protein-protein etkileşimlerinin anlaşılması için güçlü bir yöntemdir (Mertins *et al.* 2013, Ghosh and Xu 2014, Sharma *et al.* 2017, Wang and Komatsu 2018). Farklı streslere maruz kalan bitkilerde protein ifade seviyesinde her zaman kayda değer bir değişiklik meydana geldiğinden, proteomik yaklaşım stres koşulları altında proteinlerin stres toleransı ile ilişkisini aydınlatmak için oldukça önemlidir (Witzel *et al.* 2009, Hossain *et al.* 2012, Perez-Clemente *et al.* 2013).

Bitkilerin kuraklık stresine karşı yanıtları, stresin şiddetine ve süresine, bitki türüne ve gelişim evresine bağlı olarak önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Chaves *et al.* 2003). C3 bitkileri genellikle ılıman ortamlara daha iyi adapte olmuşken, C4 bitkileri tropik ve kurak ortamlarda gelişmiştir (Ward *et al.* 1999). Farklı iklim koşullarına adapte olan C3 ve C4 bitkileri anatomik ve fizyolojik olarak farklı özellikler göstermektedir (Ward *et al.* 1999, Nayyar and Gupta 2006). C4 fotosentezinin çalışılması için *Atriplex*, *Amaranthus*, *Eleocharis*, *Flaveria*, *Sorghum* ve *Zea* cinslerine ait bazı türler kullanılmıştır (Langdale and Nelson 1991, Patel *et al.* 2004, Gowik *et al.* 2004, Uzilday *et al.* 2014). Bununla birlikte, C4 fotosentezinin gelişimsel sürecine ilişkin önemli bilgiler bir C3 bitkisi olan *Arabidopsis*'ten sağlanmıştır (Brown *et al.* 2005). Bitkilerde C4 fotosentezinin nasıl geliştiğini anlamak için, C3 ve C4 fotosentezinde ortak olan genlerin C3 türlerinde nasıl düzenlendiğini ve her proteinin rolünün açıklığa kavuşturulması gerekmektedir (Brown *et al.* 2005). Bu bağlamda, *Arabidopsis*'e yakın akraba C3 ve C4 türlerinin (Marshall *et al.* 2007) karşılaştırmalı olarak çalışılması önemli olacaktır. Bu nedenle, C4 fotosentez mekanizmasının C3 bitkilerinden nasıl evrildiğinin anlaşılmasına katkıda bulunabilmek için mevcut çalışmamızda, filogenetik olarak *Arabidopsis*'e yakın olan *Cleome* cinsine ait *Cleome spinosa* (C3) ve *Cleome gynandra* (C4) türleri çalışılmıştır. Bununla birlikte, kuraklık stresine maruz bırakılan *C. spinosa* ve *C. gynandra* türlerinde reaktif oksijen türlerinin üretimi ve antioksidan savunma sistemindeki farklılıklar karşılaştırılmış (Uzilday *et al.* 2012) olmasına rağmen, bu iki türün yaprak proteom profilinin karşılaştırıldığı herhangi bir proteomik çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada kuraklık stresine maruz bırakılan *C.*

spinosa (C3) ve *C. gynandra* (C4) türlerinin yaprak dokularında proteom değişimlerinin iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ve MALDI-TOF/TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight/time of flight) kütle spektrometrisi (MS) ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Cleome Cinsi Sistematığı, Morfolojisi ve Anatomisi

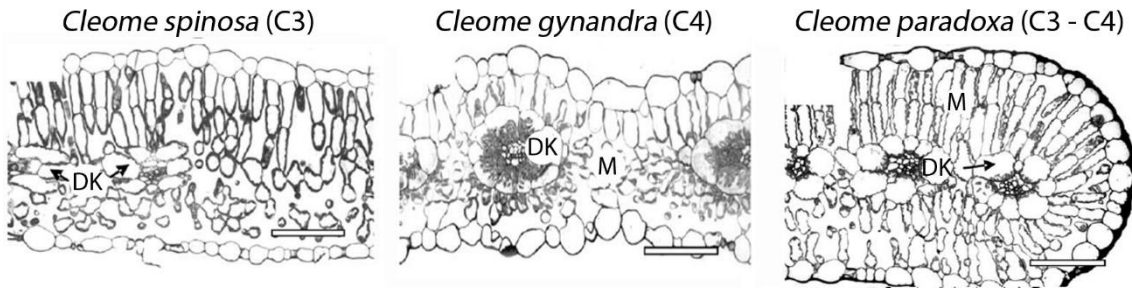
Cleomaceae içindeki filogenetik ilişkilerle ilgili çok sayıda soru hala cevaplanmamıştır (Hall *et al.* 2002, Sanchez-Acebo 2005, Inda *et al.* 2008). Cleomoideae ve Capparoidae daha önceden Capparaceae familyasına dahil edilmiştir (Cronquist 1988, Takhtajan 1997). Ancak morfolojik ve moleküler çalışmalar (Rodman *et al.* 1998, Judd *et al.* 1994) Capparaceae familyasının parafiletik (ortak ata ve ortak atayı paylaşan taksonların bir kısmını kapsayan, ancak bazılarını dışarıda tutan takson grubunu belirtmek için kullanılan terim) olduğunu göstermiş ve böylece Capparaceae familyası Brassicaceae familyasına dahil edilmiştir (Judd *et al.* 2002, APG 2003). Cleomaceae familyasının filogenetik olarak Brassicaceae familyasına oldukça yakın olduğu bilinmektedir (Hall *et al.* 2002, Sanchez-Acebo 2005). Bununla birlikte, Cleomoideae, Capparoidae ve Brassicoideae'nin monofiletik (tek bir ortak atayı ve ondan türeyen tüm taksonları içeren takson grubu) kladlar olduğu (Hall *et al.* 2002) ve Capparaceae, Cleomaceae ve Brassicaceae olmak üzere üç ayrı familyaya (Hall *et al.* 2002) ayrılmıştır. Cleomaceae familyasının bir üyesi olan Cleome cinsi (Çizelge 2.1) 200'den fazla tür içermektedir (Hall *et al.* 2002). Cleomaceae familyasına ait türlerin dünyanın farklı bölgelerindeki geniş dağılımları nedeniyle C4 mekanizmasının orijini ve filogenetiği hakkındaki bilgilerin eksik olduğu bildirilmiştir (Feodorova 2010). Tarihi biyocoğrafya analizleri, Cleomaceae'nin Orta Asya'dan kökenlendiğini ortaya koymaktadır (Feodorova 2010).

Çizelge 2.1 Cleome cinsinin taksonomik hiyerarşisi (İnt. Kay. 1)

Alem	Plantae
Alt alem	Viridiplantae
Şube	Tracheophyta
Alt şube	Spermatophytina
Sınıf	Magnoliopsida
Süper takım	Rosanae
Takım	Brassicales
Familya	Cleomaceae
Cins	<i>Cleome</i> L.
Türler	<i>Cleome spinosa</i> (C3) <i>Cleome gynandra</i> (C4)

Cleomaceae bileşik yapraklar, brakteli çiçek durumu, zigomorfik çiçekler, genellikle aynı uzunlukta altı stamen ve açılan meyveler gibi özellikleri ile Brassicaceae familyasından ayrılmıştır. Cleomaceae türleri bir ginefora sahip olması ile Capparaceae üyeleriyle floral özellikleri paylaşmasına rağmen, bu türler otsu yapıları, altı stamenli zigomorfik çiçekleri ve tipik kuru meyveleri ile tanımlanmıştır (Hall 2008).

Bazı Cleome türlerinin (C3, C4 ve C3-C4) yaprak anatomileri farklılık gösterir (Şekil 2.1). C3 tipi olan *C. spinosa* Kranz anatomisine sahip değildir. Agranal tipteki kloroplastlara sahip demet kını hücreleri çoğunlukla hücreler arası hava boşluğuna doğru gelişen bir yapı gösterir. Dorsoventral yaprak yapısına sahip olan *C. spinosa*, yaprağın üst tarafında (adaksiyal) 1-2 tabaka palizat parankiması hücresi ve 3-4 tabaka sünger parankiması hücresinden oluşan mezofil tabakasına sahiptir. Bu yapı, C3 tipi fotosentezi olan türler için tipiktir. C4 tipi *C. gynandra*, atriplikoid tipinde Kranz anatomisine sahiptir. Büyük demet kını hücreleri, merkezi pozisyonda çok sayıda organel içerir. Adaksiyal tarafta belirgin bir tek palizat parankiması tabakası vardır, buna karşın yaprağın alt tarafındaki (abaksiyal) hücreler sünger parankiması hücrelerine benzemektedir. Diğer taraftan, bir ara tür (C3-C4 tipi) olan *C. paradoxa*'nın yaprak yapısı ise yaprağın her iki tarafında iki tabaka halinde palizat klorankimasının varlığı nedeni ile izopalizat tipine yakındır. Bununla birlikte, abaksiyal taraftaki hücre tabakaları daha gevşek bir şekilde düzenlenmiş ve iletim demetleri birbirine çok yakındır. Büyük demet kını hücrelerinde merkezden çevreye doğru yerleşen birkaç kloroplast bulunur; fakat çoğu iletim demetinin yakınındaki hücre çeperine bitişik merkezci bir konumdadır (Şekil 2.1) (Voznesenskaya *et al.* 2007).



Şekil 2.1 *C. spinosa* (C3), *C. gynandra* (C4) ve *C. paradoxa* (C3-C4) türlerinin yaprak anatomisi. DK, demet kını hücreleri; M, mezofil hücreleri; Ölçek=100 µm (Voznesenskaya *et al.* 2007'den değiştirilerek).

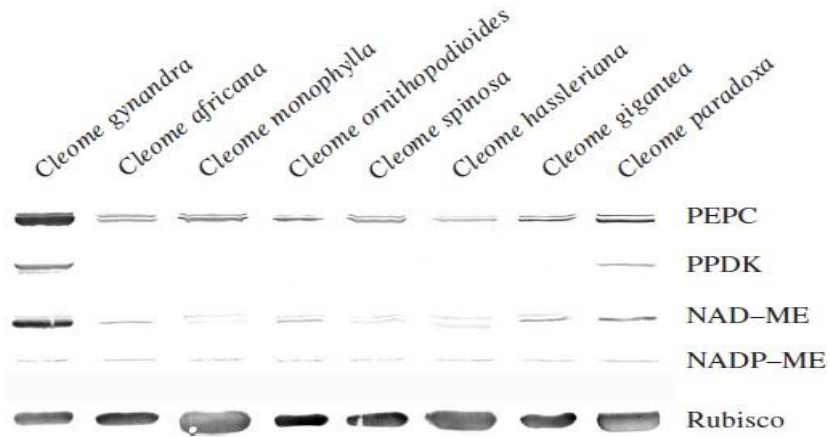
2.2 C3 ve C4 Fotosentez Mekanizmaları

Arabidopsis ile yakın akraba olan Cleome cinsinin, C3 ve C4 fotosentez mekanizmalarına sahip türler içerdiği belirlenmiştir (Marshall *et al.* 2007). Voznesenskaya vd. (2007), 6 Cleome türünü (*C. spinosa*, *C. africana*, *C. gigantea*, *C. hassleriana*, *C. monophylla*, *C. ornithopodioides*) CO₂ kompensasyonu, izotop karbon ($\delta^{13}\text{C}$) değerleri (‰-24 ila ‰-30), Kranz yaprak anatomisinin olmaması ve C4 fotosentez mekanizmasının enzim seviyeleri (çok düşük ya da yok) temelinde C3 tipi bitkiler olarak tanımlamışlardır. *C. gynandra*, *C. angustifolia* Forssk. (Afrika) ve *C. oxalidea* F.Muell. (Avustralya) türleri düşük CO₂ kompensasyon noktası, karbon izotop ($\delta^{13}\text{C}$) değerleri (~‰-10 ve ‰-15), Kranz yaprak anatomisinin varlığı ve demet kını yapısı, C4 fotosentez mekanizması enzimlerinin varlığı ve RuBisCO ve fosfoenolpiruvat karboksilazın seçici immuno-lokalizasyonuna dayalı olarak C4 tipi bitki olarak tanımlanmıştır. Diğer taraftan, *C. paradoxa* ise orta seviyede CO₂ kompensasyon noktasına (27.5 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) ve ayrıntılı yapısal özelliklere sahip olmasının yanı sıra demet kını hücrelerinin mitokondrilerdeki fotorespirasyon yolağında işlev gören glisin dekarboksilazın seçici lokalizasyonu temelinde bir C3-C4 ara tür olarak tanımlanmıştır (Voznesenskaya *et al.* 2007). Bazı C3 fotosentetik mekanizmasına sahip Cleome türlerine göre bir C4 bitkisi olan *C. gynandra*'nın düşük CO₂ kompensasyon noktası ve yüksek karboksilasyon etkinliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.2) (Marshall *et al.* 2007).

Çizelge 2.2 Bazı Cleome türlerinde CO₂ kompensasyon noktaları ve karboksilasyon etkinlikleri (Marshall *et al.* 2007)

Tür	Fotosentetik mekanizma	Kompensasyon noktası ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	Karboksilasyon etkinliği ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
<i>C. spinosa</i>	C3	50 ± 2	0.17 ± 0.01
<i>C. marshallii</i>	C3	52 ± 3	0.24 ± 0.03
<i>C. africana</i>	C3	65 ± 4	0.65 ± 0.07
<i>C. violacea</i>	C3	51 ± 4	0.20 ± 0.01
<i>C. hirta</i>	C3	123 ± 14	0.14 ± 0.02
<i>C. isomeris</i>	C3	49 ± 2	0.25 ± 0.02
<i>C. foliosa</i>	C3	40 ± 2	0.46 ± 0.11
<i>C. gynandra</i>	C4	9 ± 4	0.93 ± 0.31

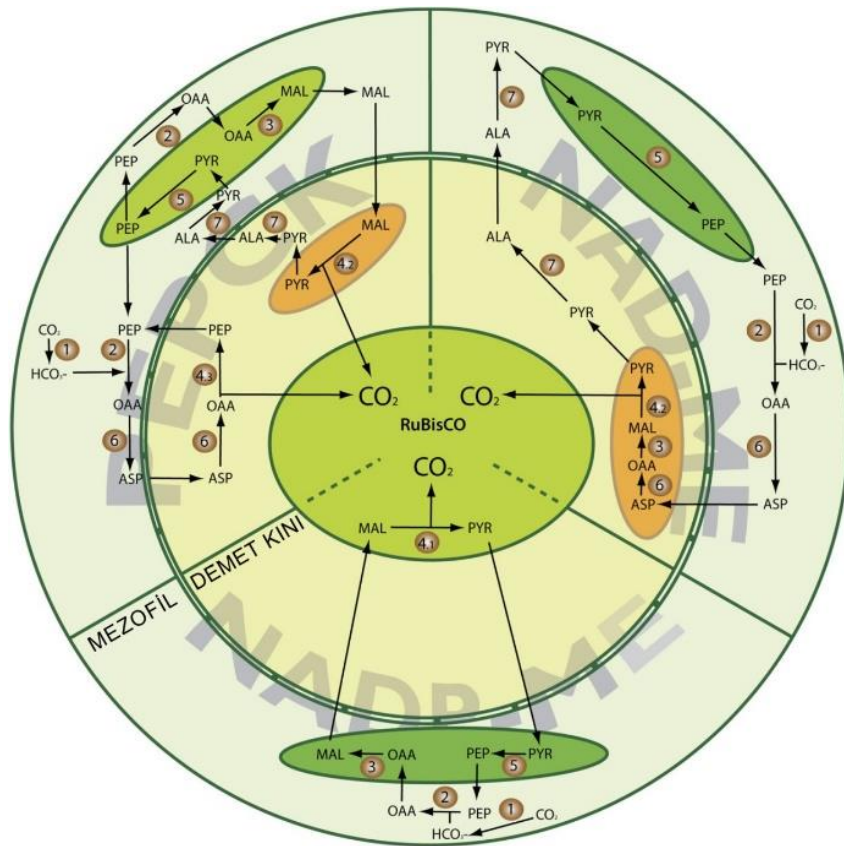
Yapılan immunoblot analizlerine göre *C. gynandra* (C4)'da fotosentetik enzimlerden fosfoenol pirüvat karboksilaz (PEPC), pirüvat ortofosfat dikinaz (PPDK) ve NAD malik enzim (NAD-ME) seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.2) (Marshall *et al.* 2007, Voznesenskaya *et al.* 2007). Diğer taraftan, *C. spinosa*'nın da içerisinde bulunduğu C3 türlerinde ise yüksek RuBisCO seviyeleri, düşük PEPC ve NAD-ME seviyelerinin yanı sıra PPDK enziminden yoksun olduğu belirlenmiştir. Farklı karboksilasyon mekanizmalarına sahip C3 ve C4 türlerine ait genomların moleküler analizlerle karşılaştırılması, C4 fotosentezinin gelişiminde rol oynayan genlerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Marshall *et al.* 2007, Voznesenskaya *et al.* 2007). Bununla birlikte, yapılan bir transkriptomik çalışma sonucu C4 fotosentezinde görev alan PEPC, NAD-ME, aspartat amino asit transferaz ve alanin amino asit transferaz enzimlerine ait transkript seviyelerinin *C. spinosa*'ya göre *C. gynandra* türünde artan yönden düzenlendiği belirlenmiştir (Bräutigam *et al.* 2011).



Şekil 2.2 Bazı Cleome türlerinin yaprak dokularında C4 enzimleri ve RuBisCO'nun immunoblot analizleri (Voznesenskaya *et al.* 2007).

Birçok C4 bitki türünde fotosentez, iletim demeti etrafında düzenlenmiş demet kını ve mezofil hücrelerinde gerçekleşmektedir (Hatch 1987). Diğer taraftan, C4 fotosentez mekanizması bazı tek hücreli deniz alglerinde (örneğin, *Udotea flabellum*) de gözlenmiştir (Reiskind and Bowes 1991). C4 bitki türlerinin mezofil hücrelerinde CO₂, karbonik anhidraz enzimi ile bikarbonata (HCO₃⁻) dönüştürüldükten sonra PEPC

oksaloasetatı (OAA) oluşturmak üzere ilk karboksilasyon basamağını kataliz etmektedir. Oluşan OAA daha sonra birer C4 asit olan malata veya aspartata indirgenir. Bu C4 asitler demet kını hücrelerine difüze olur ve burada dekarboksilaz enzimi aracılığıyla CO₂ açığa çıkar ve RuBisCO enziminin bulunduğu alanda CO₂ konsantre hale getirilir. Bu durum fotosentez oranını artırır, çünkü RuBisCO enziminin aktif bölgesi için CO₂ ve oksijen arasındaki rekabet azalır (Jordan and Ogren 1984). NADP-bağımlı malik enzim (NADP-ME), NAD-bağımlı malik enzim (NAD-ME) ve fosfoenol pirüvat karboksikinaz (PEPCK) olmak üzere C4 fotosentezinde fonksiyon gördüğü bilinen üç tip karboksilaz bulunmaktadır (Şekil 2.3) (Furbank 2011). Dekarboksilasyon sonucu oluşan üç karbonlu bileşik tekrar mezofil hücrelerine döner ve burada PDK enzimi aracılığıyla fosfoenol pirüvatın yeniden oluşturulmasında kullanılır (Hatch and Slack 1966).



Şekil 2.3 Bitkilerde C4 fotosentezi ile ilişkili reaksiyonların şematik gösterimi. Kloroplastlar yeşil, mitokondriler ise turuncu renkte gösterilmiştir. MAL, malat; OAA, oksaloasetat; PEP, fosfoenol pirüvat; ASP, aspartat; ALA, alanin; PYR, pirüvat. 1. Karbonik anhidraz, 2. Fosfoenol pirüvat karboksilaz, 3. NAD/P-Malat dehidrogenaz, 4. Dekarboksilazlar, 5. Pirüvat ortofosfat dikinaz, 6. Aspartat amino asit transferazlar, 7. Alanin amino asit transferazlar (Aubry et al. 2011'den değiştirilerek).

2.3 Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri

Atmosferik karbondioksit seviyelerindeki artıştan kaynaklanan küresel iklim değişikliği tarımsal alanların kullanılabilirliğini ve kalitesini olumsuz etkilemektedir (Peters *et al.* 2011). Bu nedenle, iklim değişikliğinin beraberinde getireceği stres koşullarının önemli tarımsal ürünlerin üzerine yapacağı etkilerin araştırılması oldukça önemlidir (Shanker *et al.* 2014). Kuraklık stresine cevap olarak metabolik değişimler ve stres sinyalizasyon yollarının yanı sıra kuraklık toleransında rol oynayan genlerin belirlenmesi, dünyanın kurak bölgelerine adapte olabilecek yeni türlerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır (Venkateswarlu and Shanker 2012).

Bazı çalışmalarda kuraklık stresinin bitki büyüme ve gelişimini nasıl etkilediği ve bitkilerin bu tür bir strese nasıl tepki verdiği incelenmiştir (Zong and Shangguan 2014, Urban *et al.* 2017, Michaletti *et al.* 2018, Xin *et al.* 2018, Li *et al.* 2018). Kuraklık stresi genellikle fotosentetik aktivitede düşüşe, enerji üretiminde azalmaya ve enerji metabolizmasının organizasyonunda bozulmalara neden olmaktadır (Kang *et al.* 2012). Kuraklık stresi altındaki dört farklı kolza (*Brassica napus* L.) genotipinde net fotosentetik oran, stoma iletkenliği, transpirasyon oranı, nispi su içeriği ve fotosentetik pigmentlerin azaldığı buna karşın yaprak su potansiyelinin negatif yönde arttığı belirtilmiştir (Urban *et al.* 2017). Mısır (*Zea mays* L.) fidelerinde net fotosentez oranının ve maksimum fotokimyasal etkinliğin kuraklık stresine cevap olarak azaldığı, buna karşın lipid peroksidasyonu, prolin ve çözünebilir şeker içeriğinin arttığı gösterilmiştir (Xin *et al.* 2018). İki orkide türü *Cymbidium tracyanum* ve *C. sinense*'de kuraklık stresi altında stoma iletkenliği ve net fotosentetik oran azalırken, jasmonik asit ve absisik asit (ABA) seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir (Li *et al.* 2018). Fotosentezdeki azalma stoma iletkenliğindeki ve RuBisCO aktivitesindeki azalmadan kaynaklanmaktadır (Bota *et al.* 2004). Bununla birlikte, ozmolitler ve reaktif oksijen türlerinin üretimindeki artış gibi birçok biyokimyasal ve moleküler değişiklikler kuraklık stresi tarafından teşvik edilmektedir (Apel and Hirt 2004, Chen and Murata 2008). Kuraklık, köklerde ABA üretimini teşvik etmekte ve ABA gövdeye taşınarak stomaların kapanmasına ve

büyümenin engellenmesine neden olmaktadır (Mittler and Blumwald 2015). Kuraklık stresi altında ABA biyosentezi ve taşınımı ile ilgili genlerin farklı şekilde düzenlenmesi kök ve gövde arasındaki sinyal yollarının stres cevabındaki önemini göstermektedir (Rasheed *et al.* 2016). Ings vd. (2013), C4 tipi *Miscanthus* türlerinde bağıl su içeriğindeki azalmanın yaygın bir kuraklık stresi cevabı olduğunu bildirmişlerdir. Topraktaki su miktarı sınırlı olduğunda bitki büyümesi genellikle azalmasına karşın, sürgün büyümesi kök büyümesinden daha fazla etkilenmekte ve bazı durumlarda bitkilerin kök/sürgün oranı iyi sulanan kontrollere göre artabilmektedir (Anithakumari *et al.* 2012). Aşırı kuraklık stresi koşullarında hücre uzaması, uzamakta olan hücrelere su akışının kesilmesi ile engellenir (Ings *et al.* 2013). Kuraklık stresi hücre bölünmesi, uzaması ve genişlemesini etkileyerek büyümede inhibisyona neden olmaktadır (Potopová *et al.* 2016).

Kuraklık stresinin hem yaprak alanını hem de birim yaprak alanı başına fotosentetik hızı düşürerek fotosentezi azalttığı bilinmektedir. Azalmış fotosentez oranı esas olarak stoma kapanması veya metabolik bozukluktan kaynaklanmaktadır (Basu *et al.* 2016). Su eksikliği tilakoid elektron taşınması, karbon indirgeme döngüsü ve stomalar ile CO₂ alımının kontrolü gibi önemli bileşenleri bozarak fotosentezin baskılanmasına yol açmaktadır (Farooq *et al.* 2009, Carmo-Silva *et al.* 2012). Kuraklık stresine bağlı olarak sınırlı hücre içi CO₂ konsantrasyonu altında devam eden fotosentetik ışık reaksiyonları indirgenmiş fotosentetik elektron taşıma bileşenlerinin birikmesine yol açar ve bu bileşikler moleküler oksijeni indirgeyerek reaktif oksijen türlerinin üretilmesine neden olmaktadır (Basu *et al.* 2016). Reaktif oksijen türleri fotosentetik aygıtlara ciddi şekilde zarar vermektedir (Lawlor and Cornic 2002). Kuraklık stresi altında fotosentezin biyokimyasal etkinliği ribuloz-1,5-bifosfatın yeniden üretilmesine ve RuBisCO aktivitesine bağlıdır (Lawlor 2002). RuBisCO aktivitesindeki bu azalmaya maksimum karboksilasyon oranı, stromal fruktoz bisfosfataz aktivitesi ve fotosistem II (FSII)'nin kuantum etkinliğindeki azalma eşlik etmektedir (Zhou *et al.* 2007, Carmo-Silva *et al.* 2012). Fotosentetik elektron taşıma zincirinin aktivitesi, kloroplasttaki CO₂ konsantrasyonu ile hassas bir şekilde ayarlanmakta ve kuraklık stresi FSII aktivitesinde

bir azalmaya neden olmaktadır (Suzuki *et al.* 2014). Fotosentezin karbon indirgenme reaksiyonları üzerindeki olumsuz etkilerinin yanı sıra kuraklık stresi fotosentezin ışık reaksiyonları sırasında devirli ve devirsiz elektron taşımalarını olumsuz etkilemektedir (Obidiegwu *et al.* 2015). C4 fotosentezinin kuraklık stresi altında su kaybını sınırlamak, fotorespirasyonu azaltmak ve fotosentez etkinliğini iyileştirmek üzere C3 fotosentezinden köken aldığı ileri sürülmüştür (Edwards and Walker 1983). Bununla birlikte, C4 fotosentez mekanizmasının C3 bitkilerine aktarılması üzerine çalışmalar devam etmesine karşın, verimlilik üzerindeki etkilerinin oldukça sınırlı olduğu bildirilmiştir (Gowik and Westhoff 2011).

C4 bitkileri, ayırt edici bir yaprak anatomisine sahip olmaları nedeniyle C3 bitkilerinden farklıdır: C4 bitkileri iyi tanımlanmış demet kını hücrelerine, kloroplast dimorfizmine, demet kını hücrelerinde ribuloz 1,5-bisfosfat karboksilaz (RuBisCO) ve mezofil hücrelerinde fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPC) enzimlerini kapsayan iki karboksilasyon yoluna ve demet kını hücrelerinde fotorespirasyonu baskılamak için karbondioksit biriktirme mekanizmasına sahiptir. C3 bitkilerine göre su stresine daha iyi adapte olan C4 bitkilerinin daha etkin su kullanım verimliliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Ward *et al.* 1999, Nelson *et al.* 2004).

Bitkiler kuraklık stresinin üstesinden gelebilmek için stoma direncinin artırılması ile bağlı su içeriklerinin kontrolü (Yoo *et al.* 2009), geniş ve derin kök sistemleri ile su alımının artırılması (Gowda *et al.* 2011), prolin ve glisin betain gibi ozmolitlerin birikimi (Rampino *et al.* 2006) gibi fizyolojik mekanizmaların yanı sıra enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri (Cruz 2008) geliştirmiştir. Prolin, enzimler ve proteinler gibi makromoleküllerin kararlı hale gelmesi, membran bütünlüğünün korunması ve reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi gibi birçok fizyolojik role sahiptir (Kaur and Asthir 2017). Bununla birlikte, pirrolin-5-karboksilat sentaz (P5CS) genini aşırı ifade eden bitkilerin prolin biriktirdiği ve bu durumun ozmotik stres toleransına neden olduğu bildirilmiştir (Khan *et al.* 2015). Rafinoz ve galaktinozun kuraklık, tuzluluk ve düşük sıcaklık streslerine toleransta rol oynadığı belirtilmiştir. Galaktinol sentaz (*GoIS1*,

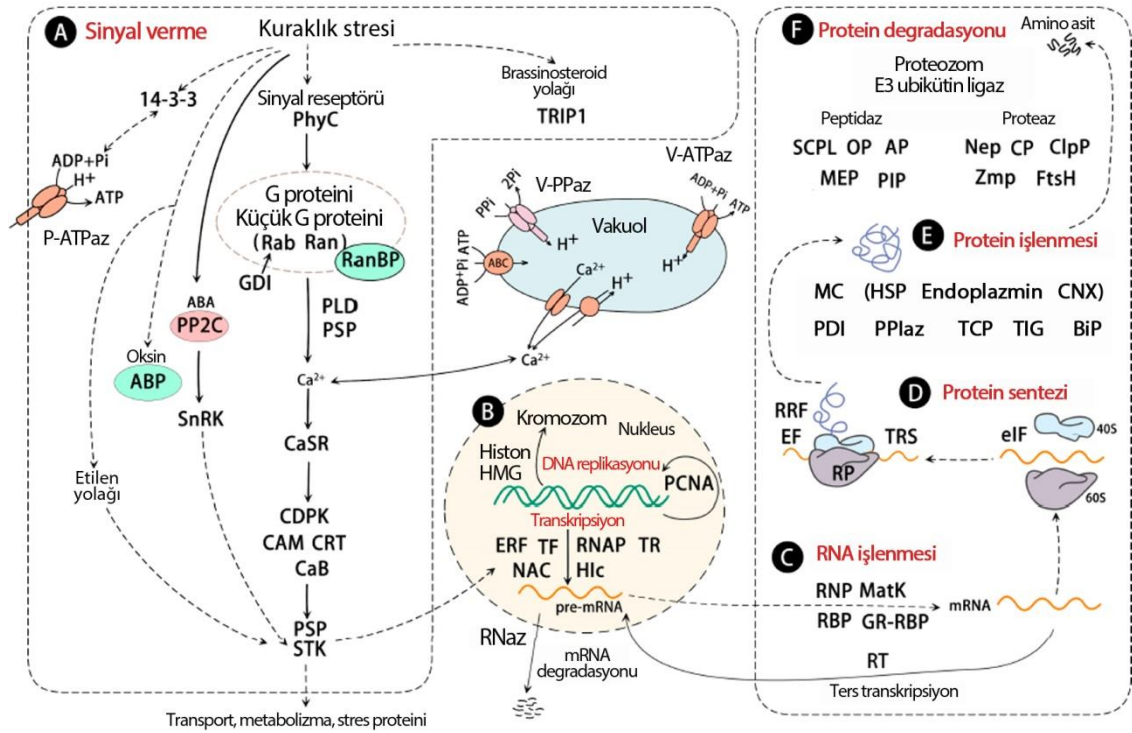
GoIS2 ve *GoIS4*), rafinoz sentaz 5, *P5CS1* ve *P5CS2* gibi galaktinol, rafinoz ve prolin sentezinde rol oynayan genlerin ifade seviyelerinin kuraklık stresine cevap olarak artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Rasheed *et al.* 2016). Bununla birlikte, *GoIS2* genini aşırı ifade eden *Arabidopsis*'te içsel galaktinol ve rafinoz içeriğinin arttığı ve bu bitkilerin kuraklık stresine daha toleranslı olduğu belirtilmiştir (Taji *et al.* 2002).

2.4 Kuraklık Stresi Altındaki Bitkilerde Proteom Değişimleri

Fonksiyonel genomik ve transkriptomik analizler, bitkilerde kuraklığa duyarlı mekanizmaların moleküler temelini anlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Rasheed *et al.* 2016, Moschen *et al.* 2017). Kuraklık stresi ile ilişkili genler ozmotik basınç düzenleyici enzimler, akuaporinler, detoksifiye edici enzimler, LEA proteinleri, reaktif oksijen türlerini temizleyen enzimler ve hücre zarlarının bütünlüğünü koruyan ve iyon taşınımı/dengesini sağlayan şaperonlardır. Ayrıca, gen ifadesi ve sinyal iletimini düzenleyen çeşitli transkripsiyon faktörleri ve protein kinazlar da kuraklık stresine yanıtta önemlidir (Wei *et al.* 2009, Rasheed *et al.* 2016). Kuraklık stresi, bitkilerin canlılıklarını sürdürebilmesinde rol oynayan genlerin ifadesindeki değişimler (Batlang *et al.* 2013), bitkilere zarar verebilen veya strese karşı tolerans sağlayacak bir mekanizmanın parçası olan proteinlerin üretimi ve degradasyonundaki değişimler (Mohammadi *et al.* 2012) ve kuraklık stresine tolerans sağlayabilen yeni metabolitlerin sentezi için metabolizmanın değiştirilmesi (Babita *et al.* 2010, Kumari *et al.* 2013) gibi etkileşimli modifikasyonlara neden olabilmektedir. Kuraklık stresine adaptasyonda, stoma hareketlerinin düzenlenmesi, süberin sentezinin teşviki ve çiçek gelişiminde önemli rol oynayan MYB transkripsiyon faktörlerinin (Gao *et al.* 2014, Baldoni *et al.* 2015), primer ve sekonder metabolizma, gelişim ve farklı biyotik ve abiyotik streslere cevaptaki rolleri bilinmektedir (Gao *et al.* 2014, Kosma *et al.* 2014, Baldoni *et al.* 2015).

Bitki proteomiği, strese maruz kalan bitkilerde de bitki proteomunun ve proteinlerin biyolojik fonksiyonlarının araştırılmasına yönelik dinamik bir disiplindir. Son yıllarda, stres altındaki bitkilerin proteomundaki değişimleri konu alan çalışmaların sayısı giderek artmaktadır (Kosová *et al.* 2018). Strese maruz kalan bitkilerden elde edilen

moleküler bilgiler, strese toleranslı bitkilerin genetik olarak geliştirilmesi için olası aday genlerin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Barkla *et al.* 2016). Farklı bitki türlerinde yapılan proteomik çalışmalar kuraklık stresine olan cevapların moleküler temellerinin anlaşılmasında önemli bilgiler sağlamıştır (Şekil 2.4) (Wang *et al.* 2016, Wang *et al.* 2017, Michaletti *et al.* 2018, Xin *et al.* 2018).



Şekil 2.4 Kuraklığa duyarlı proteinlerin sinyalleme, gen ifadesinin düzenlenmesi, protein sentezi ve parçalanması ile ilgili şematik gösterimi. Kesintisiz çizgi tek aşamalı reaksiyonları, kesikli çizgi reaksiyonun ara basamaklarını belirtir. **(A)** Sinyalleme; **(B)** DNA replikasyonu ve transkripsiyonu; **(C)** RNA işleme; **(D)** Protein sentezi; **(E)** Protein işleme; **(F)** Protein parçalanması. 14-3-3: 14-3-3 proteini; Nep: aspartik proteinaz; ClpP: ATP bağımlı Clp proteaz; ABP: oksin bağlayıcı protein; BiP: endoplasmik retikulum-lüminal bağlayıcı protein; CaB: kalsiyum iyonu bağlayıcı protein; CaSR: kalsiyum algılama reseptörü; CDPK: kalsiyum bağımlı protein kinazı; CAM: kalmodulin; CNX: kalneksin; CRT: kalretikulin; CP: sistein proteinaz; EF: uzama faktörü; ERF: etilen ile tepki veren transkripsiyon faktörü; GDI: GSYİH ayrışma önleyicisi; GR-RBP: glisin bakımından zengin RNA bağlayıcı protein; HSP: ısı şoku proteini; HMG: yüksek mobilite grup proteini; HOP: Hsp70-Hsp90 organize edici protein; AP: lösin aminopeptidaz; MatK: maturaz K; MEP: metalloendopeptidaz; MC: moleküler koruyucu; OP: oligopeptidaz A-benzeri; PPIaz: peptidil-prolil cis-trans izomeraz; PLD: fosfolipaz D; PhyC: fitokrom C; PCNA: çoğalan hücre nükleer antijen; PIP: prolin iminopeptidaz; PDI: protein disülfür izomeraz; PP2C: protein fosfataz 2C; RanBP: Ran-bağlayıcı protein; RT: retrotranspozon protein; RNaz: ribonükleaz; RNP: ribonükleoprotein; RP: ribozomal protein; RBP: RNA bağlayıcı protein; Hlc: RNA helikaz; RNAP: RNA polimeraz; SCPL: serin karboksipeptidaz benzeri protein; STK: serin/treonin kinaz; PSP: serin/treonin-protein fosfataz; SnRK: sükroz fermentasyon önleyici 1 protein kinaz; TCP: T kompleksi proteini; TRIP1: TGF- β reseptör etkileşen protein 1; TF: transkripsiyon faktörü; TR: transkripsiyon regülatörü; TIG: tetikleyici faktör benzeri protein; V-PPaz: vakuolar H⁺-pirofosfataz; V-ATPaz: vakuolar H⁺-ATPaz; Zmp: çinko metaloproteazı (Wang *et al.* 2016).

2.4.1 Kuraklık Stresi ve Fotosentez İle İlişkili Proteinler

Fotosentez doğrudan bitki verimliliği ve enerji kullanımı ile ilişkilidir ve kuraklık stresi gibi birçok abiyotik stres faktörü fotosentezi etkilemektedir (Kosova *et al.* 2011). Kuraklık stresi sırasında büyüme ve gelişimin sürdürülmesinin yollarından biri, fotosentez etkinliğini mümkün olduğu kadar yüksek tutmak ancak stresten kaynaklanan enerji ve iyon dengesizliklerini önlemektir. Bu dengesizlikler fotosentetik aygıtların aşırı uyarılmasına ve sonuç olarak foto-oksidatif hasara yol açabilir (Chaves *et al.* 2009). Bitkilerin olumsuz çevre koşullarına adaptasyonu, diğer süreçlerle birlikte bitki büyümesi ve gelişimini belirleyen fotosentezin plastisitesi ve esnekliği ile ilgilidir (Abreu *et al.* 2013). Fotosentetik bileşenlerin fonksiyonel olarak birbirleriyle ilişkili olduğu göz önüne alındığında, herhangi bir fotosentetik bileşenin zarar görmesi fotosentetik aktivitede genel bir azalmaya yol açabilmektedir (Chen *et al.* 2011). Elektron taşıma zinciri ve RuBisCO gibi karbon indirgenme döngüsünün önemli enzimlerinin kuraklık stresine bağlı olarak ifade seviyelerinin azaldığı ve bu azalmanın fotosentetik aktivitedeki inhibisyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Khodadadi *et al.* 2017).

RuBisCO'nun yanı sıra karbon indirgenme reaksiyonlarında fonksiyon gören fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, sedoheptuloz-1,7-bisfosfataz ve fosforibulokinaz gibi birçok enzimin ifade seviyelerindeki azalmalar kuraklık stresi altındaki birçok bitki türünde belirlenmiştir (Wang *et al.* 2017, Michaletti *et al.* 2018, Xin *et al.* 2018). Diğer taraftan, Calvin döngüsü enzimlerinin kuraklığa toleranslı yerkıstığı yapraklarında arttığı, hassas varyete de ise azaldığı ve düşük miktardaki bu proteinlerin oksidatif strese neden olarak fotosentetik aygıtlara zarar verdiği belirtilmiştir (Katam *et al.* 2016). Ribuloz-1,5-bisfosfatın yenilenmesinde fonksiyon gören enzim olan fosforibulokinaz enziminin kuraklığa hassas şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) yapraklarında azalan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Wang *et al.* 2017). Bununla birlikte, RuBisCO'nun aktif bölgesinden inhibitör şeker fosfatın uzaklaştırılmasından sorumlu ATP bağımlı bir enzim olan RuBisCO aktivaz da kuraklık

stresi tarafından azalan yönde düzenlenmektedir (Kausar *et al.* 2013). Kuraklık stresi altında stoma kapanmasına bağlı olarak hücre içi CO₂ konsantrasyonunun azalması ribuloz-1,5-bifosfatın oksijenasyonunu ve dolayısıyla fotorespirasyonu arttırmaktadır. Bununla birlikte, kuraklık stresi koşullarında fotorespirasyon ile ilişkili proteinlerin artan yönde düzenlenmesi fotorespirasyonun su stresi tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Fotorespirasyon, zarar görmüş FSII'nin onarılmasında önemli olan D1 proteininin sentezinin inhibe olmasını önleyebilmektedir (Takahashi *et al.* 2007).

Kuraklık stresinin fotoinhibisyona neden olarak fotosentezin biyokimyasal reaksiyonlarını sınırladığı (Johnová *et al.* 2016) ve fotosistemlerin zarar görmesinin ATP ve indirgeyici moleküllerin oluşma kapasitesini azalttığı bildirilmiştir. Işık yakalama kompleksi, fotosistem II'nin kararlılığını sağlayan önemli proteinlerin (CYP38 ve HCF136) ve bazı ATP sentaz altbirimlerinin kuraklık stresi altındaki bitki türlerinde azalan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Khodadadi *et al.* 2017, Michaletti *et al.* 2018). Diğer taraftan, FSII'nin reaksiyon merkezinde suyun parçalanmasından sorumlu bir protein olan OEE2 (oxygen-evolving enhancer 2) proteininin kuraklık toleranslı şeker pancarı yapraklarında artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Wang *et al.* 2017). Gliserat-3-fosfat, NADPH molekülünden elektronları alarak FSII'nin reaktif oksijen türlerine karşı korunmasını sağlamaktadır. Gliserat-3-fosfat dehidrogenaz proteininin kuraklığa toleranslı çeltik çeşidinde artan yönde düzenlendiği ve FSII'nin korunmasında bu enzimin bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Chintakovid *et al.* 2017). LHCB (light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins) ailesine ait proteinlerin azalan yönde düzenlenmesinin stoma bekçi hücrelerinin ABA'ya karşı olan hassasiyetini azalttığı ve bu durumun kuraklık toleransında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Xu *et al.* 2012, Urban *et al.* 2017). Ayrıca tiyoredoksin, demir-kükürt proteini, ferredoksin-NADP redüktaz ve NADH dehidrogenaz gibi proteinleri kuraklık stresi koşullarında azalmasının FSII ve FSI arasında elektron transferini baskıladığı belirtilmiştir (Xin *et al.* 2018).

2.4.2 Karbohidrat ve Enerji Metabolizması İle İlişkili Proteinler

Yeterli miktarda enerjinin ve dengeli karbonhidrat üretiminin sürdürülmesi tüm bitkilerde en önemli olaylardır. Şekerler, enerjik fonksiyona hizmet etmenin yanı sıra birçok hücre sel süreçte merkezi bir düzenleyici rol oynarlar ve bitki metabolizmasını ve gelişimini düzenleyen önemli sinyaller olarak kabul edilirler (Bilal *et al.* 2014). ATP metabolizması ile ilgili birçok enzimin kuraklık stresi koşullarında farklı şekilde ifade olduğu belirlenmiştir (Vítámvás *et al.* 2015). ATP sentaz alt birimlerindeki artışlar ile ilgili çalışmalarda belirtildiği gibi, bitki stres tepkilerini hedef alan birçok proteomik çalışmada, evrensel bir enerji kaynağı olarak ATP'ye duyulan ihtiyaç bildirilmiştir (Vítámvás *et al.* 2012, Kausar *et al.* 2013, Michaletti *et al.* 2018).

Glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü ve pentoz fosfat yolu gibi enerji metabolizması ile ilişkili birçok proteinin seviyesinin kuraklık stresi koşullarında azaldığı bilinmektedir (Xin *et al.* 2018). Fosfoglukomutaz karbohidrat metabolizmasında önemli bir enzimdir ve glukoz-1-fosfatın glukoz-6-fosfata dönüşümünü kataliz etmektedir. Fosfoglukomutaz proteinin azalan yönde düzenlenmesinin, stres hasarını hafifletmek için gerekli olan enerjiyi azalttığı ve ayrıca kuraklık stresi koşullarında koruyucu bir rol oynadığı bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2009). Malatın oksaloasetata dönüşümünü kataliz eden malat dehidrogenaz trikarboksilik asit döngüsünün önemli bir enzimidir. Malat dehidrogenaz protein seviyesinin kuraklığa toleranslı şeker pancarı yapraklarında arttığı bildirilmiştir (Wang *et al.* 2017). Fosfogliserat kinaz glikoliz sırasında ATP üretiminde ve Calvin döngüsünde 1,3-bifosfogliseratın oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Joshi *et al.* 2016). Fosfogliserat kinaz proteinin kuraklığı toleransı rezene bitkilerinde arttığı, buna karşın hassas bitkilerde azaldığı bildirilmiştir (Khodadadi *et al.* 2017). Fruktoz-bifosfat aldolaz; fruktoz-1,6-bifosfatın gliseraldehit-3-fosfata ve dihidroksiaseton fosfata dönüşmesini kataliz etmektedir. Bu proteinin seviyesindeki azalma kuraklık stresi altındaki kolza ve arpa gibi bitki türlerinde belirlenmiştir (Vitamvas *et al.* 2015, Urban *et al.* 2017). Glikolizde fonksiyon gören iki enzim olan enolaz ve fruktoz-1,6-bifosfat aldolazın kuraklık stresi altındaki buğday bitkilerinde azaldığı bildirilmiştir (Zhang *et al.*

2014). Sonuç olarak, kuraklık stresi koşullarında fotosentezin engellenmesine bağlı olarak bitkilerin karbonhidrat metabolizmasının olumsuz etkilendiği ve enerji tüketiminin azaldığı iyi bilinmektedir (Kosova *et al.* 2011).

2.4.3 Stres Savunma İle İlişkili Proteinler

Kuraklık gibi çevresel stresler, fotosentez, mitokondriyal solunum ve fotorespirasyon gibi süreçlere zarar vermekte ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırmaktadır (Mittler 2002). Normal koşullarda bitkiler reaktif oksijen türlerini programlanmış hücre ölümü, abiyotik stres cevapları ve patojenlere karşı savunma gibi çeşitli hücreyel olaylarda sinyal molekülü olarak kullanmaktadır. Strese maruz kalan bitkilerde aşırı üretilen reaktif oksijen türleri lipitlere, nükleik asitlere ve proteinlerde oksidatif zarara neden olarak hücre ölümüne yol açmaktadır (Pitzschke *et al.* 2006). Reaktif oksijen türlerinin seviyelerini korumak için enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmaların kompleks dizilerini geliştirmiştir. Kuraklık stresine maruz kalan birçok bitki türünde süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), tiyoredoksin peroksidaz, glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimlerin protein seviyelerinin değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Faghani *et al.* 2015, Li *et al.* 2018, Xin *et al.* 2018). SOD, yüksek derecede toksik süperoksit anyonunu daha az toksik hidrojen peroksit'e dönüştürerek oksidatif hasara karşı ilk savunma hattı olarak bilinmektedir. SOD proteininin ifade seviyesindeki artış kuraklık stresi altındaki çeltik ve buğday gibi bitki türlerinde belirlenmiştir (Ji *et al.* 2012, Faghani *et al.* 2015). SOD enziminin abiyotik streslere tolerans kazandırılmasındaki önemi, bu enzimi kodlayan genleri aşırı ifade eden transgenik bitkiler kullanılarak ortaya çıkarılmıştır (Faize *et al.* 2011, Negi *et al.* 2015). Artan APX ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki birçok bitki türünde belirlenmiş (Chmielewska *et al.* 2016, Wang *et al.* 2017) ve kuraklık stresi koşullarında artan askorbat-glutatyon döngüsü aktivitesinin toleranslı genotiplerde daha belirgin olduğu bildirilmiştir (Chmielewska *et al.* 2016, Wang *et al.* 2017). GST, tripeptid glutatyon ile ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan ve oksidatif stresi hafifleten önemli bir enzimdir (Marrs 1996). Kuraklığa hassas buğday genotipinde GST

ifadesinin azalan yönde düzenlendiği ve bu genotipin toksik molekülleri detoksifiye etmede başarısız olduğu bildirilmiştir (Michaletti *et al.* 2018). Benzer olarak, GST seviyesindeki artışın sadece kuraklığa toleranslı arpa genotiplerinde olduğu bildirilmiştir (Kausar *et al.* 2013, Chmielewska *et al.* 2016). Bununla birlikte, domates GST genini aşırı ifade eden transgenik Arabidopsis bitkilerinde kuraklık toleransının arttığı rapor edilmiştir (Xu *et al.* 2015).

Peroksiredoksinlerin (Prx), farklı türde biyotik ve abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde elektron taşıma aktiviteleri sonucu üretilen reaktif oksijen türleriyle mücadelede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Prx'lerin gelişim ve adaptasyon sırasında redoks sinyalini düzenlediği ve DNA hasarlarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Tripathi *et al.* 2009). Reaktif oksijen türlerini indirgeyen peroksidazların bir grubu olan 2-Cys Prx sülfidril rezidüelerinden peroksitlere elektronların transferini kataliz etmektedir. Prx-2E, tioredoksin sistemi aracılığıyla sağlanan detoksifikasyonda yer alır ve kloroplast redoks homeostazında rol oynayabilir (Baier and Dietz 1997). Farklı Prx proteinlerin kuraklık stresi altındaki bazı bitki türlerinde artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2016, Urban *et al.* 2017, Xin *et al.* 2018).

2.4.4 Protein Metabolizması İle İlişkili Proteinler

İyi bilinen moleküler şaperonlar olarak, HSP ailesi normal bitki büyüme süreçlerini düzenlemede rol oynamaktadır. Stres koşullarında reaktif oksijen türleri HSP70 üretimi ve birikiminin düzenlenmesine katılır (Piterkova *et al.* 2013). Birkaç şaperon kompleksi (HSP90) dokuya özgü ABA yanıtlarının düzenlenmesine fonksiyon görebilmektedir (Clement *et al.* 2011). Protein katlanması için önemli bir moleküler şaperon olan HSP70, hücrelerin strese karşı korunmasına yardımcı olmaktadır. Tuzluluk, soğuk ve kuraklık gibi birçok abiyotik stres altında ekspresyon seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir (Komatsu *et al.* 2013). HSP70'in artan yönde düzenlenmesi, hasarlı proteinlerin hızlı bozunması ve reaktivasyonu yoluyla korunmasını ve böylece kuraklık stresine toleransı artırmaya yardımcı olduğunu göstermektedir (Mohammadi *et al.* 2012, Xin *et al.* 2018).

Kloroplastik HSP70 proteininin ifade seviyesinin kuraklığa toleranslı şeker pancarı yapraklarında arttığı buna karşın hassas genotipte azaldığı bildirilmiştir. Bu durumun, kuraklığa toleranslı genotipte kloroplastik HSP70'in ifade seviyesinin artmasının, FSII ve diğer önemli hücresel bileşenleri kuraklık stresi altındaki hasardan koruyabileceğini gösterdiği bildirilmiştir (Wang *et al.* 2017). Bununla birlikte, HSP70, şaperonin 60, protein disülfid izomeraz, şaperonin 21 ve siklofilin gibi protein metabolizması ile ilgili proteinlerin kuraklığa toleranslı yer fıstığı genotipinde artan yönde düzenlediği, hassas genotipte ise azalan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Katam *et al.* 2016).

HSP90 hücrelerde oldukça fazla miktarda bulunan bir proteindir ve toplam hücresel proteinin yaklaşık %1-2'sini oluşturmaktadır (Frydman 2001). HSP90 protein katlanmasının yanı sıra sinyal iletimi, hücre döngüsünün kontrolü, protein degradasyonu ve protein trafiğinde fonksiyon görmektedir (Wang *et al.* 2004). HSP90'ın ifade seviyesinin birçok stres koşulunda artmakta ve Arabidopsis'in kuraklık toleransında rol oynayabileceği bildirilmiştir (Song *et al.* 2009). ATP bağımlı Clp proteazlar (HSP100) moleküler şaperonlar olarak işlevlerine ek olarak, yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonunu sağlayarak hücresel homeostazın sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Aşırı kuraklık stresine maruz bırakılan buğday fidelerinde Clp proteaz proteininin arttığı bildirilmiştir (Larkindale and Vierling 2008).

2.4.5 Sinyal İletimi İle İlişkili Proteinler

Bitkiler strese maruz kaldığında, genellikle stres sinyalleri özel reseptörler aracılığıyla algılanmakta ve daha sonra gen ifadesini düzenlemek için bu sinyaller sinyal iletim mekanizmasına gönderilmektedir (Yan *et al.* 2006). Protein fosfataz 2C (PP2C), absisik asit ve gibberellik asit gibi bitki hormonlarının yanı sıra kuraklık, tuz, yaralama ve soğuk gibi çeşitli stresler tarafından aktive edilen sinyal yollarının genel bir düzenleyicisi olarak işlev görmektedir (Liu *et al.* 2009). Kuraklık stresi altındaki mısır fidelerinde PP2C proteininin azaldığı ve PP2C'nin kısa süreli kuraklık stresine karşı savunma için sinyal yollarının düzenlenmesine katkıda bulunduğunu ileri sürülmüştür (Xin *et al.* 2018).

Yüksek oranda korunmuş asidik protein ailesi 14–3–3 sinyal iletimi ve apoptoz olmak üzere birçok fizyolojik süreçte 200'den fazla hedef protein ile etkileşime girebilmektedir (Mhaweche 2005, Sun *et al.* 2011). 14–3–3 proteininin kuraklık stresine toleranslı buğday genotipinde artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Hao *et al.* 2015). Diğer taraftan, 14–3–3 proteininin hassas buğday genotipinde kuraklık stresine cevap olarak azaldığı bildirilmiştir (Faghani *et al.* 2015). Shi vd. (2014), sinyal iletiminde yer alan 14-3-3 benzeri proteininin kuraklık stresi yanıtında önemli bir rol oynayabileceğini bildirmiştir. Ayrıca Arabidopsis 14–3–3 proteinin kodlayan geni aşırı ifade eden pamuk bitkilerinde kuraklık toleransının arttığı rapor edilmiştir (Yan *et al.* 2004). Sitoplazmik Ca^{+2} bağlayıcı bir protein olan TCTP (translationally controlled tumor protein)'nin ifade seviyesinin kuraklık stresine yanıt olarak buğday fidelerinde arttığı belirtilmiştir (Zhang *et al.* 2014). TCTP'nin strese maruz kalan bitki hücrelerinde Ca^{+2} homeostazının korunmasında rol oynaması mümkündür, çünkü biyotik ve abiyotik stres gibi hücre dışı sinyaller, bitkilerde Ca^{+2} hücresi konsantrasyonundaki değişikliklere yol açabilmektedir (Luan *et al.* 2002). Sinyal iletiminde fonksiyon gören diğer bir protein olan anneksinlerin bitkilerin tuz ve kuraklık stresi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Konopka-Postupolska *et al.* 2009, Sobhanian *et al.* 2010). Zıt olarak, anneksin proteininin kuraklığa hassas fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkilerinde artan yönde düzenlendiği ve anneksin proteininin kuraklık toleransı ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Zadraznika *et al.* 2013).

2.4.6 Kuraklık Stresi İle İlişkili Diğer Proteinler

Kuraklık dahil olmak üzere birçok çevresel stres, muhtemelen elektron taşıma zincirinin azalmasına bağlı olarak bitki hücrelerinde serbest amino asit ve aminlerin artmasına neden olmaktadır (Reggiani *et al.* 2000). Bu amino asitler ve aminler ozmoprotektan, ozmotik düzenleyici veya reaktif oksijen türlerinin temizleyicileri olarak işlev görebilmektedir. Prolin ve glisin betain (GB) gibi ozmoprotektanların sentezinde rol oynayan proteinlerin düzenlemesi bitkilerin stres toleransında önemli bir rol oynamaktadır (Alam *et al.* 2010). Glutamin sentetaz (GS) azot metabolizmasında

önemli bir oynamakta ve bitkilerde prolin seviyesinin düzenlenmesinde fonksiyon gördüğü belirtilmiştir. Kuraklık stresi altındaki soya fasulyesinde GS proteininin artan seviyesinin yüksek prolin içeriği ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Alam *et al.* 2010). Glisin betain önemli bir osmoprotektandır ve iki aşamalı bir kolin oksidasyonu ile sentezlenmektedir. Kolin monooksijenaz (CMO), GB sentezi için hız sınırlayıcı bir basamak olarak düşünülen reaksiyonun ilk adımını katalize etmektedir (Luo *et al.* 2012). Kuraklığa hassas şeker pancarı genotipinde CMO proteininin seviyesinin azalmasının ve toleranslı genotipte bu proteinin seviyesindeki artışın, bu iki genotipin farklı tolerans seviyelerini açıklayabileceği ileri sürülmüştür (Wang *et al.* 2017). Bununla birlikte, şeker pancarı CMO genini plastidlerinde aşırı ifade eden tütün bitkilerinde tuz ve kuraklık toleransının arttığı bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2008).

LEA (Late-embryogenesis abundant) proteinleri desikasyona toleranslı bitkilerde yüksek konsantrasyonda sentezlenen suda çözünebilir proteinlerdir (Alam *et al.* 2010). Kuraklık stresi altındaki soya fasulyesi bitkilerinde dehidrin ve ferritin proteinlerinin artan yönde düzenlendiği belirtilmiştir (Alam *et al.* 2010). Dehidrinler LEA proteinleridir ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini azaltarak stres altında bitki gelişimini etkili bir şekilde arttırabilmektedirler (Hossain *et al.* 2013). *Medicago truncatula* bitkilerinde tespit edilen birçok proteinin LEA proteini olduğu ve bu proteinlerin kuraklık toleransı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Boudet *et al.* 2006).

Kuraklık stresi altındaki bitkilerde amino asit metabolizması ile ilişkili birçok proteinin ifade seviyesinin farklı şekilde düzenlendiği bildirilmiştir (Khodadadi *et al.* 2017, Xin *et al.* 2018). Kuraklık stresi altındaki rezene bitkilerinde S-adenozil metiyonin sentezinden sorumlu bir enzim olan kobalamin bağımsız metiyonin sentaz protein seviyesinin hassas genotipte azaldığı, toleranslı genotipte ise arttığı bildirilmiştir (Khodadadi *et al.* 2017). Metiyonin sentaz, 5-metiltetrahidrofolattan bir metil grubunun homosisteine transferini katalize etmekte ve böylelikle etilen ve poliaminlerin öncüsü metiyonin sentezlenmektedir (González *et al.* 1992). Metionin sentaz ve kobalamin-bağımsız metiyonin sentaz enzimindeki artışlar, bitkilerin kuraklık stresinin üstesinden gelmeleri

için metiyonin ve ozmotik düzenleyicilerin metabolizmasını artırabileceğini göstermektedir (Khodadadi *et al.* 2017). Bununla birlikte, metiyonin sentaz ve metil transferazlar lignin monomerlerinin biyosentezinde aktif metil grupları sağlamak ve böylece hücre duvarı bileşenlerini güçlendirmekte ve stres sırasında bütünlüklerini korumaktadır (Ravanel *et al.* 2004). Metiyonin sentaz seviyesinin kuraklığa toleranslı yer fıstığı genotipinde daha fazla olduğu bildirilmiştir (Katam *et al.* 2016). Aspartat aminotransferaz amino asit sentezinde önemli bir enzimdir ve karbon ve azot metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Zhou *et al.* 2009). Bu enzimin azalan yönde düzenlenmesinin mısır fidelerinde amino asit sentezini olumsuz etkileyebileceği ileri sürülmüştür (Meyer *et al.* 2014, Xin *et al.* 2018). Alanin-2-oksoglutarat aminotransferaz (AlaAT), L-alanin ve 2-oksoglutarat arasındaki transaminasyon reaksiyonunu ve L-glutamat ve pirüvat arasındaki ters reaksiyonu kataliz etmektedir. Bu enzim azot metabolizmasında ve yapraklardaki serin, sitrülün ve glisin içeriğinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Rocha *et al.* 2010). Kuraklığa bağlı ATP eksikliğinde, alanin ve glutamat yollarının düzenlenmesiyle ATP'ye bağımlı enzim olan GS ile AlaAT yer değiştirmesine izin vermektedir (Limami *et al.* 2008). Bu adaptasyon ATP'yi korur, NAD⁽⁺⁾'ı yeniden üretir ve karbonu alanin formunda saklar. AlaAT'nin seviyesindeki azalmanın, ATP'ye bağımlı hemen hemen tüm proteinlerin genel olarak düşük seviyesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Urban *et al.* 2017).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Yetiştirme Koşulları ve Stres Uygulaması

Bir C3 tipi bitki olan *Cleome spinosa* ve C4 tipi bitki olan *Cleome gynandra* türlerine ait tohumlar Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'dan temin edilmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonu 5 dakika süreyle %1 sodyum hipoklorür çözeltisi ile yapıldıktan sonra tohumlar 5 kez steril distile su ile yıkanmıştır. Steril tohumlar, içerisinde distile su ile ıslatılmış iki adet filtre kağıdı bulunan steril petri kaplarına (9 cm çapında) transfer edilmiştir. Buharlaşmanın önlenmesi için petri kapları parafilm ile sarılmıştır. Her iki türe ait tohumlar 20/30°C (8/16 saat) sıcaklıkta ve karanlıkta 5 gün süreyle çimlendirilmiştir (Ochudho *et al.* 2006). Çimlenmiş tohumlar 7:2:1 oranında torf:vermikülit:perlit içeren saksılara transfer edilmiştir. Fideler kontrollü iklim kabininde (23°C, 260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu, 16:8 saat fotoperiyot ve %60 nem) 2 ay süreyle büyütülmüştür. Denemeler üç tekrarlı olup, rastgele deneme deseninde gerçekleştirilmiştir. Her tekrar için üç plastik kap (200 mL) kullanılmış ve her saksıda birer fide büyütülmüştür. Fidelere ½ oranında sulandırılmış Hoagland çözeltisi gūnaşırı verilmiştir. İkinci ayın sonunda, kuraklık stresine ait kaplardaki fidelere besin çözeltisi 10 gün süreyle verilmemiş ve bu süre sonunda fideler hasat edilmiştir. Kuraklık stresi uygulanan kaplardaki fidelerin belirgin bir şekilde turgorlarını kaybettikleri gözlenmiştir. Kontrol ve kuraklık uygulamalarında her tekrara ait üçer kaptan birer fidenin yaprak ayaları rastgele kesilerek 2'şer gram olacak şekilde tartılmıştır. Tartılan yaprak dokuları alüminyum folyo ile paketlenerek sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve proteomik analizler yapılincaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2 Protein Ekstraksiyonu

Kontrol ve kuraklık stresine maruz bırakılan *Cleome spinosa* (C3) ve *Cleome gynandra* (C4) türlerine ait fidelerin taze yaprak dokularından proteinlerin ekstraksiyonu fenol

ekstraksiyon metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Hurkman and Tanaka 1986, Ahsan *et al.* 2008). Yaprak örnekleri (2 g) sıvı azot kullanılarak havan içerisinde iyice öğütülmüş ve 5 mL Mg/NP-40 ekstraksiyon tamponunda [0.5 M Tris-HCl (pH 8.3), %2 v/v NP-40, 20 mM MgCl₂, %2 v/v β-merkaptoetanol, 1 mM fenilmetansülfonil florid ve 0.7 M sukroz] homojenize edilmiştir (Kim *et al.* 2001). Her bir uygulama grubu için üç tekrarlı olacak şekilde elde edilen homojenatlar falkon tüplerine transfer edilmiş ve 10 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra homojenata eşit hacimde Tris-HCl ile doyurulmuş fenol solüsyonu eklenmiş ve 10 dakika boyunca laboratuvar koşullarında inkübe edildikten sonra 3.500 ×g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyondan sonra üst kısımda kalan fenol faz temiz bir tüpe alınmış ve eş hacimde ekstraksiyon tamponu ilave edildikten sonra 10 dakika laboratuvar koşullarında inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 3.500 ×g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst kısımda kalan fenol faz temiz bir falkon tüpüne transfer edilmiştir. Proteinlerin çöktürülmesi için tüplere 0.1 M amonyum asetat içeren 4 hacim soğuk metanol ilave edilmiş ve -20°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu periyot sonunda çöktürülmüş proteinler 10 dakika 3.500 ×g'de santrifüj edilmiş ve elde edilen protein peleti 3 kez 0.1 M amonyum asetat içeren soğuk metanol ile yıkanmıştır. Her yıkama basamağında tüpler 10 dakika 3.500 ×g'de santrifüj edilmiştir. Son yıkama basamağından sonra tüpler santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan peletler desikatörde kurutularak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Peletler lizis tamponunda (7 M urea, 2 M thiourea, %4 (w/v) CHAPS, 40 mM DTT ve %0.2 Ampholyte pH 3-10) çözülmüş ve peletlerdeki protein miktarları Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir. Protein standardı olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır.

3.3 İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Çözünebilir protein profillerindeki polimorfizmler iki-yönlü (2-D) poliakrilamid jel elektroforezi (İzoelektrik Fokuslama/Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, IEF/SDS-PAGE) tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Elektroforezin ilk yönü olan IEF'de, Protean IEF Cell (Bio-Rad) sisteminde IPG (immobilized pH gradient)

stripleri (pH 4-7, 17 cm) kullanılarak proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılmıştır. Protein peletleri rehidrasyon tamponunda çözünmüş ve 1 saat laboratuvar koşullarında inkübe edildikten sonra 10 dakika 10.000 $\times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Görüntü analizlerinde kullanılacak analitik jeller için 80 μg protein, kütle spektrometrisi analizleri için kullanılacak jeller ise 500 μg protein olacak şekilde IPG striplere yüklenmiştir. Rehidrasyon işlemi laboratuvar koşullarında 16 saat olacak şekilde pasif olarak gerçekleştirilmiştir. Rehidrasyon işleminin ardından IPG stripler Protean IEF Cell sistemine transfer edilmiş ve toplamda 80.000 Vh olacak şekilde IEF işlemi gerçekleştirilmiştir.

IEF'den sonra stripler 15 dakika dengeleme solüsyonu I [6 M urea, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2 (w/v) DTT] ve 15 dakika dengeleme solüsyonu II [6 M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2.5 (w/v) iodoacetamide] ile muamele edilmiştir. Dengeleme basamağından sonra ikinci yön olan SDS-PAGE %12'lik akrilamid jelde (%30 akrilamid/bisakrilamid, 1.5 M Tris-HCl tamponu, pH 8.8, %10 SDS, %10 amonyum persülfat ve TEMED) Laemmli (1970)'ye göre gerçekleştirilmiştir. 2-D elektroforez PROTEAN II XL Cell (Bio-Rad)'de gerçekleştirilmiştir. Protein standardı olarak 14.4-97.4 kDa aralığında SDS-PAGE standardı (Bio-Rad) kullanılmıştır. 2-D elektroforez işleminde sonra jeller gümüş boyama işlemine kadar fiksatif (%30 etanol ve %10 glasiyal asetik asit) içerisinde saklanmıştır.

3.4 Jellerin Boyanması ve Görüntü Analizleri

Analitik jellerdeki protein benekleri gümüş boyama kullanılarak görünür hale getirilmiştir (Sinha *et al.* 2001). Fiksasyon basamağını takiben jeller hassaslaştırma çözeltisi (3 g/L potasyum tetrasyonat, 0.5 M potasyum asetat, %30 etanol) ile muamele edilmiştir. Jeller yıkandıktan sonra gümüş nitrat çözeltisinde (2 g/L AgNO₃) inkübe edilmiştir. Jeller yıkandıktan sonra geliştirme çözeltisinde (30 g/L potasyum karbonat, 300 $\mu L/L$ %40 formaldehit, 125 $\mu L/L$ %10 sodyum tiyosülfat) benekler

görünür hale gelinceye kadar inkübe edilmiştir. Son olarak, jeller durdurma çözeltisi (40 g/L Tris, 20 mL/L asetik asit) ile muamele edilmiştir. Bununla birlikte, kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılacak protein benekleri blue-silver boyama protokolü kullanılarak görünür hale getirilmiştir (Candiano *et al.* 2004). Blue-silver boyama protokolü için jeller fiksatif (%50 etanol ve %2 fosforik asit) içerisinde gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra jeller iki kez distile su ile yıkandıktan sonra boya solüsyonunda (%0.12 coomassie brilliant blue G-250, %10 amonyum sülfat, %10 fosforik asit ve %20 metanol) bir gece inkübe edilmiştir. Boyamayı takiben jeller birkaç kez distile su ile yıkanarak arka zemindeki fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Gümüş ve CBB boyalı jeller ChemiDoc™ MP jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile görüntülenmiştir. Farklı şekilde ifade olan protein benekleri (yeni sentezlenen, sentezi kaybolan, sentezi artan ve/veya azalan) PDQuest yazılımı (versiyon 8.0.1, Bio-Rad) ile saptanmış ve nispi hacimleri temelinde miktarları belirlenmiştir. Belirli bir protein beneğinin yoğunluğu, jel görüntüsündeki beneği oluşturan tüm piksellerin toplam yoğunluğu olarak tanımlanan protein hacmi olarak ifade edilmiştir. Bununla birlikte, protein miktar tayini, örnek yükleme veya jel boyama basamaklarında meydana gelebilecek olası hataları telafi etmek için her bir protein beneğinin hacmi, jelde bulunan tüm protein beneklerinin toplam hacminin yüzdesi olacak şekilde normalize edilmiştir.

3.5 Jelde Triptik Kesim

Seçilmiş protein benekleri CBB boyalı jellerden steril bisturi kullanılarak elle kesilmiş ve 0.6 mL'lik steril tüplere alınmıştır. Protein beneklerinin triptik kesimi için In-Gel Tryptic Digestion Kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Fazla boyanın uzaklaştırılması için kesilen jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37°C'de 30 dakika muamele edilmiştir. Boya uzaklaştırma çözeltisi tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra indirgeme ve alkilasyon basamaklarına geçilmiştir. İndirgeme basamağı için jel parçacıkları 50 mM Tris(2-karboksietil)fosfin çözeltisi içeren 2 g/L amonyum bikarbonat

çözeltisi ile 60°C'de 10 dakika muamele edilmiştir. Bu periyod sonunda indirgeme çözeltisi uzaklaştırılmış ve alkilasyon için jel parçacıkları 100 mM iodoasetamid ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Alkilasyon tamponu uzaklaştırıldıktan sonra jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37°C'de 15 dakika muamele edilmiştir. Jel parçalarını dehidrate etmek için örnekler konsantre asetonitril ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Asetonitril çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş jel parçacıkları üzerine aktive edilmiş tripsin (10 ng/μL) eklenmiş ve 30°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüpler sonikatörlü su banyosunda 15 dk inkübe edildikten sonra içerisindeki solüsyon yeni bir tüp alınmıştır. Geriye kalan jel parçaları üzerine %10 trifloroasetik asit (TFA) eklenmiş ve sonikatörlü su banyosunda 15 dk daha inkübe edilmiştir. Tüplerin içerisindeki solüsyonlar bir önceki basamakta elde edilen solüsyonlar ile birleştirilmiş ve vakum konsantratör (Eppendorf, Germany) ile kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş örnekler 10 μL %0.1'lik TFA ile yeniden süspanse edilmiş ve kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.6 Kütle Spektrometrisi Analizleri

Kütle spektrometrisi analizleri için %0.1'lik TFA'da çözülmüş peptidler ZipTip C₁₈ (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılarak konsantre hale getirilmiştir. Peptid solüsyonları, %50 asetonitril ve %0.1 TFA ile doyurulmuş 10 mg L⁻¹ α-cyano-4-hydroxycinnamic asit (matriks) ile karıştırılmıştır. Daha sonra yaklaşık 1 μL solüsyon MALDI plakasına yerleştirilmiş ve kuruması sağlanmıştır. Kütle spektrometrisi analizleri AB Sceix TOF/TOF 5800 kütle spektrometrisi cihazı (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumu (m/z 800–3000) pozitif iyon reflektör modunda elde edilmiştir. Her bir protein beneği için MS modundan elde edilen 10 pik MS/MS fragmentasyonu için seçilmiştir. MS/MS modu 1 kV'lık çarpışma (collision) enerjisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çarpışma teşvikli fragmentasyon için çarpışma gazı olarak hava kullanılmıştır. Öncü MS spektrumları için internal kalibrasyon

olarak otolitik tripsin peptidleri kullanılmıştır. MS verileri GPS Explorer (Applied Biosystem) ve MASCOT (Matrix Science, London, UK) yazılımları kullanılarak veri tabanlarına karşı aranmıştır. Arama kriterleri olarak Çizelge 3.1'deki parametreler kullanılmıştır. Veri tabanı taraması SwissProt protein veri tabanına karşı yapılmıştır. MS/MS verileri için %95'den daha büyük olarak belirlenen önemli derecede yüksek MASCOT skorları, güvenilir şekilde tanımlanmış protein olarak kabul edilmiştir.

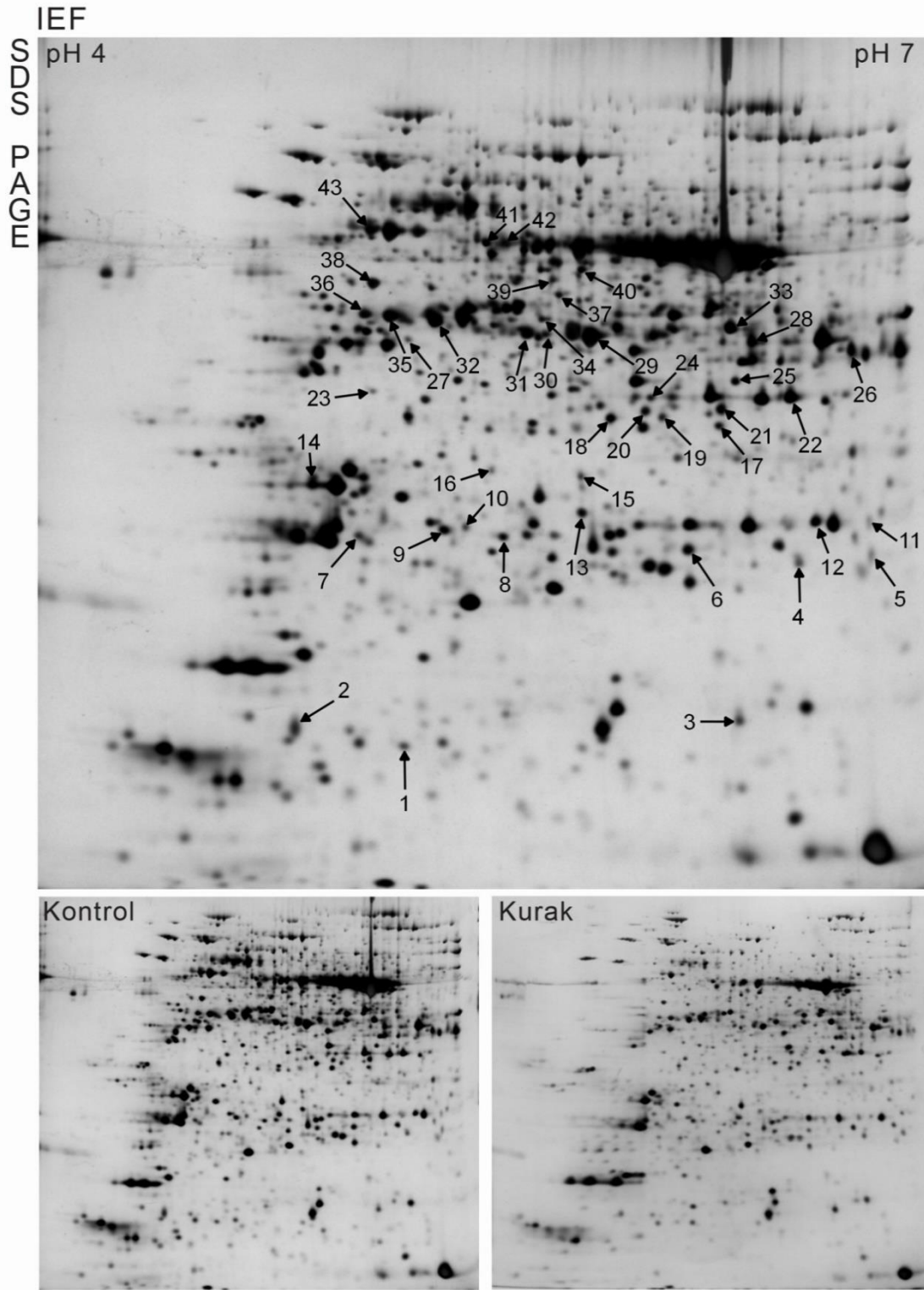
Çizelge 3.1 Protein tanımlamada kullanılan parametreler

Parametre	Açıklama
Enzim	Tripsin
Değişken modifikasyonlar	Metiyonin oksidasyonu
Sabit modifikasyonlar	Sistein karbamidometilasyonu
peptid toleransı	50 ppm
MS/MS toleransı	0.4 Da
Taksonomi	Viridiplantae (yeşil bitkiler)
Cihaz	MALDI-TOF/TOF

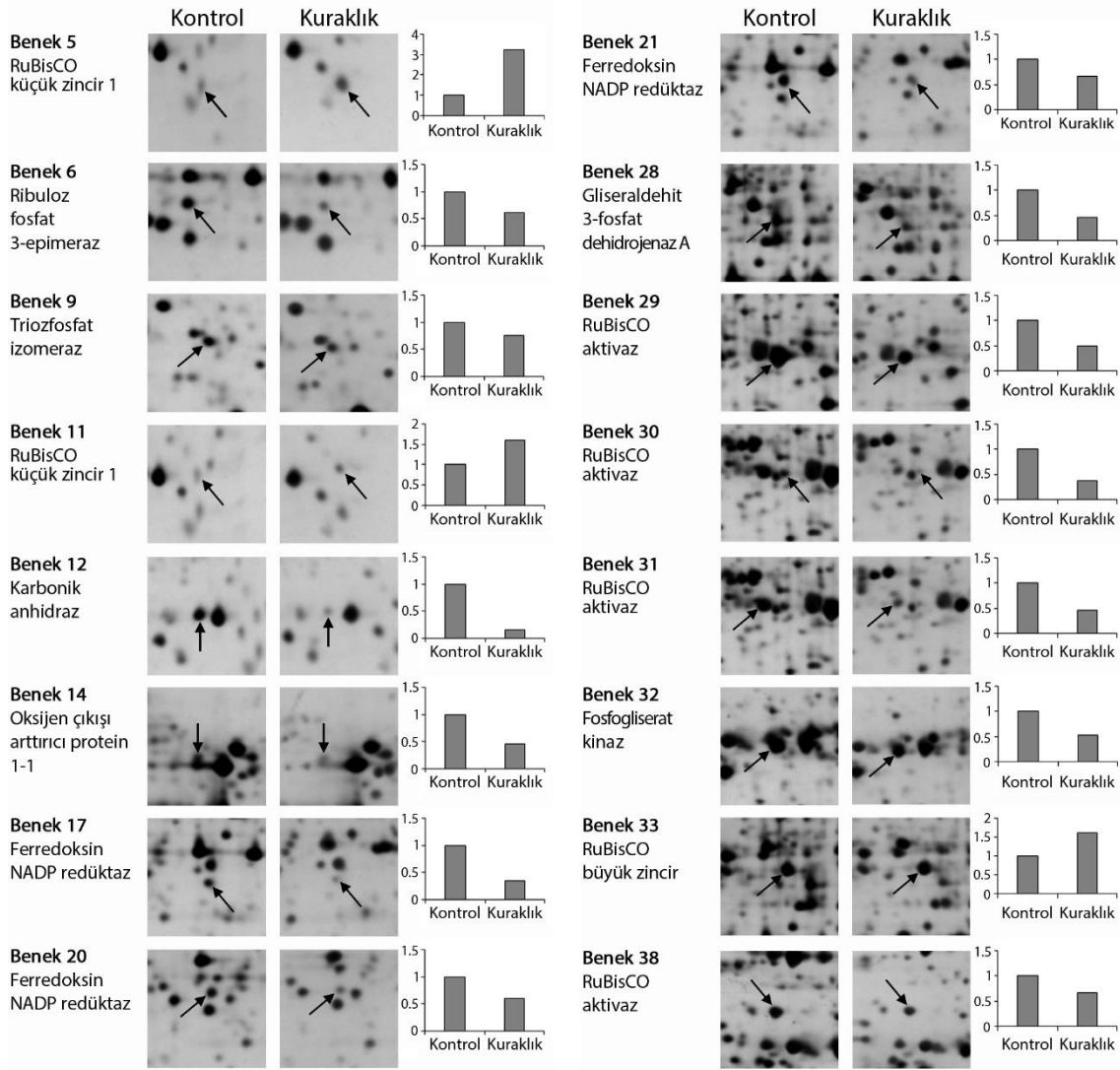
4. BULGULAR

Bu araştırmada, *Cleome spinosa* (C3) ve *Cleome gynandra* (C4) bitkilerinin yaprak dokularında proteom değişimleri üzerine kuraklık stresinin etkilerini değerlendirmek için protein ekspresyon profilleri iki yönlü (2-D) IEF/SDS-PAGE yöntemi ile analiz edilmiştir. Kontrole göre kuraklık stresi koşullarında ifade seviyesi 1.5 kattan daha fazla değişiklik gösteren protein benekleri farklı şekilde ifade olan proteinler olarak tanımlanmıştır. Elde edilen 2-D jellerin analizi ile *C. spinosa* türünde 60 protein, *C. gynandra* türünde ise 36 protein beneğinin farklı şekilde ifade olduğu belirlenmiştir (şekil 4.1 ve 4.3). Bununla birlikte, *C. spinosa* türünde 43 protein, *C. gynandra* türünde ise 22 protein beneği MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ve veri tabanı taraması ile başarılı bir şekilde tanımlanmıştır (Çizelge 4.1 ve 4.2). Tanımlanan tüm protein benekleri fonksiyonlarına göre fotosentez, enerji metabolizması, stres savunma, primer hücre metabolizması, protein metabolizması, sinyal iletimi ve transport olmak üzere farklı kategorilere ayrılmıştır (Çizelge 4.1 ve 4.2). Bununla birlikte, 2-D jellerdeki bazı protein beneklerinin özdeş olduğu belirlenmiştir.

Kuraklık stresi *C. spinosa* türünün yaprak dokularında fotosentez ile ilişkili 16, enerji metabolizması ile ilgili 9, stres savunma ile ilişkili 6, protein metabolizması ile ilgili 4, hücre metabolizması ile ilgili 4, sinyal iletimi ile ilişkili 3 ve transport ile ilişkili 1 proteinin ifade seviyesinde farklılığa neden olmuştur (Çizelge 4.1, şekil 4.2). Fotosentez ile ilişkili olarak, kuraklık stresi ribuloz-fosfat 3-epimeraz (benek 6), triozfosfat izomeraz (benek 9), karbonik anhidraz (benek 12), oksijen-çıkışı arttırıcı protein 1-1 (benek 14), ferredoksin-NADP redüktaz yaprak izozimi (benek 17, 20 ve 21), gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz A (benek 28), ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz aktivaz (benek 29, 30, 31 ve 38) ve fosfogliserat kinaz (benek 32) proteinlerinin ifade seviyelerini azalan yönde düzenlemiştir. Diğer taraftan, ribuloz bifosfat karboksilaz küçük zincir 1 (benek 5 ve 11) ve ribuloz bifosfat karboksilaz büyük zincir (benek 33) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresi koşullarında sırasıyla 3.24, 1.6 ve 1.6 kat artmıştır (Çizelge 4.1, şekil 4.1 ve 4.2).



Şekil 4.1 Kuraklık stresine maruz bırakılan *Cleome spinosa* (C3) fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri. Total proteinler (80 µg) 17 cm'lik IPG striplere (pH 4-7) yüklenmiş ve SDS-PAGE %12'lik jelde gerçekleştirilmiştir. Proteinler gümüş boyama ile görünür hale getirilmiştir. Jel profillerinde oklar ile gösterilmiş ve numaralandırılmış (1-43) proteinler farklı şekilde ifade olan proteinleri ifade etmektedir.



Şekil 4.2 Kuraklık stresi altındaki *Cleome spinosa*'da fotosentez ile ilişkili farklı şekilde ifade olan proteinlerin büyütülmüş görüntüleri.

Çizelge 4.1 Kuraklık stresine maruz bırakılan *Cleome spinosa* (C3) fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanan proteinler

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA pl ^e	Cover. f	EP ^g	İfade ^h
Fotosentez ile ilişkili proteinler							
5	RBS1_FLAPR	Ribuloz bifosfat karboksilaz küçük zincir 1 Kloroplastik <i>Flaveria pringlei</i>	128	19.6 8.93	33%	10	+3,24
6	RPE_SOLTU	Ribuloz-fosfat 3-epimeraz Kloroplastik <i>Solanum tuberosum</i>	110	29.9 7.61	31%	7	-1,61
9	TPIC_FRAAN	Triozfosfat izomeraz Kloroplastik <i>Fragaria ananassa</i>	403	33.5 7.64	34%	21	-1,50
11	RBS1_FLAPR	Ribuloz bifosfat karboksilaz küçük zincir 1 Kloroplastik <i>Flaveria pringlei</i>	176	19.6 8.93	33%	11	+1,60
12	CAHC_PEA	Karbonik anhidraz Kloroplastik <i>Pisum sativum</i>	200	35.4 7.01	12%	10	-6,67
14	PSBO1_ARATH	Oksijen-çıkışı arttırıcı protein 1-1 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	246	35.1 5.55	23%	15	-2,20
17	FNRL2_ARATH	Ferredoksin-NADP redüktaz, yaprak izozimi 2 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	138	41.1 8.51	24%	19	-2,81
20	FENR1_PEA	Ferredoksin-NADP redüktaz, yaprak izozimi Kloroplastik <i>Pisum sativum</i>	238	40.2 8.56	37%	23	-1,50
21	FENR1_PEA	Ferredoksin-NADP redüktaz, yaprak izozimi Kloroplastik <i>Pisum sativum</i>	262	40.2 8.56	36%	19	-1,50
28	G3PA_ARATH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz A Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	63	42.5 7.62	3%	2	-2,19

Çizelge 4.1 (Devam)

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA pl ^e	Cover. ^f	EP ^g	İfade ^h
Fotosentez ile ilişkili proteinler							
29	RCA_ORYSJ	Ribuloz bifosfat karboksilaz / oksijenaz aktivaz Kloroplastik <i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	244	51.4 5.43	26%	20	-2,00
30	RCA_ORYSJ	Ribuloz bifosfat karboksilaz / oksijenaz aktivaz Kloroplastik <i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	101	51.4 5.43	15%	17	-2,74
31	RCA_ARATH	Ribuloz bifosfat karboksilaz / oksijenaz aktivaz Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	90	51.9 5.87	11%	9	-2,18
32	PGKH_SPIOL	Fosfogliserat kinaz Kloroplastik <i>Spinacia oleracea</i>	287	45.5 5.83	27%	15	-1,87
33	RBL_AREDR	Ribuloz bifosfat karboksilaz büyük zincir Kloroplastik <i>Arenaria drummondii</i>	60	52.6 6.13	29%	18	+1,60
38	RCA_ARATH	Ribuloz bifosfat karboksilaz / oksijenaz aktivaz Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	101	51.9 5.87	13%	8	-1,50
Enerji metabolizması ile ilişkili proteinler							
4	MI25_TOBAC	ATP sentaz protein MI25 Mitokondriyal <i>Nicotiana tabacum</i>	40	22.4 9.53	32%	10	+2,09
10	TPIS_COPJA	Triozfosfat izomeraz Sitozolik <i>Coptis japonica</i>	84	27.1 7.67	22%	7	-1,56
22	ALFC_ORYSJ	Fruktoz-bifosfat aldolaz Kloroplastik <i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	220	41.9 6.38	23%	11	-1,76
26	ALF2_PEA	Fruktoz-bifosfat aldolaz Sitoplazmik izozim 2 <i>Pisum sativum</i>	73	38.4 6.77	17%	8	-1,70

Çizelge 4.1 (Devam)

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA pl ^e	Cover. f	EP ^g	İfade ^h
Enerji metabolizması ile ilişkili proteinler							
27	ADH1_PETHY	Alkol dehidrojenaz 1 <i>Petunia hybrida</i>	50	41.5 6.19	21%	12	-1,50
39	GLGS_BRANA	Glukoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük alt birim Kloroplastik <i>Brassica napus</i>	57	57.0 5.87	23%	11	-1,75
40	UGPA2_ARATH	UTP-glukoz-1-fosfat üridililtransferaz 2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	181	51.7 5.80	26%	14	+2,09
42	ATPB_WHIBI	ATP sentaz beta alt birimi Kloroplastik <i>Whiteheadia bifolia</i>	216	53.7 5.28	40%	27	-5,00
43	ATPA_EUCGG	ATP sentaz alfa alt birimi Kloroplastik <i>Eucalyptus globulus</i>	349	55.5 5.15	29%	27	-1,90
Stres savunma ile ilişkili proteinler							
1	TRXH2_TOBAC	Tiyoredoksin H-tipi 2 <i>Nicotiana tabacum</i>	38	13.0 9.62	28%	7	-1,66
7	FRI1_SOYBN	Ferritin-1 Kloroplastik <i>Glycine max</i>	72	28.0 5.73	18%	6	+1,51
16	SDR1_ARATH	(+)-neomentol dehidrojenaz <i>Arabidopsis thaliana</i>	96	32.8 5.38	17%	10	+1,80
18	QORL_ARATH	Kinon oksidoredüktaz-benzeri protein At1g23740 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	130	40.9 8.46	22%	11	-1,50
25	P2_ARATH	NADP-bağımlı oksidoredüktaz P2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	73	37.9 8.09	9%	8	+1,50

Çizelge 4.1 (Devam)

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA pl ^e	Cover. ^f	EP ^g	İfade ^h
Stres savunma ile ilişkili proteinler							
34	MDAR3_ARATH	Monodehidro askorbat redüktaz Sitoplazmik izoform 3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	79	46.5 6.41	5%	4	+1,79
Protein metabolizması ile ilişkili proteinler							
2	RK123_ARATH	50S ribozomal protein L12-3 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	92	19.7 5.51	20%	5	-2,19
3	RM06_PROWI	60S ribozomal protein L6 Mitokondriyal <i>Prototheca wickerhamii</i>	51	21.8 11.38	27%	9	+5,59
8	CH10C_ARATH	20 kDa şaperonin Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	174	26.8 8.86	22%	9	-2,74
41	AMPL2_ORYSJ	Lösin aminopeptidaz 2 Kloroplastik <i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	146	61.8 8.29	24%	19	+1,69
Hücre metabolizması ile ilişkili proteinler							
13	THF1_ARATH	Protein TİLAKOİD FORMASYONU 1 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	174	33.8 9.20	19%	17	-1,50
35	GLNA2_ARATH	Glutamin sentetaz Kloroplastik/mitokondriyal <i>Arabidopsis thaliana</i>	129	47.4 6.43	33%	12	-1,62
36	GLNA2_ARATH	Glutamin sentetaz Kloroplastik/mitokondriyal <i>Arabidopsis thaliana</i>	114	47.4 6.43	20%	12	-1,62
37	METK2_ELAUM	S-adenozilmetiyonin sentetaz 2 <i>Elaeagnus umbellata</i>	330	43.1 5.50	37%	21	-1,63

Çizelge 4.1 (Devam)

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA pI ^e	Cover. ^f	EP ^g	İfade ^h
Sinyal iletimi ile ilişkili proteinler							
19	ANXD6_ARATH	Anneksin D6 <i>Arabidopsis thaliana</i>	149	36.5 7.72	16%	9	+2,61
23	1433_SPIOL	14-3-3-benzeri protein <i>Spinacia oleracea</i>	42	24.7 5.38	34%	9	+1,62
24	ANXD1_ARATH	Anneksin D1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	88	36.2 5.21	17%	7	+2,71
Transport ile ilişkili proteinler							
15	VATE2_ARATH	V-tip proton ATPaz alt birim E2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	54	26.8 9.20	24%	11	-1,77

^a 2-D jellerde gösterilen benek numarasını ifade eder (Şekil 4.1).

^b SwissProt veri tabanına karşı yapılan MASCOT taramasına göre belirlenen aksesyon numarasını ifade eder.

^c SwissProt veri tabanına karşı yapılan MASCOT taramasına göre belirlenen proteini ifade eder.

^d MS analizleri ve MASCOT taraması temelinde yapılan protein tanımlaması için olasılık skorunu ifade eder.

^e Tanımlanan protein için moleküler ağırlığı (MA, kDa) ve izoelektrik noktasını (pI) ifade eder.

^f Eşleşen amino asit dizisinin yüzdesini ifade eder.

^g Eşleşen peptid (EP) sayısını ifade eder.

^h Kontrolle göre kuraklık stresinde protein miktarındaki değişimi ifade eder.

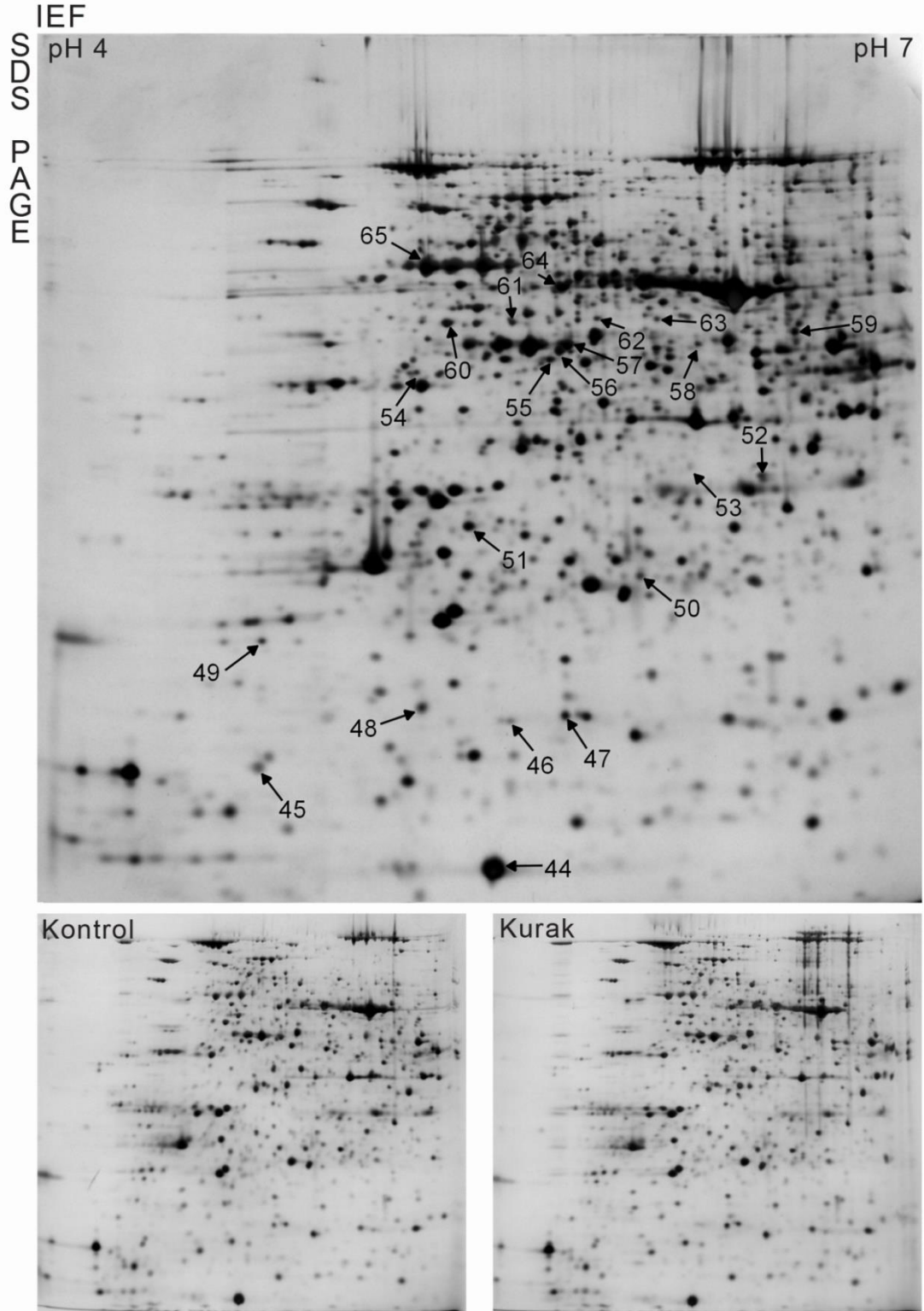
Mevcut araştırmada, enerji metabolizması ile ilgili olarak triozfosfat izomeraz (benek 10), fruktoz-bifosfat aldolaz (benek 22 ve 26), alkol dehidrojenaz 1 (benek 27), glukoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük alt birim (benek 39), ATP sentaz beta alt birimi (benek 42) ve ATP sentaz alfa alt birimi (benek 43) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresi koşulları altındaki *Cleome spinosa* türünde azalan yönde düzenlenmiştir. Diğer taraftan, ATP sentaz protein MI25 (benek 4) ve UTP-glukoz-1-fosfat üridililtransferaz 2 (benek 40) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresi koşullarında 2.09 kat artış göstermiştir (Çizelge 4.1).

Stres savunma ile ilişkili olan tiyoredoksin H-tipi 2 (benek 1) ve kinon oksidoredüktaz-benzeri protein At1g23740 (benek 18) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresi

altındaki *Cleome spinosa* türünün yaprak dokularında azalan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, ferritin-1 (benek 7), (+)-neomentol dehidrojenaz (benek 16), NADP-bağımlı oksidoredüktaz P2 (benek 25) ve monodehidro askorbat redüktaz (benek 34) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresi koşullarında artmıştır (Çizelge 4.1).

Protein metabolizması ile ilişkili olan 50S ribozomal protein L12-3 (benek 2) ve 20 kDa şaperonin (benek 8) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresi altındaki *Cleome spinosa* türünün yaprak dokularında azalan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, 60S ribozomal protein L6 (benek 3) ve lösin aminopeptidaz 2 (benek 41) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresi koşullarında sırasıyla 5.59 ve 1.69 kat artmıştır. Kuraklık stresi hücresel metabolizma ile ilgili olarak TİLAKOİD FORMASYONU 1 (benek 13), glutamin sentetaz (benek 35 ve benek 36) ve S-adenozilmetiyonin sentetaz 2 (benek 37) proteinlerinin ifade seviyesini azalan yönde düzenlemiştir. Diğer taraftan, sinyal iletim yollarında fonksiyon gören anneksin D6 (benek 19), 14-3-3-benzeri protein (benek 23) ve anneksin D1 (benek 24) proteinlerinin ifade seviyesi kuraklık stresi koşullarında artmıştır. Ayrıca kuraklık stresi V-tip proton ATPaz alt birim E2 (benek 15) proteininin ifade seviyesini azalan yönde düzenlemiştir (Çizelge 4.1).

Kuraklık stresi *C. gynandra* türünün yaprak dokularında hücre metabolizması ile ilgili 7, fotosentez ile ilişkili 6, enerji metabolizması ile ilgili 3, protein metabolizması ile ilgili 3, stres savunması ile ilişkili 2 ve sinyal iletimi ile ilişkili 1 proteinin ifade seviyesinde farklılığa neden olmuştur (Çizelge 4.2, Şekil 4.3). Hücre metabolizması ile ilişkili membran-ilişkili 30 kDa protein (benek 52), piridoksal biyosentez proteini PDX1 (benek 53), glutamin sentetaz (benek 57), glutamat-1-semialdehit 2,1-aminomutaz (benek 58), GDP-mannoz 3,5-epimeraz (benek 59) ve S-adenozilmetiyonin sentetaz (benek 62 ve 63) proteinlerinin ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki *C. gynandra* türünün yaprak dokularında azalan yönde düzenlenmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.3 Kuraklık stresine maruz bırakılan *Cleome gynandra* (C4) fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri. Total proteinler (80 µg) 17 cm'lik IPG striplere (pH 4-7) yüklenmiş ve SDS-PAGE %12'lik jelde gerçekleştirilmiştir. Proteinler gümüş boyama ile görünür hale getirilmiştir. Jel profillerinde oklar ile gösterilmiş ve numaralandırılmış (44-65) proteinler farklı şekilde ifade olan proteinleri ifade etmektedir.

Çizelge 4.2 Kuraklık stresine maruz bırakılan *Cleome gynandra* (C4) fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanan proteinler

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA pl ^e	Cover. f	EP ^g	ifade ^h
Hücre metabolizması ile ilişkili proteinler							
52	IM30_ARATH	Nembran-iliskili 30 kDa protein Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	66	36.4 9.18	34%	14	-1,50
53	PDX1_HEVBR	Piridoksal biyosentez proteini PDX1 <i>Hevea brasiliensis</i>	406	33.1 5.79	33%	26	-1,73
57	GLNA2_ARATH	Glutamin sentetaz Kloroplastik/mitokondriyal <i>Arabidopsis thaliana</i>	176	47.4 6.43	39%	15	-2,17
58	GSA_BRANA	Glutamat-1-semialdehit 2,1-aminomutaz Kloroplastik <i>Brassica napus</i>	207	50.2 6.43	28%	15	-2,00
59	GME_ARATH	GDP-mannoz 3,5-epimeraz <i>Arabidopsis thaliana</i>	430	42.7 5.85	43%	24	-1,50
62	METK_MESCR	S-adenozilmetiyonin sentetaz <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	353	42.9 5.43	33%	16	-2,00
63	METK2_ELAUM	S-adenozilmetiyonin sentetaz 2 <i>Elaeagnus umbellata</i>	381	43.1 5.50	47%	26	-1,89
Fotosentez ile ilişkili proteinler							
44	RBS_LARLA	Ribuloz bifosfat karboksilaz küçük zincir Kloroplastik <i>Larix laricina</i>	62	21.1 8.54	8%	3	-1,50
48	PSBP_BRAJU	Oksijen-çıkışı arttırıcı protein 2 Kloroplastik <i>Brassica juncea</i>	52	23.3 4.91	17%	4	+2,00
54	CHLI_ARATH	Magnezyum-şelataz alt birim chli Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	189	46.2 6.08	26%	20	-2,24

Çizelge 4.2 (Devam)

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA pl ^e	Cover. f	EP ^g	İfade ^h
Fotosentez ile ilişkili proteinler							
55	RCA2_LARTR	Ribuloz bifosfat karboksilaz / oksijenaz aktivaz 2 Kloroplastik <i>Larrea tridentata</i>	47	48.0 6.78	21%	12	+2,04
56	MDHP_MEDSA	Malat dehidrojenaz [NADP] Kloroplastik <i>Medicago sativa</i>	229	47.8 6.43	22%	13	+1,73
60	RCA_CUCSA	Ribuloz bifosfat karboksilaz / oksijenaz aktivaz Kloroplastik <i>Cucumis sativus</i>	331	45.7 7.57	27%	21	-1,50
Enerji metabolizması ile ilişkili proteinler							
47	MI25_TOBAC	ATP sentaz protein MI25 Mitokondriyal <i>Nicotiana tabacum</i>	39	22.4 9.53	44%	13	+1,74
64	ENO2_HEVBR	Enolaz 2 <i>Hevea brasiliensis</i>	400	47.9 5.92	33%	24	+1,55
65	ATPA_AETCO	ATP sentaz alfa alt birimi Kloroplastik <i>Aethionema cordifolium</i>	578	55.3 5.20	37%	25	-1,50
Protein metabolizması ile ilişkili proteinler							
45	RK123_ARATH	50S ribozomal protein L12-3 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	130	19.7 5.51	18%	6	+1,58
46	IF5A2_SOLLC	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 5A-2 <i>Solanum lycopersicum</i>	107	17.5 5.78	18%	9	+2,18
61	IF4A1_ORYSJ	Ökaryotik başlatıcı faktör 4A-1 <i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	316	47.1 5.37	43%	32	+1,50

Çizelge 4.2 (Devam)

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA pl ^e	Cover. ^f	EP ^g	İfade ^h
Stres savunma ile ilişkili proteinler							
50	SODF_ARATH	Süperoksit dismutaz [Fe] Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	66	23.8 6.06	17%	5	+1,71
51	PAP6_ARATH	Plastid-lipid-ilişkili protein 6 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	102	30.4 5.82	20%	8	+1,50
Sinyal iletimi ile ilişkili proteinler							
49	TCTP_MAIZE	Translasyonel-kontrollü tümör homolog proteini <i>Zea mays</i>	194	18.7 4.52	25%	8	+2,09

^a 2-D jellerde gösterilen benek numarasını ifade eder (Şekil 4.2).

^b SwissProt veri tabanına karşı yapılan MASCOT taramasına göre belirlenen aksesyon numarasını ifade eder.

^c SwissProt veri tabanına karşı yapılan MASCOT taramasına göre belirlenen proteini ifade eder.

^d MS analizleri ve MASCOT taraması temelinde yapılan protein tanımlaması için olasılık skorunu ifade eder.

^e Tanımlanan protein için moleküler ağırlığı (MA, kDa) ve izoelektrik noktasını (pl) ifade eder.

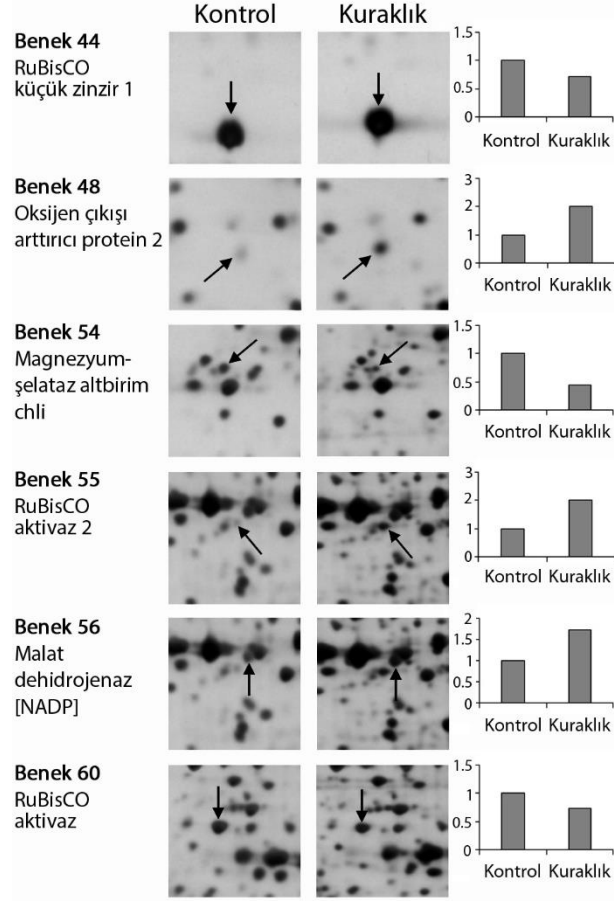
^f Eşleşen amino asit dizisinin yüzdesini ifade eder.

^g Eşleşen peptid (EP) sayısını ifade eder.

^h Kontrole göre kuraklık stresinde protein seviyesindeki değişimi ifade eder.

Mevcut araştırmada, fotosentezle ilişkili olarak ribuloz bifosfat karboksilaz küçük zincir (benek 44), magnezyum-şelataz alt birim chli (benek 54) ve ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz aktivaz (benek 60) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresi altındaki *C. gynandra* fidelerinin yaprak dokularında azalan yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.4, Çizelge 4.2). Diğer taraftan, kuraklık stresi oksijen-çıkışı arttırıcı protein 2 (benek 48), ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz aktivaz 2 (benek 55) ve malat dehidrojenaz [NADP] (benek 56) proteinlerinin ifade seviyelerinde artışa neden olmuştur. Kuraklık stresi enerji metabolizması ile ilgili olarak ATP sentaz alfa alt birimi (benek 65) proteinin ifade seviyesini azalan yönde düzenlerken, ATP sentaz protein MI25 (benek 47) ve enolaz 2 (benek 64) proteinlerinin ifade seviyelerini artan yönde düzenlemiştir. Protein metabolizması ile ilgili olan 50S ribozomal protein L12-3 (benek 45), ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 5A-2 (benek 46) ve ökaryotik başlatıcı faktör 4A-1 (benek

61) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresi koşullarında sırasıyla 1.58, 2.18 ve 1.50 kat artmıştır.



Şekil 4.4 Kuraklık stresi altındaki *Cleome gynandra*'da fotosentez ile ilişkili farklı şekilde ifade olan proteinlerin büyütülmüş görüntüleri.

Stres savunması ile ilişkili süperoksit dismutaz [Fe] (benek 50) ve plastid-lipid-ilişkili protein 6 (benek 51) proteinlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresinde sırasıyla 1.71 ve 1.50 kat artmıştır. Son olarak, sinyal iletimi ile ilişkili translasyonel-kontrollü tümör protein homolog (benek 49) proteininin ifade seviyesinin kuraklık stresi koşullarında 2.09 kat arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çevresel streslere maruz kalan bitkiler morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyelerde çeşitli cevaplar geliştirebilmektedir (Lopes and Reynolds 2011, Aprile *et al.* 2013). Proteomik bitkilerde stres toleransının moleküler temellerinin anlaşılmasında güçlü bir yaklaşımdır ve stres toleransı ile ilişkili yeni aday proteinlerin teşhisini sağlayabilmektedir. Bitkilerde kuraklık stresinin etkilerinin proteom seviyesinde incelendiği çok sayıda çalışma olmasına karşın (Khodadadi *et al.* 2017, Wang *et al.* 2017, Xin *et al.* 2018), kuraklık stresi altındaki C3 ve C4 bitkilerinde proteom değişimlerini araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Farklı fotosentez yollarına sahip bitkilerde kuraklık stresi ile ilişkili moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için iki-yönlü (2-D) jel elektroforezi *Cleome spinosa* (C3) ve *Cleome gynandra* (C4) bitkilerinin yaprak dokularındaki proteom değişimlerini mukayese etmek için kullanılmıştır. Yapılan analizler ile gümüş boyama veya blue-silver boyama ile görünür hale getirilmiş 2-D jellerde 500'den fazla protein beneği belirlenmiştir. *Cleome* türlerinin yaprak dokularından elde edilen proteinlerin karşılaştırmalı analizleri, kuraklık stresi koşullarında farklı şekilde ifade olan 96 proteinin belirlenmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, MALDI-TOF/TOF analizlerini takiben yapılan MASCOT taraması ile bu proteinlerden 65'i başarılı bir şekilde tanımlanabilmiştir. Tanımlanan proteinler biyolojik fonksiyonlarına göre fotosentez, enerji metabolizması, stres savunma, hücre metabolizması, protein metabolizması ve sinyal iletimi gibi gruplara ayrılmıştır.

Fotosentez, karbondioksitin (CO₂) organik bileşiklere dönüştürüldüğü bir süreçtir ve bitki büyümesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kuraklık stresi koşullarında fotosentez ile ilişkili birçok proteinin karmaşık ifade profillerine sahip olduğu bildirilmiştir (Ge *et al.* 2012). Mevcut araştırmada, fotosentez ile ilişkili olarak *C. spinosa* türünde 16 protein, *C. gynandra* türünde ise 6 proteinin kuraklık stresi koşullarında farklı şekilde ifade olduğu belirlenmiştir. Bu proteinlerin çoğunlukla Calvin döngüsü ve elektron taşıma ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Kuraklık stresi altında fotosentezin biyokimyasal

etkinliğinin esas olarak ribuloz-1,5-bisfosfat (RuBP) molekülünün yeniden oluşturulmasına ve ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO) aktivitesine bağlı olduğu belirtilmiştir (Lawlor 2002). RuBisCO atmosferik karbondioksitin bitkiler tarafından glikoz gibi enerji bakımından zengin moleküllere dönüştürüldüğü bir işlem olan karbon fiksasyonunun ilk ana basamağında yer alan önemli bir enzimdir (Feller *et al.* 2008). RuBisCO, ribuloz-1,5-bisfosfatın karboksilasyonunu ve inorganik karbonun biyosfere girdiği birincil kimyasal reaksiyonu kataliz etmektedir (Faghani *et al.* 2015). Yüksek bitkilerde RuBisCO'nun sekiz küçük ve sekiz büyük altbirimden oluştuğu bildirilmiştir (Parry *et al.* 2008). Mevcut araştırmada, *C. spinosa* türünde RuBisCO büyük zincir (benek 33) ve küçük zincir 1 (benek 5 ve 11) proteinlerinin ifade seviyesi kuraklık stresi koşullarında artan yönde düzenlenirken, *C. gynandra* türünde RuBisCO küçük zincir (benek 44) proteininin ifade seviyesi azalan yönde düzenlenmiştir. Benzer şekilde, RuBisCO proteininin ifade seviyesinin kuraklığa toleranslı rezene genotipinde azalan yönde düzenlendiği buna karşın hassas genotipte artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Khodadadi *et al.* 2017). Diğer bir fotosentetik enzim olan RuBisCO aktivazın ATP'ye bağımlı bir reaksiyonla RuBisCO'dan inhibe edici şeker fosfatların ayrılmasını sağladığı belirtilmiştir (Portis 2003). Diğer bir ifadeyle RuBisCO aktivaz, RuBisCO'nun inaktif formdan aktif forma geçişini kontrol eden moleküler bir şaperondur (Spreitzer and Salvucci 2002). Genel anlamda ATP üretimindeki bozulma ve kuraklık stresi koşullarında transpirasyonun azalmasına bağlı olarak yaprak sıcaklığının artması nedeniyle, RuBisCO aktivazın bitkilerin çevresel streslere verdiği yanıtları belirleyen önemli bir faktör olabileceği bildirilmiştir (Sage *et al.* 2008). Bununla birlikte, RuBisCO aktivazın kuraklık veya tuzluluk stresleri altında tarımsal bitkilerin verimliliğini artırma potansiyeline sahip olduğuna dair net kanıtlar olduğu belirtilmiştir (Kurek *et al.* 2007). Mevcut araştırmada, *C. spinosa* türünde RuBisCO aktivaz (benek 29, 30, 31 ve 38) proteinlerinin ifade seviyesi kuraklık stresi koşullarında azalan yönde düzenlenirken, *C. gynandra* türünde RuBisCO aktivaz 2 (benek 55) proteininin ifade seviyesi artan yönde düzenlenmiştir. Kuraklık stresine cevap olarak çeltik (Ji *et al.* 2012) ve mısır (Benesova *et al.* 2012) gibi bitkilerde bu proteinin seviyesinde bir artış olduğu bildirilmiştir. Kuraklığa toleranslı ve hassas buğday genotiplerinde RuBisCO aktivaz

proteininin ifade seviyesinin kuraklık stresi uygulamasında belirgin şekilde arttığı ve RuBisCO'nun aktif formda tutulmasının kuraklık stresinin üstesinden gelmesinde önemli olduğu rapor edilmiştir (Faghani *et al.* 2015). Diğer taraftan, RuBisCO aktivaz proteininin ifade seviyesinin arpa (Kausar *et al.* 2013), kolza (Urban *et al.* 2017) ve buğday (Michaletti *et al.* 2018) gibi türlerin kuraklığa hassas genotiplerinde azaldığı rapor edilmiştir. Bu bağlamda, RuBisCO aktivaz proteininin seviyesindeki azalmanın, kuraklık stresine bağlı olarak fotosentezdeki güçlü inhibisyon ile kesin olarak bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Michaletti *et al.* 2018). Kuraklık stresi nedeniyle fotosentezin biyokimyasal olarak kısıtlanması fotoinhibisyonu (Wang *et al.* 2016), fotosistemlerdeki hasarı, ATP ve indirgeyici üretme kapasitesindeki azalmayı da içermektedir (Pinheiro and Chaves 2011). Sonuç olarak, RuBisCO aktivaz proteininin seviyesindeki artışın, karbondioksit fiksasyonu için aktif RuBisCO miktarını artırarak fotosentetik verimi artırabileceği ve böylece azalmış stoma iletkenliğini telafi edebileceği ileri sürülebilir.

Diğer bir fotosentetik enzim olan karbonik anhidraz, karbondioksidin geri dönüşümlü bir şekilde hidrasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Bununla birlikte, karbonik anhidraz proteinlerinin, stoma hareketlerini modüle ederek bitki ve atmosfer arasındaki gaz alışverişini kontrol eden karbondioksit sinyal yollarına rol oynadığı (Rowlett 2010) ve su kullanım verimliliğini arttırdığı bildirilmiştir (Cui *et al.* 2012). Stres koşullarında karbonik anhidrazın, karboksilasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Zhang *et al.* 2016). Yüksek sıcaklıklara cevap olarak fotosentez hızındaki değişimin, pamuk bitkilerindeki karbonik anhidraz aktivitesi ile tutarlı olduğu bildirilmiştir (Wu *et al.* 2006). Bununla birlikte, Zeng vd. (2005) karbonik anhidraz aktivitesinin kuraklığa dayanıklı çeşitlerin ıslahı için önemli bir kriter olduğunu öne sürmüştür. Araştırmamızda, karbonik anhidraz proteininin (benek 12) ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki C3 türü *C. spinosa*'da azalan yönde düzenlenmiştir. Benzer olarak, karbonik anhidraz proteininin kuraklığa toleranslı yerfıstığı genotipinde arttığı, hassas genotipte ise azaldığı bildirilmiştir (Katam *et al.* 2016). Bu bulgular, fotosentez ile ilişkili RuBisCO ve karbonik anhidraz proteinlerinin, kuraklık stresi koşullarında ciddi şekilde etkilendiğini göstermiştir. Sonuç olarak, kuraklık stresinin C3 türü *C. spinosa*

yapraklarında karbondioksit asimilasyonunu ve RuBisCO aktivasyonunu azaltarak fotosentezi azalttığı ileri sürülebilir.

Calvin döngüsünün önemli enzimleri olan ribuloz-fosfat 3-epimeraz (benek 6), triozfosfat izomeraz (benek 9), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH, benek 28) ve fosfogliserat kinaz (benek 32) proteinlerinin C3 türü *C. spinosa* yapraklarında azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Fosfogliserat kinaz, bitkilerde karbon fiksasyonu reaksiyonlarında ATP bağımlı reaksiyonla 1,3-bifosfogliserat üretiminde önemli bir rol oynamaktadır (Joshi *et al.* 2016). Kuraklık stresine bağlı olarak fosfogliserat kinaz proteininin seviyesindeki azalma buğday bitkilerinde de gösterilmiştir (Sharma *et al.* 2017). Fosfogliserat kinaz proteininin ifade seviyesinin kuraklığa hassas rezene bitkilerinde arttığı buna karşın hassas genotipte azaldığı bildirilmiştir (Khodadadi *et al.* 2017). GAPDH, NADPH ile 1,3-difosfogliseratın gliseraldehit-3-fosfata indirgenmesini kataliz etmektedir. GAPDH protein seviyesinin kuraklığa hassas rezene genotipinde artan yönde düzenlendiği, toleranslı genotipte ise azalan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Khodadadi *et al.* 2017). Zıt olarak, kloroplastik GAPDH proteininin ifade seviyesinin kuraklığa hassas arpa ve buğday genotiplerinde azalan yönde düzenlendiği, toleranslı genotiplerde ise artan yönde düzenlendiği rapor edilmiştir (Chmielewska *et al.* 2016, Michaletti *et al.* 2018). Bitkilerde triozfosfat izomeraz, glikoliz, glukoneogenez ve Calvin döngüsünde gliseraldehit 3-fosfatın dihidroksiaseton fosfata dönüşümünü kataliz etmektedir (López-Castillo *et al.* 2016). Ribuloz-fosfat 3-epimeraz enzimi D-ribuloz 5-fosfatın D-ksiluloz 5-fosfata geri dönüşümlü epimerizasyonunu katalizlemektedir. Bu enzimin ifade seviyesindeki azalmanın, kuraklık stresi altındaki azalmış fotosentetik aktivite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Aranjuelo *et al.*, 2011, Deeba *et al.* 2012). Bu sonuçlar, kuraklık stresi altındaki C3 türü *C. spinosa*'da karboksilasyonun GAPDH, fosfogliserat kinaz, triozfosfat izomeraz ve ribuloz-fosfat 3-epimeraz proteinlerinin inhibisyonu nedeniyle azaldığını ve böylece fotosentez etkinliğini düşürdüğünü ileri sürebilir. Ayrıca RuBisCO ve Calvin döngüsüne ait diğer enzimlerin kuraklık stresi koşullarında inhibisyonu, ATP ve NADPH talebinde bir düşüş anlamına gelebilir.

NADP bağımlı malat dehidrojenaz (NADP-MDH), indirgeyici olarak NADPH kullanarak oksaloasetatın malata geri dönüşebilir şekilde indirgenmesini katalize eden redoksla düzenlenen bir kloroplastik enzimdir (Metzler *et al.* 1989). C4 fotosentezinde atmosferik karbondioksit, PEP karboksilaz aracılığıyla mezofil hücrelerinde fosfoenolpiruvatın (PEP) karboksilasyonu ile fikse edilir ve dört karbonlu bileşik oksaloasetat oluşturulur. Mezofil kloroplastlarında bulunan plastidik NADP-MDH, oksaloasetatı malata dönüştürür ve daha sonra malat malik enzim tarafından dekarboksilasyona uğrayacağı demet kını hücrelerine taşınır (Hatch and Slack 1969). Malatın mezofil hücrelerinden demet kını hücrelerine pompalanması nedeniyle, karbondioksit konsantrasyonu, RuBisCO enziminin bulunduğu ortamda artmaktadır. Bu durum fotorespirasyonun engellenmesi ve karbon asimilasyonunun artması ile sonuçlanmaktadır. Araştırmamızda, kloroplastik malat dehidrojenaz proteininin ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki C4 türü *C. gynandra*'da artan yönde düzenlenmiştir. Bu durum, kuraklık stresi altında *C. gynandra*'nın yüksek fotosentetik aktivitesi ile ilişkili olabilir. Ayrıca mısır plastidik NADP-malat dehidrojenaz (*ZmNADP-MDH*) genini aşırı ifade eden Arabidopsis bitkilerinin tuz stresine karşı daha toleranslı olduğu bildirilmiştir (Kandoi *et al.* 2018).

Oksijen çıkışı arttırıcı protein 1 ve 2 (OEE1 ve OEE2), fotosistem II'deki oksijen üretici kompleksin birer parçasıdır. OEE2 suyun fotolizini kataliz etmekten sorumlu olduğu ve OEE1 proteininin FSII reaksiyon merkezinin bir araya getirilmesi ve kararlılığının sürdürülmesi için gereken bir dengeleyici protein olduğu belirtilmiştir (Yang *et al.* 2003, Yi *et al.* 2005). OEE proteinlerinin ifade seviyelerinde iki tür arasında farklılık belirlenmiştir. C4 türü olan *C. gynandra*'da OEE2 proteinin (benek 48) ifade seviyesi kuraklık stresi koşullarında artış gösterirken, C3 türü olan *C. spinosa*'da OEE1 proteininin (benek 14) ifade seviyesi azalmıştır. Xin vd. (2018), kuraklık stresi altındaki mısır fidelerinde OEE1'in artan yönde düzenlenmesinin fotosentetik aktivitenin devamlılığı için oldukça önemli olduğunu ileri sürmüştür. Bununla birlikte, OEE1 ve OEE2 proteinlerinin ifade seviyelerinin kuraklığa toleranslı arpa ve fasulye genotiplerinde arttığı buna karşın hassas genotiplerde azaldığı bildirilmiştir (Kausar *et*

al. 2013, Zadražnik et al. 2013). Ayrıca *Elymus elongatum* bitkilerinde şiddetli kuraklık stresine cevap olarak ifadesi artan OEE2'nin, protein hasarının onarılması ve oksijen oluşumunun sürdürülmesi için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Gazanchian et al. 2007).

Feredoksin-NADP redüktaz (FNR), bitkilerin ATP ve indirgeyici güç talebini karşılamak için döngüsel ve döngüsel olmayan elektron akışını düzenlemede kilit bir rol oynamaktadır. FNR proteinleri, elektronların ferredoksin veya flavodoksinde NADPH'ye aktarıldığı fotosentetik mekanizmada işlev gördüğü ve ayrıca reaktif oksijen türlerine karşı korumada rol oynadığı bildirilmiştir (Caruso et al. 2008). Oluşan bu NADPH daha sonra karbon fiksasyonu gibi birkaç biyosentetik yolda indirgeyici güç olarak kullanılmaktadır (Hanke and Mulo 2013). Bu enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun fotosentezde hız sınırlayıcı bir basamak olduğu düşünülmektedir (Moolna and Bowsher 2010). Mevcut araştırmada kuraklık stresi altındaki C3 türü *C. spinosa*'da FNR proteinlerinin (benek 17, 20 ve 21) ifade seviyeleri azalan yönde düzenlenmiştir. Kuraklık stresi koşullarında FNR proteinlerinin ifade seviyelerindeki benzer azalmalar ayçiçeği (Castillejo et al. 2008), buğday (Budak et al. 2013) ve şeker kamışı (Khueychai et al. 2015) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir. Ayrıca FNR proteininin seviyesindeki azalma kuraklık stresine hassas fasulye genotipinde belirlenmiştir (Zadražnik et al. 2013). *A. thaliana*'da yapılan bir çalışmada, bu enzimi kodlayan genlerin ekspresyon düzeyinin kuraklık stresi altında arttığı bulunmuştur (Lehtimäki et al. 2010). Kuraklık stresi altında FNR'nin spesifik fonksiyonu hala belirsizdir. Bununla birlikte, FNR'nin bitkilerde fotosistem I'de Mehler reaksiyonu ile üretilen tek değerlikli oksijenin indirgenmesi ile üretilen serbest radikallerin detoksifiye edilmesinde çok önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Xiao et al. 2009). FNR'nin diğer bir rolünün ise çeşitli çevresel stres koşullarında plastidlerdeki NADPH/NADP⁺ dengesinin sürdürülmesi olduğu belirtilmiştir (Xiao et al. 2009). Bu sonuçlar, C3 türü *C. spinosa*'da FNR proteinlerinin azalmasının reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi ve plastidlerdeki NADPH/NADP⁺ dengesinin kuraklık stresinden olumsuz etkilendiğini göstermektedir.

Bitkiler ayrıca enerji metabolizmasıyla ilişkili enzimlerin ifade seviyelerindeki değişimleri tetikleyerek stres koşullarına cevap verirler. Araştırmamızda, glikolitik enzimler olan triozfosfat izomeraz (benek 10) ve fruktoz-bisfosfat aldolaz (benek 22 ve 26) proteinlerinin ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki C3 türü *C. spinosa*'da azalan yönde düzenlenmiştir. Diğer taraftan, diğer bir glikolitik enzim olan enolaz 2 (benek 62) proteininin ifade seviyesi C4 türü *C. gynandra*'da artan yönde düzenlenmiştir. Triozfosfat izomeraz verimli enerji üretimi için gerekli olan şeker metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Fruktoz-bisfosfat aldolaz, fruktoz-1,6-bisfosfatın gliseraldehit 3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfata geri dönüşümlü şekilde bölünmesini katalize etmektedir. Enolaz ise 2-fosfogliseratın fosfoenolpirüvata dönüşümünü katalizlemede rol oynayan önemli bir enzimdir. Kuraklık stresi altında glikolitik enzimlerin azalan yönde düzenlenmesinin, stres sonrası iyileşme döneminde gerekli büyümeyi karşılamak için bir enerji kaynağı olarak şekerlerin biriktirilmesinde bir strateji olabileceği bildirilmiştir (Ahmad *et al.* 2016). Kuraklık altında fruktoz-bisfosfat aldolaz düşük seviyede birikiminin şiddetli kuraklık stresine maruz bırakılan arpa ve kolza bitkilerinde meydana geldiği bildirilmiştir (Vitamvas *et al.* 2015, Urban *et al.* 2017). Fruktoz bisfosfat aldolaz ve triozfosfat izomeraz proteinlerinin, enerji ve karbon iskeletlerini sağlamak için stres koşulunda kuraklığa toleranslı genotiplerde arttığı bildirilmiştir (van Dongen *et al.* 2011, Katam *et al.* 2016). Ayrıca kuraklık koşullarında mısır fidelerinde artan fruktoz-bisfosfat aldolaz proteininin su potansiyelini arttırmak için daha fazla enerji ürettiğini ve uzun süreli kuraklık stresine karşı bitki toleransını artırdığı ileri sürülmüştür (Xin *et al.* 2018). Glikolitik yolda işlev gören enolaz proteininin kuraklığa toleranslı fasulye, buğday ve arpa genotiplerinde artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Zadražnik *et al.* 2013, Cheng *et al.* 2015, Chmielewska *et al.* 2016). Ayrıca kuraklık stresi altındaki çeltik bitkilerinde enolaz seviyesindeki artışın oldukça yüksek olduğu ve bu proteininin bitkilerde kuraklık toleransının belirlenmesi için potansiyel bir marker olduğu belirtilmiştir (Paul *et al.* 2015). Kuraklık stresi koşullarında enolaz proteininin artan yönde düzenlenmesi muhtemelen düşük ATP üretimini telafi etmek için artan glikoliz ihtiyacının bir sonucu olarak bir cevaptan kaynaklanmaktadır.

Kloroplastik glukoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük alt birim nişasta biyosentezi ve sukroz metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Bu proteininin ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki *C. spinosa* türünde azalan yönde düzenlenmiştir. Benzer sonuçlar kuraklık stresi altındaki kolza genotiplerinde de belirlenmiş ve nişasta biyosentez hızının bu proteine bağlı olduğu bildirilmiştir (Urban *et al.* 2017). Ayrıca kuraklık stresinin buğday genotiplerinde bu proteininin seviyesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Budak *et al.* 2013, Sharma *et al.* 2017). UTP-glukoz-1-fosfat uridililtransferaz enzimi glukoz 1-fosfatı, polisakkaritler için ana glikozil donörü olan UDP-glukoza dönüştürmektedir. Bu enzimin sukroz, nişasta ve hücre duvarının sentezi ve kalloz birikimi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Meng *et al.* 2009, Park *et al.* 2010). Bu proteininin ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki *C. spinosa* türünde azalan yönde düzenlenmiştir.

Kuraklık stresi, ATP miktarındaki net azalma ile karbondioksit asimilasyonunu önemli ölçüde azalttığından (Tezara *et al.* 1999), ATP sentezinin artırılmasının abiyotik stres toleransına yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür (Zhang *et al.* 2008). Kloroplastik ATP sentaz proteininin membran boyunca bir proton gradiyenti varlığında ADP'den ATP ürettiği ve kuraklık stresi tepkilerinde anahtar bir unsur olduğu bildirilmiştir (Abreu *et al.* 2013). ATP sentaz, kloroplast ve mitokondride enerji iletiminde ve stresin azaltılmasında merkezi bir rol oynamaktadır. Araştırmamızda, kuraklık stresi C3 türü *C. spinosa*'da kloroplastik ATP sentaz alfa (benek 43) ve beta alt birimlerinin (benek 42) ifade seviyesinde azalmaya neden olurken, C4 türü *C. gynandra*'da sadece alfa alt biriminin (benek 65) ifade seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Diğer taraftan, mitokondriyal ATP sentaz protein MI25'in ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki *C. spinosa* (benek 4) ve *C. gynandra* (benek 47) türünde artan yönde düzenlenmiştir. ATP sentaz protein seviyesindeki kuraklık stresi teşvikli azalma fasulye ve kolza gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir (Zadražnik *et al.* 2013, Urban *et al.* 2017). Diğer taraftan, kloroplastik ATP sentaz proteininin kuraklığa toleranslı yabancı buğday genotiplerinde artan yönde düzenlendiği ve bu bitkilerin stres koşullarında ATP üretme kabiliyetlerinin daha büyük olduğu ileri sürülmüştür (Budak *et al.* 2013). ATP sentaz geninin aşırı ifade

olmasının Arabidopsis'te kuraklığa daha fazla toleransla sonuçlandığı bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2008). Ayrıca toleranslı yer fıstığı genotiplerinde bu proteininin artan yönde düzenlenmesinin, strese bağlı artan enerji talebini karşılamak için ATP üretimini artırarak su eksikliği stresini azaltabileceği ileri sürülmüştür (Kottapalli *et al.* 2009). Kuraklık stresi ATP sentazın ifade seviyesini azaltabilir ve azalmış su seviyelerinin karbondioksit fiksasyonunda ve elektron taşıma reaksiyonlarında rol oynayan enzimlerin aktivitesi üzerine direkt etkileri gibi stomatal olmayan faktörler tarafından C4 fotosentezini inhibe edebilir.

Kuraklık stresi koşullarında ifade seviyeleri değişen diğer önemli protein grubu savunma ile ilişkili proteinlerdir. Tiyoredoksinler (Trx) redoks regülasyon döngüsüne katılarak tiyol redoks dengesini korumakta ve okside edilmiş peroksiredoksinin aktif indirgenmiş forma dönüşümünde rol oynamaktadır (Navrot *et al.* 2011). Bitkilerde, her biri bir multigen ailesinden oluşan üç ana Trx tipi tanımlanmıştır. Trx H, sitozolde bulunurken, Trx M ve F kloroplastlarda lokalize olmuştur (Jacquot *et al.* 1997). Araştırmamızda Trx H proteininin ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki *C. spinosa* türünde azalan yönde düzenlenmiştir. Zıt olarak, Trx H proteininin seviyesinin kuraklık stresi altındaki buğday fidelerinde arttığı rapor edilmiştir (Bazargani *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2014, Sharma *et al.* 2017). Demir (Fe) fotosentez için önemli bir unsurdur ve serbest Fe Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikallerinin ($\bullet\text{OH}$) üretimine katılmaktadır (Ravet *et al.* 2009). Bitki hücrelerinde serbest demirin kontrolü önemlidir çünkü Fenton reaksiyonu ile oluşan Fe^{+3} süperoksit radikali veya askorbat ile Fe^{+2} ye indirgenebilmektedir. Ferritin familyasının stres koşullarında kuvvetli ve düzgün bir şekilde artan yönde düzenlendiği ve demirin alıkonulmasında ve serbest demirin salınmasında rol oynayarak $\bullet\text{OH}$ radikallerinin oluşumunu sınırladığı ileri sürülmüştür (Briat *et al.* 2010). Araştırmamızda ferritin-1 proteininin seviyesi kuraklık stresi altındaki *C. spinosa* türünde artan yönde düzenlenmiştir. Ferritin proteininin ifade seviyesindeki artış kuraklık stresi altındaki soya fasulyesi, nohut ve buğday gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir (Bhushan *et al.* 2007, Alam *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2014, Yamaguchi *et al.* 2010). Ferritin proteininin kuraklık stresi koşullarında seviyesinin

artması, serbest demir seviyelerinin düzenlenmesinin yapraklardaki kuraklık stresine uyumun önemli bir bileşeni olduğunu göstermektedir. Kuraklık stresi koşullarında *C. spinosa* türünde ifade seviyesi azalan diğer bir protein kinon oksidoredüktaz-benzeri proteindir (benek 18). Kinon oksidoredüktaz proteininin yükseltgenme-indirgenme işlemlerinde rol alan ve kloroplastın tilakoid zarında bulunan bir membran proteini olduğu bildirilmiştir (Rahman *et al.* 2016). Mevcut araştırmanın bulgularına zıt olarak, kinon oksidoredüktaz proteininin seviyesindeki artış kuraklık stresi altındaki yerfıstığı, şeker kamışı ve ayçiçeği bitkilerinde belirlenmiştir (Castillejo *et al.* 2008, Katam *et al.* 2016, Rahman *et al.* 2016). Bu enzimin tuz stresinin neden olduğu oksidatif strese karşı korunmadaki önemi gösterilmiştir (Nohzadeh Malakshah *et al.* 2007). Sobhanian vd. (2010), kinon oksidoredüktazın azalan yönde düzenlendiği ancak bu enzimin tuza tolerans ile ilişkili olmadığını bildirmiştir. Monohidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enzimi NADH kullanarak monohidroaskorbatın askorbata dönüşümünü kataliz etmektedir (Lisenbee *et al.* 2005). MDHAR proteininin (benek 34) ifade seviyesi kuraklık stresine maruz bırakılan C3 türü *C. spinosa*'da artan yönde düzenlenmiştir. Diğer taraftan, kloroplastik süperoksit dismutaz (benek 50) ve plastid-lipid-ilişkili protein 6 (benek 51) proteinlerinin ifade seviyeleri C4 türü *C. gynandra*'da kuraklık stresi koşullarında artan yönde düzenlenmiştir. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini hidrojen peroksite dönüştürerek oksidatif stresin hafifletilmesine yardımcı olmaktadır (Zhang *et al.* 2008). C4 türünde, reaktif oksijen türlerinin temizleyicileri vasıtasıyla kuraklık stresi ile daha etkin şekilde başa çıkabileceği ileri sürülebilir.

Kloroplastik 50S ribozomal alt birimi, protein biyosentezinde peptidil transfer reaksiyonunu katalize etmektedir (Kotusov *et al.* 1976). 50S ribozomal protein L12-3'ün ifade seviyesi kuraklık stresi altındaki C3 türü *C. spinosa*'da azalan yönde düzenlenirken, C4 türü *C. gynandra*'da artan yönde düzenlenmiştir. 50S ribozomal L12 proteininin kuraklığa toleranslı yerfıstığı genotipinde artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Katam *et al.* 2016). C4 türü *C. gynandra*'da ribozomal proteininin artan yönde düzenlenmesi, kuraklık stresinin bu türdeki protein biyosentezi üzerindeki inhibe edici etkisine karşı direnç mekanizması ile ilişkili olabilir. Bir ısı şoku proteini olan

şaperoninlerin, termal stres altında protein katlanmasını dengelediği ve genellikle kuraklığa dayanıklı bitki türlerinde bulunduğu bildirilmiştir (Xu ve Huang 2010). Araştırmamızda, 20 kDa şaperonin proteinin (benek 8) ifade seviyesinin kuraklık stresi altındaki C3 türü *C. spinosa*'da azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Benzer olarak, 20 kDa şaperonin proteininin kuraklık stresi altındaki fasulye ve buğday bitkilerinde arttığı belirtilmiştir (Zadražnik *et al.* 2013, Sharma *et al.* 2017). Diğer taraftan, bu proteinin seviyesinin yarıya düştüğü ve mısır bitkilerinde kuraklık stresine cevap olarak arttığı rapor edilmiştir (Benesova *et al.* 2012, Katam *et al.* 2016). Ayrıca 20 kDa şaperonin proteininin artan yönde düzenlenmesinin, tuz stresi altında soya fasulyesi proteinlerinin korunmasında etkili bir rol oynadığı bildirilmiştir (Sobhanian *et al.* 2010).

Metabolik kontrol ve çevresel koşullara adaptasyon, karmaşık sinyal iletim yollarını gerektirmektedir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde hücrel sinyal iletimi, reseptörlere ligand bağlanmasını, ikinci habercilerin oluşmasını ve ilgili kaskadları içermektedir. Araştırmamızda, kuraklık stresi C3 türü *C. spinosa*'da 14-3-3 (benek 23), anneksin D1 (benek 24) ve D6 (benek 19) proteinlerinin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Yüksek oranda korunmuş asidik protein ailesi 14-3-3'ün sinyal iletimi, apoptoz ve hücrel sağ kalım gibi fizyolojik işlemlerde işlev gören 200'den fazla hedef protein ile etkileşime girebildiği bildirilmiştir (Mhawech 2005). Bununla birlikte, 14-3-3 proteinlerinin sinyal iletimi, karbon ve azot metabolizmasının düzenlenmesi ve iyon homeostazında rol oynayan küçük düzenleyici adaptör proteinler olduğu belirtilmiştir (Yan *et al.* 2004). Çok sayıda proteomik çalışmada, kuraklık stresine cevap olarak 14-3-3 proteininin farklı şekilde ifade olduğu gösterilmiştir (Faghani *et al.* 2015, Hao *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016). Ayrıca Arabidopsis 14-3-3 proteinini kodlayan geni aşırı ifade eden pamuk ve mısır 14-3-3 genini aşırı ifade eden çeltik bitkilerinin kuraklığa karşı tolerans geliştirdikleri bildirilmiştir (Yan *et al.* 2004, Campo *et al.* 2012, Ho *et al.* 2013). Diğer taraftan, bu proteininin kuraklığa hassas buğday genotipinde azalan yönde düzenlenmesinin kuraklığa hassasiyet ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Faghani *et al.* 2015). Anneksinler, Ca^{+2} 'ye bağımlı ve bağımlı olmayan şekillerde sinyal iletiminde işlev gören membrana bağlı proteinlerdir (Mortimer *et al.* 2008). Anneksin proteininin

ifade seviyesindeki kuraklık stresi teşvikli artış kuraklığa hassas fasulye genotipinde belirlenmiştir (Zadražnik *et al.* 2013). Bazı anneksinler ile bitkilerin tuz ve kuraklık streslerine karşı toleransları arasında ilişki olduğu belirtilmiştir. Sobhanian vd. (2010) artan yönde düzenlenen anneksin proteininin tuza tolerans ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Benzer olarak, Arabidopsis'te kuraklık stresi ve anneksinler arasında bağlantı olduğu bildirilmiştir (Konopka-Postupolska *et al.* 2009). Araştırmamızda kuraklık stresi C4 türü *C. gynandra*'da ise translasyonel-kontrollü tümör proteininin (TCTP, benek 49) ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. TCTP proteininin bitkiler de dahil olmak üzere insan ve maya gibi birçok canlı türünde bulunduğu ve sitoplazmik bir kalsiyum bağlayıcı protein olduğu bildirilmiştir (Bommer *et al.* 2002). TCTP proteininin seviyesindeki artış kuraklık stresi altındaki bazı bitki türlerinde de belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2004, Rahman *et al.* 2015, Sharma *et al.* 2017). TCTP proteininin stres koşullarında hücrelerdeki Ca⁺² homeostazının korunmasında rol alması mümkündür, çünkü biyotik ve abiyotik stres gibi birçok hücre dışı sinyal hücrel Ca⁺² konsantrasyonunda değişimlere neden olabilmektedir (Luan *et al.* 2002). Bu sonuçlar, TCTP'nin bitkilerde stres yanıtlarının yanı sıra büyüme kontrolünde de rol oynadığını gösterebilir.

Kloroplastik glutamin sentetaz (GS), fotorespirasyon tarafından üretilen amonyağın yeniden özümlemesinden sorumlu bir enzimdir (Taira *et al.* 2014). Araştırmamızda, GS proteininin ifade seviyesi her iki türde de azalan yönde düzenlenmiştir. GS'nin buğdayda kuraklığa toleransın iyi bir metabolik göstergesi olduğu ve özellikle su eksikliği sırasında kuraklığa duyarlı buğday çeşitlerinin plastidik izoform GS2'nin hem seviyesinde hem de aktivitesinde önemli bir düşüş gösterdiği bildirilmiştir (Nagy *et al.* 2013). Proteomik analizler birçok bitki türünde GS proteininin seviyesindeki önemli düşüşleri göstermiştir (Wang *et al.* 2016, Urban *et al.* 2017, Michaletti *et al.* 2018). Diğer taraftan, GS proteininin ifade seviyesindeki artış kuraklık stresi altındaki bazı bitki türlerinde belirlenmiştir (Shi *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2014, Chmielewska *et al.* 2016). Bununla birlikte, GS transgenik bitkilerde azot metabolizmasındaki değişimin kuraklık koşullarında reaktif oksijen türlerine karşı korumada rol oynayan genlerin

ekspresyonunu modüle ettiği ve bu durumun kuraklığa dirençle sonuçlandığı bildirilmiştir (Molina-Rueda *et al.* 2013).

Bitkiler, kuraklık stresi koşullarına hücre metabolizmasında olaylar ağını tetikleyerek yanıt vermektedir. ATP bağımlı bir reaksiyon ile metiyoninden S-adenozilmetiyoninin (SAM) sentezinde işlev gören S-adenozilmetilyonin sentetaz (Roje 2006) proteininin ifade seviyesi her iki türde de azalan yönde düzenlenmiştir. SAM'in üretilmesi, SAM'in nükleik asitlerin, proteinlerin ve lipidlerin transmetilasyonunda evrensel bir donör olması nedeniyle özellikle önemli olduğu bildirilmiştir (Narita *et al.* 2004, Ravel *et al.* 2004). SAM bitkilerin abiyotik ve biyotik streslere karşı toleransını düzenlediği bilinen poliaminlerin biyosentezi için öncü olarak önemli bir rol oynamaktadır (Köllner *et al.* 2010). SAM ayrıca kuraklık stresine cevap olarak artış gösteren lignin biyosentezinde de kullanılmaktadır (Roje 2006). Her iki türde gözlenen düşük SAMS düzeyleri, kuraklık stresi altında düşük poliamin üretimi ve lignifikasyon ile ilişkilendirilebilir.

Sonuç olarak, farklı fotosentez mekanizmalarına sahip *C. spinosa* (C3) ve *C. gynandra* (C4) türlerinin kuraklık stresine verdikleri protein düzeyindeki cevapları incelemek için karşılaştırmalı bir proteomik analizi yapılmıştır. Proteomik analizler ile *C. spinosa* ve *C. gynandra* türlerinde kuraklık stresi koşullarında farklı şekilde ifade olan sırasıyla 43 ve 22 protein tanımlanmıştır. Özellikle C3 türü *C. spinosa*'da, fotosentez ve enerji metabolizması organizasyonu ile ilgili proteinler ağırlıklı olarak kuraklık stresi altında etkilenmiştir. *C. spinosa*'da RuBisCO küçük alt birim proteinlerinin ifade seviyesi artmış olmasına karşın RuBisCO'nun aktif forma dönüşmesini sağlayan RuBisCO aktivaz proteinlerinin seviyesi azalmıştır. Ayrıca ışık reaksiyonları ile ilgili olarak OEE1 ve FNR proteinlerinin ifade seviyesi *C. spinosa*'da azalırken, OEE2 proteinin ifade seviyesi *C. gynandra*'da artmıştır. Glikolitik enzimler olarak triozfosfat izomeraz ve fruktoz-bisfosfat aldolaz enzimlerinin seviyesi *C. spinosa*'da azalırken, enolaz enziminin seviyesi, *C. gynandra*'da artmıştır. Kloroplastik ATP sentaz proteinlerinin her iki türde azalan yönde düzenlendiği buna karşın mitokondriyal ATP sentaz proteininin artan yönde düzenlendiği bulunmuştur. Protein, amino asit ve hücre metabolizması ile ilişkilili

birçok proteininin ifade seviyesi her iki türde de azalan yönde düzenlenirken, sinyal iletimi ve stres savunma ile ilgili proteinler genellikle artan yönde düzenlenmiştir. Bu bulgular farklı fotosentez stratejilerine sahip türlerin kuraklık stresine farklı şekillerde ve farklı seviyelerde cevap verdiğini göstermektedir. Bu araştırma, kuraklık gibi olumsuz çevresel koşullarına karşı bitki adaptasyonunun moleküler mekanizmaları hakkında yeni bilgiler sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abreu, I., Farinha, A., Negrao, S., Goncalves, N., Fonseca, C., Rodrigues, M., Batista, R., Saibo, N. and Oliveira, M. (2013). Coping with abiotic stress: proteome changes for crop improvement. *Journal of Proteomics*, **93**: 145–168.
- Ahmad, P., Abdel Latef, A. A. H., Rasool, S., Akram, N. A., Ashraf, M. and Guzel, S. (2016). Role of proteomics in crop stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1–14.
- Ahsan, N., Lee D.G., Alam, I., Kim, P., Lee, J., Ahn, Y.O., Kwak, S.S., Lee, I.J., Bahk, J.D., Kang, K.Y., Renaut, J., Komatsu, S. and Lee, B.H. (2008). Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, **8**: 3561-3576.
- Alam, I., Sharmin, S. A., Kim, K., Yang, J. K., Choi, M. S. and Lee, B. (2010). Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. *Plant and Soil*, **333**: 491–505.
- Alvarez, S., Choudhury, S.R. and Pandey, S. (2014). Comparative quantitative proteomics analysis of the ABA response of roots of drought-sensitive and drought-tolerant wheat varieties identifies proteomic signatures of drought adaptability. *Journal of Proteome Research*, **13**: 1688–1701.
- Anithakumari, A.M., Nataraja, K.N., Visser, R. G. and van der Linden, C.G. (2012). Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population. *Molecular Breeding*, **30(3)**: 1413–1429.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 371–399.
- Aprile, A., Havlickova, L., Panna, R., Marè, C., Borrelli, G.M., Marone, D., Perrotta, C., Rampino, P., De Bellis, L., Curn, V., Mastrangelo, A.M., Rizza, F. and Cattivelli, L. (2013). Different stress responsive strategies to drought and heat in two durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency. *BMC Genomics*, **14**: 821.
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Avice, J.C. and Nogue, S. (2011). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, **62(1)**: 111–123.
- Ashraf, M., Akram, N. A., Al-Qurainy, F., and Foolad, M. R. (2011). Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators and mineral nutrients. *Advances in Agronomy*, **111**: 249–296.

- Aubry, S., Brown, N.J. and Hibberd, J.M. (2011). The role of proteins in C3 plants prior to their recruitment into the C4 pathway. *Journal of Experimental Botany*, **62(9)**: 3049–3059.
- Babita, M., Maheswari, M., Rao, M., Shanker, A.K. and Rao, D.G. (2010). Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in castor (*Ricinus communis* L.) hybrids. *Environmental and Experimental Botany*, **69**: 243–249.
- Baier, M. and Dietz, K.J. (1997). The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *The Plant Journal*, **12**: 179–190.
- Baldoni, E., Genga, A. and Cominelli, E. (2015). Plant MYB transcription factors: their role in drought response mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**: 15811–15851.
- Barkla, B.J., Vera-Estrella, R. and Raymond, C. (2016). Single-cell-type quantitative proteomic and ionomic analysis of epidermal bladder cells from the halophyte model plant *Mesembryanthemum crystallinum* to identify salt-responsive proteins. *BMC Plant Biology*, **16**: 110.
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A. and Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, **5**: 1554.
- Batlang, U., Baisakh, N., Ambavaram, M.M. and Pereira, A. (2013). Phenotypic and physiological evaluation for drought and salinity stress responses in rice. *Methods in Molecular Biology*, **956**: 209–225.
- Bazargani, M.M., Sarhadi, E., Bushehri, A.S., Matros, A., Mock, H.P. and Naghavi, M. (2011). A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *Journal of Proteomics*, **74**: 1959–1973.
- Benesova, M., Hola, D., Fischer, L., Jedelsky, P.L., Hnilicka, F. and Wilhelmova, N. (2012). The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? *PLoS ONE*, **7**: e38017.
- Bhushan, D., Pandey, A., Choudhary, M.K., Datta, A., Chakraborty, S. and Chakraborty, N. (2007). Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. *Molecular and Cellular Proteomics*, **6**: 1868–1884.

- Bilal, T., Bisma, P. and Reiaz, M. (2014). Signaling in response to cold stress, in: I. Tahir, R.U. Rehman, K.R. Hakeem (Eds.), *Plant Signaling: Understanding the Molecular Crosstalk*, Springer India, pp. 193–226.
- Boggess, M.V., Lippolis, J.D., Hurkman, W.J., Fagerquist, C.K., Briggs, S.P. and Gomes, A.V. (2013). The need for agriculture phenotyping: “moving from genotype to phenotype.” *Journal of Proteomics*, **93**, 20–39.
- Bommer, U.A., Borovjagin, A.V., Greagg, M.A., Jeffrey, I.W., Russell, P., Laing, K.G., Lee, M. and Clemens, M.J. (2002). The mRNA of the translationally controlled tumour protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *RNA*, **8(4)**: 478–496.
- Bota, J., Medrano, H. and Flexas, J. (2004). Is photosynthesis limited by decreased RuBisCO activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist*, **162**: 671–681.
- Boudet, J., Buitink, J., Hoekstra, F. A., Rogniaux, H., Larré, C. and Satour, P. (2006). Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology*, **140**: 1418–1436.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Brautigam, A., Kajala, K., Wullenweber, J., Sommer, M., Gagneul, D., Weber, K.L., Carr, K.M., Gowik, U., Maß, J., Lercher, M.J., Westhoff, P., Hibberd, J.M. and Weber, A.P.M. (2011). An mRNA blueprint for C4 photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C3 and C4 species. *Plant Physiology*, **155(1)**: 142–156.
- Briat, J.F., Ravet, K., Arnaud, N., Duc, C., Boucherez, J., Touraine, B., Cellier, F. and Gaymard, F. (2010). New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of Botany*, **105**: 811–822.
- Brown, N.J., Parsley, K. and Hibberd, J.M. (2005). The future of C4 research – maize, Flaveria or Cleome? *Trends in Plant Science*, **10**: 215–221.
- Budak, H., Akpınar, B.A., Ünver, T. and Türktas, M. (2013). Proteome changes in wild and modern wheat leaves upon drought stress by two-dimensional electrophoresis and nanoLC-ESI–MS/MS. *Plant Molecular Biology*, **83**: 89–103.

- Campo, S., Peris-Peris, C., Montesinos, L., Penas, G., Messeguer, J. and Segundo, B.S. (2012). Expression of the maize *ZmGF14-6* gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 983–999.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, **25**: 1327-1333.
- Carmo-Silva, A.E., Gore, M.A., Andrade-Sanchez, P., French, A.N., Hunsaker, D.J. and Salvucci, M.E. (2012). Decreased CO₂ availability and inactivation of RuBisCO limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. *Environmental and Experimental Botany*, **83**: 1–11.
- Caruso, G., Cavaliere, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P. and Lagana, A. (2008). Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391(1)**: 381–390.
- Castillejo, M.A., Maldonado, A.M., Ogueta, S. and Jorin, J.V. (2008). Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves by 2DE gel electrophoresis and mass spectrometry. *The Open Proteomics Journal*, **1**: 59–71.
- Chamnanmanoontham, N., Pongprayoon, W., Pichayangkura, R., Roytrakul, S. and Chadchawan, S. (2015). Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast. *Plant Growth Regulation*, **75**: 101–114.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P. and Pereira, J.S. (2003). Understanding plant responses to drought- from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, **30**: 239–264.
- Chaves, M.M., Flexas, J. and Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, **103**: 551–560.
- Chen, T.H.H. and Murata, N. (2008). Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science*, **13**: 499–505.
- Chen, F., Zhang, S., Jiang, H., Ma, W., Korpelainen, H. and Li, C. (2011). Comparative proteomics analysis of salt response reveals sex-related photosynthetic inhibition by salinity in *Populus cathayana* cuttings. *Journal of Proteome Research*, **10(9)**: 3944–3958.

- Cheng, Z. Dong, K., Ge, P., Bian, Y., Dong, L., Deng, X., Li, X. and Yan, Y. (2015). Identification of leaf proteins differentially accumulated between wheat cultivars distinct in their levels of drought tolerance. *PLoS ONE*, **10**: e0125302.
- Chintakovid, N., Maipoka, M., Phaonakrop, N., Mickelbart, M.V., Roytrakul, S. and Chadchawan, S. (2017). Proteomic analysis of drought-responsive proteins in rice reveals photosynthesis-related adaptations to drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **39(10)**: 1–13.
- Chmielewska, K., Rodziewicz, P., Swarczewicz, B., Sawikowska, A., Krajewski, P., Marczak, Ł., Ciesiołka, D., Kuczynska, A., Mikołajczak, K., Ogrodowicz, P., Krystkowiak, K., Surma, M., Adamski, T., Bednarek, P. and Stobiecki, M. (2016). Analysis of drought-induced proteomic and metabolomic changes in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves and roots unravels some aspects of biochemical mechanisms involved in drought tolerance. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1–14.
- Clement, M., Leonhardt, N., Droillard, M. J. and Reiter, I. (2011). The cytosolic/nuclear HSC70 and HSP90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **156**: 1481–1492.
- Cronquist, A. (1988). Capparales. Pp. 346-350 in *The Evolution and Classification of Flowering Plants*, 2nd ed. The New York Botanical Garden, New York.
- Cruz, D.C.M. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling and Behavior*, **3**: 156–165.
- Cui, S., Hu, J., Guo, S., Wang, J., Cheng, Y., Dang, X., Wu, L. and He, Y. (2012). Proteome analysis of *Physcomitrella patens* exposed to progressive dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 711–726.
- Deeba, F., Pandey, A.K., Ranjan, S., Mishra, A., Singh, R., Sharma, Y.K., Shirke, P.A. and Pandey, V. (2012). Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **53**: 6–18.
- Edwards, G. and Walker, D. (1983). C3, C4: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. Univ of California Press.
- Faghani, E., Gharechahi, J., Komatsu, S., Mirzaei, M., Khavarinejad, R.A., Najafi, F., Farsad, L.K. and Salekdeh, G.H. (2015). Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance. *Journal of Proteomics*, **114**: 1–15.

- Faize, M., Burgos, L., Faize, L.V., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M.J., Alcobendas, R., Artlip, T. and Hernandez, J.A. (2011). Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*, **62**:2599–2613.
- Faize, E.M., Nicolás, L., Faize, P., Díaz-Vivancos, L., Burgos, J. and Hernández, A. (2015). Cytosolic ascorbate peroxidase and Cu, Zn-superoxide dismutase improve seed germination, plant growth, nutrient uptake and drought tolerance in tobacco. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, **27(3–4)**: 215–226.
- Farooq, M., Basra, S.M.A., Wahid, A., Ahmad, N. and Saleem, B.A. (2009). Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of salicylic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **195**: 237–246.
- Feller, U., Anders, I. and Mae, T. (2008). RuBisCOlytics: fate of RuBisCO after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 1615–1624.
- Feodorova, T.A., Voznesenskaya, E.V., Edwards, G.E. and Roalson, E.H. (2010). Biogeographic patterns of diversification and the origins of C-4 in Cleome (Cleomaceae). *Systematic Botany*, **35**: 811–826.
- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry*, **70**: 603–647.
- Furbank, R.T. (2011). Evolution of the C4 photosynthetic mechanism: are there really three C4 acid decarboxylation types? *Journal of Experimental Botany*, **62**: 3103–3108.
- Gao, S., Zhang, Y.L., Yang, L., Song, J.B. and Yang, Z.M. (2014). AtMYB20 is negatively involved in plant adaptive response to drought stress. *Plant and Soil*, **376**: 433–443.
- Ghatak, A., Chaturvedi, P. and Weckwerth, W. (2017). Cereal crop proteomics: Systemic analysis of crop drought stress responses towards marker-assisted selection breeding. *Frontiers in Plant Science*, **8**: 757.
- González, J.C., Banerjee, R.V., Huang, S., Sumner, J.S. and Matthews, R.G. (1992). Comparison of cobalamin-independent and cobalamin-dependent methionine synthases from *Escherichia coli*: two solutions to the same chemical problem. *Biochemistry*, **31**: 6045–6056.
- Ghosh, D. and Xu, J. (2014). Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. *Frontiers in Plant Science*, **5**: 6.

- Gowda, V.R.P., Henry, A., Yamauchi, A., Shashidhar, H.E. and Serraj, R. (2011). Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crop Research*, **122**: 1–13.
- Gowik, U., Burscheidt, J., Akyildiz, M., Schlue, U., Koczor, M., Streubel, M. and Westhoff, P. (2004). cis-Regulatory elements for mesophyll specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Plant Cell*, **16**: 1077–1090.
- Gowik, U. and Westhoff, P. (2011). The path from C3 to C4 photosynthesis. *Plant Physiology*, **155**(1): 56–63.
- Hall, J.C., Sytsma, J. and Iltis, H.H. (2002). Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. *American Journal of Botany*, **89**: 1826–1842.
- Hall, J.C. (2008). Systematics of Capparaceae and Cleomaceae: an evaluation of the generic delimitations of Capparis and Cleome using plastid DNA sequence data. *Botany*, **86**: 682–696.
- Hanke, G. and Mulo, P. (2013). Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. *Plant Cell and Environment*, **36**: 1071–1084.
- Hao, P., Zhu, J., Gu, A., Lv, D., Ge, P. and Chen, G. (2015). An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery. *Proteomics*, **15**: 1544–1563.
- Hatch, M.D. and Slack, C.R. (1966). Photosynthesis in sugar cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemical Journal*, **101**: 103–111.
- Hatch, M.D. (1987). C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **895**: 81–106.
- Ho, S.L., Huang, L.F., Lu, C.A., He, S.L., Wang, C.C., Yu, S.P., Chen, J. and Lu, S.M. (2013). Sugar starvation- and GA-inducible calcium-dependent protein kinase 1 feed-back regulates GA biosynthesis and activates 14-3-3 protein to confer drought tolerance in rice seedlings. *Plant Molecular Biology*, **81**: 347–361.
- Hossain, Z., Nouri, M.Z. and Komatsu, S. (2012). Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. *Journal of Proteome Research*, **11**: 37–48.
- Hossain, Z., Khatoon, A. and Komatsu, S. (2013). Soybean proteomics for unraveling abiotic stress response mechanism. *Journal of Proteome Research*, **12**: 4670–4684.
- Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, **81**: 802–806.

- Inda, L.A., Torrecilla, P., Catalan, P. and Ruiz-Zapata, T. (2008). Phylogeny of *Cleome* L. and its close relatives *Podandrogyne* Ducke and *Polanisia* Raf. (Cleomoideae, Cleomaceae) based on analysis of nuclear ITS sequences and morphology. *Plant Systematics and Evolution*, **274**: 111–126.
- Ings, J., Mur, L.A.J., Robson, P.R.H. and Bosch, M. (2013). Physiological and growth responses to water deficit in the bioenergy crop *Miscanthus x giganteus*. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 468.
- Jacquot, J.P., Lancelin, J.M. and Meyer, Y. (1997). Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytologist*, **136**: 543–570.
- Ji, K., Wang, Y., Sun, W., Lou, Q., Mei, H. and Shen, S. (2012). Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *Journal of Plant Physiology*, **169**: 336–344.
- Johnová, P., Skalák, J., Saiz-Fernández, I. and Brzobohatý, B. (2016). Plant responses to ambient temperature fluctuations and water-limiting conditions: a proteome-wide perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1864**: 916–931.
- Jordan, D.B. and Ogren, W.L. (1984). The CO₂-O₂ specificity of ribulosebisphosphate-1,5-carboxylase/oxygenase—dependence on ribulosebisphosphate concentration, pH and temperature. *Planta*, **161**: 308–313.
- Joshi, R., Karan, R., Singla-Pareek, S.L. and Pareek, A. (2016). Ectopic expression of Pokkali phosphoglycerate kinase-2 (*OsPGK2-P*) improves yield in tobacco plants under salinity stress. *Plant Cell Reports*, **35**: 27–41.
- Judd, W.S., Sanders, R.W. and Donoghue, M.J. (1994). Angiosperm family pairs: Preliminary phylogenetic analyses. *Harvard Papers in Botany*, **5**: 12–18.
- Judd, W.S., Camphell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. and Lonoghue, M.J. (2002). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Kandoi, D., Mohanty, S. and Tripathy, B.C. (2018). Overexpression of plastidic maize NADP-malate dehydrogenase (*ZmNADP-MDH*) in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to salt stress. *Protoplasma*, **255**: 547–563.
- Kang, G., Li, G., Xu, W. and Peng, X. (2012). Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *Journal of Proteome Research*, **11**: 6066–6679.
- Katam, R., Sakata, K., Suravajhala, P., Pechan, T., Kambiranda, D.M., Naik, K.S. and Basha, S.M. (2016). Comparative leaf proteomics of drought-tolerant and -susceptible peanut in response to water stress. *Journal of Proteomics*, **143**: 209–226.

- Kaur, G. and Asthir, B. (2017). Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*, **61**(2): 201–209.
- Kausar, R., Arshad, M., Shahzad, A. and Komatsu, S. (2013). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids*, **44**: 345–359.
- Khan, M.S., Ahmad, D. and Khan, M.A. (2015). Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced abiotic stress tolerance. *Electronic Journal of Biotechnology*, **18**: 257–266.
- Khodadadi, E., Fakheri, B. A., Aharizad, S., Emamjomeh, A., Norouzi, M. and Komatsu, S. (2017). Leaf proteomics of drought-sensitive and -tolerant genotypes of fennel. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1865**(11): 1433–1444.
- Khueychai, S., Jangpromma, N., Daduang, S., Jaisil, P., Lomthaisong, K., Dhiravisit, A. and Klaynongsruang, S. (2015). Comparative proteomic analysis of leaves, leaf sheaths, and roots of drought-contrasting sugarcane cultivars in response to drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **37**, 88.
- Kim, S.T., Cho, K.S., Jang, Y.S. and Kang, K.Y. (2001). Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*, **22**: 2103–2109.
- Komatsu, S., Makino, T. and Yasue, H. (2013). Proteomic and biochemical analyses of the cotyledon and root of flooding-stressed soybean plants. *PLoS ONE*, **8**: e65301.
- Konopka-Postupolska, D., Clark, G., Goch, G., Debski, J., Floras, K. and Cantero, A. (2009). The role of annexin 1 in drought stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **150**: 1394–410.
- Kosma, D. K., Murmu, J., Razeq, F. M., Santos, P., Bourgault, R. and Molina, I. (2014). AtMYB41 activates ectopic suberin synthesis and assembly in multiple plant species and cell types. *The Plant Journal*, **80**: 216–229.
- Kosova, K., Vitamvas, P., Prasil, I.T. and Renaut, J., (2011). Plant proteome changes under abiotic stress – contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, **74**: 1301–1322.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M.O., Práčil, I.T. and Renaut, J. (2018). Plant abiotic stress proteomics: The major factors determining alterations in cellular proteome. *Frontiers in Plant Science*, **9**: 1–22.
- Kottapalli, K.R., Rakwal, R., Shibato, J., Burow, G., Tissues, D., Burke, J., Puppala, N., Burow, M. and Payton, P. (2009). Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant Cell and Environment*, **32**: 380–407.

- Kotusov, V.V., Kukhanova, M.K., Krayevsky, A.A. and Gottikh, B.P. (1976). Catalysis of the peptide bond formation by 50S subunits of *E. Coli* ribosomes with N-(formyl) methionine ester of adenylic acid as peptide donor. *Molecular Biology Reports*, **3**: 151–156.
- Köllner, T.G., Lenk, C., Zhao, N., Seidl-Adams, I., Gershenzon, J., Chen, F. and Degenhardt, J. (2010). Herbivore-induced SABATH methyltransferases of maize that methylate anthranilic acid using s-adenosyl-L-methionine. *Plant Physiology*, **153**: 1795–1807.
- Kumari, S., Roy, S., Singh, P., Singla-Pareek, S.L. and Pareek, A. (2013). Cyclophilins: proteins in search of function. *Plant Signaling and Behavior*, **8(1)**: e22734.
- Kurek, I., Chang, T.K., Bertain, S.M., Madrigal, A., Liu, L., Lassner, M.W. and Zhu, G. (2007). Enhanced thermostability of Arabidopsis RuBisCO activase improves photosynthesis and growth rates under moderate heat stress. *Plant Cell*, **19**: 3230–3241.
- Langdale, J.A. and Nelson, T. (1991). Spatial regulation of photosynthetic development in C4 plants. *Trends in Genetics*, **7**: 191–196.
- Larkindale, J. and Vierling, E. (2008). Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiology*, **146**: 748–761.
- Lawlor, D.W. (2002). Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, **89**: 871–85.
- Lawlor, D.W. and Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 275–294.
- Lehtimäki, N., Lintala, M., Allahverdiyeva, Y., Aro, E.M. and Mulo, P. (2010). Drought stress-induced upregulation of components involved in ferredoxin-dependent cyclic electron transfer. *Journal of Plant Physiology*, **167**: 1018-1022.
- Li, J.W., Chen, X.D., Hu, X.Y., Ma, L. and Zhang, S.B. (2018). Comparative physiological and proteomic analyses reveal different adaptive strategies by *Cymbidium sinense* and *C. tracyanum* to drought. *Planta*, **247(1)**: 69–97.
- Limami, A.M., Glevarec, G., Ricoult, C., Cliquet, J.B. and Planchet, E. (2008). Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 2325–2335.
- Lisenbee, C.S., Lingard, M.J. and Trelease, R.N. (2005). Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *The Plant Journal*, **43**: 900-914.

- Liu, L., Hu, X., Song, J., Zong, X., Li, D. and Li, D. (2009). Over-expression of a *Zea mays* L. protein phosphatase 2C gene (*ZmPP2C*) in *Arabidopsis thaliana* decreases tolerance to salt and drought. *Journal of Plant Physiology*, **166**: 531–542.
- López-Castillo, L.M., Jiménez-Sandoval, P., Baruch-Torres, N., Trasviña-Arenas, C.H., Díaz-Quezada, C., Lara-González, S., Winkler, R. and Briebe, L.G. (2016). Structural basis for redox regulation of cytoplasmic and chloroplastic triosephosphate isomerases from *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1817.
- Lopes, M.S. and Reynolds, M.P. (2011). Drought adaptive traits and wide adaptation in elite lines derived from resynthesized hexaploid wheat. *Crop Sciences*, **51**: 1617–1626.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S. and Gruissem, W. (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, **14**: 389–400.
- Luo, D., Niu, X., Yu, J., Yan, J., Gou, X., Lu, B.R. and Liu, Y. (2012). Rice choline monooxygenase (OsCMO) protein functions in enhancing glycine betaine biosynthesis in transgenic tobacco but does not accumulate in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Plant Cell Reports*, **31**: 1625–1635.
- Marshall, D.M., Muhaidat, R., Brown, N.J., Liu, Z., Stanley, S., Griffiths, H., Sage, R.F. and Hibberd, J.M. (2007). Cleome, a genus closely related to *Arabidopsis*, contains species spanning a developmental progression from C3 to C4 photosynthesis. *The Plant Journal*, **51**: 886–896.
- Marrs, K.A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 127–158.
- Meng, M., Geisler, M., Johansson, H., Harholt, J., Scheller, H.V., Mellerowicz, E.J. and Kleczkowski, L.A. (2009). UDP-glucose pyrophosphorylase is not rate limiting, but is essential in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **50**: 998-1011.
- Mertins, P., Qiao, J.W., Patel, J., Udeshi, N.D., Clauser, K.R. and Mani, D.R. (2013). Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nature Methods*, **10**: 634–637.
- Metzler, M.C., Rothermel, B.A. and Nelson, T. (1989). Maize NADP malate dehydrogenase: cDNA cloning, sequence and mRNA characterization. *Plant Molecular Biology*, **12**: 713–722.

- Meyer, E., Aspinwall, M.J., Lowry, D.B., Palacio-Mejia, J.D., Logan, T.L., Fay, P.A. and Juenger, T.E. (2014). Integrating transcriptional, metabolomic, and physiological responses to drought stress and recovery in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *BMC Genomics*, **15**: 527.
- Mhaweche, P. (2005). 14-3-3 proteins—an update. *Cell Research*, **15**: 228–236.
- Michaletti, A., Naghavi, M. R., Toorchi, M., Zolla, L. and Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific Reports*, **8(1)**: 1–18.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**: 405–410.
- Mittler, R. and Blumwald, E. (2015). The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell*, **27(1)**: 64-70.
- Mohammadi, P.P., Moieni, A. and Komatsu, S. (2012). Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant rapeseed roots and their hybrid F1 line under drought stress. *Amino Acids*, **43**: 2137–2152.
- Molina-Rueda, J.J., Tsai, C.J. and Kirby, E.G. (2013). The *Populus* superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in transgenic poplar over-expressing a pine cytosolic Glutamine synthetase (*GS1a*). *PLoS ONE*, **8**: e56421.
- Moolna, A. and Bowsher, C.G. (2010). The physiological importance of photosynthetic ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase (FNR) isoforms in wheat. *Journal of Experimental Botany*, **61(10)**: 2669–2681.
- Mortimer, J.C., Laohavisit, A., Macpherson, N., Webb, A., Brownlee, C., Battey, N.H. and Davies, J.M. (2008). Annexins: multifunctional components of growth and adaptation. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 533–544.
- Moschen, S., Di Rienzo, J. A., Higgins, J., Tohge, T., Watanabe, M., González, S. and Heinz, R. A. (2017). Integration of transcriptomic and metabolic data reveals hub transcription factors involved in drought stress response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Molecular Biology*, **94(4–5)**: 549–564.
- Nagy, Z., Nemeth, E., Guoth, A., Bona, L., Wodala, B. and Pecsvaradi, A. (2013). Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase iso-enzymes and RuBisCO. *Plant Physiology and Biochemistry*, **67**: 48–54.
- Narita, Y., Taguchi, H., Nakamura, T., Ueda, A., Shi, W.M. and Takabe, T. (2004). Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. *Plant Science*, **167(5)**: 1009–1016.

- Navrot, N., Finnie, C., Svensson, B. and Häggglund, P. (2011). Plant redox proteomics. *Journal of Proteomics*, **74**: 1450-1462.
- Nayyar, H. and Gupta, N. (2006). Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, **58**: 106–113.
- Negi, N.P., Shrivastava, D.C., Sharma, V. and Sarin, N.B. (2015). Overexpression of *CuZnSOD* from *Arachis hypogaea* alleviates salinity and drought stress in tobacco. *Plant Cell Reports*, **34(7)**: 1109–1126.
- Nelson, D.M., Hu, F.S., Tian, J., Stefanova, I. and Brown, T.A. (2004). Response of C3 and C4 plants to middle-Holocene climatic variation near the prairie-forest ecotone of Minnesota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **13**: 562–567.
- Nohzadeh Malakshah, S., Habibi Rezaei, M., Heidari, M. and Salekdeh, G.H. (2007). Proteomics reveals newsalt responsive proteins associated with rice plasma membrane. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **71**: 2144–2154.
- Obidiegwu, J. E., Bryan, G. J., Jones, H. G. and Prashar, A. (2015). Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. *Frontiers in Plant Science*, **6**: 542.
- Ochuodho, J.O., Modi, A.T. and Beukes, M. (2006). Accumulation of storage proteins of *Cleome gynandra* and *Brassica kaber*. *South African Journal of Plant Soil*, **76**: 238–244.
- Oh, M. and Komatsu, S. (2015). Characterization of proteins in soybean roots under flooding and drought stresses. *Journal of Proteomics*, **114**: 161–181.
- Park, J.I., Ishimizu, T., Suwabe, K., Sudo, K., Masuko, H., Hakozaiki, H., Nou, I.S., Suzuki, G. and Watanabe M. (2010). UDP-glucose pyrophosphorylase is rate limiting in vegetative and reproductive phases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **51**: 981-996.
- Parry, M.A. and Hawkesford, M.J. (2012). An integrated approach to crop genetic improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, **54**: 250–259.
- Parry, M.A.J., Keys, A.J., Madgwick, P.J., Ana, E., Carmo-Silva, P. and Andralojc, J. (2008). RuBisCO regulation: a role for inhibitors. *Journal of Experimental Botany*, **23**: 1–12.
- Patel, M., Corey, A.C., Yin, L.P., Ali, S., Taylor, W.C. and Berry, J.O. (2004). Untranslated regions from C4 Amaranth AhRbcS1 mRNAs confer translational enhancement and preferential bundle sheath cell expression in transgenic C4 *Flaveria bidentis*. *Plant Physiology*, **136**: 3550–3561.

- Paul, S., Gayen, D., Datta, S.K. and Datta, K. (2015). Dissecting root proteome of transgenic rice cultivars unravels metabolic alterations and accumulation of novel stress responsive proteins under drought stress. *Plant Science*, **234**: 133–143.
- Perez-Clemente, R. M., Vives, V., Zandalinas, S. I., Lopez-Climent, M. F., Munoz, V. and Cadenas, A. (2013). Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *BioMed Research International*, **2013**: 654120.
- Peters, G.P., Marland, G., Le Quéré, C., Boden, T., Canadell, J.G. and Raupach, M.R. (2011). Rapid growth in CO₂ emissions after the 2008–2009 global financial crisis. *Nature Climate Change*, **2**: 2–4.
- Pinheiro, C. and Chaves, M.M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, **63**: 869–882.
- Piterkova, J., Luhova, L., Mieslerova, B., Lebeda, A. and Petrivalsky, M. (2013). Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. *Plant Science*, **207**: 57–65.
- Pitzschke, A., Forzani, C. and Hirt, H. (2006). Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants and Redox Signaling*, **8**: 1757–1764.
- Portis, A.R. (2003). RuBisCO activase—RuBisCO's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research*, **751**: 11–27.
- Potopová, V., Boroneant, C., Boincean, B. and Soukup, J. (2016). Impact of agricultural drought on 586 main crop yields in the Republic of Moldova. *International Journal of Climatology*, **36**: 2063–2082.
- Rahman, M.A., Ren, L., Wu, W. and Yan, Y. (2015). Proteomic analysis of PEG-induced drought stress responsive protein in *TERF1* overexpressed sugarcane (*Saccharum officinarum*) leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*, **33**: 716–730.
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G. and Perrotta, C. (2006). Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell and Environment*, **29**: 2143–2152.
- Rasheed, S., Bashir, K., Matsui, A., Iida, K., Tanaka, M. and Seki, M. (2016). Transcriptomic analysis of soil-grown *Arabidopsis thaliana* roots and shoots in response to a drought stress. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1–21.

- Ravanel, S., Block, M.A., Rippert, P., Jabrin, S., Curien, G., Reelle, F. and Douce, R. (2004). Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 22548–22557.
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J.F., Gaymard, F. and Cellier, F. (2009). Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **57**: 400–412.
- Reggiani, R., Nebuloni, M., Mattana, M. and Brambilla, I. (2000). Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. *Amino Acids*, **18**: 207–217.
- Reiskind, J.B., Madsen, T.V., VanGinkel, L.C. and Bowes, G. (1997). Evidence that inducible C4-type photosynthesis is a chloroplastic CO₂ concentrating mechanism in *Hydrilla*, a submersed monocot. *Plant Cell and Environment*, **20**: 211–220.
- Rocha, M., Sodek, L., Licausi, F., Hameed, M.W., Dornelas, M.C. and van Dongen, J.T. (2010). Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. *Amino Acids*, **39**: 1043–1053.
- Rodman, J.E., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Sytsma, K.J. and Karol, K.G. (1998). Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies. *American Journal of Botany*, **85**: 997–1006.
- Roje, S. (2006). S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry*, **67**: 1686–1698.
- Rowlett, R.S. (2010). Structure and catalytic mechanism of the beta-carbonic anhydrases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1804**: 362–373.
- Roy, A., Rushton, P. J. and Rohila, J.S. (2011). The potential of proteomics technologies for crop improvement under drought conditions. *Critical Reviews in Plant Science*, **30**: 471–490.
- Sage, R.F., Way, D.A. and Kubien, D.S. (2008). RuBisCO, RuBisCO activase, and global climate change. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 1581–1595.
- Sanchez-Acebo, L. (2005). A phylogenetic study of the new world Cleome (Brassicaceae, Cleomoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **92**: 179–201.
- Shanker, A.K., Maheswari, M., Yadav, S.K. and Desai, S. (2014). Drought stress responses in crops. *Functional and Integrative Genomics*, **14**: 11–22.

- Sharma, M., Gupta, S. K., Majumder, B., Maurya, V. K., Deeba, F., Alam, A., and Pandey, V. (2017). Salicylic acid mediated growth, physiological and proteomic responses in two wheat varieties under drought stress. *Journal of Proteomics*, **163**: 28–51.
- Shi, H., Ye, T. and Chan, Z. (2014). Comparative proteomic responses of two bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.) varieties contrasting in drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, **82**: 218–228.
- Sinha, P., Poland, J., Schnölzer, M. and Rabilloud, T. (2001). A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **1**: 835-840.
- Sobhanian, H., Razavizadeh, R., Nanjo, Y., Ehsanpour, A.A., RastgarJazii, F. and Motamed, N. (2010). Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Science*, **8**: 1–15.
- Song, H., Zhao, R., Fan, P., Wang, X., Chen, X. and Li, Y. (2009). Overexpression of AtHsp90.2, AtHsp90.5 and AtHsp90.7 in *Arabidopsis thaliana* enhances plant sensitivity to salt and drought stresses. *Planta* 229: 955–964.
- Spreitzer, R.J. and Salvucci, M.E. (2002). RuBisCO: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Reviews in Plant Biology*, **53**: 449–475.
- Stuart, M.E., Gooddy, D.C., Bloomfield, J.P. and Williams, A.T. (2011). A review of the impact of climate change on future nitrate concentrations in groundwater of the UK. *Science of Total Environment*, **409**: 2859–2873.
- Sun, G., Xie, F. and Zhang, B. (2011). Transcriptome-wide identification and stress properties of the 14-3-3 gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Functional and Integrative Genomics*, **11**: 627–636.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E. and Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations, *New Phytologist*, **203**: 32–43.
- Taira, M., Valtersson, U., Burkhardt, B. and Ludwig R.A. (2004). *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell*, **16**: 2048-2058.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M. and Kobayashi, M. (2002). Important roles of drought-and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **29**: 417–426.
- Takahashi, Y., Kinoshita, T. and Shimazaki, K. (2007). Protein phosphorylation and binding of a 14-3-3 protein in *Vicia* guard cells in response to ABA. *Plant and Cell Physiology*, **48**: 1182–1191.

- Takhtajan, A. I. (1997). *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Columbia Univ. Press, New York.
- Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.D. and Lawlor, D.W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, **401**: 914-917.
- Tripathi, B.N., Bhatt, I. and Dietz, K.J. (2009). Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma*, **235**: 3–15.
- Urban, M.O., Vašek, J., Klíma, M., Krtková, J., Kosová, K., Prášil, I.T. and Vítámvás, P. (2017). Proteomic and physiological approach reveals drought-induced changes in rapeseeds: Water-saver and water-spender strategy. *Journal of Proteomics*, **152**: 188–205.
- Uzilday, B., Turkan, I., Sekmen, A.H., Ozgur, R. and Karakaya, H.C. (2012). Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. *Plant Science*, **182(1)**: 59–70.
- Uzilday, B., Turkan, I., Ozgur, R. and Sekmen, A. H. (2014). Strategies of ROS regulation and antioxidant defense during transition from C3 to C4 photosynthesis in the genus *Flaveria* under PEG-induced osmotic stress. *Journal of Plant Physiology*, **171(1)**: 65–75.
- van Dongen, J.T., Gupta, K.J., Ramirez-Aguilar, S.J., Araujo, W.L., Nunes-Nesi, A. and Fernie, A.R. (2011). Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. *Journal of Plant Physiology*, **168**: 1434–1443.
- Venkateswarlu, B., Shanker, A.K. (2012). Dryland agriculture: bringing resilience to crop production under changing climate. In: Venkateswarlu, B., Shanker, A.K., Shanker, C. and Maheswari, M. (eds). *Crop stress and its management: perspectives and strategies*. Springer, the Netherlands, pp 19–44.
- Vítámvás, P., Prášil, I. T., Kosová, K., Planchon, S. and Renaut, J. (2012). Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *Proteomics*, **12**: 68–85.
- Vitamvas, P., Urban, M.O., Skodacek, Z., Kosova, K., Pitelkova, I., Vitamvas, J., Renaut, J. and Prasil, I.T. (2015). Quantitative analysis of proteome extracted from barley crowns grown under different drought conditions. *Frontiers in Plant Science*, **6**: 479.

- Voznesenskaya, E.V., Koteyeva, N.K., Chuong, S.D.X., Ivanova, A.N., Barroca, J., Craven, L.A. and Edwards, G.E. (2007). Physiological, anatomical and biochemical characterisation of photosynthetic types in genus *Cleome* (Cleomaceae). *Functional Plant Biology*, **34**(4): 247–267.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, **9**: 244–252.
- Wang, X., Cai, X., Xu, C., Wang, Q. and Dai, S. (2016). Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**: 1706.
- Wang, Y., Fan, K., Wang, J., Ding, Z. tang, Wang, H., Bi, C. and Sun, H. (2017). Proteomic analysis of *Camellia sinensis* (L.) reveals a synergistic network in the response to drought stress and recovery. *Journal of Plant Physiology*, **219**: 91–99.
- Wang, X. and Komatsu, S. (2018). Proteomic approaches to uncover the flooding and drought stress response mechanisms in soybean. *Journal of Proteomics*, **172**: 201–215.
- Ward, J.K., Tissue, D.T., Thomas, R.B. and Strain, B.R. (1999). Comparative responses of model C3 and C4 plants to drought in low and elevated CO₂. *Global Change Biology*, **5**: 857–867.
- Weckwerth, W. (2011). Green systems biology - From single genomes, proteomes and metabolomes to ecosystems research and biotechnology. *Journal of Proteomics*, **75**: 284–305.
- Wei, W., Huang, J., Hao, Y.-J., Zou, H.-F., Wang, H.-W. and Zhao, J.-Y. (2009). Soybean GmPHD-type transcription regulators improve stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *PLoS ONE*, **4**: e7209.
- Witzel, K., Weidner, A., Surabhi, G., Borner, A. and Mock, H. (2009). Salt stress- induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 3545–3557.
- Wu, Y.Y., Zhang, H.P., Wu, D.Y., Liu, J. and Li, G.X. (2006). Relations between carbonic anhydrase activities and photosynthetic rates in the leaves and pods of plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, **26**(10): 2094–2098.
- Xiao, X., Yanga, F., Zhanga, S., Korpelainen, H. and Li, C. (2009). Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiologia Plantarum*, **136**: 150–168.

- Xin, L., Zheng, H., Yang, Z., Guo, J., Liu, T., Sun, L. and Guo, L. (2018). Physiological and proteomic analysis of maize seedling response to water deficiency stress. *Journal of Plant Physiology*, **228**: 29–38.
- Xu, C. and Huang, B. (2010). Comparative analysis of drought responsive proteins in kentucky bluegrass cultivars contrasting in drought tolerance. *Crop Science*, **50**: 2543–3252.
- Xu, Y.-H., Liu, R., Yan, L., Liu, Z.-Q., Jiang, S.-C., Shen, Y.-Y., Wang, X.-F. and Zhang, D.-P. (2012). Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 1095–1106.
- Xu, J., Xing, X.J., Tian, Y.S., Peng, R.H., Xue, Y., Zhao, W. and Yao, Q.H. (2015). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress. *PLoS ONE*, **10(9)**: e0136960.
- Yamaguchi, M., Valliyodan, B., Zhang, J., Lenoble, M.E., Yu, O., Rogers, E.E., Nguyen, H.T. and Sharp, R.E. (2010). Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant Cell and Environment*, **33**: 223–224.
- Yan, J., He, C., Wang, J., Mao, Z., Holaday, S.A. and Allen, R.D. (2004). Overexpression of the *Arabidopsis* 14-3-3 protein GF14 lambda in cotton leads to a “stay-green” phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions. *Plant and Cell Physiology*, **45**: 1007–1014.
- Yan, S.P., Zhang, Q.Y., Tang, Z.C., Su, W.A. and Sun, W.N. (2006). Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular and Cellular Proteomics*, **5**: 484–496.
- Yang, E.J., Oh, Y.A., Lee, E.S., Park, A.R., Cho, S.K. and Yoo, Y.J. (2003). Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305**: 862–868.
- Yi, X., McChargue, M., Laborde, S., Frankel, L.K. and Bricker, T.M. (2005). The manganese-stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 16170–16174.

- Yoo, C.Y., Pence, H.E., Hasegawa, P.M. and Mickelbart, M.V. (2009). Regulation of transpiration to improve crop water use. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **28**: 410–431.
- Zdražnika, T., Hollung, K., Egge-Jacobsen, W., Meglič, V. and Šuštar-Vozlič, J. (2013). Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Proteomics*, **78**: 254–272.
- Zeng, X.D., Yu, L.J., Li, W., Yang, Y. and Wu, Y. (2005). Stability of carbonic anhydrase in leaves of *Vitex negundo* in Karst areas of southwest China. *China Bulletin of Botany*, **22(2)**: 169–174.
- Zhang, J., Tan, W., Yang, X.-H. and Zhang, H.-X. (2008). Plastid-expressed choline monooxygenase gene improves salt and drought tolerance through accumulation of glycine betaine in tobacco. *Plant Cell Reports*, **27**: 1113.
- Zhang, X., Liu, S. and Takano, T. (2008). Overexpression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (*AtMtATP6*) confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology Letters*, **30**: 1289–11294.
- Zhang, S., Li, C. and Cao, J. (2009). Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by TLD1/OsGH3.13 activation. *Plant Physiology*, **151(4)**: 1889–1901.
- Zhang, H., Zhang, L., Lv, H. and Yu, Z. (2014). Identification of changes in *Triticum aestivum* L. leaf proteome in response to drought stress by 2D-PAGE and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Acta Physiologiae Plantarum*, **36**: 1385–1398.
- Zhang, H., Ni, Z., Chen, Q., Guo, Z., Gao, W., Su, X. and Qu, Y. (2016). Proteomic responses of drought-tolerant and drought-sensitive cotton varieties to drought stress. *Molecular Genetics and Genomics*, **291(3)**: 1293–1303.
- Zhou, J., Wang, X., Jiao, Y., Qin, Y., Liu, X. and He, K. (2007). Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Molecular Biology*, **63**: 591–608.
- Zhou, Y., Cai, H., Xiao, J., Li, X., Zhang, Q. and Lian, X. (2009). Over-expression of aspartate aminotransferase genes in rice resulted in altered nitrogen metabolism and increased amino acid content in seeds. *Theoretical and Applied Genetics*, **118**: 1381–1390.
- Zong, Y. and Shangguan, Z. (2014). Nitrogen deficiency limited the improvement of photosynthesis in maize by elevated CO₂ under drought. *Journal of Integrative Agriculture*, **13**: 73–81.

İnternet Kaynakları:

- 1) https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=22613#null, 28.02.2019

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fadimana KAYA
Doğum Yeri ve Tarihi : 28.02.1990, Konya
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 05456381893 / fadimana.kaya@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Meram Konya Lisesi (YDA), (2004-2008)
Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, (2009-2013)
Yüksek Lisans : Necmettin Erbakan Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, (2014-2016)
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, (2016-2019)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Araştırma Görevlisi, 2016 - halen

Yayınları (SCI ve diğer) :

- 1) Yıldız, M., Terzi, H., Sakartepe, E., Pehlivan, E. ve Kaya, F. (2016). Mısır fidelerinde kadmiyum stresinin oksidatif etkilerinin araştırılması. 2. *Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu*, s.101, Mersin.
- 2) Terzi H., Sakartepe E., Yıldız M. ve Kaya F. (2017). *Lycium barbarum* L. (Goji berry)'un geleneksel ve modern tıpta potansiyel kullanımı ve biyolojik aktiviteleri. 3. *Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi*, s.174, İstanbul.
- 3) Yıldız, M., Terzi, H. ve Kaya, F. (2018). Krom stresine maruz kalan mısır (*Zea mays* L.) fidelerinde sisteinin koruyucu rolleri. III. *Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu*, s.29, Çanakkale.