T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKLAGİLLERDE F-BOX/WD40 GENLERİNİN ANLATIM ANALİZLERİ

Haluk ÇELİK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Ocak, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 20.01.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Özgür ÇAKIR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Cenk KIĞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2020-36473 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Tezden üretilmiş herhangi bir yayın yoktur.

ÖNSÖZ

Lisans dönemimde laboratuvarında geçirdiğim süreçte ve yüksek lisans öğrenim sürecimde aktardığı bilgi ve tecrübeleri ile beni yetiştiren, çalışmalarım boyunca fikirleri ile yol gösteren, sunduğu fırsatlar ile beni ileriye taşıyan danışman hocam Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Sayın Dr. Ögr. Üyesi Andres ARAVENA'ya tez çalışmalarımda gösterdiği yardım ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince birçok konuda desteğini aldığım Araş. Gör. Burcu ARIKAN, Bekir Ahmet İLGAR, Rabia Merve CEYLAN ve deneyimleri ile yanımda olan tüm çalışma arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Varlığı ile hayatımın bir parçası olan, desteğini her zaman hissettiğim, hayat arkadaşım Asuman BAHÇE ÇELİK'e sonsuz teşekkür ederim.

Bugün olduğum kişi olmamda en büyük emeğe sahip olan ve beni her daim destekleyerek ileriye taşıyan annem Aynur ÇELİK'e ve desteklerini esirgemeyen kardeşlerim Zekiye ÇELİK, Göksel ÇELİK ve Rabia ÇELİK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ocak 2021 Haluk ÇELİK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xiii**
SUMMARY ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **6**
2.1. BAKLAGİLLER 6
2.2. BİTKİLERDE STRES 9
2.2.1. Abiyotik Stres 14
2.2.1.1. Sıcaklık Stresi 15
2.2.1.2. Tuzluluk Stresi 18
2.3. UBİKİTİN PROTEAZOM SİSTEMİ VE F-BOX GEN AİLESİ 21
2.3.1. WD40 Tekrarları 26
2.4.GEN ANLATIM ANALİZLERİ VE GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU 28
2.5. BİYOİNFORMATİK 30
3. MALZEME VE YÖNTEM **32**
3.1.C-TERMİNALİNDE W40 DOMAİNİ İÇEREN F-BOX DİZİLERİNİN TARANMASI VE BİYOİNFORMATİK ANALİZİ 32
3.1.1. F-BOX/WD40 Tekrarlarının Dizi Analizleri 32
3.2. PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ 32
3.3. BİTKİ MATERYALLERİ 33
3.4. BESİYERİ HAZIRLANMASI 33
3.5. TOHUMLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU 33
3.6. BİTKİLERE STRES UYGULAMALARI 34
3.7. TOPLAM RNA İZOLASYONU 35

3.8. İZOLE EDİLEN RNA MOLEKÜLLERİNİN KALİTATİF VE KANTİTATİF ANALİZİ 35
3.9. cDNA SENTEZİ 36
3.10. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU 37
3.11. İSTATİKSEL ANALİZLER 39
4. BULGULAR 40
4.1. F-BOX/WD40 GENLERİNE İLİŞKİN BİYOİNFORMATİK ANALİZLER 40
4.2. PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİM ANALİZLERİ 46
4.3. TOHUMLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ VE STRES UYGULAMALARI 50
4.4. F-BOX/WD40 GENLERİNİN ANLATIM ANALİZLERİ 51
4.5. RNA İZOLASYONU VE cDNA SENTEZİ 51
4.6. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZLERİ 53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 68
KAYNAKLAR 80
ÖZGEÇMİŞ 98

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Bitkilerde stres yanıtının aşamaları. 11

Şekil 2.2: Bitki termosensörleri ve ana sinyal iletim yollarının, sıcaklık stresi tepkisi ve sıcaklık toleransı şeması (Bokszczanin ve Fragkostefanakis, 2013). 17

Şekil 4.1: *A. thaliana, M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinum* bitkilerine ait olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN protein dizilerinin ve AtFBP7 protein dizisinin komşu birleştirme yöntemine (Neighbor-joining method) dayalı filogenetik ağacı (proteinin korunmuş bölgelerine göre oluşturuldu) ve motif analizi.....41

Şekil 4.2: ClustalW kullanılarak oluşturulan *A. thaliana, M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinum* olası Met30 proteinlerinin ve AtFBP7 proteinin çoklu dizi hizalaması.....42

Şekil 4.3: ClustalW kullanılarak oluşturulan *A. thaliana, M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinu*m olası WD40/YVTN proteinlerinin ve AtFBP7 proteininin çoklu dizi hizalaması. 43

Şekil 4.4: HsFBXW7, AtMet30 ve olası baklagil Met30 proteinlerinin 3 boyutlu yapıları. 45

Şekil 4.5: HsFBXW7, AtWD40/YVTN ve olası baklagil WD40/YVTN proteinlerinin 3 boyutlu yapıları.....46

Şekil 4.6: STRING analizi sonucu MtMet30 protein-protein etkileşim ağ sistemi (STRING veritabanı-http://string-db.org). 47

Şekil 4.7: STRING analizi sonucu PvMet30 protein-protein etkileşim ağ sistemi (STRING veritabanı-http://string-db.org). 48

Şekil 4.8: STRING analizi sonucu CaMet30 protein-protein etkileşim ağ sistemi (STRING veritabanı-http://string-db.org). 49

Şekil 4.9: *In vitro* kültürlenen *M. truncatula, P. vulgaris, C. arietinum* kültürleri. Çimlenen; a) 3 günlük *M. truncatula;* b) 5 günlük *P. vulgaris;* c) 7 günlük *C. arietinum* tohumları. Gelişen; d) 30 günlük *M. truncatula;* e) 15 günlük *P. vulgaris;* f) 15 günlük *C. arietinum* bitkicikleri.....50

Şekil 4.10: (A) *M. truncatula,* (B) *P. vulgaris* ve (C) *C. arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. Kısaltmalar: KK:Kontrol Kök; KG:Kontrol Gövde; KY:Kontrol Yaprak; 1K:1 saat sıcaklık uygulama kök; 1G: 1 saat sıcaklık uygulama gövde; 1Y: 1 saat sıcaklık uygulama yaprak; 2K:2 saat sıcaklık uygulama kök; 2G:1 saat sıcaklık uygulama gövde; 2Y:2 saat sıcaklık uygulama yaprak; 6K: 6 saat tuzluluk uygulama kök; 6G: 6 saat tuzluluk uygulama gövde; 6Y: 6 saat tuzluluk uygulama yaprak; 24K: 24 saat

tuzluluk uygulama kök; 24K: 24 saat tuzluluk uygulama gövde; 24K: 24 saat tuzluluk uygulama yaprak; 48K: 48 saat tuzluluk uygulama kök; 48K: 48 saat tuzluluk uygulama gövde; 48K: 48 saat tuzluluk uygulama yaprak. 52

Şekil 4.11: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası MtMet30 transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$). 53

Şekil 4.12: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası MtWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$). 54

Şekil 4.13: GZ PZR analizleri sonucunda *Phaseolus vulgaris* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası PvMet30 transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$). 55

Şekil 4.14: GZ PZR analizleri sonucunda *Phaseolus vulgaris* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası PvWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$). 56

Şekil 4.15: GZ PZR analizleri sonucunda *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası CaMet30 transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$). 57

Şekil 4.16: GZ PZR analizleri sonucunda *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası CaWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$). 58

Şekil 4.17: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası MtMet30 transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$), "***" ($p \leq 0.001$). 59

Şekil 4.18: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası MtWD40/YVTN transkript düzeyi. "*" ($p \leq 0.05$), "**" ($p \leq 0.01$). 60

Şekil 4.19: GZ PZR analizleri sonucunda *Phaseolus vulgaris* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası PvMet30 transkript düzeyi. "*" ($p \leq 0.05$), "**" ($p \leq 0.01$). 61

Şekil 4.20: GZ PZR analizleri sonucunda *Phaseolus vulgar*is kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası PvWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$), "***" ($p \leq 0.001$). 62

Şekil 4.21: GZ PZR analizleri sonucunda *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası CaMet30 transkript düzeyi. "*" ($p \leq 0.05$), "**" ($p \leq 0.01$), "***" ($p \leq 0.001$). 63

Şekil 4.22: GZ PZR analizleri sonucunda *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası CaWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$). 64

Şekil 4.23: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula, Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN gen anlatım düzeylerinin ısı haritası üzerinde gösterimi.....66

Şekil 4.24: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula, Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN gen anlatım düzeylerinin ısı haritası üzerinde gösterimi.....67

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bitkilerde abiyotik ve biyotik stres koşulları (Mahajan ve Tuteja, 2005).....9

Tablo 3.1: MS besiyeri (1L) bileşenleri.....33

Tablo 3.2: Bitkilere stres uygulamaları. 34

Tablo 3.3: 1L 50X TAE hazırlamak için gerekli bileşenler ve konsantrasyonları. 36

Tablo 3.4: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.....37

Tablo 3.5: cDNA sentez reaksiyon bileşenleri. 37

Tablo 3.6: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer dizileri. 38

Tablo 3.7: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri. 39

Tablo 3.8: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları. 39

Tablo 4.1: *M. truncatula*, *P. vulgaris* ve *C. arietinum* genomlarında sadece F-box ve WD40 motiflerini içeren, tanımlanan XP_003617076.1, XP_003599502.1, XP_007141583.1, XP_007149035.1, XP_004491170.1 ve XP_004514570.1 proteinleri. 40

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°C	**:** Santigrat Derece
mm	**:** Milimetre
g	**:** Gram
L	**:** Litre
M	**:** Molar
mM	**:** Milimolar
mg	**:** Miligram
NaCl	**:** Sodyum Klorür
mL	**:** Mililitre
V	**:** Volt
µL	**:** Mikrolitre
>	: Büyüktür

Kısaltmalar	Açıklama
dNTP	**:** Deoksinükleotid
cDNA	**:** Komplementer DNA
EtBr	**:** Etidyum Bromür
EtOH	**:** Etil Alkol
NaCl	**:** Sodyum klorür
g	**:** Rölatif Santrifüj Kuvveti, “RCF”
MS	**:** Murashige ve Skoog
GZ PZR	**:** Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	**:** Ribonükleik Asit
rpm	**:** Dakikadaki Devir Sayısı, ‘Rotation per minute’
TAE	**:** Tris-asetat EDTA
TE	**:** Tris-EDTA
Sa	**:** Salisilik asit
Ja	**:** Jasmonik asit

ET : Etilen
ABA : Absisik asit
MYC : Myelocytomatosis
MYB : Myeloblastosis
ZF : Çinko parmak
HSF : Isı şoku faktörü
β-ABA : β–aminobütirik asit
BTH : Benzatiyadiazol
CDPK : Kalsiyum-bağımlı protein kinaz
PLD : Fosfolipaz D
SOD : Süperoksit dismutaz
APX : Askorbat peroksidaz
GPX : Glutatyon peroksidaz
CAT : Katalaz
UPR : Katlanmamış protein tepkisi
ER UPR : Endoplazmik retikulum katlanmamış protein tepkisi
PIPK : Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfat kinaz
PA : Fosfatidik asit
PUT : Putresin
SPD : Spermidin
SPM : Spermin
PIP2 : Fosfatidilinositol fosfat kinaz
IP3 : D-myo-inositol-1, 4, 5-trifosfat
HSR : Isı şoku tepkisi
HSF : Isı şoku faktörleri
HSP : Isı şoku proteinleri
ROS : Reaktif oksijen türler**i**
SCF : Skp, Cullin, F-box içeren kompleks
SKP1 : S-fazı kinaz ile ilişkili protein 1
Cdc34 : Hücre Bölünme Döngüsü 34
Rbx1/Hrt1 : Halka kutusu 1/kalp proteini 1
Sgt1 : SKP1'in G-iki alelinin baskılayıcısı
M.Ö. : Milattan Önce

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKLAGİLLERDE F-BOX/WD40 GENLERİNİN ANLATIM ANALİZLERİ

Haluk ÇELİK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Doğada, bitkiler gelişimlerini ve verimliliklerini büyük ölçüde etkileyen çeşitli abiyotik stres faktörlerine maruz kalır. Küresel iklim değişikliğinin sonuçlarından tuzluluk gün geçtikçe tarım arazilerini kullanılamaz hale getiren, sıcaklık ise bitki gelişimini tehdit eden abiyotik stres faktörleridir. Yaşanabilecek muhtemel açlık tehditlerine karşı, bitkilerin yanlış tarım tekniklerine veya küresel ısınma nedeniyle değişen çevre koşullarına verdikleri cevapların moleküler mekanizmalarının anlaşılması ile strese dayanıklı bitkiler geliştirilmeli ve tarımın sürdürülebilirliği sağlanmalıdır. İnsan beslenmesinin önemli bir parçası olan baklagillerin üretimi çeşitli stres faktörleri nedeni ile tehdit altındadır. Bu sebeple fasulye, nohut ve yonca gibi bitkilerin stres faktörlerine karşı gösterdikleri fizyolojik ve moleküler cevaplar birçok araştırma ile incelenmiştir. Bu tez çalışmasında ise F-box ve WD40 motiflerini birlikte içeren, SCF kompleksinin alt birimi olan protein genlerinin sıcaklık ve tuzluluk streslerine verdikleri moleküler cevaplar ilk kez incelenmiştir. Genom dizilimleri tamamlanmış baklagillerden fasulye, nohut ve yoncada sadece 6 adet F-box/WD40 proteini tanımlanmıştır. Baklagil F-box/WD40 proteinlerinin biyoinformatik analizleri sonucunda, proteinlerin 3 boyutlu yapıları ve protein–protein etkileşimleri incelenmiş olup, türler arasında 3 boyutlu yapının yüksek oranda korunduğu, protein-protein etkileşiminin beklendiği gibi çoğunlukla ubikitin proteazom sisteminde bulunan proteinler ile sağlandığı belirlendi. Fasulye, nohut ve yonca tohumları *in vitro* çimlendirildikten sonra fasulye ve nohut bitkilerine 15. gün, yonca bitkisine ise 30. gün 38^{o}C sıcaklık ve 180 mM tuzluluk stresi uygulanmıştır. Stres uygulaması sonunda kök, gövde ve yaprak dokularından total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak GZ PZR ile gen

anlatım analizleri yapılmıştır. Özetle, biyoinformatik analizler sonucu bulunan F-box/WD40 motifleri içeren olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin gen anlatım analizleri, sıcaklık ve tuzluluk streslerine verilen yanıtta doğrudan rolleri olduğunu düşündürmektedir. Dizi benzerlikleri ve anlatım analizi profillerine bakarak olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin abiyotik stres koşullarındaki rolünün Cdc34/SCF kompleksi ile ilgili olduğu sonucuna varılmıştır.

Ocak 2021, 114 sayfa.

Anahtar kelimeler: F-box proteinleri, WD40 tekrarları, NaCl, sıcaklık, ubikitinasyon.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EXPRESSION ANALYSIS OF F-BOX/WD40 GENES IN LEGUMES

Haluk ÇELİK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

In nature, plants are subjected to variety of abiotic stress factors that greatly affect their development and productivity. As a result of global climate change, salinity is an abiotic stress factor that makes agricultural land unusable day by day and temperature threatens plant growth. The production of legumes, which are an important part of human nutrition, is threatened by various stress factors. For this reason, the physiological and molecular responses of plants such as beans, chickpeas, and barrel medic to stress factors have been analyzed in many studies. In this thesis, the molecular responses of protein genes, which are the subunits of the SCF complex, and contain F-box motif and WD40 repeats together, to temperature and salinity stress were examined for the first time. Only 6 F-box/WD40 proteins were identified in common beans, chickpeas, and barrel medic from legumes whose genome sequences were completed. As a result of the bioinformatics analysis of the legume F-box/WD40 proteins, the 3-

dimensional structures and protein-protein interactions of the proteins were examined, and it was determined that the 3-dimensional structure was highly preserved among the species, and the protein-protein interaction was mostly provided by the proteins in the ubiquitin proteasome system, as expected. After the common bean, chickpea, and barrel medic seeds were germinated *in vitro*, bean and chickpea plants were applied on the 15th day and barrel medic plant on the 30th day with 38^{o}C temperature and 180 mM salinity stress. At the end of the stress application, total RNA isolation and cDNA synthesis were performed sequentially from the root, stem and leaf tissues, and gene expression analysis was performed with qPCR. In conclusion, gene expression analysis of putative legume Met30 and WD40/YVTN proteins containing F-box/WD40 motifs found as a result of bioinformatics analysis suggests that they have direct roles in the response to temperature and salinity stresses. By looking at sequence similarities and expression analysis profiles, it was concluded that the role of putative legume Met30 and WD40/YVTN proteins in abiotic stress conditions is related to the Cdc34/SCF complex.

January 2021, 114 pages.

Keywords: F-box proteins, WD40 repeats, NaCl, temperature, ubiquitination.

1. GİRİŞ

Bitkiler doğal ortamlarında soğuk, sıcak, tuzluluk, kuraklık, patojenler, herbivorlar gibi çeşitli zorlu stres koşullarıyla karşı karşıya kalabilmektedir. Bunlar arasında kuraklık, tuzluluk ve aşırı sıcaklıklar gibi su eksikliği stresi yaratan çevresel faktörler, bitki üretkenliğini büyük ölçüde sınırlar (Boyer, 1982). Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve artan dünya nüfusuna paralel üretim verimliliğini artırmak için, strese dayanıklı bitkiler geliştirilmelidir (Ribaut ve diğ. 1997). İklim değişikliğinin genel çevre üzerindeki etkileri, özellikle yetiştirilen tarımsal bitkiler üzerindeki olumsuz etkileri yıllar içinde önemli oranda artmıştır. Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli'ne (IPCC) göre, çoğunlukla gelişmekte olan ülkeler tarafından ekimi yapılan arazilerde, tarımsal üretimi etkileyen en etkili faktörün iklim değişikliği olduğu bildirilmiştir (Onyekachi ve diğ. 2019). İklim değişikliğinin tetiklediği stres faktörleri genellikle abiyotiktir (Mittler, 2006). Bu abiyotik stres faktörleri arasında kuraklık, yüksek karbondioksit, sıcaklık (düşük ve yüksek), sel, aşırı yağış, yüksek güneş ışığı maruziyeti, tuzluluk ve kimyasal faktörler (ağır metaller ve pH) bulunur (Compant ve diğ. 2010; Onyekachi ve diğ. 2019). Kuraklık, tuz ve sıcaklık stresi, bitkilerin doğadaki coğrafi dağılımını etkileyen, tarımda bitki verimliliğini sınırlayan ve gıda güvenliğini tehdit eden başlıca çevresel faktörlerdir. Abiyotik stresler, dünya çapında mahsul kayıplarının birincil nedenidir ve çoğu bitkinin verimini %50 azaltır (Rodríguez ve diğ. 2006). Abiyotik stresler, bitki büyümesini, üretkenliğini ve verimini olumsuz etkileyen bir dizi morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliğe neden olur (Bita ve Gerats, 2013). Bu nedenle bitkilerin stres sinyallerini nasıl algıladığı ve olumsuz ortamlara nasıl uyum sağladığı konusu biyolojinin temel sorularından biridir (Zhu, 2016).

Baklagiller (Fabaceae/Leguminosae), yaklaşık 700 cins ve 18.000 türden oluşan geniş bir ailedir. Baklagil bitkileri, farklı mevsimlerde gelişebilme yeteneklerine göre soğuk mevsimlik baklagiller ve sıcak veya tropikal mevsimlik baklagiller olarak iki gruba ayrılabilir (Miller ve diğ. 2002). Baklagiller, çeşitli tarım sistemlerinde önemli gıda ve yem kaynaklarıdır ve yarı kurak tropik bölgelerde büyük ölçekte yetiştirilmektedir (Popelka ve diğ. 2004; Varshney ve diğ. 2012). Sıcaklık ve tuz gibi çeşitli abiyotik stresler, farklı gelişim aşamalarında baklagillerin büyümesini etkiler (Suzuki ve diğ. 2014). Ayrıca, baklagiller azotu fikse edebilen rhizobia adlı toprak bakterileri ile simbiyotik (ortak yaşam) olarak yaşarlar. Bu ortak yaşamın sonucunda, bitki kökü üzerinde bakterilerin atmosferik nitrojeni bitki tarafından kullanılabilecek amonyağa

dönüştürebildiği yumrular oluşmaktadır. Rhizobium-baklagil simbiyozu, konakçı bitki ile mikrosimbiyotu arasında bir sinyal alışverişi ile başlar (Oldroyd, 2013). Konakçı tarafından uyumlu bakterilerin tanınması ile başlayan süreç, bakterileri nodül hücrelerine ulaştırmak için bir enfeksiyon sürecini başlatması ile devam eder. Nodüllerde biriken bakteriler, bitki kökenli bir zarla çevrelenerek, simbiyozom adı verilen organel benzeri bir yapı oluşturur ve burada bakteriler, nitrojen sabitleyici bakteroidlere dönüşür (Jones ve diğ. 2007; Oldroyd ve diğ. 2011). Rhizobium-baklagil simbiyozunda, bakteriler bitki için nitrogen kaynağı sağlarken, bunun karşılığında bitkiden fotosentez ürünleri alarak yaşamlarını devam ettirirler. Hem baklagiller hem de rhizobia bakterileri filogenetik olarak çeşitlidirler. Tek bir rhizobia türü, tüm baklagillerle simbiyoz oluşturamaz. Aynı şekilde tek bir baklagil türü tüm rhizobia türleri ile simbiyoz oluşturamaz (Broughton ve diğ. 2000; Wang ve diğ. 2012). Biyolojik nitrojen fiksasyonu, tarım yapılan topraklardaki en önemli nitrojen kaynağıdır. Bu nedenle rhizobium-baklagil simbiyozu agronomik açıdan son derece önemlidir (Hirsch ve diğ. 2001).

Sıcaklık, baklagillerde tohum verimini ve kalitesini etkileyen önemli bir faktördür (Ruelland ve Zachowski, 2010; Salon ve diğ. 2011). Hava sıcaklığındaki artışlar, eşik seviyesinin bir derece üzerinde bile olsa, bitkilerde sıcaklık stresi olarak kabul edilir (Teixeira ve diğ. 2013). Çoğu subtropikal ve tropikal bitki için sıcaklık stresi, sıcaklıkların 32–35°C'nin üzerine çıkması anlamına gelmektedir (Bita ve Gerats, 2013). Sıcaklık stresinin etkisi, yoğunluğa, maruz kalma süresine ve sıcaklığın derecesine bağlıdır (Sita ve diğ. 2017). Hem yüksek hem de düşük sıcaklıktaki aşırı farklılıklar, bitki büyümesini ve işlevini bozarak bitki gelişimi üzerinde negatif etkilere sebep olabilir (Wahid ve diğ. 2007).

Tuzluluk stresi ise, dünya çapında 8×10^8 hektardan fazla araziyi etkilediği için mahsul üretiminin önündeki en büyük kısıtlamalardan biridir. Baklagillerde tuz stresi, bitkinin büyümesi ve nitrojen fiksasyon kapasitesi üzerindeki olumsuz etkiler ile önemli bir üretkenlik sınırlaması getirir (Manchanda ve Garg, 2008). Bitkilerin tuz stresine olan tolerans mekanizmaları, hücresel veya moleküler düzeydeki çalışmalar ile baklagillerde kapsamlı olarak incelenmektedir (Fougère ve diğ. 1991). Elde edilen sonuçlar, tuzluluğun baklagillerdeki genel bitki büyümesini; hormonlar, beslenme dengesizliği, spesifik iyon toksisitesi ve ozmotik etkilerin karmaşık etkileşimi sonucunda olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir (Sayed, 2011).

Ubikitin proteazom sistemi, çok sayıda enzimin, yapısal ve düzenleyici proteinlerin parçalamasından sorumlu ökaryotik hücrelerdeki başlıca proteolitik mekanizmadır.

Ubikitinasyon, üç enzimin sırayla etkili olduğu çok aşamalı bir süreçtir. Bunlar E1 (ubikitin aktive edici enzim), E2 (ubikitin konjüge edici enzim) ve E3 (ubikuitin ligaz) enzimleridir. Sistem art arda gelen iki süreçten oluşur: birincisi, ubikuitin molekül zincirinin seçilen bir proteine bağlanması ve ikincisi, modifiye edilmiş proteinin, 26S proteazom ve ubikitin moleküllerinin geri dönüşümü ile parçalanmasıdır (Stone, 2019). Ubikitin, ökaryotik organizmalarda bulunan yüksek oranda korunmuş, hücrelerin hemen her bölümünde anlatımı yapılan bir proteindir (Goldstein ve diğ. 1975). Yüksek derecede korunmuş ubikitin amino asit dizilerinin, bitki türleri arasında aynı olduğu ve bitki ubikitininin maya ve insan ubikitininden sırasıyla sadece iki ve üç amino asit kadar farklı olduğu belirlenmiştir (Callis ve Vierstra, 1989). Ubikitinasyon tersine çevrilebilir bir mekanizmadır. Modifiye edilmiş proteinden ubikitin molekülleri çıkarılarak deubikitine edilebilir. Açığa çıkan ubikuitin molekülleri geri dönüştürülür. Deubikitinasyon enzimleri (DUBs), ubikuitin C-terminali ile lizin kalıntılarının amino grubu arasındaki amin bağını hidrolize eden proteazlardır. Hücresel düzeyde, ubikitin-proteazom sistemi, önemli enzimlerin, yapısal ve düzenleyici proteinlerin varlığını dikkatlice kontrol eden düzenleyici ağların önemli bir parçasıdır (Stone, 2019).

Ubikuitin proteazom sistemi, tüm ökaryotlarda birçok biyolojik sürecin anahtar düzenleyicisidir. Bu mekanizma birkaç enzimi içerir ve bunlardan en önemlisi, 26S proteazomu tarafından bozunmaları için hedef proteinlere poliubikitin zincirlerinin bağlanmasını katalize eden ubikitin E3 ligaz'dır. E3 enzimleri arasında, SCF (Skp, Cullin, F-box içeren kompleks) en iyi anlaşılanıdır; F-box proteininin hedef substratı protein- protein etkileşimi ile bağlayarak çok önemli bir rol oynadığı bir çoklu protein kompleksinden oluşur. Çarpıcı bir şekilde, Arabidopsis'te yaklaşık 700 F-box proteini olduğu belirlenmiş, bu da bitkilerin çok sayıda SCF kompleksini bir araya getirme kapasitesine sahip olduğunu ve muhtemelen çok sayıda biyolojik süreçte yer alan yüzlerce substratın stabilitesini kontrol ettiğini göstermektedir (Lechner ve diğ. 2006). F-box proteinleri, 26S proteazomu tarafından degradasyon için substrat tanıma ve substrat alımında işlev gören SCF kompleksinin bileşenlerinden biridir. F-box proteinlerinin N-terminali, doğrudan SKP1 ile etkileşime giren iyi korunmuş bir F-box motifinden (35-60 amino asit) oluşur. C-terminal bölgesinde hedef proteinlere, protein-protein etkileşimi yoluyla spesifik olarak bağlanan kelch tekrarları, lösin bakımından zengin tekrarlar (LRR), WD40 tekrarları, F-box-ilişkili motifler (FBA) ve tubby motifleri (TUB) gibi bir veya birkaç fonksiyonel motif içerir (Jain ve diğ. 2007). F-box proteinleri, C-terminallerindeki motif değişkenliğinden dolayı spesifik olarak subsratlarına bağlanırlar (Hong ve diğ. 2020).

WD40 tekrarları, bir triptofan ve bir aspartik asit (WD) ile biten 40-60 amino asit uzunluğundaki motiflerdir. WD-tekrar içeren proteinler, protein-protein ve DNA-protein etkileşimlerinde anahtar rol oynar. Ayrıca bitki stres tepkilerinin pozitif düzenlenmesinde rol alırlar (Arıkan ve diğ. 2016). Bakterilerden memelilere yüksek oranda korunurlar ve genellikle protein protein etkileşimlerine aracılık etmede rol oynadıkları alt birim komplekslerinin bir parçası olarak bulunurlar (Migliori ve diğ. 2012). WD40 tekrarları, ökaryotlarda en çok bulunan ilk 10 motif arasındadır. Çoğu WD40 tekrarı, katalitik veya diğer fonksiyonel aktivitelere sahip ek motifler ile birlikte bulunur. En yaygınları, ubikitilasyon ve protein bozunması (FBOX, RING, SOCS), mikrotübül dinamikleri (LisH), fosfolipid bağlanma (FYVE) ve vezikül kaplamada (vesicle coating-CLH) fonksiyonları bulunan motiflerdir. WD40 tekrarının çeşitli işlevlere sahip 30 farklı protein ailesinde bulunduğunu bildirmiştir. WD40 tekrarı içeren proteinlerin çoğu, çiçek gelişimi, hücre bölünmesi, sinyal iletimi, meristem organizasyonu, RNA işleme, kromatin modifikasyonu ve transkripsiyon gibi düzenleyici işlevlere sahiptir (Yu ve diğ. 2000; Van Nocker ve Ludwig, 2003; Stirnimann ve diğ. 2010). WD40 tekrarları iki veya daha fazla protein için bağlanma bölgesi sağlar ve protein komplekslerinin ayrılmaz bileşenleri olarak görev alırlar. Bir model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'nın WD40 tekrarları içeren 143 farklı aileye ait yaklaşık 269 proteine sahip olduğu ve her birinin en az bir WD40 tekrarı içerdiği belirtilmiştir (Van Nocker ve Ludwig, 2003; Stirnimann ve diğ. 2010; Li ve diğ. 2014a).

Bu tez çalışmasında baklagil ailesine ait *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* bitkilerinde F-Box/WD40 proteinleri biyoinformatik analizlerle belirlenmiştir. Daha sonra sıcaklık stresi ve NaCl stresi uygulanarak bu proteinlere ait genlerin anlatım analizleri yapılarak strese karşı verdikleri cevap incelenmiştir. Sıcaklık uygulaması 38ºC'de 1 ve 2 saat olarak, tuzluluk uygulaması 180 mM NaCl içeren MS besiyerinde 6, 24 ve 48 saat olarak uygulanmıştır. Stres uygulamasının bitkilerdeki F-box/WD40 proteinlerinin mRNA düzeylerine olan etkisi gerçek zamanlı PZR ile analiz edilmiştir. Ubikitin proteazom sistemi ile ilişkili F-box proteinlerinin ve sahip olduğu motiflerden sadece WD40 motifinin abiyotik stres koşullarında verdiği moleküler cevap incelenmiştir.

Bitkilerin hayatta kalması ve gelişimi için abiyotik streslere verilen erken tepki kritiktir. Bu nedenle, tuzluluk ve sıcaklık stresi algısını ve sinyal yolaklarını kontrol eden moleküler süreçlerin anlaşılması önem arz etmektedir. Biyoinformatik analizler sonucunda, genom

dizilimleri bulunan baklagillerden fasulye, nohut ve yoncada 6 adet F-box/WD40 proteini tanımlanmıştır. Yapılan dizi ve 3 boyutlu protein analizleriyle, baklagil F-box/WD40 proteinlerinin, *Arabidopsis thaliana* Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin homoloğu olduğu ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, F-box/WD40 proteinleri isimlendirilmiştir. Ayrıca, *S. cerevisiae* Cdc34/SCF^{met30} kompleksinin *S. cerevisiae* Met4 trasnkripsiyon faktörünün ubikitinasyonunu düzenlediği gibi, bu çalışmada belirlenen olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin Cdc34/SCF kompleksinde yer alarak baklagil transkripsiyon faktörlerini düzenlendiğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada yapılan GZ PZR sonuçlarına göre, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin farklı dokularda anlatımının azaldığı veya güçlü bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Yapılan GZ PZR analizleri, yüksek sıcaklığa (38°C) ve tuzluluk stresine yanıt veren olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinleri olduğunu ortaya koymuştur. Genlerin anlatımı hem doku hem de bitki çeşidine göre değiştiği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN genlerinin sıcaklık ve tuzluluk stresine moleküler düzeyde erken cevapta rol aldığını, ayrıca dokuya özgü anlatım sergilediklerini göstermiştir.

Sonuçlar, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin abiyotik strese verilen cevapta aktif rol oynadığı ubikitin proteazom sisteminin mekanizmalarının aydınlatılmasının bitkilerin stres koşullarına dayanıklı hale getirilmesinde önemli bir aşama olduğunu düşündürmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BAKLAGİLLER

Baklagiller, Fabaceae olarak da adlandırılan Leguminosae familyasına ait, tohumlarını zarf içinde üreten bitkilerdir (Maphosa ve Jideani, 2017). Baklagiller ekonomik ve tarımsal açıdan değerli olan en önemli dikotil bitki ailesi olmasının yanısıra, Orkidegiller (Orchidaceae) ve Papatyagiller (Asteraceae) ile dünyanın üç büyük bitki ailesinden birini oluştururlar. Tarımsal üretim amaçları arasında gıda, medikal ve endüstriyel kullanımlar yatmaktadır. Fabaceae familyası 650 cins ve 20.000 dolayında tür içerir. Dünyanın birçok bölgesinde, baklagil tohumları insan ve hayvan diyetinde benzersiz protein kaynağıdır (Doyle ve Luckow, 2003).

Taze fasulye, soya fasulyesi, mercimek, bezelye ve nohut gibi başlıca temel besinlerin kaynağı olan bitkilerin tümü baklagil ailesi üyesidir. Esas olarak insan tüketimi için yetiştirilen bu baklagillere ek olarak, acı bakla (Lupinus) ve yonca (Medicago) yem bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Baklagillerde rhizobia simbiyozu, konakçı bitkinin azot ihtiyacı ile başlar. Oluşan simbiyozda, konakçıdan gelen fotosentez ürünleri karşılığında, bakteriler bitki büyümesi için nitrojen kaynağı sağlar. Rhizobia simbiyozu sonucunda, kök bölgesinde azot miktarı dolayısıyla; bitki verimi, tohum ağırlığı ve tohum protein içeriği yüksek oranda artar (Maróti ve Kondorosi, 2014; Šenberga ve diğ. 2017). Baklagiller iyi bir protein, nişasta, lif, vitamin ve mineral kaynağı olmasının yanısıra insan sağlığına faydalı, önemli antioksidanlar olan kaempferol, kateşin ve diğer flavonoidler gibi önemli miktarlarda fenolik bileşikleri yüksek oranda içermektedir. Makro ve mikro besinlerinin yoğunluğu nedeniyle tahıl baklagillerinin beslenmedeki önemi tartışılmazdır (Duranti, 2006). Baklagiller beslenme dışında, biyolojik olarak parçalanabilen plastikler, yağlar, zamklar, boyalar ve mürekkeplerin üretimi için endüstriyel amaçlı olarak da kullanılmaktadır (Graham ve Vance, 2003).

Baklagil bitkilerinin tuz stresine (Nichols ve diğ. 2009; Flowers ve diğ. 2010; Al-Lawati ve diğ. 2016) ve sıcaklık stresine (Porch ve Jahn, 2001; Stefanov ve diğ. 2011; Devasirvatham ve diğ. 2012; Das ve diğ. 2017) olan dirençleri ve moleküler cevapları birçok çalışmada incelenmiştir. Örneğin, West ve Taylor (1981) çalışmalarında 70 mM NaCl üzerindeki konsantrasyonlarda *Trifolium subterraneum*'un, Rogers and Noble (1991) ise *T. michelianum* ve *T. subterraneumin*'nin 100 mM NaCl varlığında çimlenmede %50'lik bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Sıcaklık stresi ise, baklagil üretimi açısından öncelikle tohum veriminde önemli

kayıplara neden olur (Liu ve diğ. 2019). Çiçeklenme öncesi veya çiçeklenme sırasındaki sıcaklık stresi, baklagillerde tohum oluşumu üzerinde zararlı etkiye sahiptir (Patriyawaty ve diğ. 2018). Baklagiller için optimum sıcaklık 10ºC-38ºC arasındadır ancak günlük maksimum sıcaklık 25ºC olarak kabul edilir. Yüksek sıcaklıklar ayrıca baklagil kök nodüllerinin yapısına ve işlevine zarar vererek baklagillerin toprağa azot bağlama yeteneğini etkiler (Farooq ve diğ. 2017). Baklagil türleri için hem tuzluluk hem de sıcaklık stresi önemli abiyotik streslerin başında gelmektedir. Baklagillerde verimi artırmak, sıcaklık ve tuzluluk stresine dayanıklı yeni baklagil çeşitleri üretmek için yenilikçi yaklaşım ve stratejilerin değerlendirilmesi, moleküler yaklaşımların oluşturulması gerekmektedir.

Yonca (*Medicago truncatula* L.), yüksek protein içeriği ve iyi sindirilebilirliği nedeniyle çok yıllık baklagillerden önemli bir yem bitkisidir. Hayvanlar tarafından gerek yaş ot gerekse kuru ot olarak tüketilen çok yıllık bir serin mevsim bitkisidir ve "yem bitkilerinin kraliçesi" olarak bilinir. Yonca, çoğunlukla yabancı bitkileri bulunduğu ortamda barındırmayan ve hızlı gelişim gösteren bir bitki olduğu için üretici tarafından tercih edilmektedir (Uygur, 1991). Yonca, Türkiye'nin her bölgesinde doğal olarak yetişmekte ve gittikçe artan oranlarda tarımı yapılmaktadır (Kır ve Soya, 2015). Türkiye yonca bitkisinin gen merkezi olup yem bitkisi olarak kullanımı günümüzden 3300 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Hanson ve diğ. 1998). Önemli bir yem bitkisi olmasının yanı sıra, yonca toprağa azot bağlaması, vitaminler ve mineraller bakımından zengin olması, fitoremediasyon ve biyo-yakıt potansiyeline sahip olması açısından da önemli bir baklagildir (Öten ve Albayrak, 2018). Yonca'da önemli üretim sınırlamalarından biri tuzluluktur. Toprak tuzluluğu, yonca veriminde önemli bir azalmaya neden olur. Toprak tuzluluğu 22 mM NaCl eşiğinin üzerine çıktığında yonca üretimi azalır (Johnson ve diğ. 1992). Tuza dayanıklı yonca çeşitlerinin geliştirilmesi, tuzlu hale getirilmiş topraklarda yonca üretimini sürdürmek için oldukça önemlidir. Dünya çapında yaklaşık 30 milyon hektar alanda yonca yetiştirilmektedir. Geleneksel ıslah yöntemleri ve genetik mühendisliği teknikleri (Liu ve diğ. 2011; Zhang ve Wang, 2015) kullanılarak tuza toleranslı yonca çeşitleri oluşturulması için çaba gösterilmiş olsa da çok az sayıda tuza dayanıklı yonca çeşidi tarımsal kullanımdadır (Liu ve Yu, 2017).

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), Amerika'da bilinen en eski bitki türlerinden biridir (Schmutz ve diğ. 2014). Fasulye, protein, kompleks karbonhidratlar ve mikro besinlerin başlıca kaynağı olduğu için, dünya çapında gıda amaçlı tüketilen en önemli baklagillerden biridir. Hem Latin

Amerika'da hem de Doğu Afrika'da tüketimi yaygındır (Graham ve Ranalli, 1997). Ayrıca atmosferik nitrojeni sabitleyerek sürdürülebilir tarımda önemli bir rol oynar (Abd-Alla, 2011; Kaymakanova ve Stoeva, 2008). Fasulye, protein, karbonhidrat, lif, vitamin ve demir, fosfor, kalsiyum ve magnezyum gibi mineraller içeren yüksek besin değeri ile öne çıkan bir baklagil türüdür. Küresel fasulye üretimi yılda 23 milyon ton kadardır (FAOSTAT, 2014). Fasulye üretimi, en önemli ikinci baklagil olan nohutun neredeyse iki katıdır (Broughton ve diğ. 2003). Fasulye, aynı zamanda Rhizobium cinsindeki nitrojen bağlayıcı bakterilerle birlikte simbiyoz çalışması için bir model türdür. *P. vulgaris* genom dizisinin yakın zamanda ortaya konulması, genom analizlerinin yapılabilmesine ve bu organizma hakkında yeni genomik verilerin elde edilmesine olanak sağlamıştır.

Nohut (*Cicer arietinum* L.) günümüz Türkiye'sinin güneydoğu bölgesinde ve Suriye'ye bitişik bir bölgede ortaya çıkmıştır. Nohut, özellikle Afrika-Asya ülkeleri başta olmak üzere tüm dünyada yetiştirilen ve tüketilen önemli bir baklagil ürünüdür (Jukanti ve diğ. 2012). Nohut, Fabaceae familyasına ait tek yıllık bir bitkidir. Ağırlıklı olarak ılıman ve yarı kurak bölgelerde, yani Asya, Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'da yetiştirilir. Yıllık 13,1 milyon tonluk üretimle, fasulyeden sonra en yaygın yetiştirilen ikinci baklagil bitkisidir (FAOSTAT, 2013). Nohut, yüksek protein içeriği, temel amino asitler bakımından zengin içeriği ve yüksek biyoyararlanımlılığı sebebiyle önemli bir protein kaynağıdır (Clemente ve diğ. 1999).

Nohut taneleri, potansiyel olarak alkaloid, flavonoid, steroid ve terpenoid fitokimyasallarını içerir. Nohut, simbiyotik nitrojen fiksasyonu yoluyla toprak verimliliğini geri kazanmaya ve korumaya yardımcı olur. Nohutun üretkenliği birkaç biyotik ve abiyotik faktör tarafından sınırlandırılmıştır. Toprak tuzluluğu, nohut yetiştirme alanlarının çoğunda artan bir başka abiyotik strestir ve nohut tohumlarının çimlenme oranını azaltır (Flowers ve diğ. 2010). Tuzluluğa toleransın genetik ve moleküler mekanizmalarını anlamak, nohutun bu olumsuz koşullara adaptasyonunu geliştirmeye yardımcı olacaktır. Hem kuraklık hem de tuzluluk stresi, köklerden suyun alımı ile yaprak terlemesiyle kaybedilmesi arasındaki dengesizlikten kaynaklanan doku dehidrasyonuna neden olur ve köklerde su alımını değiştirir (Wahid ve diğ. 2003). Farklı biyotik ve abiyotik streslere karşı geliştirilmiş dirençli olan birkaç çeşit nohut ticari hale getirilmiştir. Ancak, küresel olarak nohut verimliliği hala çok düşüktür (FAO, 2011). Modern genomik yaklaşımların uygulanması ise birçok tahıl mahsulünde genel verim artışına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (Mayor ve Bernardo, 2009; Varshney ve diğ. 2012).

Yetiştirme ve genetik mühendisliği yoluyla bitkilerin kuraklığa, yüksek tuzluluğa, düşük ve yüksek sıcaklığa karşı toleransını iyileştirmeye yönelik geçmiş çabalar, stres tepkilerinin genetik karmaşıklığı nedeniyle sınırlı başarı ile sonuçlanmıştır (Cushman ve Bohnert, 2000).

2.2. BİTKİLERDE STRES

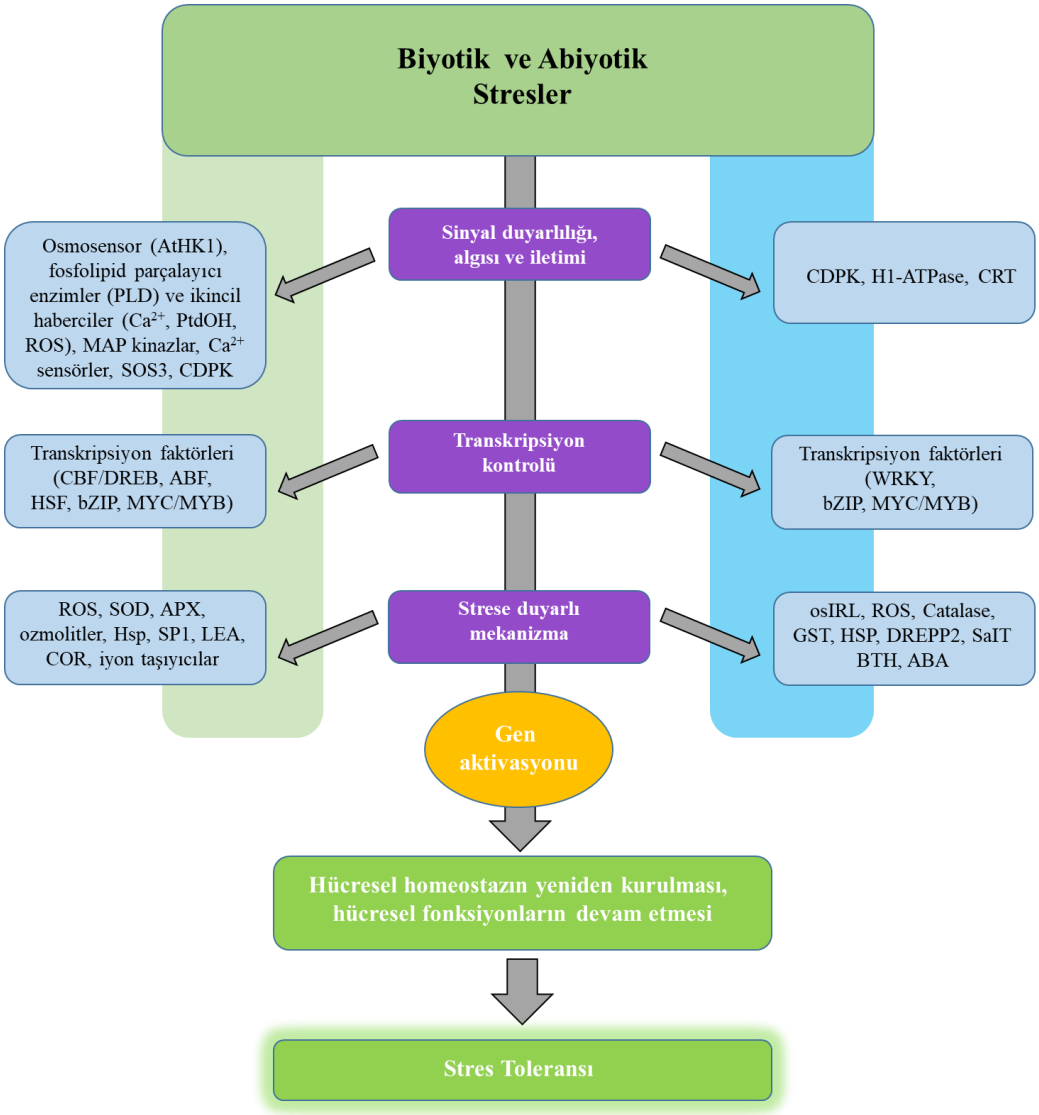
Bitkisel ürünlere olan talep artmaya devam ederken, tarımsal üretkenlik, genellikle küresel ısınmayla ilişkilendirilen çeşitli stres faktörleri tarafından tehdit edilmektedir (Schlenker ve Roberts, 2009; Zhao ve diğ. 2017). Bitkiler için stres, büyüme, gelişme ve üreme için genetik potansiyelini tam olarak ifade edilmesini engelleyen normal gelişiminden sapma şeklinde tanımlanabilir. Bitkiler genellikle farklı stres faktörlerine maruz kaldıkları ortamlarda yaşayabilmek üzere evrimleşmişlerdir. Aynı zamanda, büyüme ve gelişmeleri için değerli kaynakları korurken, hassas çevresel değişiklikleri tespit etmelerine olanak veren, karmaşık stres koşullarının vereceği hasarı en aza indirmelerini sağlayan özel mekanizmalar geliştiren bitkiler, bu şekilde hayatta kalmaya çalışırlar (Rizhsky ve diğ. 2004).

Bitkiler doğada abiyotik stres olarak nitelendirilen sıcaklık, soğukluk, tuzluluk, kuraklık, ağır metaller (arsenik, krom, kurşun vb.); biyotik stres olarak nitelendirilen herbivorlar ve patojen (bakteri, mantar ve virüs) enfeksiyon gibi stres koşullarına maruz kalmaktadır (Suzuki ve diğ. 2014). Abiyotik ve biyotik stres koşulları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Bitkilerde abiyotik ve biyotik stres koşulları (Mahajan ve Tuteja, 2005).

Abiyotik Stres	Yüksek Sıcaklık
	Aşırı Soğuk ve Don
	Kuralık
	Sel
	Tuzluluk
	Kimyasallar ve kirletici maddeler (pestisitler, ağır metaller)
	Oksidatif stres (reaktif oksijen türleri)
	Rüzgar (rüzgarda kum ve toz parçacıkları)
	Toprakta besin yoksunluğu
Biyotik Stres	Otoburlar
	Kemirgenler
	Böcekler
	Virüsler
	Bakteriler
	Mantarlar

Kuraklık, tuzluluk, soğuk, sıcaklık ve kimyasal kirlilik gibi stresler ozmotik ve oksidatif stres gibi ikincil streslere yol açarak hücresel hasara neden olurlar. İlk stres sinyalleri (örneğin ozmotik ve iyonik etkiler veya sıcaklık, membran akışkanlığı değişiklikleri), homeostazı yeniden kurmak, hasarlı proteinleri ve membranları korumak veya onarmak için strese duyarlı mekanizmaları etkinleştiren aşağı yönlü sinyalleme sürecini ve transkripsiyon kontrollerini tetikler. Sinyal yolaklarında ve gen aktivasyonundaki yetersiz yanıt ise, hücresel homeostazı da geri döndürülemez değişikliklere, proteinlerin ve zarların fonksiyonel ve yapısal olarak tahrip olmasına ve bu da hücre ölümüne yol açabilir (Wang ve diğ. 2003). Abiyotik stresler, birçok geni ve biyokimyasal-moleküler mekanizmayı etkiler. Bitkilerin abiyotik streslere verdikleri yanıtlar ve bu yanıtları oluşturan mekanizmalar ile genlerin bir kısmı belirlenmiştir. Abiyotik stres cevap genlerinin kodladıkları proteinler üç ana kategoriye ayrılabilir. Bunlar (1) sinyalleme kademelerinde ve transkripsiyonel kontrolde yer alan Myc, MAP kinazlar, SOS kinaz, fosfolipazlar ve HSF, CBF/DREB, ABF/ABAE gibi transkripsiyon faktörleri; (2) HSP'ler, şaperonlar, geç embriyojenez (LEA) proteinleri, osmoprotektan ve serbest radikal temizleyici proteinler gibi zarların ve proteinlerin korunmasında doğrudan işlev görenler; (3) aquaporinler, iyon taşıyıcılar gibi su ve iyon alımında, ayrıca taşınmasında yer alan proteinler şeklindedir (Şekil 2.1) (Rizhsky ve diğ. 2004).



Şekil 2.1: Bitkilerde stres yanıtının aşamaları.

Bitkilerde ROS oluşumu, elektrolitik sızıntı, bağıl su içeriği, serbest radikal birikimi, yaprak solması, yaprak yaşlanması ve kök büyümesi uyarımı gibi biyokimyasal ve fizyolojik seviyelerde ortaya çıkan değişiklikler hücresel homeostazı bozar. Bu da enzimlerin inaktivasyonuna, lipid peroksidasyonuna ve zar hasarına neden olarak hücre canlılığını etkiler. Gen anlatımı, stresle ilişkili genlerin anlatımını düzenleyen çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilen önemli bir moleküler yanıttır (Singh ve diğ. 2002; Hasanuzzaman ve diğ. 2013b). Bu faktörler, farklı abiyotik streslere duyarlı genlerin anlatımlarının düzenlenmesi ile ilişkilidir (Journot-Catalino ve diğ. 2006). Transkripsiyon faktörleri, stres altındaki bitkide gen anlatımını düzenlemek için moleküler anahtarlar olarak cis-düzenleyici faktörlerle birlikte

rol alırlar. Genlerin promotör bölgesi ile bağlanma kabiliyetine sahiptirler ve bitkinin etkilendiği strese duyarlı genlerin anlatımını azaltarak veya artırarak kontrol ederler (Gujjar ve diğ. 2014).

Enzimlerin ve proteinlerin fonksiyonlarındaki aksaklıklar genellikle abiyotik stresle birlikte başlar. Bu nedenle, proteinlerin fonksiyonlarının korunması stres altındaki bitki hücrelerinin hayatta kalması için özellikle önemlidir. Strese duyarlı birçok protein, özellikle HSP'lerin, proteinlerin sentezinden, hedeflenmesinden ve parçalanmasından sorumlu moleküler şaperonlar olarak görev yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca, bu moleküler şaperonlar, proteinlerin ve hücre zarının stabilizasyonuna ve stres koşulları altında proteinin yeniden katlanmasına yardımcı olur (Wang ve diğ. 2003).

LEA tipi proteinler, çok çeşitli bitki türlerinde bulunmuştur. Bu proteinler, bitkilerde kuruma, soğuk ve ozmotik stresten kaynaklanan su eksikliğine tepki verirler. LEA tipi proteinlerin su bağlayıcı moleküller olarak hareket ettiği bilinmektedir (Thomashow ve diğ. 2001; Wang ve diğ. 2003).

Uyumlu çözünen maddeler veya ozmolitler, ozmotik strese yanıt olarak bitki hücrelerinde birikir. Ozmolitlerin birincil işlevi, hücre turgorunu sürdürmek ve su alımını sağlamaktır. Aynı zamanda, proteinleri doğrudan stabilize ederek serbest radikal süpürücüler veya kimyasal şaperonlar olarak da hareket edebilirler. Ozmolitler, amino asitler (ör. prolin), aminler (ör. glisin betain, dimetilsülfoniopropiyonat) ve şekerler (ör. mannitol, trehaloz) olarak üç ana gruba ayrılır. Ozmolitlerin aşırı birikimi stres toleransını artırır. Topraktaki ve sulama suyundaki ozmotik stres, iyon toksisitesi ve yüksek tuz içeriği bitki büyümesini önemli ölçüde engeller. İyon taşıyıcılar, iyonları seçici bir şekilde taşır ve fizyolojik olarak ilgili konsantrasyonlarda muhafaza ederken, Na^+/H^+ antiportörler de hücresel iyon homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar. Böylece tuzlu koşullar altında bitkinin hayatta kalmasına ve büyümesi sağlanır.

Tuzluluk, kuraklık, yüksek sıcaklıklar ve oksidatif stres, $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 ve $OH^{\cdot}$ gibi ROS'ların oluşumuna neden olarak hücre membranlarına ve makromoleküllere zarar verir. Bitkiler, bu toksik bileşikleri temizlemek için çeşitli antioksidasyon stratejilerine sahiptirler. Bunlar katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz gibi ROS süpürücü enzimler ve askorbik asit, glutatyon, karotenoidler ve antosiyaninler gibi moleküllerdir. (Wang ve diğ. 2003).

Bitkiler doğada hareketsiz olduğundan, çevresel streslerden kaçma seçenekleri yoktur. Yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi abiyotik stres koşullarının patojenlerin, böceklerin ve yabani otların oluşumunu ve yayılmasını etkilediği de ayrıca bilinmektedir (Coakley ve diğ. 1999; Scherm ve Coakley, 2003). Bitkiler, abiyotik ve biyotik stres tehditlerinin üstesinden gelmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Abiyotik stres, bitki büyümesini ve üretkenliğini olumsuz etkileyen bir dizi morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliğe yol açar. Sonuç olarak, bu çeşitli çevresel stresler sıklıkla benzer hücre sinyal yollarını ve stres proteinlerinin üretimi, antioksidan üretiminin artması gibi hücresel yanıtları aktive eder (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Knight ve Knight, 2001).

Salisilik asit, jasmonik asit, etilen ve absisik asit gibi fitohormonlar, öncelikle bitkilerin hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı koruyucu tepkilerini sinerjik olarak düzenleyen moleküllerdir. Dahası, ROS oluşumu, biyotik ve abiyotik stres yanıtları arasında paylaşılan anahtar bir süreçtir (Fujita ve diğ. 2006). Örneğin, transkripsiyonel düzenlemenin bakır sülfat ($CuSO_4$) stresi ve uyumsuz nekrotrofik patojen enfeksiyonu gibi çevresel zorluklarla korelasyonu, biyotik ve abiyotik streslere verilen yanıtlar arasında önemli bir örtüşme olduğunu ortaya koyar (Narusaka ve diğ. 2004).

Bitkilerdeki biyotik strese canlı organizmalar, özellikle virüsler, bakteriler, mantarlar, nematodlar, böcekler ve yabani otlar neden olur. Tuzluluk ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin neden olduğu abiyotik stresin tersine, biyotik stres ajanları, konakçılarını besinlerinden doğrudan mahrum bırakır ve bu da bitki canlılığının azalmasına ve aşırı durumlarda konakçı bitkinin ölümüne yol açar. Bitki savunma mekanizması, doğuştan gelen ve sistemik bir yanıt olarak sınıflandırılır. Enfeksiyondan sonra ROS oluşur ve oksidatif stresin artışı patojen yayılmasını sınırlar (Atkinson ve Urwin, 2012). Ayrıca, patojen saldırısına yanıt olarak bitkiler hücre odunlaşmasını arttırır. Bu mekanizma parazitlerin istilasını engeller ve konakçı bitkinin duyarlılığını azaltır. Morfolojik ve yapısal engeller, fitokimyasal bileşikler, proteinler ve enzimler biyotik strese karşı başlıca savunma mekanizmalarıdır. Bitki hormonları, SA, JA ve ET hem biyotik hem de abiyotik stres sinyallemesinde merkezi rol oynarken, β-ABA veya BTH gibi spesifik kimyasal bileşikler yoluyla biyotik strese direnç aktive edilmektedir. WRKY, bZIP, MYC/MYB gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri, çoklu hormon sinyallemesinde aracı moleküller olarak rol alır. Abiyotik streste ise, sinyal duyarlılığı ve iletimi ozmosensörler, CDPK'lar, MAP kinazlar, Ca^{2+}, ROS, PLD, SOS3 ile sağlanır. SOD, PX, HSP, LEA ve COR

gibi strese duyarlı mekanizmalar ile strese karşı cevap oluşturulur. CFB/DREB, ABF, HSF, bZIP, MYC/MYB transkripsiyon faktörleri ile gen anlatımı düzenlenerek abiyotik streslere karşı moleküler cevap oluşturulur (Gull ve diğ. 2019).

2.2.1. Abiyotik Stres

Abiyotik stresler ozmotik stres, oksidatif stres ve iyonik stres gibi ikincil stres faktörlerini tetikler. İkincil stresler, hücre zarında ve işlevsel proteinlerde hasara, ozmotik ve iyonik dengenin bozulmasına yol açarak, hücre zarı akışkanlığında değişikliğe neden olur. Oluşan ikincil stresler, başlangıç stres sinyalleri olarak ifade edilerek, hücrede bozulan dengenin geri kazanılması için işlevsel proteinlerin korunması ve hücre zarında oluşan hasarların giderilmesinde görevli stres yanıt mekanizmalarını aktive ederek transkripsiyonel kontrolü uyarır. Stres mekanizmasının başarı ile sonuçlanması durumunda bitki stres toleransı oluşur. Bitkinin sıcaklık veya tuzluluk stresi etkisinde kalması öncelikle hücrenin su kaybına neden olur. Dolayısıyla, bitkideki susuzluk da ozmotik strese yol açmaktadır. Bitkideki ozmotik stresin şiddetine bağlı olarak büyüme de olumsuz yönde etkilenir (Sairam ve Tyagi, 2004).

Bitkilerde stres koşullarına karşı oluşan moleküler cevap mekanizmaları üç grupta toplanabilir; makromoleküllerin ve iyonların homeostazisi, koruyucu moleküllerin sentezi, ROS oluşumu ve detoksifikasyonu. Abiyotik çevresel koşulların çoğu hücresel dehidrasyona yol açmakta ve homeostazı bozmaktadır. Örneğin, tuzluluk stresinde, potasyum (K^+) ve sodyum (Na^+) iyon dengesinin sağlanması oldukça önemlidir. Yani, iyon taşınımının düzenlenmesi stresin üstesinden gelinebilmesi için önemlidir. Tuzluluk stresinin bir sonucu olan Na^+ stresi, kök dokularındaki hücrelerin topraktan K^+ alımını engeller. Bunun dışında, Na^+ hücre içerisinde birikerek toksik etkilere sebep olur. Bitkilerde tüm iyon ve metabolitlerin taşınımı H-ATPazlar ve H-pirofosfatazlar ile gerçekleştirilir. Stres koşulları altında bitkilerde hücre homeostazı, H-ATPazlar ve H-pirofosfatazlar aracılığı ile iyonların iletimine bağlı olarak sağlanır. Bitkilerde strese karşı verilen cevaplardan bir diğeri ise düşük moleküler ağırlıklı ozmolitler, HSP'ler ve LEA proteinleridir. Koruyucu moleküllerden olan ozmolitler, stres tarafından oluşturulan ROS'un temizlenmesinde görev yapar. HSP'ler ise protein katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin hücrede birikiminin önlenmesi gibi birçok konuda işlevsellerdir. Ayrıca, farklı stres koşullarında da sentezlendiği bilinen HSP'ler, moleküler şaperon gibi davranırlar. Yani proteinlerin katlanarak üç boyutlu hale gelmesi işleminde rol alırlar.

LEA proteinleri, bitkilerde stres savunmasında koruyucu etkilere sahiptir. LEA genleri tarafından anlatımı yapılan LEA proteinleri yüksek hidrofilik özellikleri ile suyu bağlama kapasitelerini kullanırlar. Sonuç olarak su eksikliği etkilerini azaltmada, dolayısıyla hücresel bütünlüğün korunmasında etkin rol alırlar. Ayrıca LEA proteinleri glisince zengin proteinler olup antioksidan, metal iyonları bağlama, membran ve protein stabilizasyonu, DNA ve RNA etkileşimi özellikleri ile bilinirler. LEA proteinlerinin, özellikle bitkinin abiyotik stres koşullarından korunmasında etkin rol oynadığı bilinmektedir. LEA proteinlerinin anlatımı soğuk, sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık gibi stres koşullarından aktive edildiği bildirilmiştir (Chen ve diğ. 2019).

ROS'lar ikincil haberciler olarak birçok hücresel süreçte rol oynamaktadır. ROS'ların üretimi, özellikle abiyotik stres faktörleri altında artmaktadır. Hücresel ROS konsantrasyonunun artması sonucunda antioksidan savunma sistemleri ve ROS üretimi arasındaki denge bozulur. Bu zincirleme reaksiyonlar sonucunda bitki oksidatif strese girmektedir. Bitkiler oksidatif stresle başa çıkabilmek için ROS'un kontrolü ve detoksifikasyonunu sağlayan çeşitli antioksidan mekanizmaları geliştirmiştir. Antioksidanlar, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Enzimatik olmayanlar, askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir. Enzimatik antioksidanlar ise SOD, APX, CAT, GPX olarak bilinmekte ve hücrede serbest radikallere karşı temel savunma hattını oluştururlar. SOD'ların $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2'yi dönüştürme kabiliyeti vardır. SOD genlerinin anlatımındaki artışların, biyotik ve abiyotik strese bağlı oluşan oksidatif stresle başa çıkmada ve bitkilerin stres koşulları altında canlılığı sürdürmesine katkı sağlamada önemli rolü vardır. APX ve CAT enzimatik antioksidanları H_2O_2'nin dönüşümünde rol alır. APX, CAT'a göre H_2O_2'ye karşı daha yüksek affinitiye sahiptir. CAT ise, H_2O_2'in doğrudan H_2O ve $O_2^{\cdot -}$'ye dönüşümü sağlar. Bitkilerde strese karşı korumada görevli olan en önemli enzimatik antioksidanlardan biridir. GPX, mitokondri ve bazen de sitozolde hidrojen peroksidi suya parçalayan önemli bir enzimatik antioksidandır (Ighodaro ve Akinloye, 2018; Aslankoç ve diğ. 2020).

2.2.1.1. Sıcaklık Stresi

Optimumun üzerindeki ve altındaki sıcaklıklar, tüm canlı organizmalar tarafından sıcaklık ve soğuk stresi olarak algılanır. Sıcaklık stresi hücresel homeostazı bozar, büyüme ve gelişmede gerilemeye ve hatta organizmanın ölümüne neden olabilir. Hareketsiz organizmalar olarak

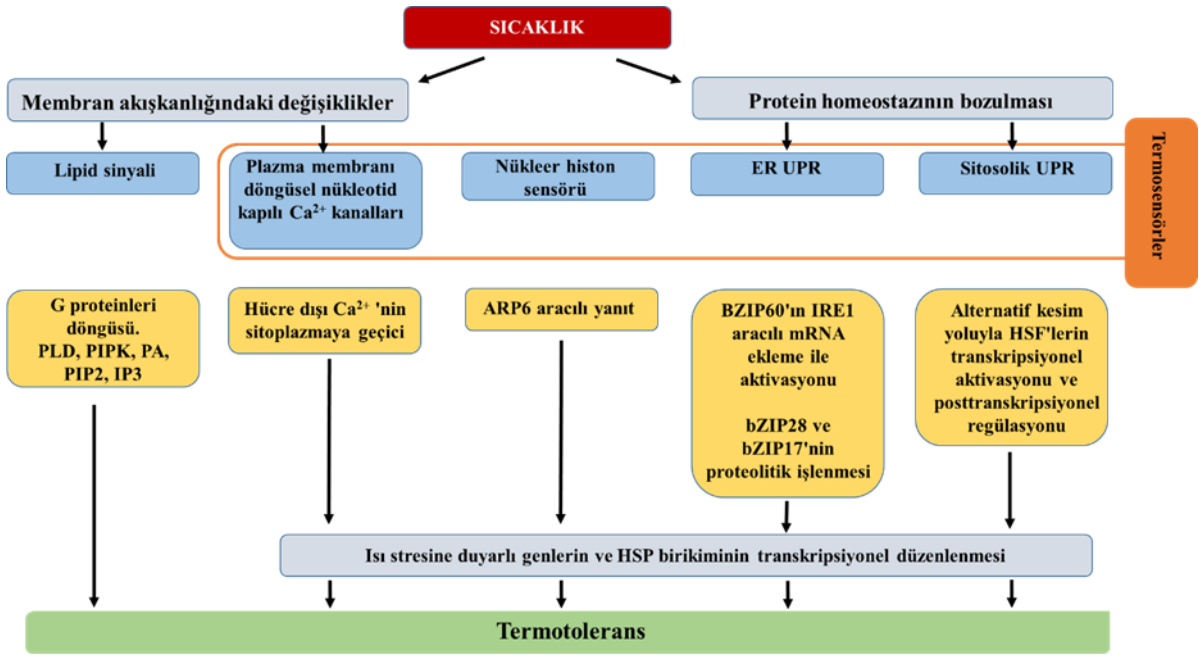
bitkiler, sürekli olarak sıcaklık değişimlerine ve diğer abiyotik faktörlere maruz kalırlar (Kotak ve diğ. 2007). Bitkiler, membranlarında bulunan algılama mekanizmalarının varlığından dolayı sıcaklıktaki hafif artışları bile algılayabilirler ve sıcaklık stresine direnmek için çeşitli fizyolojik ve moleküler mekanizmalar geliştirmişlerdir (Wise ve diğ. 2004). Sıcaklık stresi sonrası farklı doku türlerinde, gelişim aşamalarında ve büyüme koşulları altında farklı bitki türlerinden elde edilen veriler genlerin yaklaşık %2'sinin etkilediğini göstermektedir (Porch ve Jahn, 2001; Rensink ve diğ. 2005).

Sıcaklık stresine olan tepki termosensörler ile başlar ve termotolerans ile sonuçlanır. Bitki, gövdesindeki fiziksel değişikliklerle ve sıklıkla metabolizmayı değiştirmek için sinyaller oluşturarak sıcaklık stresini bir dereceye kadar tolere edebilir (Hasanuzzaman ve diğ. 2013a). Sıcaklık stresi, sıcaklık stresinden doğrudan korunmada rol oynayan bZIP60, bZIP28, BZIP17 gibi transkripsiyon faktörlerinde ve ARP6 protein geninin ifadesinde değişikliklere neden olur (Chinnusamy ve diğ. 2007; Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Sıcaklık stresi gibi koşullarda, fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin gen anlatımı değişiklikleriyle kademeli olarak alıştırma, sıcaklık toleransının gelişmesi veya bitkinin adaptasyonuyla sonuçlanır (Şekil 2.2) (Moreno ve Orellana, 2011).

Yüksek sıcaklık stresi, bitkilerde hücresel zarara veya ölümlere neden olurken, nispeten bitkinin direnç gösterebileceği sıcaklıklarda ise hücresel düzeyde ısı şoku tepsisi (HSR) uyarılır. Sıcaklık stresi, transkripsiyonun ve translasyonun inhibisyonuna neden olurken, HSP'lerin anlatımını arttır. Bu da sıcaklık toleransının sağlanması ile sonuçlanır. Stres çok şiddetli ise, apoptotik benzeri hücre ölümüne ("apoptatic-like cell death" – "AL-PCD") yol açan sinyal yolları da aktive olur. HSP 60, HSP 70, HSP 90 VE HSP 100 sıcaklık stresine yanıtta anlatımı yapılan HSP'lerdir. Bu proteinleri kodlayan HSP genlerinin anlatımı HSF kontrolünde yapılır (Schoffl ve Prandl, 1998; Georgieva, 1999; Gurley, 2000; Waters, 2003).

Sıcaklık stresi bitkide ilk olarak, membran akışkanlığındaki değişiklikler ve protein homeostazının bozulması ile ortaya çıkar. Membran akışkanlığındaki değişiklikler lipid sinyalleri ve plazma membranlarındaki Ca^{+} kanalları olan termosensör ile saptanır. Ardından, membran akışkanlığındaki sıcaklık kaynaklı değişiklikler, lipid etkileşimlerini tetikler. Bitkiler, sıcaklıktaki ani artıştan birkaç dakika sonra, fosfolipitleri belirli hücre içi konumlara dağıtır: PLD ve PIPK aktive edilir. PA, PIP2 ve IP3 hücre içerisinde hızla birikir. PIP2 ve PA birikimi için gerekli olan ısıyla başlatılan sinyalin bu iletimi için, G proteininin aktif döngüsü gerekli

görünmektedir. Hücre dışı Ca^{2+}'un sitoplazmaya geçişi ile strese duyarlı genler ve transkripsiyon faktörleri tetiklenir. Protein homeostazının bozulması, nükleer histon sensörü, ER UPR ve sitolik UPR termosensörleri ile algılanır. Ardından, sensörlerin tetiklediği hücre içi stres mekanizmaları aktive olarak strese duyarlı genlerin, HSP'lerin transkripsiyon faktörleri ile düzenlenmesi sağlanır. Sonuç olarak termotolerans sağlanarak bitki hücresinin yaşamsal faaliyetleri devam ettirilir (Şekil 2.2) (Bokszczanin ve Fragkostefanakis, 2013).



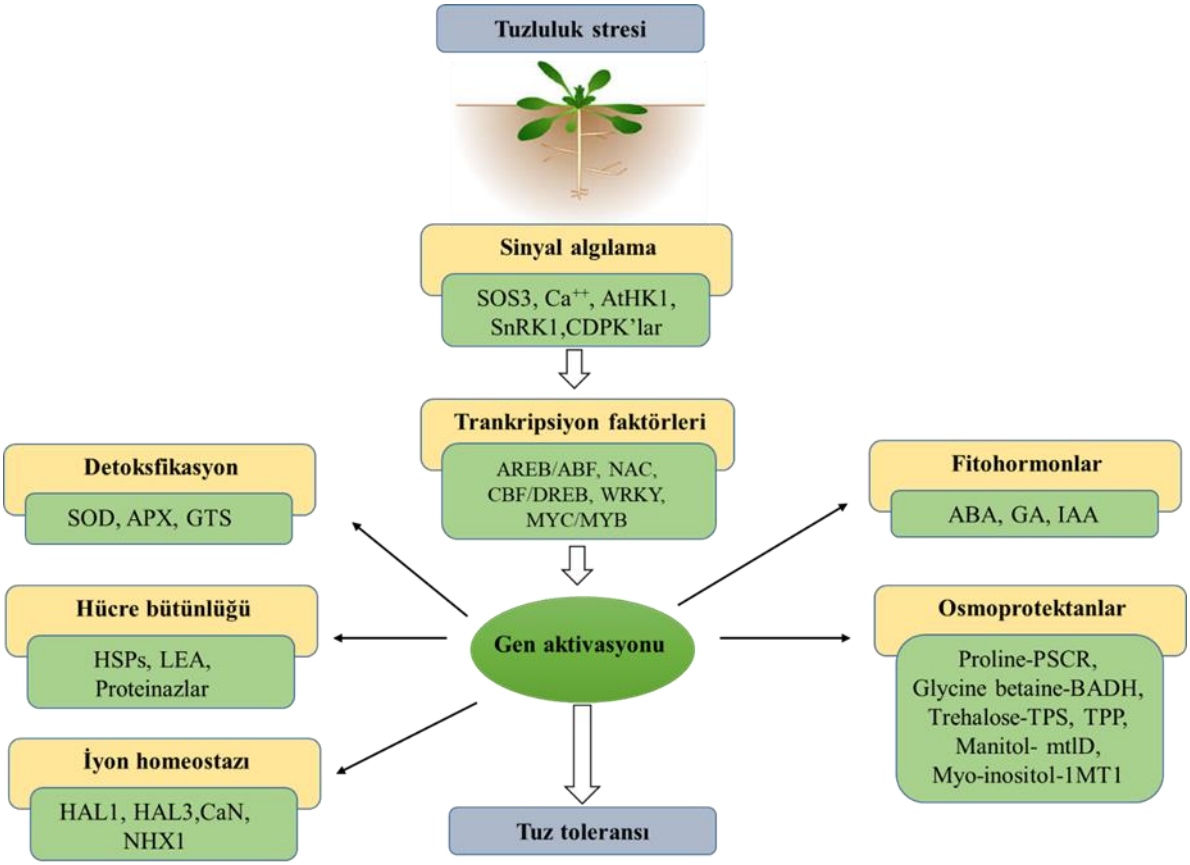
Şekil 2.2: Bitki termosensörleri ve ana sinyal iletim yollarının, sıcaklık stresi tepkisi ve sıcaklık toleransı şeması (Bokszczanin ve Fragkostefanakis, 2013).

Bitkilerin ısı şoku tepkisi (HSR) yüksek oranda korunmuştur ve HSR'yi tetiklediği varsayılan en az dört hücresel sensör bulunmaktadır (Mittler ve diğ. 2012). Bunlar; hücre içerisine bir kalsiyum akışı başlatan plazma membran (PM) kanalı, çekirdekte bir histon sensörü, endoplazmik retikulumda ve sitozolde iki katlanmamış protein sensörüdür (Saidi ve diğ. 2009; Sugio ve diğ. 2009; Bussell ve diğ. 2010; Kumar ve Wigge, 2010; Deng ve diğ. 2011). Bu varsayımsal sensörlerin her biri ısı toleransına yol açar. Bu sensörlerin her birinin benzer bir HSR genleri kümesini etkinleştirdiği düşünülmekte ve bu da gelişmiş toleransı sağlamaktadır (Mittler ve diğ. 2011).

2.2.1.2. Tuzluluk Stresi

Abiyotik stres çeşidi olan tuzluluk, birim hacim veya ağırlık bazında sularda ve toprakta bulunan çözünmüş mineral tuzlarının konsantrasyonudur (Läuchli ve Epstein, 1990). Tuzluluk stresi, kurak ve yarı kurak bölgelerde baklagil verimini sınırlayan ana faktörlerden biridir (Lluch ve diğerleri, 2007). Tuzluluk stresi, fotosentezi ve hormonal düzeni bozarak, baklagillerde, beslenme dengesizliğine, iyon toksisitesine, ozmotik etkilere neden olarak tohum verimini ve kalitesini düşürür. Tuzluluk stresi, embriyodaki su alımını engelleyerek ve iyonların neden olduğu toksik etki nedeniyle tohum çimlenme oranını %50'den fazla azaltır (Farooq ve diğ. 2017). Tuzluluk stresinin bitki büyümesi ve mahsul üretimi üzerinde negatif etkileri olduğundan bitkilerde tuz toleransı mekanizmasının anlaşılması gereklidir (Fahad ve diğ. 2013). Hücrenin dış ortamda yüksek seviyelerde NaCl mevcutsa, sodyum taşıyıcılarının zayıf bağlama özellikleri nedeniyle sodyum iyonu aktif olmayan bir şekilde ve spesifik olmayan kanallar yoluyla bitki köklerine doğru hareket eder. Tuzluluk stresi toleransının geliştirilmesi, tüm bitkinin hücre, doku ve organ düzeyinde dahil olduğu karmaşık bir süreçtir (Munns ve Tester, 2008).

Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip topraklarda hayatta kalabilmek için bitkiler çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalar geliştirmişlerdir. Ana mekanizmalar arasında, iyon homeostazı, iyon aktarımı-alımı ve ozmolitlerin biyosentezi, antioksidan enzim aktivasyonu ve antioksidan bileşiklerin sentezi, poliamin sentezi, nitrik oksit (NO) üretimi ve hormonal düzenleme bulunur (Şekil 2.3) (Gupta ve Huang, 2014).



Şekil 2.3: Bitkilerin tuzluluk stresine verdiği tepkileri.

Tuz stresine uyum, stres uyarılarının algılanmasıyla başlar. Tuz stresinin tetiklediği sinyaller, sensör proteinleri tarafından algılanır ve bu stres sinyalleri takip eden sinyalleme süreçlerini ve transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gen aktivasyonunu tetikler. Tuzluluk stresine maruz kalan bitki kökleri ile Na^+ alarak diğer hücre, doku ve organlarına iletir. Sonuçta, membran potansiyeli Na^+ akışı ile bozulur (Maathuis ve Amtmann, 1999; Maathuis ve diğ. 2014). Hücre içerisindeki fazla Na^+ toksik etkisi ile enzimleri çalışamaz hale getirir. Yüksek Na^+ konstrasyonu nedeniyle bozulan osmotik denge ile hücre bölünmesi engellenir, dolayısıyla bitki büyümesi yavaşlar (Yeo, 1998; Hasegawa ve diğ. 2000).

Tuzluluk stresi, stresin şiddetine ve süresine bağlı olarak çeşitli fizyolojik ve metabolik süreçlerdeki değişiklikleri içerir. Başlangıçta, toprak tuzluluğunun bitki büyümesini ozmotik stres şeklinde bastırdığı ve ardından iyon toksisitesini takip ettiği bilinmektedir. Tuzluluk stresinin ilk aşamasındaki ozmotik stres, membranların kesintiye uğraması, besin dengesizliği gibi çeşitli fizyolojik değişikliklere neden olur. Ayrıca, fotosentetik aktivitede ve stomatal

açıklıkta azalmaya sebebiyet verir (Rahnama ve diğ. 2010; James ve diğ. 2011). Tuzluluk stresi hiperiyonik stres olarak kabul edilir. Tuzluluk stresinin en zararlı etkilerinden biri, yüksek NaCl konsantrasyonlu topraklara maruz kalan bitkilerin dokularında Na^+ ve Cl^- iyonlarının birikmesidir. Tuzluluk stresine yanıt olarak, ROS üretimi artar. Bu da proteinler, lipidler ve DNA gibi çeşitli hücresel bileşenlerde oksidatif hasarlara yol açarak bitkilerin hayati hücresel işlevlerini kesintiye uğratır (Ahmad ve diğ. 2012)

İyon homeostazı ve tuz toleransında SOS stres sinyal yolunun rolü bilinmektedir. SOS sinyal yolu SOS1, SOS2 ve SOS3 olarak üç ana proteinden oluşur. Bir plazma membranı olan Na^+/H^+ antiporter'ı kodlayan SOS1, hücre düzeyinde Na^+ dışa akışını düzenlemede önemlidir. Bu proteinin aşırı anlatımını ise bitkilerde tuz toleransı sağlar (Shi ve diğ. 2000, 2003). SOS2 geni Ca^+ sinyalleri ile aktive edilir ve serin/treonin kinazı kodlar. SOS stres sinyalleme yolunda yer alan üçüncü tip protein, Ca^+ bağlayıcı protein olan ve N-terminalinde bir miristilasyon bölgesi içeren SOS3 proteinidir. SOS3, tuz toleransı sağlamada önemli bir rol oynar. Membranlar ise, iyon alımını ve taşınmasını düzenleyerek stres süresi boyunca sitozol içindeki iyon konsantrasyonunun korunmasında önemli rol oynar. İyonların taşınması farklı taşıyıcı proteinler, kanal proteinleri, antiportörler ve simporterler tarafından gerçekleştirilir. Hücresel Na^+/K^+ homeostazının sürdürülmesi, tuzlu ortamlarda bitkilerin hayatta kalması için çok önemlidir. Arabidopsis'te, tuz stresi altında Na^+/K^+ homeostazının ROS'a bağlı regülasyonunda Arabidopsis NADPH oksidaz AtrbohD ve AtrbohF'nin işlev gördüğü bildirilmiştir (Sairam ve Tyagi, 2004; Liu ve diğ. 2006; Ma ve diğ. 2012). K^+ taşıyıcılarını ve kanallarını kodlayan HKT ve NHX gibi çok sayıda gen ve protein, çeşitli bitki türlerinde tanımlanmıştır (Ma ve diğ. 2012).

Ozmolit terimi, yüksüz, polar ve doğada çözünür olan, yüksek konsantrasyonlarda bile hücresel metabolizmaya zarar vermeyen, kimyasal olarak çeşitli organik bileşikleri tamamlamak için kullanılır. Ozmolitlerin temel işlevleri, yapıyı korumak ve hücre içindeki ozmotik dengeyi sürekli su akışı yoluyla sağlamaktır (Hasegawa ve diğ. 2000). Prolin birikimi, tuzluluk stresinin hafifletilmesi için önlemdir (Matysik ve diğ. 2002; Saxena ve diğ. 2013). Tuzluluk stresi sırasında biriken hücre içi prolin, strese karşı tolerans sağlamakla kalmaz, aynı zamanda stresten sonra hücre homeostazının sağlanması sırasında organik bir nitrojen rezervi olarak da hizmet eder. Bitki sistemi içinde bulunan en yaygın poliaminler (PA) putresin, spermidin ve spermindir (Gill ve Tuteja, 2010; Hasanuzzaman ve diğ. 2013b). PA biyosentetik yolu, bitkiler dahil birçok organizmada kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve ayrıntılı olarak incelenmiştir

(Kusano ve diğ. 2007; Alet ve diğ. 2012). Arabidopsis'teki poliamin biyosentez yolu altı ana enzimi içerir: ADC (ADC1 ve ADC2); SPDS (SPDS1 ve SPDS2) ve SAMDC (SAMDC1-4) (Hanzawa ve diğ. 2002). Bitki tuzluluk stresine maruz kaldığında endojen poliamin seviyelerinde artış bildirilmiştir. Hücre içi poliamin seviyesi, poliamin katabolizması ile düzenlenir. Bu enzimler stres toleransında önemli bir rol oynar (Cona ve diğ. 2006; Takahashi ve Kakehi, 2010)

ABA, bitkiye uygulanması stres koşullarının etkisini iyileştiren önemli bir fitohormondur. Tuzluluk stresi ozmotik strese ve su açığına neden olarak sürgünlerde ve köklerde ABA üretimini arttırır. ABA birikimi ile tuzluluk toleransı arasındaki pozitif ilişki vardır. Transkripsiyon faktörleri, stres koşulları altında, gen ifadelerini kontrol eden en önemli düzenleyiciler olarak kabul edilir. Bunlar arasında *bZIP*, *WRKY*, *AP2*, *C2H2* ve *DREB* genleri vardır. Tuza duyarlı buğday kültivarında, uzun süreli tuzluluğa maruz kalındığında *bZIP* genlerinin anlatımının arttığını gözlemlemiştir (Johnson ve diğ. 2002). Çok sayıda gen ve transkripsiyon faktörü, çeşitli işlevlere hizmet eden farklı bitki türlerinde tuzluluğa yanıt olarak yukarı regüle edilir. Bu genler esas olarak aşağıdaki fonksiyonel kategorilerde sınıflandırılır: iyon taşıma veya homeostaz (örneğin, *SOS* genleri, AtNHX1 ve H+-ATPase), yaşlanma ile ilişkili genler (örneğin, SAG), moleküler şaperonlar (örneğin, HSP) ve dehidrasyon ile ilgili transkripsiyon faktörleri (örneğin, DREB) (Roshandel ve Flowers, 2009).

2.3. UBİKİTİN PROTEAZOM SİSTEMİ VE F-BOX GEN AİLESİ

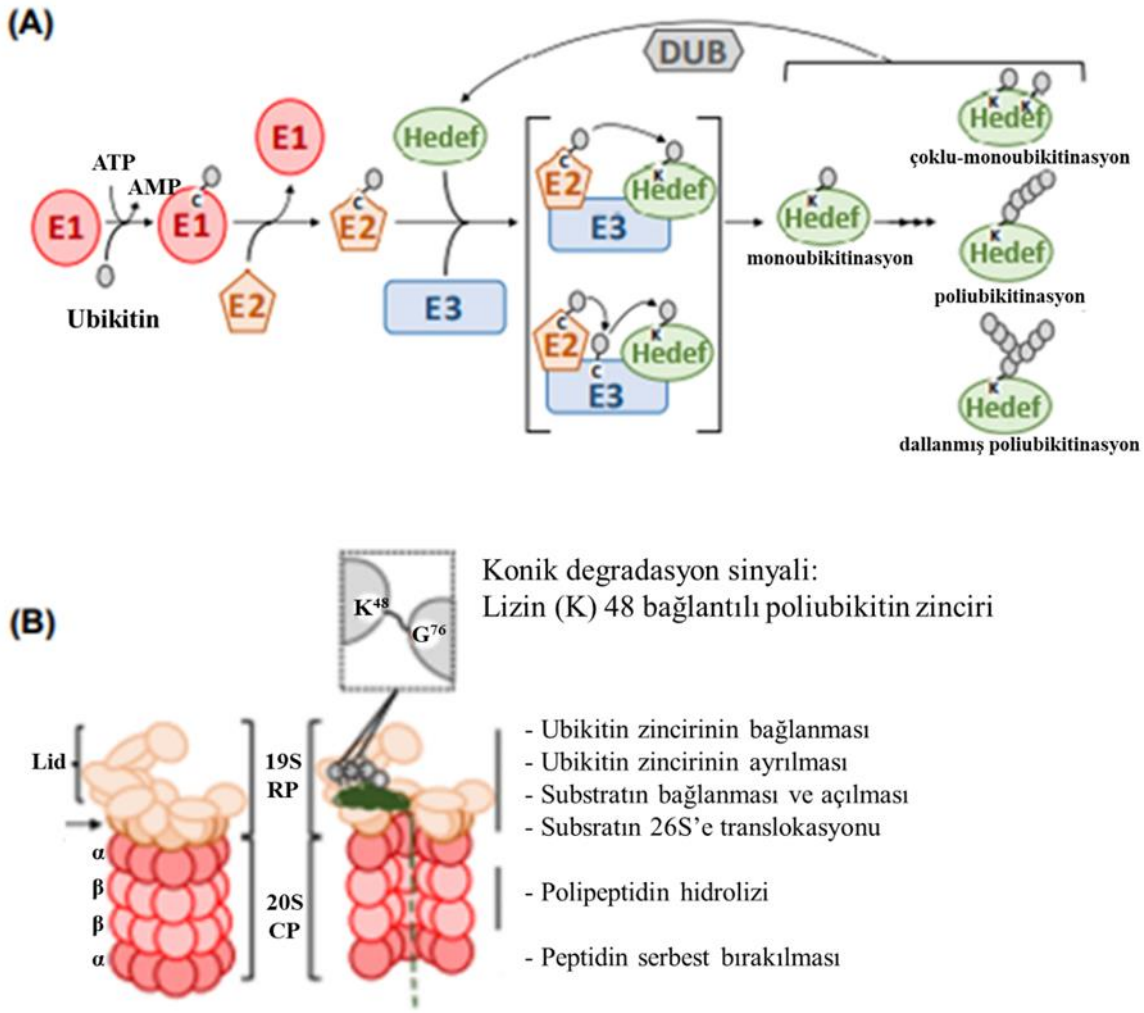
Ubikitin proteazom sistemi, ökaryotlarda görülen protein yıkım sistemidir (Mazzucotelli ve diğ. 2006). Yapılan çalışmalar, ubikitin proteazom sisteminin hücre döngüsü kontrolü, gelişim, biyolojik saatin dengelenmesi ve sinyal iletimi gibi hücresel aktiviteleri kontrol ettiğini göstermektedir (Muratani ve Tansey, 2003; Smalle ve Vierstra, 2009). Bu mekanizma, 26S proteazomu tarafından bozunmaları için hedef proteinlere poliubikitin zincirlerinin bağlanmasını katalize eden ubikitin E3 ligazları olan çeşitli tiplerde enzimler kullanır ve E3 enzimleri arasında, “SCF” en iyi anlaşılanıdır. SCF, F-box proteininin hedef substratı tanıyarak çok önemli bir rol oynadığı çoklu protein kompleksinden oluşur. Çarpıcı bir şekilde, Arabidopsis'te yaklaşık 700 F-box proteini belirlenmiştir. Bu bilgi bitkilerin çok sayıda SCF kompleksini bir araya getirme kapasitesine sahip olduğunu ve muhtemelen çok sayıda biyolojik süreçte yer alan yüzlerce substratın stabilitesini kontrol ettiğini göstermektedir. İlginç bir

şekilde, virüsler ve hatta patojenik bakteriler de bitkinin SCF'sini ele geçirmek ve kendi amaçları için yeniden programlamak için temel yollara sahiptir (Lechner ve diğ. 2006).

Bir bitkinin abiyotik stresle mücadele yeteneği büyük ölçüde proteomik plastisiteye dayanır. Ubikitin proteazom sistemi, abiyotik stresleri etkili ve verimli bir şekilde algılamak ve bu streslere tepki vermek için bitkilerin proteomlarını değiştirmelerine olanak sağlayarak çok önemli bir rol oynar (Smalle ve diğ. 2003; Kurepa ve diğ. 2008). Abiyotik stres toleransının ubikitin proteazom sistemi ile ilişkisinin en önemli göstergelerinden biri, yüksek sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde ubikitin gen anlatımının arttığı bulgusudur (Genschik ve diğ. 1992; Sun ve Callis, 1997). Ayrıca, monoubikitinin aşırı anlatımı tuzluluk ve kuraklık koşullarına toleransı arttırmıştır (Guo ve diğ. 2008). Ubikitin proteazom sistemindeki çoğu E2 enzimini kodlayan genin strese tepki verdiği saptanmıştır. Örneğin, *Glycine max* (Soya fasulyesi) UBC2, *Arachis hypogaea* (yer fıstığı) UBC2 ve Arabidopsis UBC32'nin transkript seviyeleri kuraklık ve/veya tuz stresine yanıt olarak artmıştır (Zhou ve diğ. 2010; Wan ve diğ. 2011; Cui ve diğ. 2012). Ancak, AtUBC32'nin geninin yüksek anlatımı bitkileri tuz stresine duyarlı hale getirmiştir (Cui ve diğ. 2012).

Ubikitin proteazom sistemi çok sayıda enzimin, yapısal ve düzenleyici proteinlerin yıkımından sorumlu ökaryotik hücrelerdeki başlıca proteolitik mekanizmadır. Sistem, birbirini takip eden iki aşamadan oluşur: birincisi, seçilen bir proteine bir ubikitin molekülleri zincirinin bağlanması ve ikincisi, modifiye edilmiş proteinin 26S proteazomu tarafından yıkılmasıdır. Ubikitinin, diğer proteinlere konjuge olabilme kabiliyetinin yanı sıra kendi başına poliubikitin zincirleri oluşturabilmektedir. Ubikitin konjugasyonu veya ubikitinasyonu, üç ubikitin enziminin (E1, E2 ve E3) ardışık eylemini gerektiren çok aşamalı bir süreçtir. Süreç, ubikitinin bir E1 tarafından enerjiye bağımlı aktivasyonu ile başlar. E1, üzerindeki korunmuş aktif bölgedeki sistin bakiyesini ve kendi üzerindeki ubikitinin C-terminal-karboksil grubunu kullanır. Ubikitin daha sonra E1'den E2 enzimi üzerinde korunmuş aktif bölgedeki sistin bakiyesine aktarılır. Son aşamada, E3 enzimi tarafından E2 enzimi üzerindeki ubikitin substrat üzerindeki lizin bakiyesine aktarılır. Bu aşamada Ubikitin terminal glisin (Gly76), substrat proteini üzerindeki lizin ile bir izopeptid bağı oluşumunda kullanılır. Substrata tek bir ubikitin eklenebileceği gibi (monoubikitin), ek ubikitin molekülleri hedef proteinin diğer lizin kalıntılarına (çoklu-monoubikitin) eklenebilir. Ayrıca, konjugasyon işleminin tekrarı, substratın tek bir lizini üzerinde birden fazla monobikitin zinciri (poliubikitin) oluşturabilir. Çoklu ubikitin

moleküllerinin, aynı önceki ubikitin üzerindeki farklı lizin kalıntılarına konjuge edildiği dallı zincirler de (dallanmış poliubikitin) üretilebilir. Ubikitinasyon tersine çevrilebilir proteolitik bir işlemdir. Deubikitinasyon enzimleri, ubikitin C-terminali ile substrat lizin bakiyelerinin amino grubu arasındaki izopeptid bağını hidrolize eden proteazlardır. Substrattan ubikitin molekülleri deubikitinasyon (DUB) enzimleri ile çıkarılarak, substrat deubikitine edilebilir. Açığa çıkan ubikitin molekülleri ise geri dönüştürülür. Süreç, ubikitine edilmiş proteinin bir multi proteaz kompleksi olan 26S proteazomu tarafından parçalanması ve ubikitin moleküllerinin geri dönüşümü ile sonlanır (Şekil 2.4).

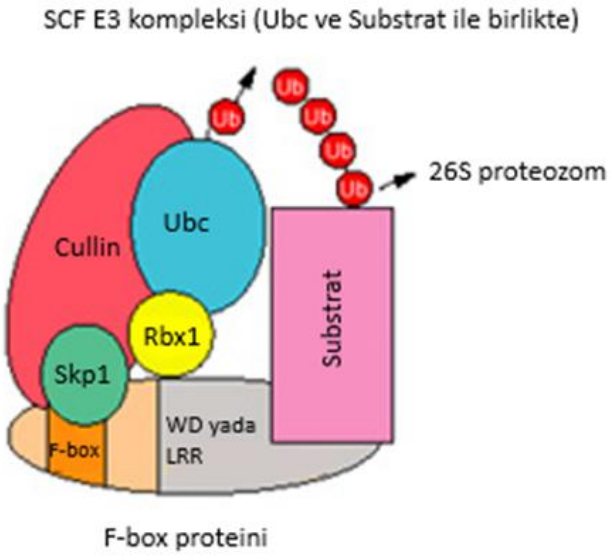


Şekil 2.4: Ubikitin proteazom sistemi. (A) Ubikitin enzimleri E1, E2 ve E3'ün işlevini gösteren ubikitinasyon yolu, (B) Her bir alt kompleksin bileşimini ve işlevini gösteren temsili 26S proteazomu (Stone, 2019).

Tipik bir F-box motifinin N-terminali yaklaşık olarak 40-60 amino asitlik korunmuş amino asit dizisi içerir. F-box proteinlerinin özelliği, 26S proteazomda gerçekleşen seçici protein yıkımında kritik rol oynamalarıdır. Bitki F-box gen ailesi bitkilerde bulunan en büyük gen ailelerinden biridir. F-box genleri çiçek gelişimi, bitki büyümesi-gelişimi, biyotik ve abiyotik strese cevap, hormonal düzenleme ve hücre yaşlanması gibi birçok önemli biyolojik süreçte görev yapar. Azotu fikse edebilen bakteriler olan Rhizobia ile nodül oluşturabilme kapasitesi ve insan diyeti açısından son derece önemli olan baklagil bitkilerinin genomlarında genellikle duplike halde bulunduğu belirlenen F-box protein genlerinin kritik baklagil özellikleri (ör; nodülasyon ve tohum olgunlaşması) ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Lechner ve diğ. 2006; Lyzenga ve Stone, 2012).

Ökaryotlarda, F-box proteinlerinin prokaryotlara göre daha fazla sayıda olduğu tespit edilmiştir (Jin ve diğ. 2004). 22 bakteri türünde ortalama 70 F-box bildirilmiştir (Abu Kwaik ve Price, 2010; Magori ve Citovsky, 2011). Hua ve diğ. (2011), sadece 100 FBP bulunduran *Chlamydomonas reinhardtii* hariç, 18 bitki türündeki F-box gen sayısının 159 ile 980 arasında olduğunu bildirmiştir. Bu kapsamlı çalışma aynı zamanda, ilgili organizmalarda bildirilen F-box genlerinin sayısına karşılık gelen F-box psödogenlerinin sayısını da vurgulamıştır. Örneğin, *Arabidopsis thaliana*'da 897 F-box genine karşılık 199 F-box psödogeni, *Brachypodium distachyon*'da 998 FBP genine karşılık 312 F-box psödogeni ve *Medicago truncatula*'da 1148 F-box genine karşılık 240 F-box psödogeni bildirilmiştir.

F-box proteinleri ilk olarak SCF ubikitin-ligaz (E3) komplekslerinin bileşenleri olarak tanımlanmıştır (Feldman ve diğ. 1997; Skowyra ve diğ. 1997). SCF kompleksleri dört bileşen içerir: Skp1, cullin, Rbx1/Roc1/Hrt1 ve F-box proteini (Craig ve Tyers, 1999; Deshaies, 1999; Tyers ve Jorgensen, 2000). SCF kompleksleri, substratlar ve ubikitin-konjüge edici enzimler arasındaki etkileşimi kolaylaştırır, bu daha sonra ubikitini substratlara kovalent olarak aktarır. Poli-ubikitinlenmiş substratlar daha sonra 26S proteazomu tarafından parçalanır (Hershko ve Ciechanover, 1998). F-box proteini, spesifik substratları bağlayan SCF kompleksinin alt birimidir ve Skp1'i kendisi aracılığıyla bağlayarak komplekse tutunmayı sağlar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: SCF kompleksi. F-box proteini, F-box ve Skp1 arasındaki etkileşim yoluyla SCF kompleksine bağlanır. Bir ubikitin konjüge edici enzim (Ubc), SCF kompleksine bağlanır ve ubikitini (Ub), F-box proteini tarafından bağlanan substratlara aktarır. Substrat, poli-ubikitinleştiğinde, 26S proteazomu tarafından bozulur (Kipreos ve Pagano, 2000).

Korunmuş F-box motifi Pfam, Prosite, Interpro veri tabanları aracılıyla belirlenebilmektedir. F-box motifinin dizisi, 3–4 α-sarmal yapılar oluşturmak için katlanır. F-box proteinleri, N-terminal bölgesinde F-box motifi bulunurken, C-terminal bölgesinde ise F-box proteinleri birkaç alt aileye sınıflandırılmasına neden olan WD40, lösin açısından zengin tekrarlar (LRR), kelch tekrarları, F- box ilişkili (FBA) veya TUBBY (TUB) gibi karakteristik ikincil bir motif bulunur (Abd-Hamid ve diğ. 2020). Diğer motiflerin çeşitliliği, F-box motiflerinin ökaryotik canlıların evrimi sırasında birçok kez mevcut proteinlere aktarıldığını göstermektedir (Kipreos and Pagano, 2000). LRR, çeşitli fonksiyonlara sahip proteinlerde bulunan 20-29 amino asitlik motifleridir. Bu motiflerin birincil işlevi, protein-protein etkileşimlerinin oluşumu için çok yönlü bir yapısal çerçeve sağlamak gibi görünmektedir (Kobe ve Kajava, 2001). Kelch tekrarları, ilk olarak Drosophila'da "sitoskeletal düzenleyici protein Kelch" olarak tanımlanmıştır. Yaklaşık 44-56 amino asit boyutunda olup protein-protein etkişiminde görev alır (Hudson ve Cooley, 2008). F-box proteinlerindeki FBA motifi ise 42-48 amino asit uzunluğunda olup ubikitinasyon ve proteazom aracılı degradasyon için substratları tanır. F-box

proteinlerinin C-terminali genellikle bir veya daha fazla yüksek oranda değişken protein-protein etkileşim motifi veya tekrarları içerir. Bunlardan biri TUBB motifi olup yaklaşık 250 amino asit uzunluğundadır (Yang ve diğ. 2008).

F-box proteinlerinin C-terminalinde bulunan WD40 tekrarlarını (WD veya beta-transdüsin tekrarları olarak da bilinir) içeren proteinler, protein-protein etkileşimi görevine sahiptir (Kuroda ve diğ. 2002). WD40 tekrarlarını içeren F-box proteinlerinin, protein komplekslerinin bağlanma bölgesi olarak görev aldığı bilinmektedir. N-terminalde bulunan WD40 tekrarları yaklaşık 40 amino asit içeren motiflerdir (Gupta ve diğ. 2015) ve F-box proteinlerinin N-terminalde bulunarak protein-protein etkileşimleri için spesifik bölgeler oluşturup iki veya daha fazla protein için bağlanma yerleri sağlar (Stirnimann ve diğ. 2010). WD40 tekrarının çeşitli özelliklere sahip 30 farklı ailede bulunduğu, sinyal iletimi, hücre bölünmesi ve RNA işleme gibi işlevlere sahip olduğu bildirilmiştir (Jia ve diğ. 2013; Yu ve diğ. 2000).

2.3.1. WD40 Tekrarları

WD40 tekrarları, bir triptofan ve bir aspartik asit (WD) ile 40-60 amino asit uzunluğunda ve protein-protein etkileşiminde etkili, F-box proteinlerinin N-terminalinde bulunan korunmuş dizilerdir. WD40 tekrarı, ilk olarak heterotrimerik G proteinlerinin Gβ alt biriminde ve CDC4 proteininde, yaklaşık 43 amino asitlik tekrarlayan bir dizi olarak tanımlanmıştır (Fong ve diğ. 1986). WD40 motifi, ökaryotik genomlarda en bol bulunan ilk on motif arasındadır (Stirnimann ve diğ. 2010). Bu nedenle WD40 motifi içeren proteinler ökaryotik organizmalarda sıklıkla bulunmaktadır, ancak prokaryotlarda nadiren bulunur. WD40 tekrar içeren proteinler, yapısal destek molekülleri olarak hareket eder ve protein aktivitesini teşvik ederek protein-protein veya protein-DNA etkileşimlerinde önemli bir rol oynar (Kong ve diğ. 2014; Miller ve diğ. 2016; Zhang ve diğ. 2020). Çalışmalar, WD-tekrarlarını içeren proteinlerin çeşitli hücresel faaliyetlerde rol oynadığını göstermiştir. Bu proteinlerin çoğunun düzenleyici işlevleri vardır. N-terminalde bulundurdukları tekrarlar sayesinde protein-protein etkileşimleri için spesifik bölgeler sunarlar. İki veya daha fazla protein için bağlanma yerleri sağlayabilirler ve daha büyük proteinlerin modüler etkileşim alanı olarak işlev görebilirler (Van Nocker ve Ludwig, 2003; Stirnimann ve diğ. 2010). WD40 tekrarının çeşitli işlevlere sahip 30 farklı ailede bulunduğu, sinyal iletimi, hücre bölünmesi ve RNA işleme gibi işlevlere sahip olduğu bildirilmiştir (Yu ve diğ. 2000). WD-tekrarı içeren proteinlerin çoğu çiçek gelişimi, meristem organizasyonu, RNA işleme, kromatin modifikasyonu ve transkripsiyon gibi düzenleyici

işlevlere sahiptir (Van Nocker and Ludwig, 2003; Stirnimann ve diğ. 2010). WD40 tekrarları içeren proteinler biyoinformatik yöntemler ile birçok bitkide incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada, WD40 tekrarı içeren bir proteini kodlayan *TaWD40D* geninin buğday bitkisinde tuz stresi ve ozmotik strese karşı bitki tepkilerininde pozitif bir düzenleyici olarak işlev gördüğü Kong ve diğ. (2015) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca, Arabidopsis'te TaWD40D'nin artan gen anlatımının, tohum çimlenmesi ve fide gelişimi sırasında absisik asit (ABA), tuz stresi ve ozmotik strese karşı bitki toleransını büyük ölçüde artırdığı bilinmektedir. Elde ettikleri sonuçlar ile *TaWD40D*'nin bitkilerde tuz ve ozmotik strese karşı, stres toleransının genetik olarak iyileştirilmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Huang ve diğ. (2008) tarafından yapılan bir genom araştırmasında, pirinçte strese duyarlı 5 genin duyarlı WD40 proteinlerini (SRWD1-5) kodladığı belirlenmiştir. Bu proteinlerden SRWD1'i pirinç çeşitlerinin tuz stresine duyarlılığı ile ilişkilendirmişlerdir. Tilki kuyruğu bitkisinde WD40 proteinini kodlayan başka bir gen olan *SiWD40*'ın çeşitli abiyotik streslere karşı anlatımının arttığı belirlenmiştir (Mishra ve diğ. 2012). Arabidopsis'de ise WD40 tekrarı içeren GIGANTUS1'in (GTS1) protein etkileşimi yoluyla tohum çimlenmesine ve biyokütle birikimine aracılık ettiği gösterilmiştir (Gachomo ve diğ. 2014). Çeşitli bitkilerde alınan bu sonuçlar, bitki stres yanıtlarında WD40 tekrarı içeren proteinlerin önemini ve WD40 tekrarlarının fonksiyonel analizlere ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır.

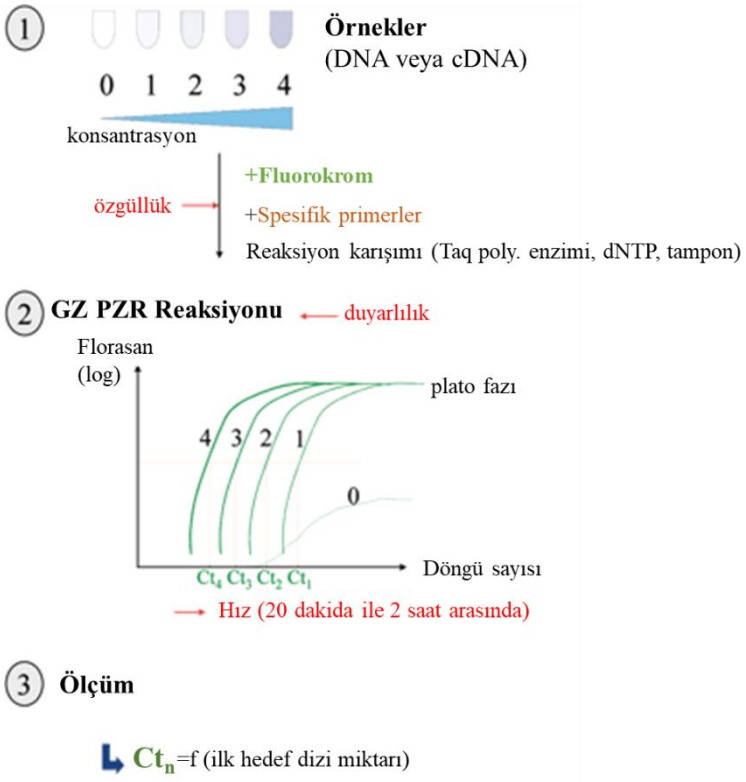
Yukarıda belirtildiği gibi sadece F-box ya da sadece WD40 motiflerini içeren protein genlerinin stresle olan ilişkisi incelenmiş ancak her iki motifi de içeren proteinlerin stresle ilişkisi incelenmemiştir. Bu nedenle çalışmamızda ilk kısımda baklagillere ait F-box/WD40 genleri biyoinformatik araçlarla belirlenmiş, genlerin abiyotik stres çeşitlerinden sıcaklık ve tuzluluk sırasında bir rolü olup olmadığına dair gen anlatım analizleri ekonomik önemi yüksek *M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinum*'da ilk kez gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık uygulaması 38^{o}C'de 1 ve 2 saat olarak, tuzluluk uygulaması 180 mM NaCl içeren besiyerinde 6, 24 ve 48 saat olarak uygulanmış olup, olası baklagil F-box/WD40 gen anlatımları GZ PZR ile analiz edilmiştir.

2.4. GEN ANLATIM ANALİZLERİ VE GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Organizmaların hücresel aktiviteleri gen anlatım mekanizmalarının bir sonucu olarak gerçekleştirilir. Dolayısıyla, dış uyaranlara karşı değişen gen anlatım profillerinin analizi biyolojik araştırmaların önemli bir bölümünü oluşturur. Hücre içerisindeki tüm sistemin nasıl işlendiğinin aydınlatılması için, DNA molekülünde yer alan kalıtsal bilginin hangi koşullarda nasıl, ne zaman ve ne kadar kullanıldığının belirlenmesi moleküler biyoloji çalışmaları için gereklidir. Organizma veya hücre çevresindeki değişen koşullar gen anlatımına yansır. Dolayısıyla, gen anlatımıyla beraber protein sentezide değişir (Tarhan, 2009; Derveaux, 2010).

Gen anlatımı analizi ilk kez Alwine ve diğ. (1977) tarafından Northern melezleme ("Northern blotting") yöntemi kullanılarak RNA miktarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Gen anlatımının belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem ise gerçek zamanlı PZR (GZ PZR; "Real-time PCR")'dir. Son yıllarda, GZ PZR gen anlatımı analizlerinin yapıldığı biyolojik araştırmalar için güvenilir olarak kullanılan bir yöntemdir. GZ PZR yönteminin temeli, 1985'te Kary Mullis tarafından keşfedilen ve 1993'te Nobel Ödülü almasını sağlayan; hedef DNA parçasından milyonlarca kopya oluşturulmasına olanak tanıyan devrim niteliğindeki PZR yöntemine dayanmaktadır. GZ PZR'nin temel amacı, PZR reaksiyonu sırasında gerçekleşen kopya çoğaltımını anlık olarak izlemektir. Çoğaltılan gen parçalarının anlık olarak izlenmesi floresan boyaların kullanımı ile sağlanır. Amplifikasyon sırasında, floresan sinyalin eşik değerin üzerine çıkacak şekilde artışı, hedef dizinin başlangıç miktarı ile ilişkilidir. GZ PZR ile sınırlı doku örneğinden, özellikle düşük RNA konsantrasyonlarına sahip dokulardaki az sayıdaki mRNA'nın hassas miktar değişimlerinin aydınlatılması için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Derveaux ve diğ. 2010).

GZ PZR, bağımsız örneklerde bulunan bir hedef gen ürününün farklı miktarlarını doğru bir şekilde ölçmek için kullanılır. GZ PZR yönteminde, numuneler önceden RNA'dan ters transkripsiyonla cDNA'ya çevrilir. Her örnek, yalnızca belirli bir gen bölgesi tanındığında florasan ışıma veren, reaksiyon karışımında bulunan bir florokromla birlikte GZ PZR amplifikasyonuna tabi tutulur. Spesifik hedefin bilinen başlangıç miktarları kullanılarak paralel çalışmalardan bir kalibrasyon eğrisi çizilir. Bu şekilde örnekte bulunan hedef miktarının hesaplanmasına izin verir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: GZ PZR özeti (Gachon ve diğ. 2004).

Gerçek zamanlı PZR bileşenleri klasik PZR ile neredeyse aynı olmakla beraber, SYBR Green gibi ışıma yapabilen boyalar veya reaksiyonu daha da özgünleştiren problar içermektedir. Floresan boyaların ışıma düzeyleri GZ PZR cihazı tarafından okunarak hedef nükleik asitin anlatımı kantitatif şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Sonrasında, GZ PZR döngü grafiği ve reaksiyon sonunda elde edilen kopya ürün miktarı ile veri analizi yapılır. Bir GZ PZR sonunda oluşan grafik üssel, doğrusal ve durağan faz olarak üç fazda incelenir. Döngü sonunda ürünün üssel faza geçtiği andaki değer Ct ("Cycle Treshold") değeri, anlatımın kantitatif analizinde 2-ΔΔCt metodu yaygın olarak kullanılmaktadır. GZ PZR çalışmalarında içsel kontrol genleri olarak GAPDH, β-aktin ve 18S rRNA sıklıkla tercih edilmektedir. Referans genlerin Ct değerinin test genlerinden daha düşük olması önem arz etmektedir (Derveaux ve diğ. 2010).

2.5. BİYOİNFORMATİK

Biyoinformatik disiplini, bilgisayar ve biyolojik bilimleri birleştirirerek, biyoloji temelli soruları yanıtlamaktadır. İlk olarak 1968 yılında kullanılan biyoinformatik terimi, aynı zamanda "hesaplamalı biyoloji" olarak da anılmaktadır. Biyoinformatik, özellikle moleküler genetik ve genomiğe uygulanan bir alan olup, bilgisayar kullanılarak biyokimyasal ve biyolojik bilgilerin toplanması, sınıflandırılması, depolanması, analizini ve yorumlanmasını kapsamaktadır (Sharma ve Sarkar, 2013).

Son yıllarda gelişen moleküler teknikler sonucunda ortaya çıkan büyük verilerin depolanması, analizi ve yorumlanması için biyoinformatik bilimine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, Dünya genelinde en sık kullanılan, temel moleküler ve genetik çalışmalarında ortaya çıkan verilerin anlaşılmasında, karmaşık verilerin analizinde ve yorumlanmasında en yeni süreçlerin ve araçların geliştirilmesinde etkin bir kurum olan “National Center for Biotechnoloy Infotmation (NCBI) 1998 yılında kurulmuştur. İnsan genom projesiyle birlikte önemi katlanarak artan biyoinfotmatik disiplini, moleküler çalışmalardan biyoteknolojiye, ilaç tasarımından endüstriyel üretime kadar birçok süreçte kullanılır hale gelmiştir. Bunun en önemli sebepleri arasında pahalı ve zaman alıcı süreçlerin bilgisayar ortamında gerçekleştirilebiliyor oluşudur. Biyoinformatik hem bu süreçlerin maliyetini hem de gerçekleşme süresini kısaltmaktadır. Ayrıca, bir çalışmaya ait ilk sonuçların alınmasında kullanılması ile deneysel süreçlerin geliştirilmesine ön ayak olmaktadır. Biyoinformatik, günümüzde ilaç tasarımının yanında medikal tanı ve tedavi alanında da kullanılmaya başlanmıştır.

Proteinlerin yapısını belirlemede kullanılan deneysel yöntemlerin çok pahalı olması ve deney sürelerinin uzun olması nedeniyle, protein veri bankaları oluşturulmuş ve veri setleri oluşturularak proteinlerin yapıları istatiksel olarak incelenmiştir. Bu veri setleri protein-protein, protein-DNA ve protein-RNA etkileşimlerini incelemek için de kullanılmaktadır. Biyoinformatik araçlar ilk geliştirildiğinde dizi analizleri için kullanılmıştır. Ancak günümüzde; genomik, yapısal biyoloji, gen anlatımı, filogenetik gibi geniş bir konu aralığında kullanım bulmaktadırlar. Biyoinformatik çalışmaları iki temel prensibe dayalıdır. İlki, biyolojik olarak anlamlı benzerliklere göre verilerin kıyaslanması ve gruplanması, ikincisi ise veri türünün analiz edilmesidir (Polat ve Karahan, 2009).

Biyoinformatik, stres biyolojisi de dahil olmak üzere birçok biyolojik araştırma alanında sıklıkla faydalanılan bir alandır. Bu çalışmalar kapsamında üretile verilerin fazlalığı, uygun yönetim ve analiz araçlarını gerekli kılmıştır. Yazılım, veritabanları ve web kaynakları biyoinformatik araçlar stresle ilgili araştırmalarda sıklıkla kullanılır hale gelmiştir. Bu kaynaklar, deneyler yoluyla oluşturulan verilerin analizine ve karşılaştırmalı olarak yorumlanmasına yardımcı olur (Kumar ve Shanker, 2018). Biyoinformatik disiplini kapsamında üç önemli alt disiplin vardır. Bunlar; (i) büyük biyolojik veri kümeleri arasındaki farklı ilişkileri değerlendirmek için yeni algoritmalar ve modellerin geliştirilmesi, (ii) nükleotid ve amino asit dizilerinin, analizi, görselleştirilmesi ve yorumlanması, (iii) farklı bilgi türlerine verimli erişim ve yönetim sağlayan araçların geliştirilmesi ve uygulanmasıdır (Pal ve diğ. 2006). Bu nedenle, biyoinformatik "biyolojik makromoleküllerle ilişkili bilgileri organize etmek, analiz etmek, anlamak, görselleştirmek ve depolamak için hesaplama araçlarının uygulanması" olarak da tanımlanabilir (Diniz ve Canduri, 2017). Günümüzde, biyoinformatik araçlar, sunucular ve biyolojik veritabanları gibi farklı biyoinformatik kaynaklar geliştirilmiştir. Biyolojik veritabanları genomik, proteomik, metabolomik, gen anlatımı, filogenetik vb. biyolojik veri türleri dikkate alınarak geliştirilmiştir. Genbank, EMBL-EBI, UniProtKB/Swiss-Prot, PDB, KEGG ve Ensembl Plants günümüzde sıklıkla kullanılan veri tabanlarıdır. Şimdiye kadar birçok biyolojik sorunu çözmek için biyoinformatik alanında farklı araçlar ve teknikler geliştirilmiştir. BLAST, MAFFT, SWISSMODEL, ClustalW, STRING, AutoDOCK ve MEGAX ise bunlardan başlıcalarıdır (Kumar ve Shanker, 2018).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. C-TERMİNALİNDE W40 DOMAİNİ İÇEREN F-BOX DİZİLERİNİN TARANMASI VE BİYOİNFORMATİK ANALİZİ

F-box proteinin kodlayan genler *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* genomlarında manuel BLAST kullanılarak arandı. Genomlardan filtre edilen F-box dizilerinden sadece F-box (PF00646) ve WD40 (PF00400) tekrarları içerenler filtrelendi. İlgili gen ve protein dizileri daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere FASTA formatında depolandı.

NCBI BLAST kullanılarak yapılan taramada (varsayılan ayarlarda), XP_007141583.1, XP_004491170.1 ve XP_003617076.1 proteinlerinin *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki homoloğunun AtMET30 (At5g21040) olduğu belirlendi. XP_003599502.1, XP_007149035.1 ve XP_004514570.1 proteinlerinin *A. thaliana* bitkisindeki homoloğunun AtWD40/YVTN (NP_001190063.1) olduğu belirlendi.

3.1.1. F-BOX/WD40 Tekrarlarının Dizi Analizleri

Medicago truncatula, *Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* bitkilerine ait protein dizilerinin komşu birleştirme yöntemine (Neighbor-joining method) dayalı filogenetik ağacı MEGA X programı ile varsayılan ayarlar kullanılarak oluşturuldu (Kumar ve diğ. 2018). Yine MEGA X programı ile proteinlerin çoklu dizi hizalaması yapıldı. F-box/WD40 proteinlerinin motif analiz ScanProsite ile yapıldı (de Castro ve diğ. 2006). F-box/WD40 protein dizilerinin benzerlik matrisi ClustalW ile varsayılan ayarlar kullanılarak yapıldı (Sievers ve diğ. 2011). Proteinlerin 3 boyutlu yapıları ise SWISS-MODEL ile varsayılan ayarlar kullanılarak oluşturuldu (Waterhouse ve diğ. 2018). Tüm analizler adı geçen biyoinformatik araçlarının "varsayılan ayarları" kullanılarak yapıldı.

3.2. PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Baklagil proteinlerinin analizi hem işlevsel hem de fiziksel protein-protein etkileşimlerinin değerlendirilmesini sağlayan bir veri tabanı olan STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins system) ile varsayılan ayarlar kullanılarak yapıldı (Szklarczyk ve diğ. 2019).

3.3. BİTKİ MATERYALLERİ

Ticari olarak satın alınan Leguminosae (Fabacea) ailesi üyelerinden *Medicago truncatula, Phaseolus vulgaris, Cicer arietinum* bitki tohumları *in vitro* çimlendirildi. *Medicago truncatula* 30 gün, *Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* 15 gün yetiştirildikten sonra tuzluluk ve sıcaklık stresi uygulanmıştır. Stres koşulları uygulanan bitkiler kök, gövde ve yaprak olarak ayrılıp sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra toplam RNA izolasyonu için -80°C'de muhafaza edildi.

3.4. BESİYERİ HAZIRLANMASI

Medicago truncatula, Phaseolus vulgaris, Cicer arietinum bitki tohumlarının çimlendirilmesi amacıyla Murashige ve Skoog (MS) katı besiyeri kullanıldı (Murashige ve Skoog, 1962). Besiyerleri Tablo 3.1'de miktarları belirtilen bileşenler kullanılarak hazırlandı ve 5N NaOH ile pH 5.7'ye ayarlandı. Hazırlanan besiyeri otoklavda (Nüve, OT 012) (121°C'de, 1.2 atmosfer basınçta, 15 dakika) steril edildi. Besiyerleri elle tutulur sıcaklığa (~40°C) geldiği zaman steril MS vitamini eklendi. Stres uygulaması amacı ile Tablo 3.1 verilen MS besiyerine 180 mM sodyum klorür eklenerek laminar akışlı kabin içinde cam tüplere dökülerek hazırlandı.

Tablo 3.1: MS besiyeri (1L) bileşenleri.

Besiyeri Bileşenleri	Miktar	Marka
Sukroz	30 gram	Multicell, 800-081-LG
MS Temel Tuz Karışımı	4,4 gram	Caisson Laboratories, MSP09-50LT
Agar	9 gram	Sigma, 05039
MS Vitamin (1 mg/mL)	1 mL	Sigma, 3900

3.5. TOHUMLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU

Yüzey sterilizasyonu amacıyla tohumlar sırasıyla %95'lik etil alkolde 15 saniye, %20'lik çamaşır suyunda (ACE klasik) 20 dakika boyunca bekletildi. Çamaşır suyunun uzaklaştırılması için 3 kez 10 dakika steril suda durulama gerçekleştirildi. Sterilizasyon işlemi tamamlanan tohumlar steril filtre kâğıdı üzerinde kurumaya bırakıldı. Tüm işlemler laminar akışlı kabin içerisinde gerçekleştirildi. Kuruyan *Medicago truncatula* tohumları Tablo 3.1'de verilen MS

katı besiyerini içeren 90 mm çaplı Petri kaplarına ekilip, kenarları parafilm ile sarılarak kapatıldı. *Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* tohumları 90 mm çapında 110 mm yüksekliğindeki kavanozlara ekildi ve kapakları kapatılarak, kenarları parafilm ile sarıldı. MS besiyerine ekilen tohumlar iklimlendirme kabininde [25±2°C, 16 saat ışık/8 saat karanlık, 1400 lux (Sanyo, MLR-352H)] çimlenmeye bırakıldı.

3.6. BİTKİLERE STRES UYGULAMALARI

Çimlenen tohumlar MS besiyerinin bulunduğu 13x130 mm boyutlarındaki steril cam tüplere aktarılarak, *M. truncatula* 30 gün, *Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* ise 15 gün kültürlendi. Çimlenen *Medicago truncatula* tohumları her bir tüpe 2 adet olacak şekilde, *Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* tohumları her bir tüpe 1 adet olacak şekilde ekildi. Bu çalışmada, Song ve diğ. (2015)'de kullanıldığı gibi tuz stresi olarak 180 mM NaCl ve sıcaklık stresi olarak 38°C uygulanmıştır. Kültürlenen bitkiler, tuzluluk stresi uygulaması amacıyla NaCl içeren MS besiyerine her bir cam tüpe 1 adet olacak şekilde aktarıldılar. Tuzluluk stresi uygulaması süresince (6, 24 ve 48 saat) 180 mM NaCl içeren besiyerinde kültürlenen bitkiler toplanarak kök, gövde ve yaprak örnekleri olarak ayrılıp, sıvı azotta dondurulduktan sonra -80°C'de toplam RNA izolasyon işlemine kadar muhafaza edildiler. Sıcaklık stresi uygulaması için MS besiyerini içeren cam tüplere aktarılmış bitkiler kullanıldı. Sıcaklık stresi uygulaması sonunda (1 ve 2 saat 38°C), bitkiler toplanarak kök, gövde ve yaprak örnekleri olarak ayrılıp bekletilmeden doğrudan toplam RNA izolasyonları yapıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Bitkilere stres uygulamaları.

Doku	**Sıcaklık**				**NaCl**					
	Kontrol (24°C)		**Uygulama (38°C)**		**Kontrol (0 mM)**			**Uygulama (180 mM)**		
Kök	1 saat	2 saat	1 saat	2 saat	6 saat	24 saat	48 saat	6 saat	24 saat	48 saat
Gövde										
Yaprak										

3.7. TOPLAM RNA İZOLASYONU

Stres uygulamalarından ve kontrol grubundan elde edilen örneklerden TRIzol (Hibrigen, MG-TRZ-01) RNA izolasyon solüsyonu kullanılarak toplam RNA izolasyonu yapıldı. Önceden 121^{o}C'de, 1.2 atm basınçta 30 dakika otoklav yapılarak steril edilmiş ve -20^{o}C'de soğutulmuş porselen havanlarda yaklaşık 100 mg bitki dokusu, sıvı nitrojen yardımı ile parçalanarak toz haline getirildi, ardından üzerine 1 mL TRIzol solüsyonu eklendi. Karışım 1,5 mL'lik Eppendorf tüplere alınarak oda sıcaklığında yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Ardından örneklerin üzerine 200 µL kloroform eklendi ve 15 kez yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı. Daha sonra 3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örnekler 4^{o}C'de 12.000 *xg*'de 20 dakika santrifüj edildi (NÜVE, NF800R). Santrifüj sonunda oluşan üst faz yeni bir Eppendorf tüpe alındı ve üzerine 500 µL izopropanol (Sigma, 24137) eklenerek yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra 4^{o}C'de 12.000 *xg*'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Sonrasında üst sıvı atılarak oluşan pelletlerin üzerine 1 mL %75'lik soğuk etanol eklenerek yıkama yapıldı ve 4^{o}C'de 7500 *xg*'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra pelletler 15-20 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletlerin üzerine 30-50 µL steril ve nükleaz bulundurmayan milliQ su eklendi. RNA pelletleri ısıtıcı blok (Biosan, TS-100C) ile 40^{o}C'de 25-30 dakika sürede çözündürüldü. RNA'lar daha sonra yapılacak cDNA sentezine kadar -80^{o}C'de saklandı.

3.8. İZOLE EDİLEN RNA MOLEKÜLLERİNİN KALİTATİF VE KANTİTATİF ANALİZİ

RNA örneklerinin saflıkları ve konsantrasyonları Nanodrop spektrofotometre cihazı (Thermo scientific, Nanodrop 2000) ile belirlendi. RNA örneklerinin saflıklarının belirlenmesi için A_{260}/A_{280} oranı kullanıldı. Ölçüm sonucunda 1.8-2.0 aralığına sahip RNA'lar saf olarak kabul edildi. RNA örneklerinin konsantrasyonu ise denklem 3.1'e göre µg/mL cinsinden hesaplandı. Saflığı ve konsantrasyonu uygun bulunan RNA'lar kadar –80°C'de saklandı.

$$\text{RNA } (\mu g/mL) = A_{260} \text{ x sulandırma katsayısı x } 40 \qquad (3.1)$$

Saflığı ve konsantrasyonu uygun bulunan RNA'ların bütünlüklerinin değerlendirilmesi için %1'lik agaroz jel kullanıldı. Agaroz jelin hazırlanmasından ve elektroforez tankında tampon olarak 50X Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponundan seyreltilen 1X TAE tamponu kullanıldı (Tablo 3.3). Agaroz jel (%1) hazırlamak için 0,40 g agaroz (Sigma, A5073) hassas olarak

tartıldıktan sonra üzerine 40 mL 1X TAE tamponu eklendi. Karışım mikrodalga fırın kullanılarak orta derecede 2 dakikada çözündürüldü. Soğuyan karışım üzerine 3 µL EtBr (10 mg/ml) (Sigma, E7637) eklendi. Uygun tarak yerleştirilen 60x90 mm jel kasetine (Thermo, EC 320) karışım döküldü. Soğuduktan sonra polimerize olan agaroz jel, 1x TAE tamponu ile doldurulan tankın içine yerleştirildi. 1 µL 6X yükleme boyası (Thermo Fisher, R0611) ve 5 µL RNA örneği karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Yükleme sonrası RNA örnekleri 85 V güçte 30 dakika boyunca jel elektroforezi sisteminde yürütüldü ve UV görüntüleme sisteminde (Avegene-Xlite 30R) 365 nm dalga boyu ile jel görüntüsü kayıt altına alındı.

Tablo 3.3: 1L 50X TAE hazırlamak için gerekli bileşenler ve konsantrasyonları.

Bileşen	Konsantrasyon
37,2 g EDTA (Merck, 324503)	50 mM
242 g Tris-base (Sigma, T-8524)	2 mM
57,1 mL Glasiyel asetik asit (Merck, 101830)	1 mM
ddH2O	1000 mL'ye tamamlanır ve pH 8.0'a ayarlanır.

3.9. cDNA SENTEZİ

Medicago truncatula, *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum* bitki dokularından izole edilen RNA'lardan "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" ile (Applied Biosystem, 00709629) Tablo 3.4'te verilen koşullar ve Tablo 3.4'te verilen bileşenler kullanılarak 20 µL hacimde PZR (BIORAD, T100) cihazında cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3.4: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Primer bağlama	25°C	10’
cDNA uzaması	37°C	120’
Enzim inaktivasyonu	85°C	5’
Saklama	4°C	∞

Reaksiyon Tablo 3.5’te sıralanan bileşenler kullanılarak gerçekleştirildi. 10X RT Random Primers, MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µL), 10X RT Buffer, 25X dNTP Mix (100 mM) ve Nükleaz içermeyen milliQ su bileşenleri cDNA sentez reaksiyonun ihtiyaç duyduğu hacim kadar tek bir tüpte toplanarak ana karışım hazırlandı. Hazırlanan ana karışım her bir PZR tüpüne 10 µL dağıtıldı. Ana karışımın üzerine 10 µL RNA (1000 ng) eklenerek hacim 20 µL’ye tamamlandı.

Tablo 3.5: cDNA sentez reaksiyon bileşenleri.

cDNA Reaksiyon Bileşenleri	Hacimleri
10X RT Random Primers	2 µL
MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1 µL
10X RT Buffer	2 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µL
RNA (1000 ng)	10 µL
Nükleaz içermeyen milliQ su	4,2 µL
Toplam Hacim	20 µL

3.10. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ PZR) gerçekleştirilerek kontrol grubu ve stres grubundan elde edilen cDNA’lar kalıp olarak kullanılmış ve gen anlatımları incelendi.

F-box/WD40 ilişkili genlerin anlatımlarını incelemek için Primer3 (v.0.4.0) programı kullanılarak uygun primerler tasarlandı (Tablo 3.6) (Untergasser ve diğ. 2012). Reaksiyon bileşenleri ve hacimleri 3.7'de, reaksiyon koşulları ise Tablo 3.8'de verildi. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları Roche marka LightCycler Nano cihazı ve LightCycler Nano programı (v.1.0.7.) ile yapıldı ve elde edilen C_t değerleri ile Denklem 3.2'ye göre $\Delta\Delta C_t$ değerleri belirlendi. Ardından $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak genlerin anlatımları kat değişimi olarak ortaya kondu.

$$\Delta\Delta C_t: [C_t(\text{uygulama})-C_t(\text{aktin})]-[C_t(\text{kontrol})-C_t(\text{aktin})] \quad (3.2)$$

Tablo 3.6: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer dizileri.

Primer	**Primer Dizisi**	**İleri/Geri Primer**
MtMet30	5'- TGATTCTGCGTAGTCTTGCT -3'	İleri
	5'- CAGATTCCGAATCCAGGACA -3'	Geri
MtWD40/YVTN	5'- GCGCTTCACCTACTTAACAC -3'	İleri
	5'- CTAAGAGAGAGAAGCTGCGT -3'	Geri
PvMet30	5'- TCTCCGATCCTATCCCAACT -3'	İleri
	5'- ATGGAGTCCTCGTCCAAATC -3'	Geri
PvWD40/YVTN	5'- GAGTTTCAAAGCCTCCACA -3'	İleri
	5'- CCTCCACACACAATTCGAT -3'	Geri
CaMet30	5'- GTTATTGCTTCGCGTAGGTC -3'	İleri
	5'- GGAGAATCGTGGAGACACAT -3'	Geri
CaWD40/YVTN	5'- CAACACATCAAAGCAATTCAGG -3'	İleri
	5'- CGAGGCATGTAATAGAAGGTCG -3'	Geri
AKTİN	5'- GAGACAGCCAGGACAAGCTC-3'	İleri
	5'- TTGGAACAGGACCTCTGGAC -3'	Geri

Tablo 3.7: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri	Hacimleri
SYBR Green Master Mix (2x) (Hibrigen, MG-SYBR-01)	10 µL
10 µM Primer	0,5 µL (İleri) 0,5 µL (Geri)
cDNA	1 µL
Nükleaz içermeyen milliQ su	8 µL
Toplam Hacim	20 µL

Tablo 3.8: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

	Aşama	Sıcaklık	Zaman
	Bekleme	50°C	1’
40 Döngü	Denatürasyon	94°C	30’’
	Primer bağlama	56°C(Aktin), 53°C (baklagil Met30), 58°C(baklagil WD40/YVTN)	30’’ 30’’ 30’’
	Uzama	72°C	30’’
	Bekleme	40°C	30’’

3.11. İSTATİKSEL ANALİZLER

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonunda gen anlatım analizlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde GraphPad Prism 8.4.3 programında çift yönlü ANOVA (Two-Way-ANOVA) Tukey testi kullanıldı. Test sonucunda $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Isı haritalarının oluşturulmasında ise yine GraphPad Prisim 8.4.3 programı kullanıldı. Tüm analizler programın varsayılan ayarları kullanılarak yapıldı. Gen anlatım deneyleri 3 biyolojik, 3 teknik tekrarla yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. F-BOX/WD40 GENLERİNE İLİŞKİN BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

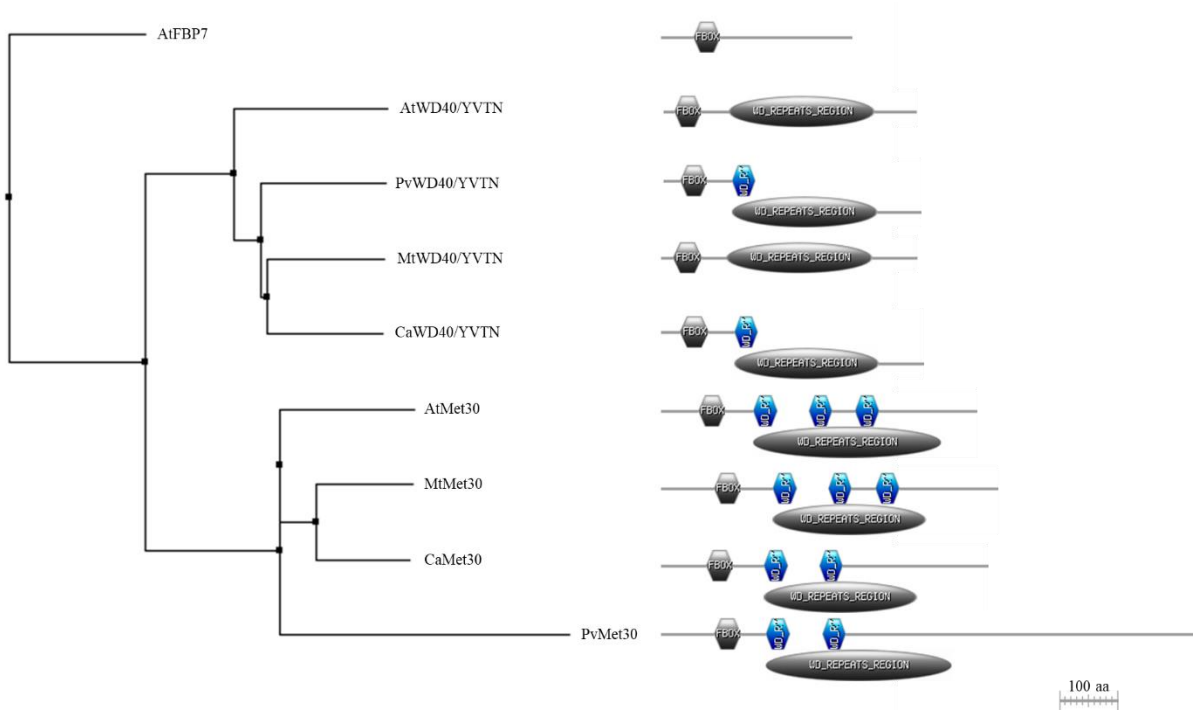
M. truncatula, P. vulgaris ve *C. arietinum* genomlarında manuel BLAST kullanılarak, F-box proteini kodlayan genler belirlenmiştir. Bunların içerisinde sadece F-box (PF00646) ve WD40 (PF00400) motifi içeren diziler filtrelendiğinde *M. truncatula*'da iki F-box/WD40 proteini, *P. vulgaris*'de iki F-box/WD40 proteini ve *C. arietinum*'da iki F-box/WD40 proteini bulunmuştur. Literatürde bulunan bu proteinlere ait deneysel bir çalışma olmadığı, dolayısıyla henüz isimlendirilmedikleri belirlenmiştir. Bu sebeple bulunan F-box/WD40 proteinlerinin isimleri ait olduğu baklagil bitkisi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, F-box/WD40 proteinlerinin çoklu dizi ve 3 boyutlu protein yapılarının analiz sonuçları (dizi benzerliği>%90) AtMet30 ve AtWD40/YVTN proteinlerinin homologları olduklarını düşündürmektedir. Bu bilgiler ışığında proteinler Tablo 4.1'deki gibi isimlendirilmiştir.

Tablo 4.1: *M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinum* genomlarında sadece F-box ve WD40 motiflerini içeren, tanımlanan XP_003617076.1, XP_003599502.1, XP_007141583.1, XP_007149035.1, XP_004491170.1 ve XP_004514570.1 proteinleri.

mRNA	Protein	İsimlendirme
XM_003617028.3	XP_003617076.1	MtMET30
XM_003599454.3	XP_003599502.1	MtWD40/YVTN
XM_007141521.1	XP_007141583.1	PvMET30
XM_007148973.1	XP_007149035.1	PvWD40/YVTN
XM_004491113.3	XP_004491170.1	CaMET30
XM_004514513.3	XP_004514570.1	CaWD40/YVTN

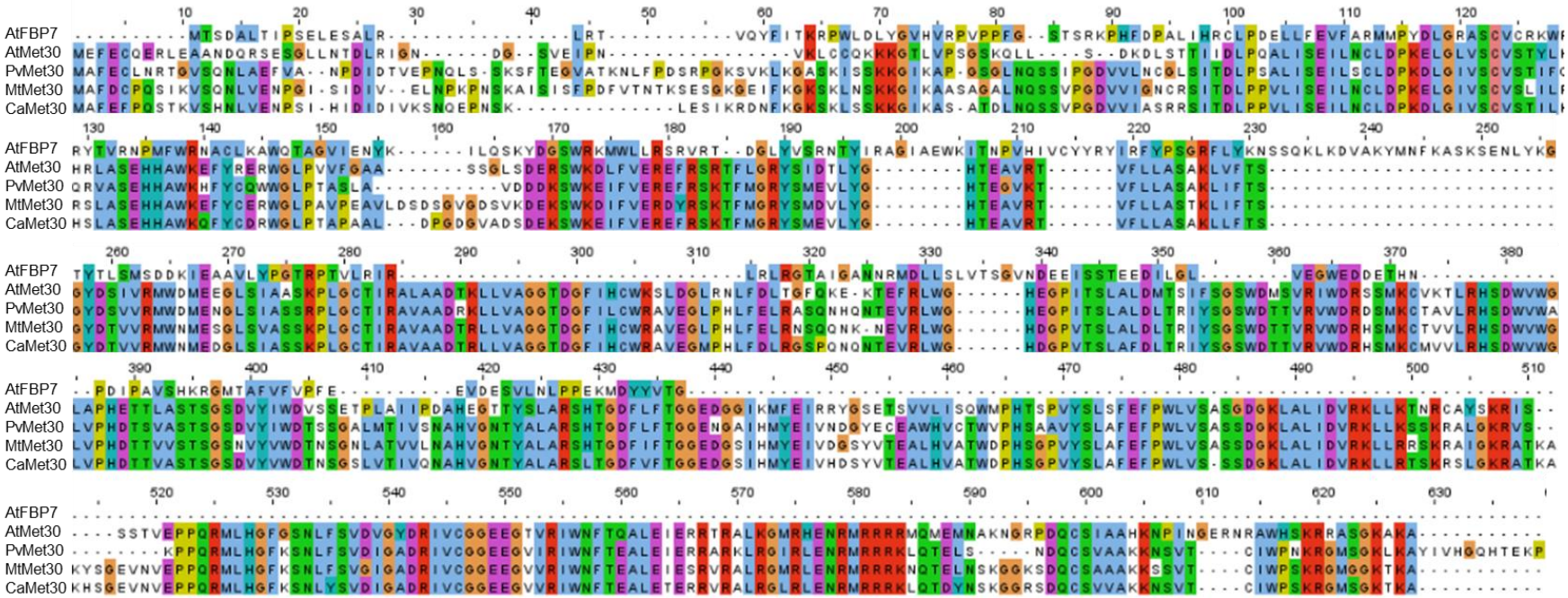
Yapılan filogenetik ağaç, olası baklagil MET30 ve WD40/YVTN proteinleri ve AtFBP7'nin birbirleri arasındaki dizi korunmuşluğunu ve filogenetik ilişkiyi göstermektedir. Filogenetik ağaca göre, olası baklagil Met30 proteinlerine kıyasla, olası baklagil WD40/YVTN proteinleri

AtFBP7 proteini ile yakından ilişkili olduğu belirlendi. Proteinlerin motif analizleri sonuncunda, tümünün hem F-box hem de WD40 tekrarı içerdiği belirlendi (Şekil 4.1).

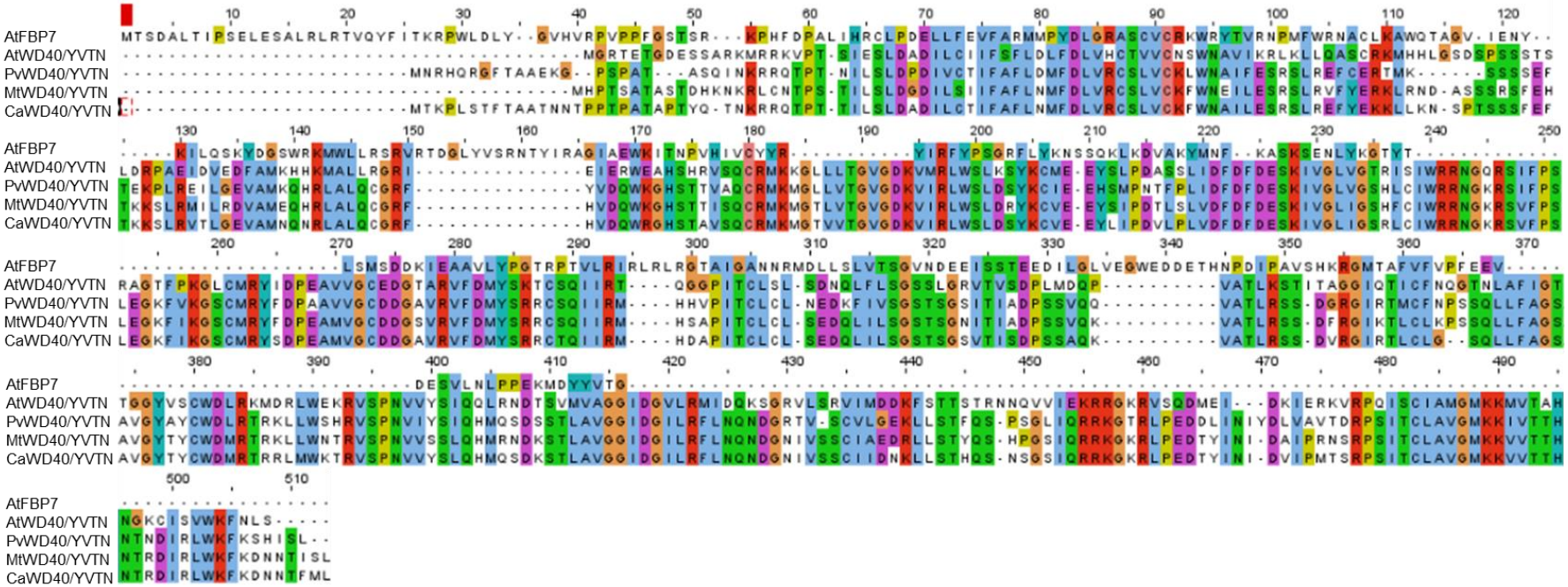


Şekil 4.1: *A. thaliana, M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinum* bitkilerine ait olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN protein dizilerinin ve AtFBP7 protein dizisinin komşu birleştirme yöntemine (Neighbor-joining method) dayalı filogenetik ağacı (proteinin korunmuş bölgelerine göre oluşturuldu) ve motif analizi.

M. truncatula, P. vulgaris ve C. arietinum olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinde çoklu dizi analizi ile korunmuş fonksiyonel bölgeler belirlendi. Yapılan çoklu dizi analizinde, AtFBP7 proteini, *A. thaliana* Met30 ve WD40/YVTN, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinleri karşılatırıldı. Dizilerdeki benzerlik, amino asitler boyanarak gösterilmiştir. Çoklu dizi analizinden elde edilen veriler, GZ PZR çalışmaları için proteini kodlayan transkripte özgü primer tasarlaması aşamasında da kullanılmıştır. AtFBP7, *A. thaliana* Met30 ve WD40/YVTN, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin dizi analizleri sonucunda, korunmuş bölgeler paylaştıkları belirlendi. Olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN protein motifleri arasında yüksek korunmuşluk belirlendi. AtFBP7 proteininin, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinleriyle sadece N-terminal bölgesinden dizi benzerliği olduğu ve oranın %90'dan fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.2, 4.3).



Şekil 4.2: ClustalW kullanılarak oluşturulan *A. thaliana, M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinum* olası Met30 proteinlerinin ve AtFBP7 proteinin çoklu dizi hizalaması.



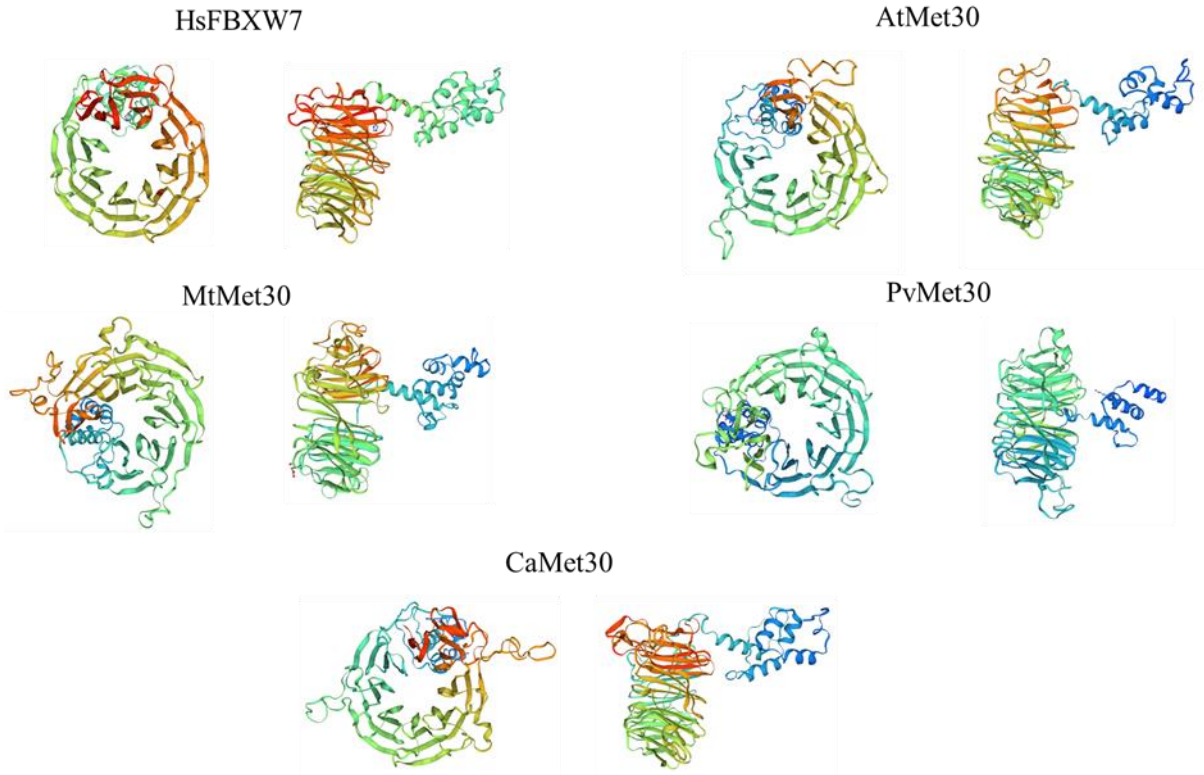
Şekil 4.3: ClustalW kullanılarak oluşturulan *A. thaliana*, *M. truncatula*, *P. vulgaris* ve *C. arietinu*m olası WD40/YVTN proteinlerinin ve AtFBP7 proteininin çoklu dizi hizalaması.

Baklagil F-box/WD40 proteinlerinin birbirleri arasındaki dizi benzerliği incelendiğinde benzerlik oranı %19,80 ile %85,43 arasında olduğu ve dizi farklılıklarının motif arasındaki bölgelerde yoğunlaştığı belirlendi (Tablo 4.2).

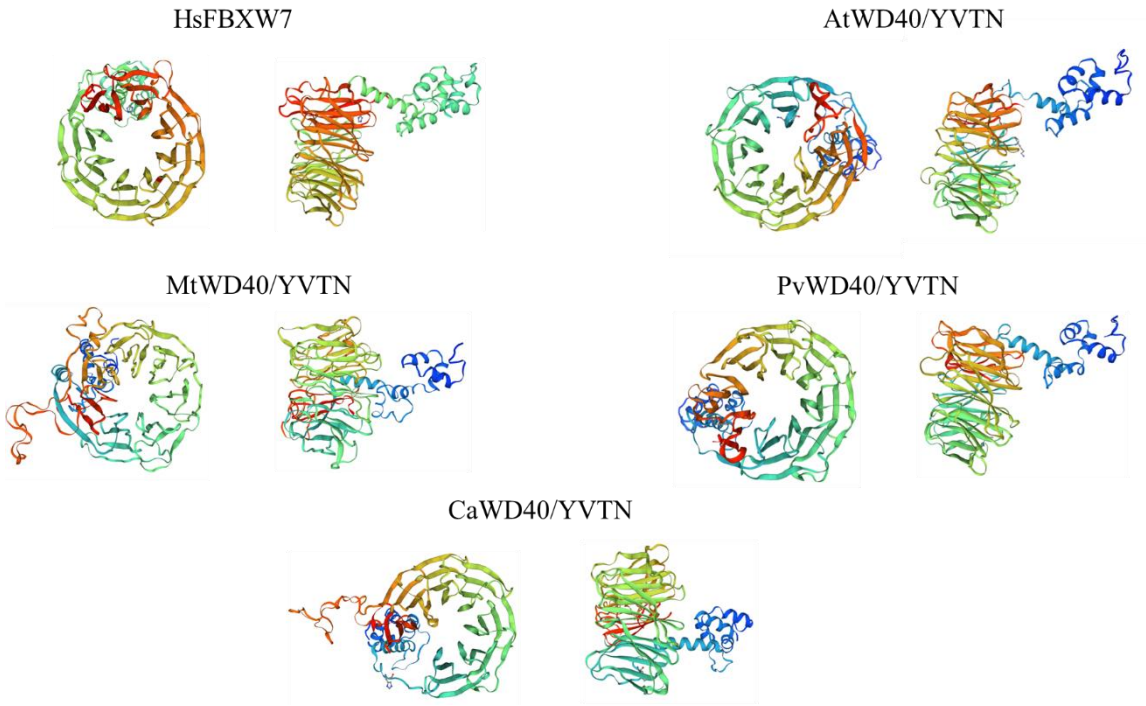
Tablo 4.2: F-box/WD40 protein dizilerinin benzerlik matrisi.

Proteinler	**PvWD40/YVTN**	**CaWD40/YVTN**	**MtWD40/YVTN**	**PvMet30**	**CaMet30**	**MtMet30**
PvWD40/YVTN	%100,00	%77,06	%75,53	%21,04	%21,46	**%20,45**
CaWD40/YVTN	%77,06	%100,00	%83,45	%21,34	%21,14	**%21,52**
MtWD40/YVTN	%75,53	%75,53	%100,00	%20,63	%19,80	**%20,35**
PvMet30	%21,04	%21,34	%20,63	%100,00	%78,84	**%75,27**
CaMet30	%21,46	%21,14	%19,80	%78,8	%100,00	**%85,43**
MtMet30	%20,45	%21,52	%20,35	%75,27	%85,43	**%100,00**

İnsan (*Homo sapiens*) FBXW7 proteini (Erişim numarası: AAI43945.1) temel alınarak SWISS-MODEL programı ile 3 boyutlu yapıları oluşturulan olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin, AtMet30 (Erişim numarası: At5g21040) ve WD40/YVTN (Erişim numarası: NP_001190063.1) proteinlerinin 3 boyutlu yapıları ile benzerlikler taşıdığı görüldü. Dairesel şekilde olan ve proteinin bağlanma bölgesini oluşturan yapı WD40 tekrarlarını içermekte olup, türler ve çeşitler arasında yüksek oranda korunduğu görüldü. Proteinlerin bağlanma bölgesini oluşturan WD40 tekrarlarında, WD40/YVTN proteinlerinde 304-364. amino asit dizileri arasında ve Met30 proteinlerinde 432-521. amino asit dizileri arasında dizi farklılıklar belirlendi (Şekil 4.4, 4.5).



Şekil 4.4: HsFBXW7, AtMet30 ve olası baklagil Met30 proteinlerinin 3 boyutlu yapıları.



Şekil 4.5: HsFBXW7, AtWD40/YVTN ve olası baklagil WD40/YVTN proteinlerinin 3 boyutlu yapıları.

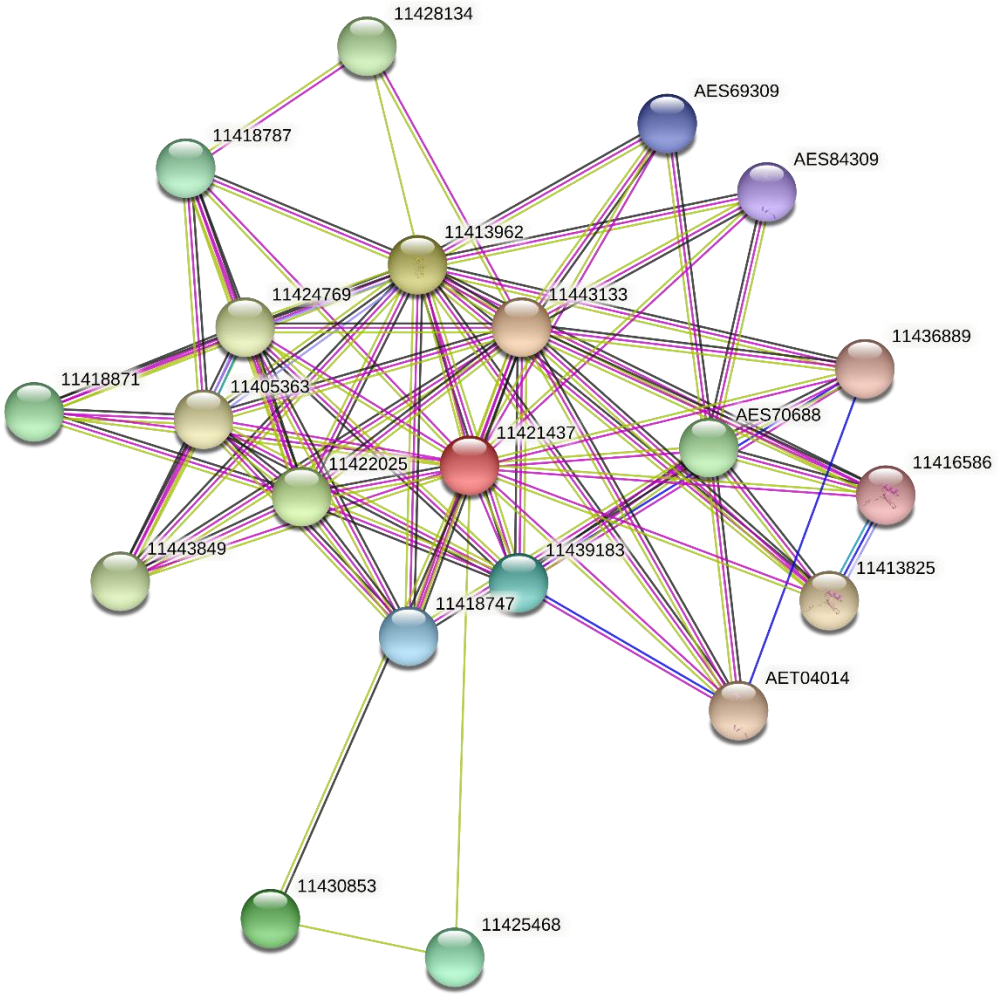
4.2. PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİM ANALİZLERİ

Olası MtMet30, PvMet30 ve CaMet30 proteinleri ile fonksiyonel olarak ilişkili proteinlerin, protein-protein etkileşim örüntüleri STRING programı (sürüm 11) ile oluşturulmuştur. MtWD40/YVTN, PvWD40/YVTN ve CaWD40/YVTN proteinlerinin ise protein-protein örüntüleri oluşturulamamıştır. STRING programı ile elde edilen veriler, en az 0.4 etkileşim puanı ve maksimum 20 etkileşim sayısı ile sadece 1.grubu içerecek şekilde oluşturulmuştur. Mor çizgiler deneysel olarak belirlenen etkileşimleri temsil ederken, açık yeşil çizgiler ise metin madenciliğiyle tahmin edilen etkileşimleri temsil eder. Siyah çizgilerse eş zamanlı anlatıma göre tahmin edilen etkileşimleri temsil eder.

STRING ağ sistemi üzerinde görülen bütün proteinler, bir birliktelik içeren protein-protein etkileşimi göstermektedir. STRING protein-protein etkileşim derecesi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. Yani, proteinlerden sadece birinde anlatım seviyesinde meydana gelen değişim, zincirleme olarak protein-protein etkileşim ağında bulunan diğer proteinlerin de anlatım seviyelerini etkileyeceğinden elde edilen veriler istatistiksel açıdan son derece

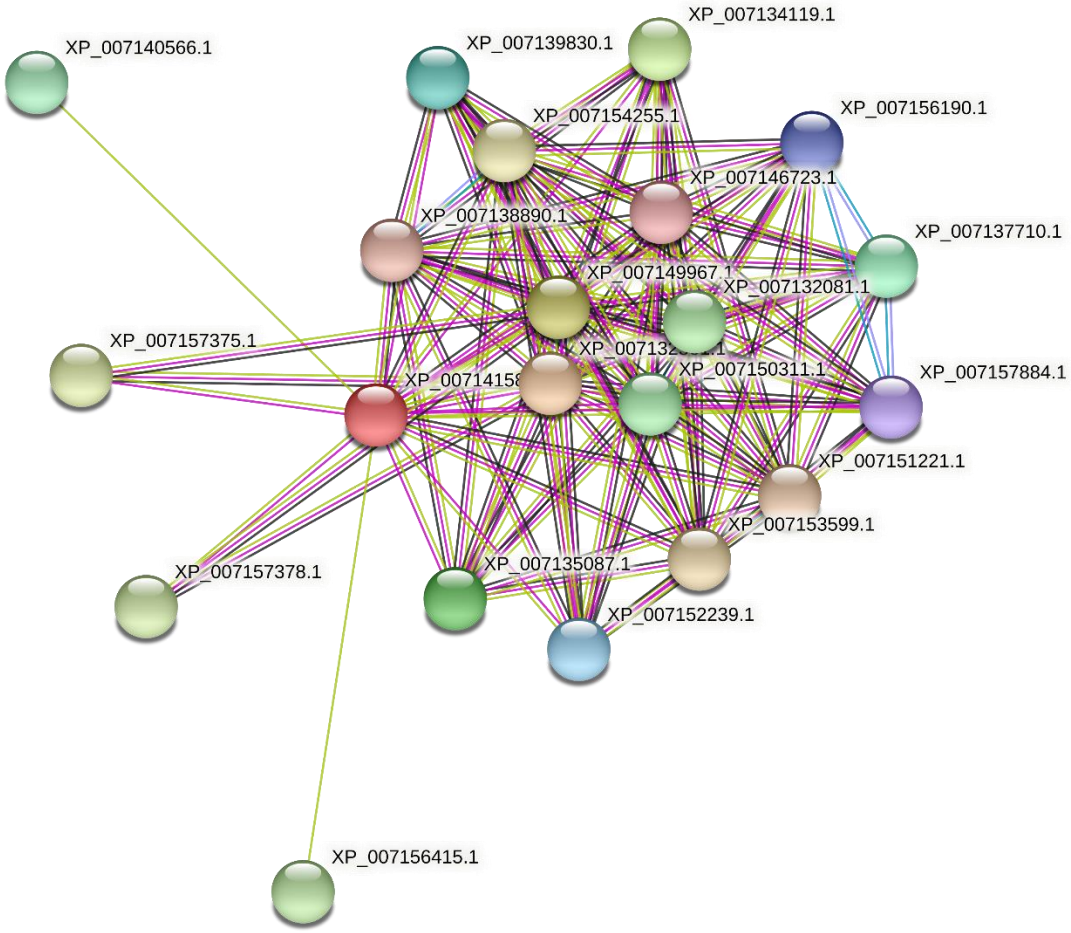
önemlidir. STRING sistemde önemli etkileşimlerde etkin olan çoğu proteininin ubikitin proteazom sistemi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

STRING ağ sistemi üzerindeki proteinlerden 11443133, AES84309, 11416586, 11436889, AET04014, 11413825, 11443849, 11418871, 11418787'in SKP1 ailesine ait, 11439183, 11418747, 11422025'in ise ubikitin bağlayıcı enzim ailesine ait olduğu tespit edildi. STRING ağ sistemi üzerindeki diğer proteinler ise 11413962'in RING-box proteini, 11430853' in çinko parmak proteini, 11428134'in F-box proteini, 11424769 ve 11405363'in anafaz promoting kompleksi alt birimleri, AES70688'in DNA ile aktiflenebilir protein, 11425468 ve AES69309'in transkripsiyon faktörleri olduğu tespit edildi (Şekil 4.6).



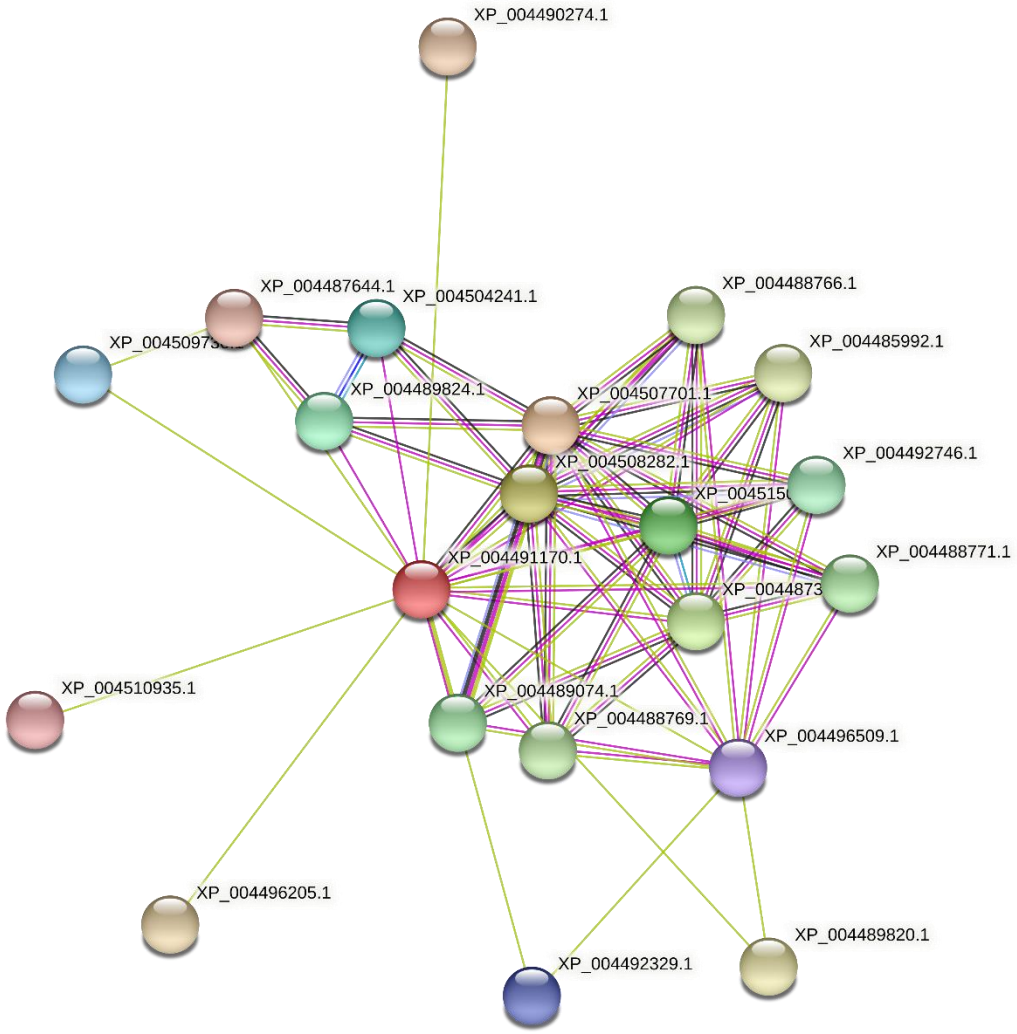
Şekil 4.6: STRING analizi sonucu MtMet30 protein-protein etkileşim ağ sistemi (STRING veritabanı-http://string-db.org).

STRING ağ sistemi üzerindeki proteinlerden XP_007135087.1, XP_007137710.1, XP_007139830.1, XP_007152239.1, XP_007156190.1, XP_007157884.1, XP_007134119.1'in SKP1 proteini, XP_007138890.1, XP_007151221.1, XP_007153599.1, XP_007154255.1'in CULLIN proteini, XP_007132081.1, XP_007150311.1 'in ubikitin bağlayıcı enzim, XP_007149967.1'in RING-box proteini, XP_007146723.1'in ise CDC6/cdc18 proteini olduğu tespit edildi. XP_007140566.1 F-box proteini, XP_0077157375.1 ve XP_007157378.1 ubikitin ribozomal S27 proteini, XP_007156415.1 ise çinko parmak proteinidir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: STRING analizi sonucu PvMet30 protein-protein etkileşim ağ sistemi (STRING veritabanı-http://string-db.org).

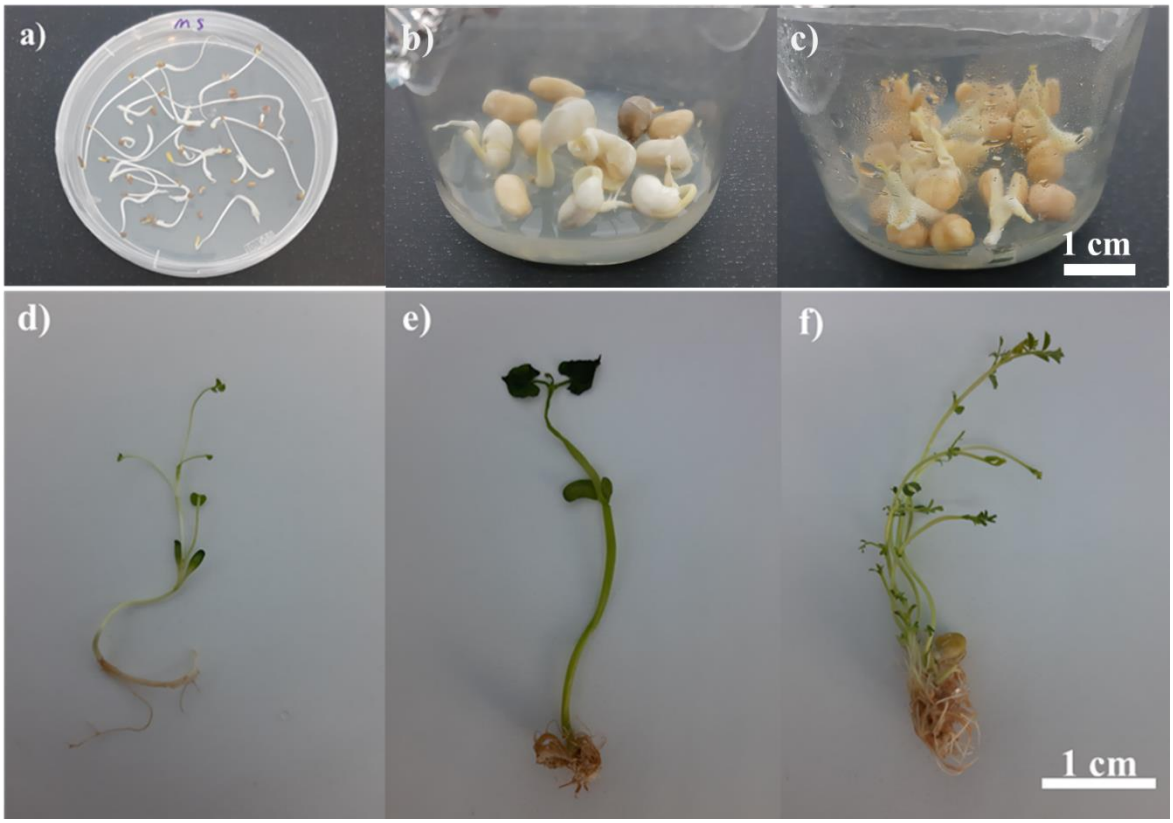
STRING ağ sistemi üzerindeki proteinlerden XP_004485992.1, XP_004488766.1, XP_004488769.1, XP_004488771.1, XP_004489074.1, XP_004492746.1, XP_004507701.1, XP_004508282.1 SKP1 ailesine ait, XP_004490274.1, XP_004496205.1 transkripsiyon faktörleri olduğu tespit edildi. XP_004487394.1 ve XP_004515077.1'in RING-box proteinleri, XP_004509736.1'in Çinko parmak proteini, XP_004492329.1 ve XP_004489820.1'in F-box/kelch-repeat proteini, XP_004496509.1'in F-box proteini, XP_004489824.1 ve XP_004504241.1'in ubikitin-40S ribosomal proteini, XP_004487644.1'in Ubikitin karbonil-terminal hidroliz proteini, XP_004510935.1'in ise büyüme-düzenleyici faktör 9-like proteini olduğu belirlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: STRING analizi sonucu CaMet30 protein-protein etkileşim ağ sistemi (STRING veritabanı-http://string-db.org).

4.3. TOHUMLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ VE STRES UYGULAMALARI

M. truncatula, P. vulgaris, C. arietinum tohumları yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra *M. trucatula* MS besiyeri içeren petri kaplarına, *P. vulgaris* ve *C. arietinum* MS besiyeri içeren kavanozlara ekildi ve iklimlendirme kabininde çimlendirildi. *M. truncatula* tohumları ekimleri yapıldıktan üç gün sonra, *P. vulgaris* beş gün sonra ve *C. arietinum* yedi gün sonra çimlenmeye başladı. MS besiyeri içeren Petri kaplarında çimlendirilen *M. truncatula* bitkileri on günlük olduktan sonra MS besiyeri içeren cam tüplere aktarılarak otuz günlük olana kadar iklimlendirme kabininde tutuldu. *P. vulgaris* ve *C. arietinum* çimlenen tohumları MS besiyeri içeren cam tüplere aktarılarak onbeş günlük olana kadar iklimlendirme kabininde yetiştirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: *In vitro* kültürlenen *M. truncatula, P. vulgaris, C. arietinum* kültürleri. Çimlenen; a) 3 günlük *M. truncatula;* b) 5 günlük *P. vulgaris;* c) 7 günlük *C. arietinum* tohumları. Gelişen; d) 30 günlük *M. truncatula;* e) 15 günlük *P. vulgaris;* f) 15 günlük *C. arietinum* bitkicikleri.

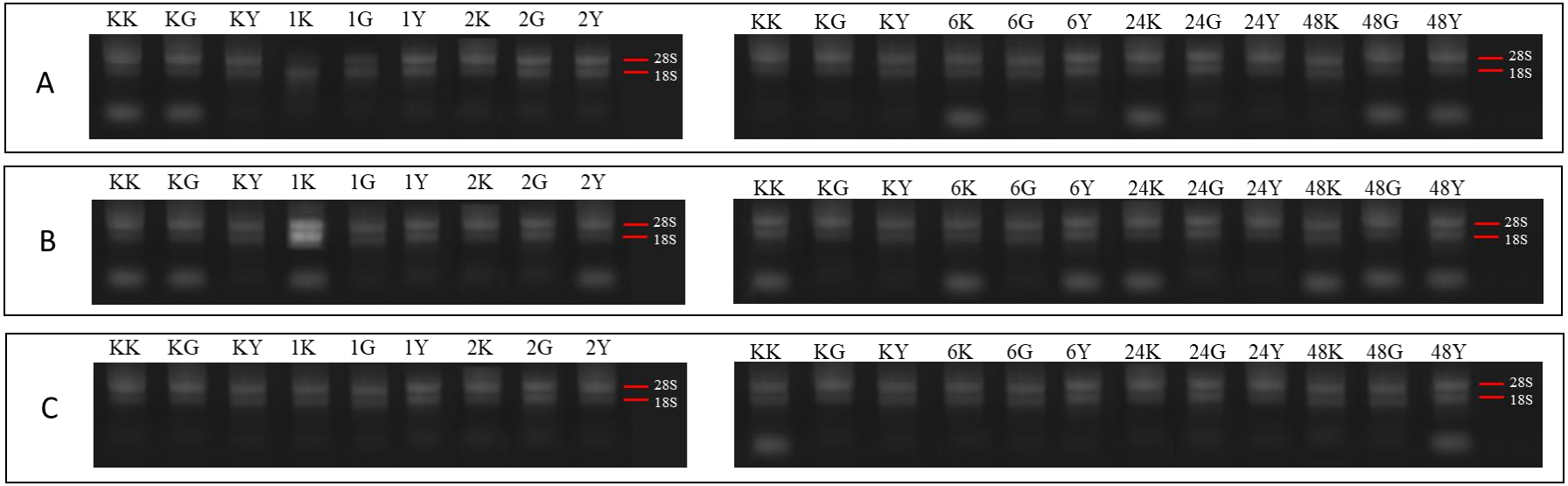
Olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN protein genlerinin abiyotik stres koşullarındaki rolleri *M. truncatula, P. vulgaris, C. arietinum* bitkilerinde NaCl ve sıcaklık stresi uygulanarak, erken aşamada incelendi. Sıcaklık uygulaması 38^{o}C'de 1 ve 2 saat olarak, tuzluluk uygulaması 180 mM NaCl içeren besiyerinde 6, 24 ve 48 saat olarak uygulandı.

4.4. F-BOX/WD40 GENLERİNİN ANLATIM ANALİZLERİ

Bu tez çalışmasında, *M. truncatula, P. vulgaris, C. arietinum*'da ubikitin-proteazom-bağımlı metabolik yolunda rol oynadığı düşünülen ve F-box gen ailesine ait olan ve WD40 motifleri içeren olası MtMet30 (XM_003617028.3), PvMeT30 (XM_007141521.1), CaMet30 (XM_004491113.3), MtWD40/YVTN (XM_003599454.3), PvWD40/YVTN (XM_007148973.1) ve CaWD40/YVTN (XM_004514513.3) protein genlerinin NaCl ve sıcaklık stresi uygulaması sonrası transkript anlatım değişimleri incelendi.

4.5. RNA İZOLASYONU VE cDNA SENTEZİ

Gen anlatım analizleri için *Medicago truncatula, Phaseolus vulgaris, Cicer arietinum* bitkilerinin kök, gövde ve yaprak dokularından toplam RNA izolasyonları yapılarak bütünlükleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 4.10). Spektrofotometrik analiz sonucu A_{260}/A_{280} oranı 1.8-2.0 olan RNA'lar saf olarak kabul edildi. Bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile doğrulanan ve saf olduğu belirlenen RNA'lardan GZ PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere cDNA sentezlendi.

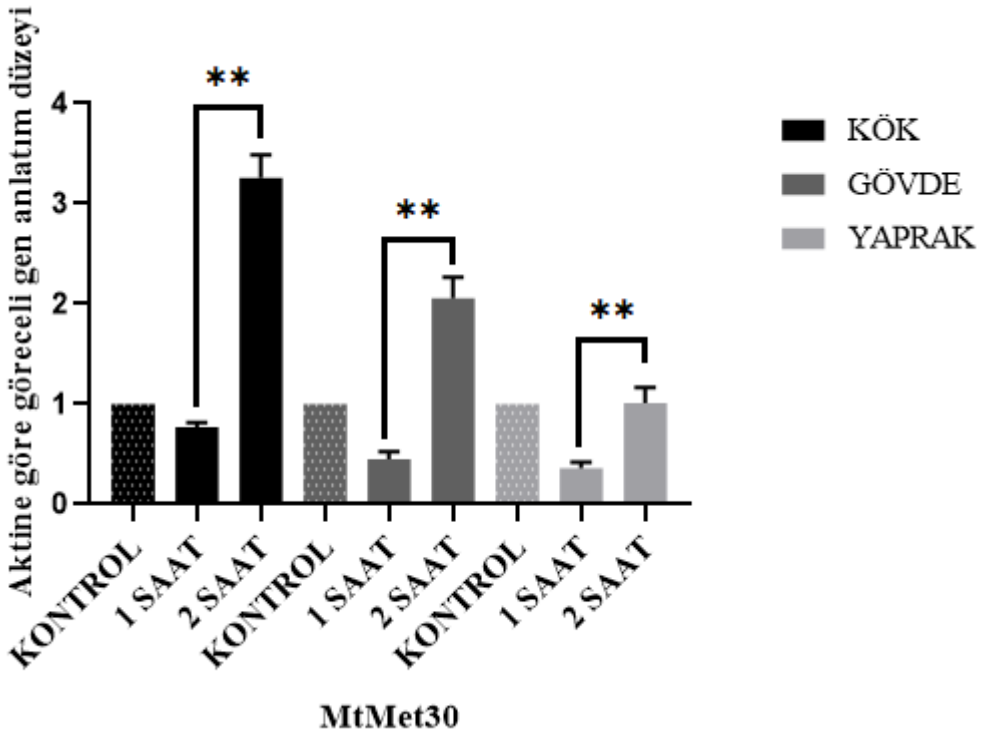


Şekil 4.10: (A) *M. truncatula*, (B) *P. vulgaris* ve (C) *C. arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. Kısaltmalar: KK:Kontrol Kök; KG:Kontrol Gövde; KY:Kontrol Yaprak; 1K:1 saat sıcaklık uygulama kök; 1G: 1 saat sıcaklık uygulama gövde; 1Y: 1 saat sıcaklık uygulama yaprak; 2K:2 saat sıcaklık uygulama kök; 2G:1 saat sıcaklık uygulama gövde; 2Y:2 saat sıcaklık uygulama yaprak; 6K: 6 saat tuzluluk uygulama kök; 6G: 6 saat tuzluluk uygulama gövde; 6Y: 6 saat tuzluluk uygulama yaprak; 24K: 24 saat tuzluluk uygulama kök; 24K: 24 saat tuzluluk uygulama gövde; 24K: 24 saat tuzluluk uygulama yaprak; 48K: 48 saat tuzluluk uygulama kök; 48K: 48 saat tuzluluk uygulama gövde; 48K: 48 saat tuzluluk uygulama yaprak.

4.6. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZLERİ

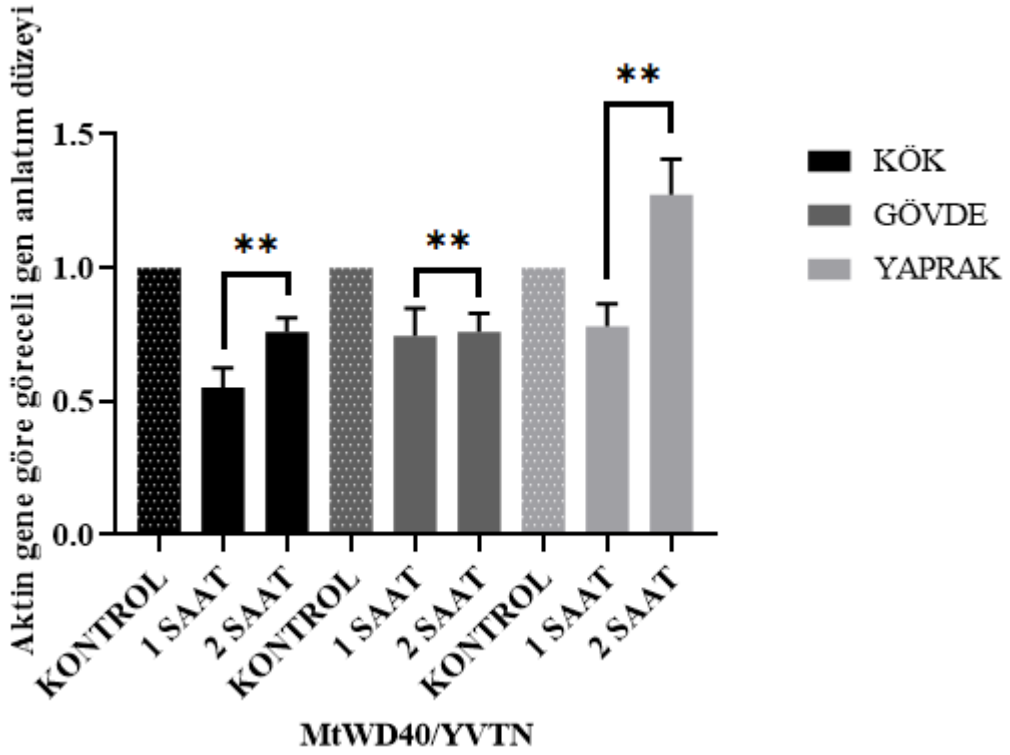
Tuzluluk ve sıcaklık stres koşullarına maruz bırakılan *M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinum* kök, gövde ve yaprak dokuları kullanılarak olası MtMet30, MtWD40YVTN, PvMet30, PvWD40YVTN, CaMet30, CaWD40YVTN genlerinin anlatım analizleri GZ PZR ile gerçekleştirildi. Gen anlatımları, aktine göre göreceli gen anlatım düzeylerinin (Şekil 4.11-4.23) tamamında kontrole göre anlamlıdır.

M. truncatula bitkilerine 38°C sıcaklık uygulaması sonucunda MtMet30'un kök dokusundaki gen anlatımı ilk 1 saatte kontrole göre 0,77 kat azaldığı, 2.saatinde ise 3,25 kat arttığı belirlendi. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 1 saatte 0,45 katlık azalış, 2. saatinde 2,06 kat artış belirlendi. Yaprak dokusunda, ilk 1 saatte 0,36 katlık azalış, 2. saatinde ise kontrole göre anlatımın değişmediği belirlendi (Şekil 4.11).



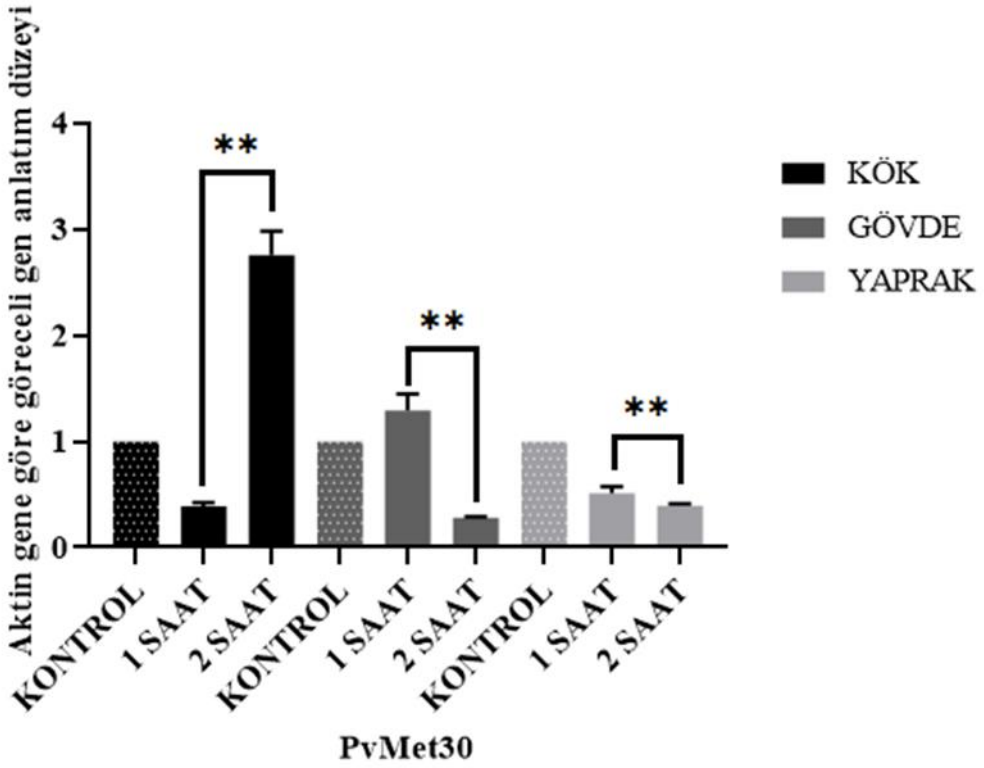
Şekil 4.11: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası MtMet30 transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$).

M. truncatula bitkilerine 38°C sıcaklık uygulaması sonucunda MtWD40/YVTN'nin kök dokusundaki transkript seviyesinin ilk 1 saatte kontrole göre 0,55 kat, 2.saatinde ise 0,76 kat azaldığı belirlendi. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 1 saatte 0,74 kat azalış ve 2. saatinde 0,76 kat anlatımın azaldığı belirlendi. Yaprak dokusunda, ilk 1 saatte 0,78 kat azalış, 2. saatinde 1,27 kat anlatımın arttığı belirlendi. Dolayısıyla, MtMet30 geninin kök ve gövde dokularında sıcaklık stresine cevap olarak artış gösterdiği, MtWD40/YVTN geninin ise yaprak dokusu hariç azalış gösterdiği belirlenmiştir. Buna göre MtMet30'un sıcaklığa cevapta kök ve gövde, MtWD40/YVTN'nin ise yaprak dokusunda rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil 4.12).



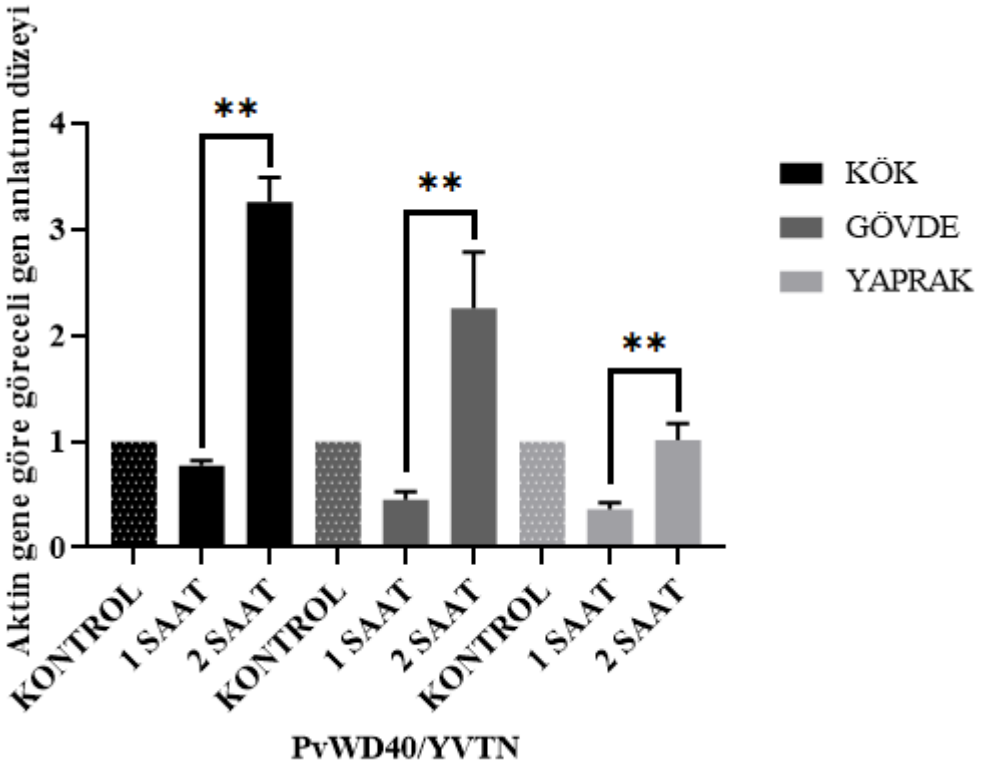
Şekil 4.12: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası MtWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$).

P. vulgaris bitkilerine 38°C sıcaklık uygulaması sonucunda PvMet30'nin kök dokusundaki gen anlatımı ilk 1 saatte kontrole göre 0,39 kat azalış, 2.saatinde ise 2,75 kat artış belirlendi. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 1 saatte 1,29 kat artış ve 2. saatinde 0,28 kat azalış belirlendi. Yaprak dokusunda, ilk 1 saatte 0,51 kat azalış, 2. saatinde 0,39 kat anlatımın azaldığı belirlendi. Analiz sonuçlarına göre *P. vulgaris*'de ise hem PvWD40/YVTN hem de PvMet30 geninin kök ve gövde dokusunda sıcaklığa verilen yanıtta transkript artışı şeklinde yanıt oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).



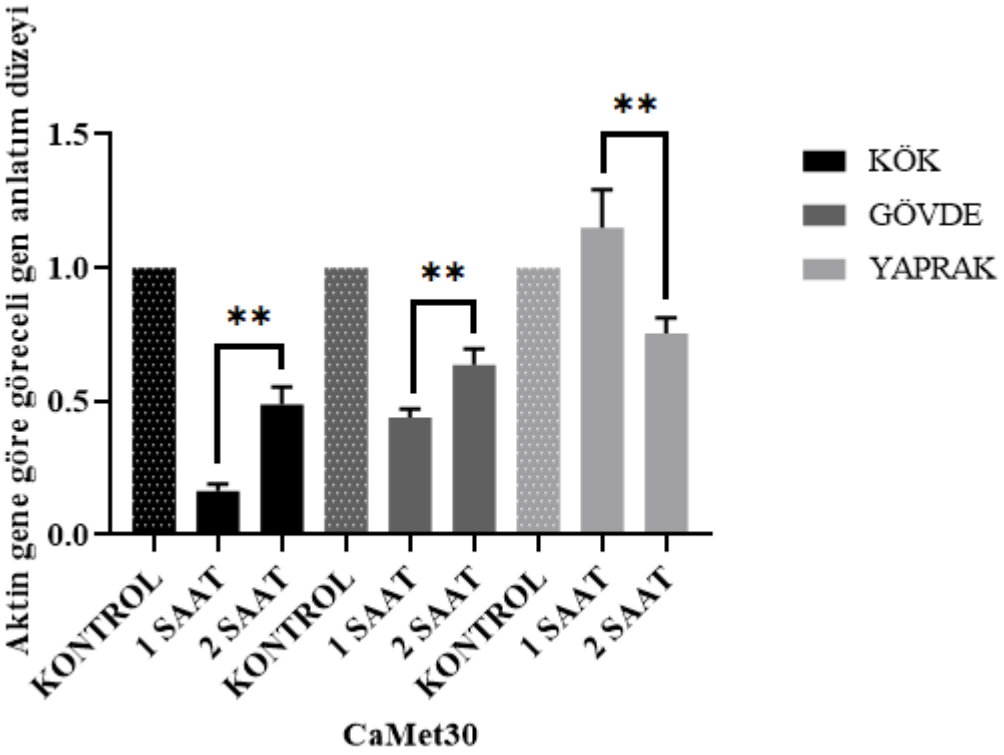
Şekil 4.13: GZ PZR analizleri sonucunda *Phaseolus vulgaris* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası PvMet30 transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$).

P. vulgaris bitkilerine 38°C sıcaklık uygulaması sonucunda PvWD40/YVTN'nin kök dokusundaki gen anlatımı ilk 1 saatte kontrole göre 0,77 kat azalış, 2.saatinde ise 3,25 kat artış gösterdi. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 1 saatte 0,45 kat azalış ve 2. saatinde 2,26 kat anlatımın arttığı belirlendi. Yaprak dokusunda, ilk 1 saatte 0,36 kat azalış, 2. saatinde kontrole göre anlatımın değişmediği belirlendi (Şekil 4.14).



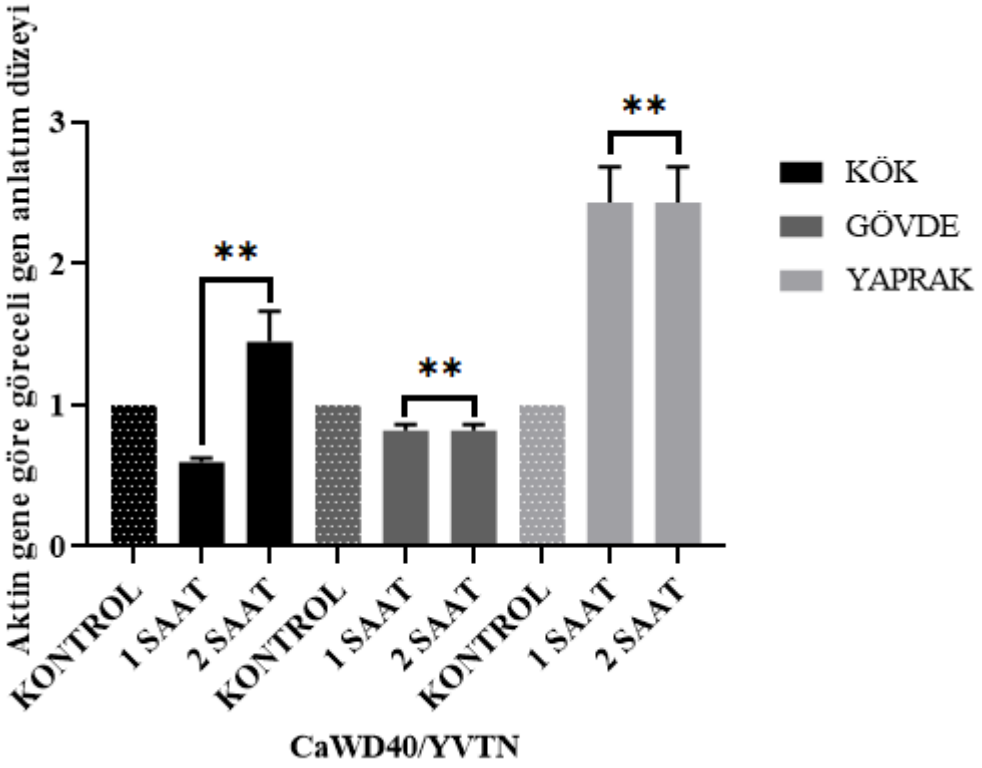
Şekil 4.14: GZ PZR analizleri sonucunda *Phaseolus vulgaris* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası PvWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$).

C. arietinum bitkilerine 38°C sıcaklık uygulaması sonucunda CaMet30'un kök dokusundaki gen anlatımı ilk 1 saatte kontrole göre 0,16 kat azalış, 2.saatinde ise 0,48 kat anlatımı azaldığı belirlendi. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 1 saatte 0,46 kat azalış ve 2. saatinde ise 0,63 kat azalış belirlendi. Yaprak dokusunda, ilk 1 saatte 1,15 kat artış, 2. saatinde 0,75 kat anlatımın azaldığı belirlendi. Özetle, nohutta CaWD40/YVTN geninin kökte ve yaprakta, CaMet30 geninin ise yaprakta sıcaklık stresine cevapta artarak yanıt verdiği belirlenmiştir. Buna göre CaWD40/YVTN'in sıcaklığa erken cevapta kök ve yaprak, CaMet30'un ise yaprak dokusunda rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil 4.15).



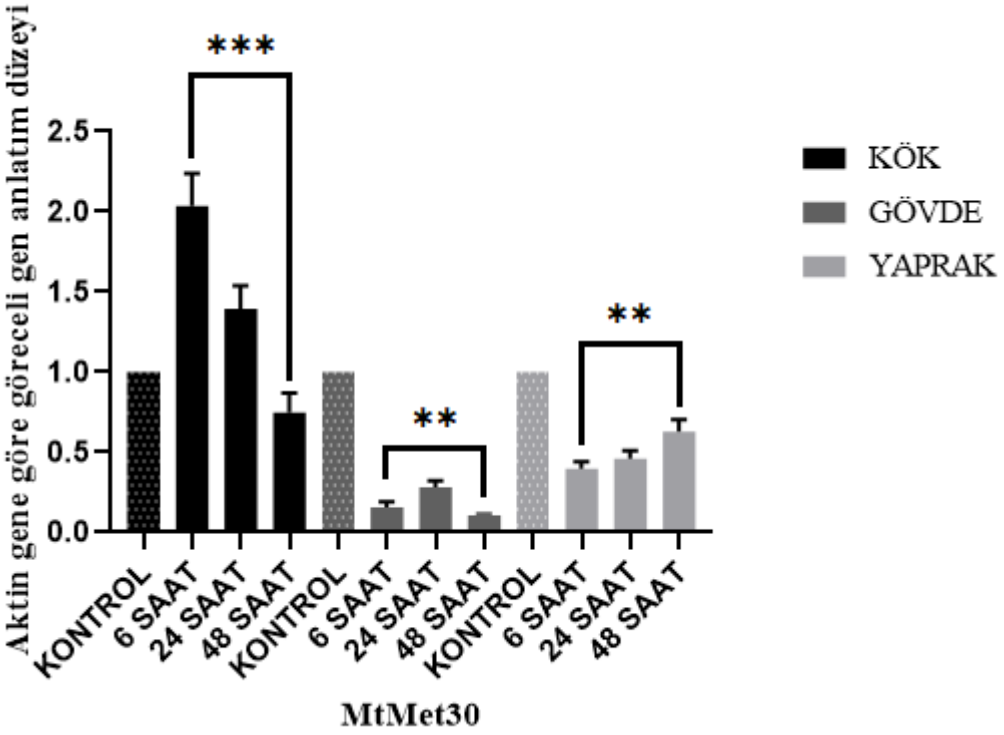
Şekil 4.15: GZ PZR analizleri sonucunda *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası CaMet30 transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$).

C. arietinum bitkilerine 38°C sıcaklık uygulaması sonucunda CaWD40/YVTN'nin kök dokusundaki gen anlatımı incelenerek ilk 1 saatte kontrole göre 0,60 kat azalış, 2.saatinde ise 1,45 kat artış belirlendi. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 1 saatte 0,82 kat azalış ve 2. saatinde 0,84 kat azalış ile anlatımın neredeyse aynı şekilde azaldığı belirlendi. Yaprak dokusunda, ilk 1 saatte kontrole göre 2,41 kat artış, 2. saatinde 2,43 kat artış belirlendi (Şekil 4.16).



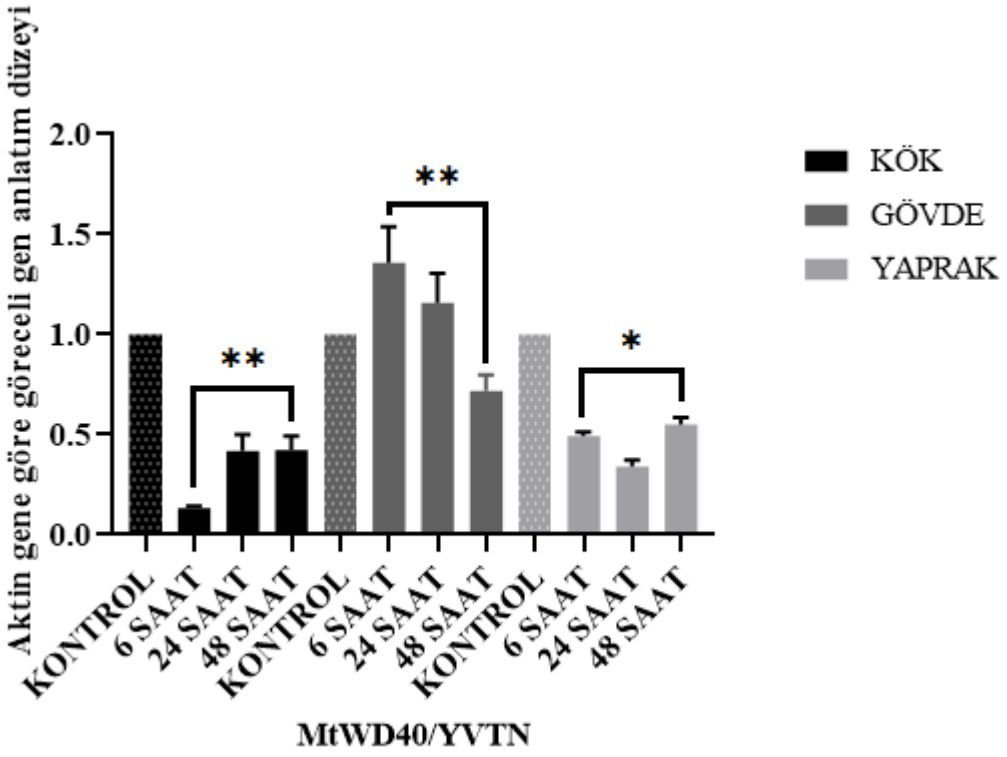
Şekil 4.16: GZ PZR analizleri sonucunda *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası CaWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$).

M. truncatula bitkilerine 180 mM NaCl uygulaması sonucunda MtMet30'un kök dokusundaki transkript seviyesi ilk 6 saatte kontrole göre 2,03 kat artış, 24.saatte 1,39 kat artış, 48.saattte ise 0,75 kat azalış gösterdi. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 6 saatte 0,16 kat azalış ve 24. saatinde 0,28 kat azalış, 48.saatinde ise anlatımın 0,1 kat azaldığı belirlendi. Yaprak dokusunda, ilk 6 saatte 0,40 kat azalış, 24.saatinde 0,46 kat azalış, 48.saatinde ise 0,62 kat anlatımın azaldığı belirlendi (Şekil 4.17).



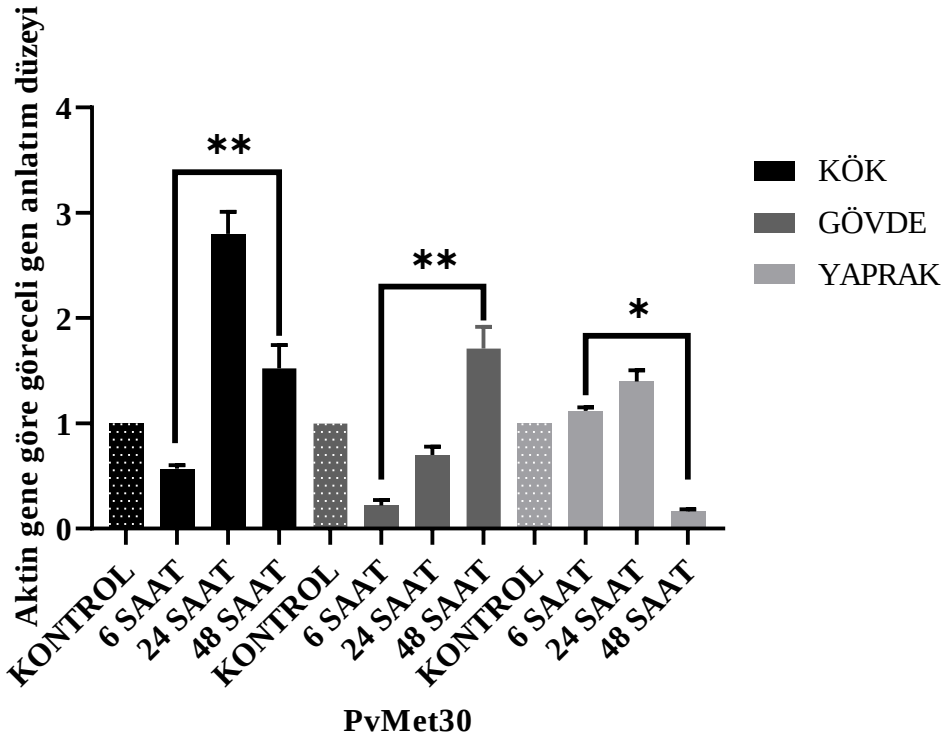
Şekil 4.17: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası MtMet30 transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$), "***" ($p \leq 0.001$).

M. truncatula bitkilerine 180 mM NaCl uygulaması sonucunda MtWD40/YVTN'nin kök dokusundaki gen anlatımı ilk 6 saatte kontrole göre 0,13 kat azalış, 24. ve 48.saatinde 0,42 kat azalış belirlendi. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 6 saatte 1,36 kat artış ve 24. saatinde 1,16 kat artış, 48.saatinde ise anlatımın 0,72 kat azaldığı belirlendi. Yaprak dokusunda, ilk 6 saatte 0,49 kat azalış, 24.saatte 0,34 kat azalış, 48. saatte anlatımın 0,55 kat azaldığı belirlendi. Dolayısıyla, yonca da kök dokularında 6 ve 24 saat NaCl uygulamasının MtMet30'da artışa, gövde ve yaprakta ise azalışa sebep olduğu; MtWD40/YVTN anlatımının ise kök ve yaprakta azalış, gövde de ise artış şeklinde yanıt verdiği belirlendi. Bu da MtMet30'un kökte NaCl anlatımında, MtWD40/YVTN'nin ise gövde de NaCl'ye erken cevapta etkin rol oynayacağını düşündürmektedir (Şekil 4.18).



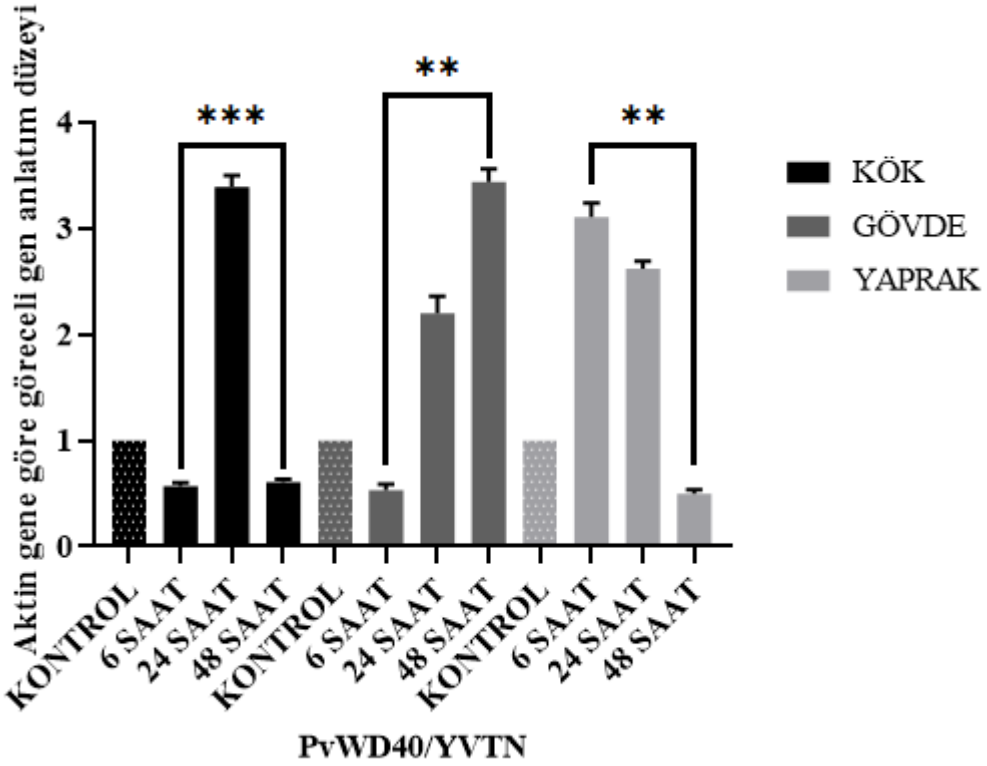
Şekil 4.18: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası MtWD40/YVTN transkript düzeyi. "*" ($p \leq 0.05$), "**" ($p \leq 0.01$).

P. vulgaris bitkilerine 180 mM NaCl uygulaması sonucunda PvMet30'un kök dokusundaki gen anlatımı ilk 6 saatte kontrole göre 0,57 kat azalış, 24.saatinde 2,80 kat artış, 48.saatinde ise anlatımın 1,52 kat arttığı belirlenmiştir. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 6 saatte 0,22 kat azalış ve 24. saatinde 0,70 kat azalış, 48.saatinde 1,70 kat anlatım artışı belirlenmiştir. Yaprak dokusundaki gen anlatımında, ilk 6 saatte 1,12 kat artış, 24.saatinde 1,40 kat artış, 48.saatinde ise 0,16 kat azalış belirlenmiştir. Fasulye'de kök dokularında 24.saat, gövde dokularına 24 ve 48.saat, yaprak dokularında ise 6 ve 24 saat NaCl uygulamasının PvWD40/YVTN'nin artışına, kök ve gövde dokularında 6.saatte, yaprak dokularında 48.saatte azalışa sebep olduğu belirlendi. PvMet30'un anlatımında ise kök dokularında 24 ve 48.saatte, gövde dokularına 48.saatte, yaprak dokularında ise 6 ve 24.saatte NaCl uygulaması sonucunda artış belirlendi. Elde edilen bu sonuçlar, hem PvWD40/YVTN hem de PvMet30 genlerinin fasulyede kök, gövde, ve yaprak dokularında NaCl'ye erken yanıtta görev aldığını düşündürmektedir (Şekil 4.19).



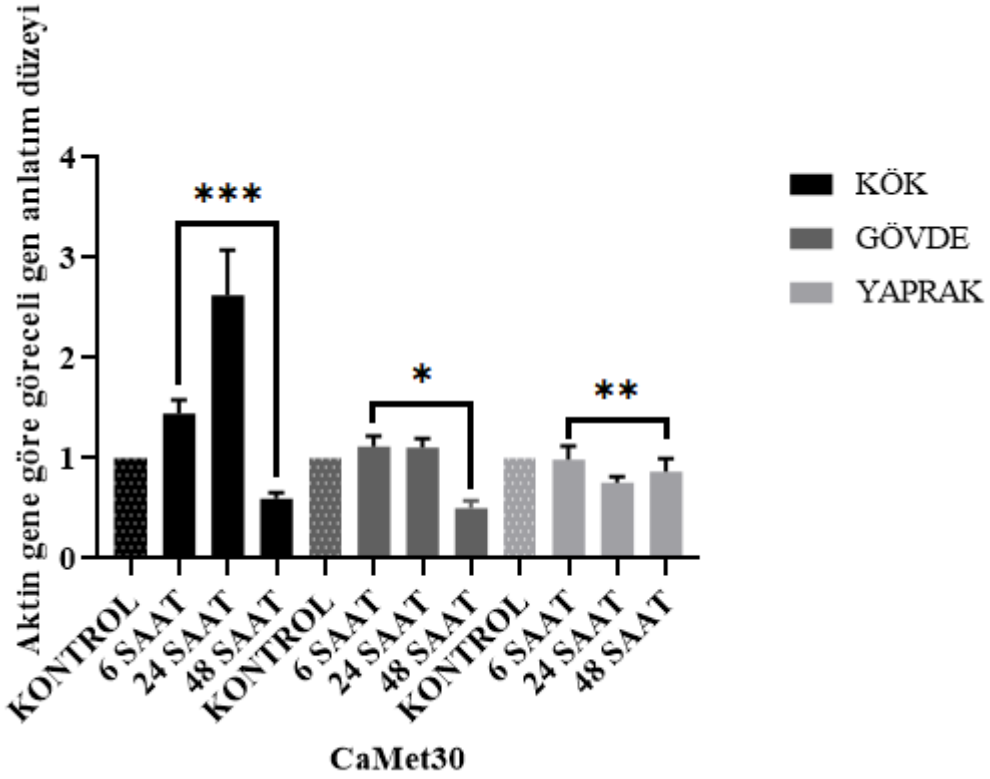
Şekil 4.19: GZ PZR analizleri sonucunda *Phaseolus vulgaris* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası PvMet30 transkript düzeyi. "*" ($p \leq 0.05$), "**" ($p \leq 0.01$).

P. vulgaris bitkilerine 180 mM NaCl uygulaması sonucunda PvWD40/YVTN'nin kök dokusundaki gen anlatımı ilk 6 saatte kontrole göre 0,57 kat azalış, 24.saatinde 3,39 kat artış, 48.saatinde ise 0,60 kat azaldığı belirlenmiştir. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 6 saatte 0,53 kat azalış ve 24. saatinde 2,20 kat artış, 48.saatinde 3,43 kat anlatımın arttığı belirlenmiştir. Yaprak dokusunda, ilk 6 saatte 3,1 kat artış, 24.saatinde 2,62 kat artış, 48.saatinde 0,50 kat anlatımın azaldığı belirlendi (Şekil 4.20).



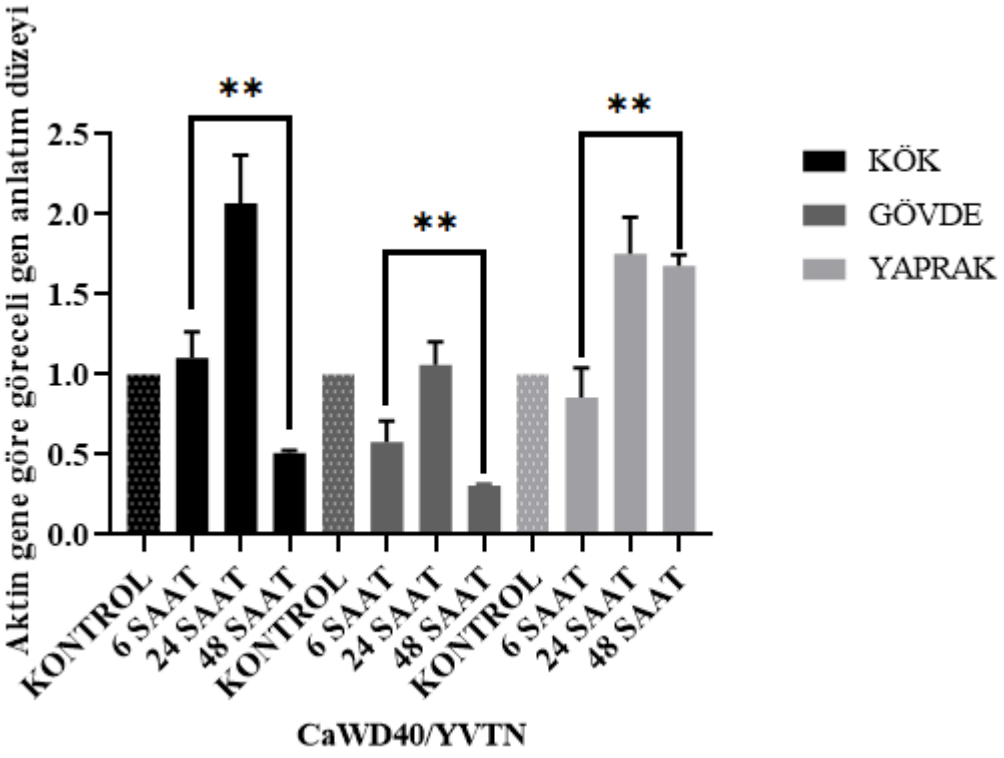
Şekil 4.20: GZ PZR analizleri sonucunda *Phaseolus vulgar*is kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası PvWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$), "***" ($p \leq 0.001$).

C. arietinum bitkilerine 180 mM NaCl uygulaması sonucunda CaWD40/YVTN'nin kök dokusundaki gen anlatımı ilk 6 saatte kontrole göre 1,10 kat artış, 24.saatinde 2,07 kat artış, 48.saatinde ise 0,51 kat azaldığı belirlendi. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 6 saatte 0,58 kat azalış ve 24. saatinde 1,06 kat artış, 48.saatinde 0,3 kat anlatımın azaldığı belirlendi. Yaprak dokusunda, ilk 6 saatte 0,86 kat azalış, 24.saatinde 1,75 kat artış, 48.saatinde 1,68 kat anlatımın arttığı belirlendi (Şekil 4.21).



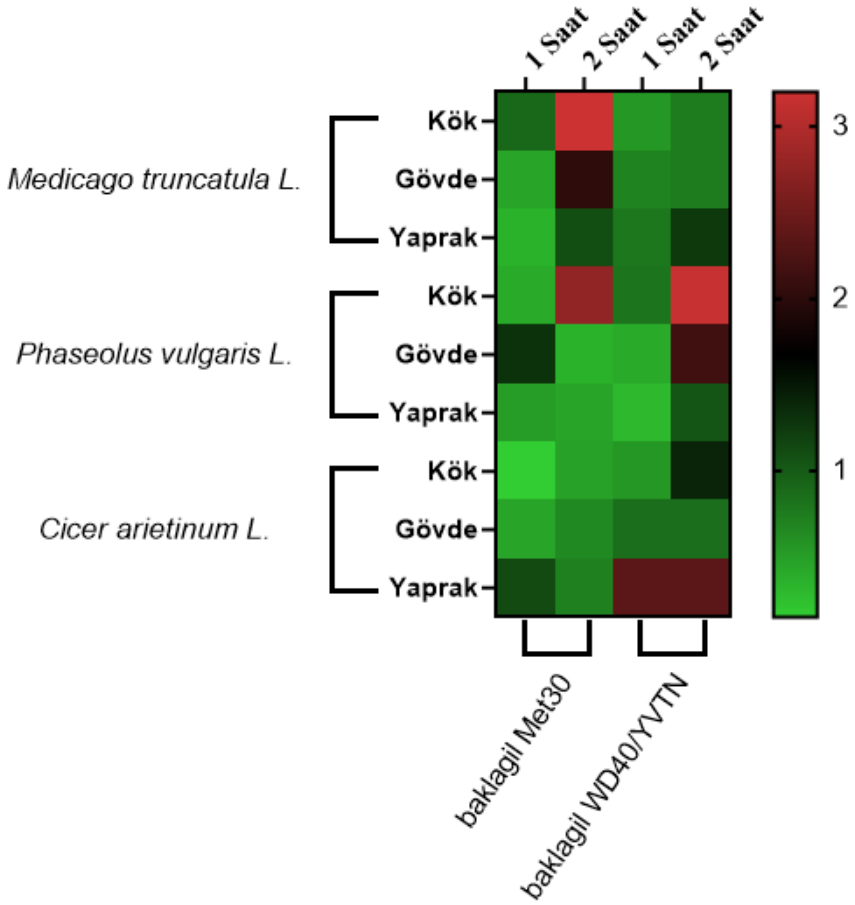
Şekil 4.21: GZ PZR analizleri sonucunda *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası CaMet30 transkript düzeyi. "*" ($p \leq 0.05$), "**" ($p \leq 0.01$), "***" ($p \leq 0.001$).

C. arietinum bitkilerine 180 mM NaCl uygulaması sonucunda CaMet30'un kök dokusundaki gen anlatımı ilk 6 saatte kontrole göre 1,45 kat artış, 24.saatinde 2,63 kat artış, 48.saatinde ise 0,60 kat azaldığı belirlenmiştir. Gövde dokusunda ise kontrole göre ilk 6 saatte 1,12 kat artış ve 24. saatinde 1,10 kat artış, 48.saatinde 0,50 kat anlatımın azaldığı belirlenmiştir. Yaprak dokusunda, ilk 6 saatte 0,98 kat azalış, 24.saatinde 0,76 kat azalış, 48.saatinde 0,87 kat anlatımın azaldığı belirlendi. *C. arietinum*'da ise kök ve yaprak dokularında 24 saat NaCl uygulamasının CaWD40/YVTN'de artışa, gövde de ise azalışa sebep olduğu belirlendi. CaMet30'un ise kök dokularında 24 saat NaCl uygulamasının artışına, gövde dokularında 48.saatte azalış, yaprak dokularında 24.saatte azalış olduğu belirlendi. Dolayısıyla, NaCl stresine karşı CaWD40/YVTN'nin kökte 6. saat ve 24.saatte; CaMet30'un ise 24.saatte erken cevapta rol oynadığı düşündürmektedir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: GZ PZR analizleri sonucunda *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası CaWD40/YVTN transkript düzeyi. "**" ($p \leq 0.01$).

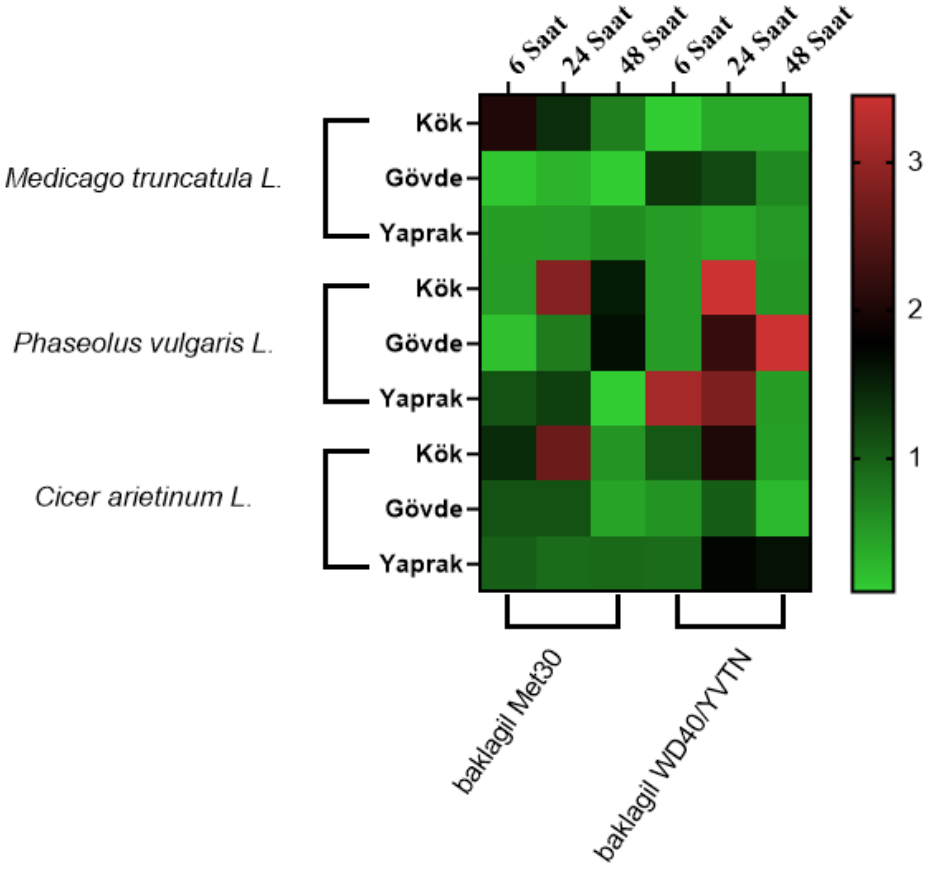
M. truncatula, P. vulgaris ve C. arietinum kök, gövde ve yaprak dokularında 38°C sıcaklık uygulamasının olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN gen anlatımına olan etkisi ısı haritası üzerinde toplu olarak Şekil 4.23'te verilmiştir. Buna göre, *M. truncatula* ve *P. vulgaris* bitkilerinin özellikle kök dokularında olası baklagil Met30 transkriptinin anlatımının arttığı belirlenmiştir. Tüm bitkilerde transkript artışının 38°C sıcaklık uygulamasının 2. saatinde en yüksek miktarda gerçekleştiği belirlenmiştir. *C. arietinum* bitkisinde ise CaWD40/YVTN transkriptinin anlatımı en çok yaprak dokularında gerçekleşmiştir. Ayrıca *M. truncatula* ve *P. vulgaris*'in aksine CaWD40/YVTN transkriptinin anlatımı *C. arietinum* yaprak dokusunda ilk 1 saat ve 2.saatte eşit miktarda gerçekleşmiştir. Kök dokusunda ise kontrole göre 1,45 kat artış belirlenmiştir. Olası baklagil Met30 gen anlatımı ise *M. truncatula, P. vulgaris ve C. arietinum* bitkilerinin farklı dokularında ve farklı stres uygulama sürelerinde en yüksek miktarda gerçekleşmiştir. Sıcaklık uygulamasın sonucunda, MtWD40/YVTN gen anlatımının *M. truncatula* yaprak dokusunda 2. saatinde en yüksek miktarda, CaMet30 ise *C. arietinum* yaprak dokusunun 1. saatinde en yüksek miktarda gerçekleştiği belirlenmiştir. Ancak, *P. vulgaris* bitkisinde kontrole göre en yüksek PvMet30 gen anlatımının kök dokusunda 2. saatte, gövde dokusunda 1.saatte gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula, Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 1 ve 2 saatlik 38°C sıcaklık uygulama sonrası olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN gen anlatım düzeylerinin ısı haritası üzerinde gösterimi.

M. truncatula, P. vulgaris ve C. arietinum kök, gövde ve yaprak dokularında 180 mM NaCl uygulamasının olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN gen anlatımına olan etkisi Şekil 4.24'teki ısı haritası üzerinde verilmiştir. Buna göre, *M. truncatula* bitkisinde 180 mM NaCl uygulamasının 6.saatinde en yüksek MtMet30 anlatımı kök dokusunda gerçekleşmiştir. 24. ve 48.saatlerde kontrole göre trankript anlatımı yüksek kalmıştır ancak azalan bir anlatım sergilemişlerdir. *C. arietinum* bitkisinde ise kök dokusunda 24.saatte, yaprak dokusunda 24. ve 48.saatlerde en yüksek düzeyde CaWD40/YVTN anlatımı gerçekleşmiştir. *P. vulgaris* bitkisinde ise *M. truncatula* ve *C. arietinum* bitkilerinin aksine tüm dokularında PvWD40/YVTN yüksek gen anlatımı gerçekleşmiştir. *P. vulgaris* kök dokusunda 24. saatte, gövde dokusunda 24. ve 48.saatte, yaprak dokusunda 6. ve 24. saatte en yüksek PvWD40/YVTN anlatımı gerçekleşmiştir. *M. truncatula* bitkisinde 180 mM NaCl

uygulamasının 6. ve 24.saatinde en yüksek MtWD40/YVTN anlatımı gövde dokusunda gerçekleşmiştir. *C. arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında kontrole göre CaMet30 anlatımı artış göstermiştir. Ancak bu artış kontrole göre yüksekliğini korurken NaCl uygulamasında geçen süre içerisinde azalış göstermiştir. *P. vulgaris* bitki dokularında en yüksek PvMet30 anlatımı kök ve gövde dokularında 24. ve 48. saatinde gerçekleşmiştir. Aksine, en yüksek trankript anlatımı yaprak dokusunda 6. ve 24.saatte gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: GZ PZR analizleri sonucunda *Medicago truncatula, Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arietinum* kök, gövde ve yaprak dokularında 6, 24 ve 48 saatlik 180 mM NaCl uygulama sonrası olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN gen anlatım düzeylerinin ısı haritası üzerinde gösterimi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Baklagiller, insanlığın besin zincirindeki en önemli bitki ailelerinden biri olup aynı zamanda topraktaki serbest azotu bağlaması sebebiyle yeryüzündeki azot döngüsünün vazgeçilmez bileşenleridir (Pandey ve diğ. 2008). Baklagiller arasında yonca, fasulye ve nohut gibi protein kaynağı bitkilerin dünya çapında yüksek miktarlarda üretimi yapılmaktadır. Çalışma materyallerimizden biri olan yonca (*M. truncatula* L.), Türkiye'nin her bölgesinde yetiştirilebilmekte ve tarımı her geçen yıl giderek artmaktadır (Kır ve Soya, 2015). M.Ö. 1300 yıllarına kadar uzanan kayıtlar, yoncanın yem bitkisi olarak kullanıldığını ve Anadolu'nun yoncanın gen merkezi olduğunu bildirmektedir (Hanson ve Barnes, 1998). Diğer bir çalışma materyali olan fasulye ise tarımı yapılan en eski bitkilerden biridir ve yılda 23 milyon ton ile dünya çapında tüketilen en önemli baklagillerden biri haline gelmiştir (Geil ve Anderson, 1994; Priya ve Manickavasagan, 2020). Fasulye, içerdiği protein, karbonhidrat, lif, vitamin ve mineraller ile beslenmede önemli yer tutmaktadır (FAOSTAT, 2014). Günümüzde küresel nohut üretiminin neredeyse iki katı kadar fasulye üretilmektedir (Broughton ve diğ. 2003). Yine bir baklagil olan nohut (*Cicer arietinum* L.), tüm dünyada tüketilen önemli bir baklagildir (Jukanti ve diğ. 2012). Nohut yıllık 13,1 milyon tonluk üretimle, fasulyeden sonra en yaygın olarak yetiştirilen ikinci baklagil bitkisidir (FAOSTAT, 2013).

Abiyotik stres kaynakları, bitki büyümesini, üretkenliğini ve verimini olumsuz etkileyerek bitkide bir dizi morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliğe neden olurken dünya çapında mahsul kayıplarının da birincil nedenini oluşturmaktadır (Rodríguez ve diğ. 2006; Bita ve Gerats, 2013). Baklagil türleri için hem tuzluluk hem de sıcaklık stresi önemli abiyotik streslerin başında gelmektedir. Baklagillerde verimi artırmak, sıcaklık ve tuzluluk stresine dayanıklı yeni baklagil çeşitleri üretmek için yenilikçi yaklaşım ve stratejilerin değerlendirilmesi, özellikle de moleküler yaklaşımlara gereksinim vardır. Bu sebeple ilk aşama bitkilerin değişen çevre koşullarının neden olduğu stres faktörlerine verdikleri cevapların moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıdır. Biyoinformatik araçların ve deneysel tekniklerin başarılı kombinasyonu, moleküler müdahalelerin yapılması için gerekli hedeflerin belirlenmesi adına bilgi üretimi sağlayabilir ve bu streslere toleransın altında yatan mekanizmalar ortaya çıkarabilir.

Doğada, tuzluluk bitki gelişimini ve verimini önemli miktarda kısıtlayan stres koşullarının başında gelmektedir. Tuzluluk stresine maruz kalan bitki hücrelerinde ozmotik stres ortaya çıkar. Hücre homeostazının korunması H^+, Na^+, Ca^+ ve K^+ iyonları arasındaki etkileşim ile sağlanır. Doğadaki tuzluluk stresi genellikle NaCl kaynaklı olup, bitkiler kökleri ile Na^+ alarak diğer hücrelerine, dokularına ve organlarına iletir. Sonuçta, yüksek konsanstrasyonlara ulaşan Na^+ iyonları hücre bölünmesini engelleyerek bitki büyümesini yavaşlatır (Negrão ve diğ. 2017).

Küresel ısınmanın neden olduğu artan sıcaklıklar, bitki büyümesini ve gelişimini engelleyerek mahsul üretimini tahrip edebileceğinden tarımı tehdit eder. Sıcaklık tepkisi bitkilerde karmaşık bir süreçtir. Oksidatif strese yol açan ROS'lar sıcaklık stresinin sonuçlarındandır. Sıcaklık stresi altındaki bitkide gen anlatımı değişir, bu da sıcaklık toleransının gelişmesi veya bitkide adaptasyonun oluşması anlamına gelir. Sıcaklık stresine tepki, normal transkripsiyonun engellenmesi ve HSP'lerinin daha yüksek anlatımı ve sıcaklık toleransının aktif hale gelmesi şeklinde gerçekleşir. Stres çok şiddetli ise apoptoz benzeri programlı ölümüne (AL-PCD) giden yolaklar aktive olur (Conrath ve diğ. 2015; Caparrotta ve diğ. 2018; Gull ve diğ. 2019).

Değişen çevre, iklim koşulları ve bunlara bağlı abiyotik ve biyotik stres faktörleri bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için kısıtlayıcı koşullar haline gelmiş, önemli mahsul kayıplarına neden olmuş ve tarımsal üretimin sürdürülebilirliğini tehdit eder hale gelmiştir. Bu nedenle bitkilerin değişen çevreye nasıl adapte olduğunu anlamak büyük önem taşımaktadır. Bu aşamada ubikitin proteazom sistemi devreye girerek bitkilerin dış uyaranlara karşı, büyümeyi ve hayatta kalmayı sağlamak için proteomu çevresel koşullara uyarlar (Fa-Qing Xu., 2019). Ubikitin 76 amino asitten oluşan korunmuş bir proteindir. Ubikitin proteazom yolu hücresel sinyal olaylarını kontrol eder (Smalle ve Vierstra, 2004). Ubikitin proteazom yolu, bitki büyümesinin ve gelişiminin hemen hemen tüm aşamalarını düzenler. Ayrıca, hormon algısı ve sinyali (Santner and Estelle, 2009), epigenetik düzenleme, bitki patogenezi, hastalık kontrolü (Vierstra, 2009), ışık tepkisi ve çiçek gelişimi dahil çeşitli mekanizmalarda görev alır (Sullivan ve diğ. 2003). İlk ubikitinasyon aşaması, üç enzimin eylemiyle gerçekleştirilir: E1 (ubikitin aktive edici enzim), E2 (ubikitin konjüge edici enzim) ve E3 (ubikitin ligaz) (Wang and Deng, 2011). E3 ubikitin ligazları, bitkilerdeki çeşitli gen aileleri tarafından kodlanır. E3'ler, tek alt birim proteinler veya çok alt birimli protein kompleksleri olarak ubikitinasyon işlevini gerçekleştirebilir (Smalle ve Vierstra, 2004). Ubikitin E3 ligazlarından olan SCF kompleksi bunlar arasında en iyi anlaşılanıdır. SCF kompleksi, F-box proteininin hedef substratı tanıyarak

çok önemli bir rol oynadığı çoklu protein kompleksinden oluşur. F-box gen ailesi bitkilerde bulunan en büyük gen ailelerinden biridir. Proteinin N terminalinde bulunan F-box motifi yaklaşık olarak 40-60 amino asitlik korunmuş bir dizi içerir. F-box proteinlerinin özelliği, 26S proteazomda gerçekleşen seçici protein yıkımında kritik rol oynamalarıdır (Lechner ve diğ. 2006). F-box proteinlerinin C-terminalinde değişik fonksiyonları olan farklı motifler bulunur ve bunlardan bir tanesi WD40 tekrarlarıdır (Xu ve diğ. 2009). WD40 tekrarları protein-protein etkileşiminde görev alır ve bu tekrarları içeren F-box proteinlerinin, protein bağlanmasında görev aldığı bilinmektedir (Kuroda ve diğ. 2002; Jain ve Pandey, 2018). N-terminalde bulunan WD40 tekrarları kısa yaklaşık 40 amino asit içeren motiflerdir (Gupta ve diğ. 2015). Sadece F-box ve WD40 motifini içeren F-box/WD40 proteinleri de SCF kompleksinin bir parçasıdır (Kuroda ve diğ. 2002). Ancak bugüne kadar her iki motifi de içeren proteinlerin stres mekanizmalarındaki rollerine dair herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bitkiler, olumsuz çevresel koşullara çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yanıtlar verir. Bitkilerin abiyotik streslere karşı verdikleri moleküler yanıtlar strese özel genlerin anlatımlarının düzenlenmesine bağlıdır. Sinyal iletiminde veya gen anlatımının düzenlenmesinde geç ya da yetersiz kalınırsa hücresel işlevler yerine getirilemez, yapısal proteinler hasar görür dolayısıyla hücresel ölüm gerçekleşir. Abiyotik stres faktörleri gen anlatım mekanizmalarını etkilediğinden, F-box proteinleri gibi protein parçalama mekanizmasına ait bileşenlerin de etkilenmesi oldukça muhtemeldir (Jain ve diğ. 2007). F-box proteinlerinin, çeşitli substratları hedefleyerek proteinlerin stabilitesi üzerinde kontrol sağladıkları ve çok çeşitli süreçlerde hücresel mekanizmaları düzenledikleri bilinmektedir (Ho ve diğ. 2006).

Abiyotik streslere verilen erken tepki, bitkilerin hayatta kalması ve gelişimi için son derece önemlidir. Ancak, erken tuzluluk ve sıcaklık stresi algısını ve sinyal yolaklarını kontrol eden moleküler süreçler tam olarak anlaşılmamıştır. Gen anlatım sonuçlarına göre, tuzluluk stresi ile aktive edilebilir genler, sırasıyla erken ve geç yanıt veren genler olarak ayırt edilebilir. Erken yanıt veren genler, tuzluluk stresinden sonra hızlı ve geçici olarak aktive edilirken, geç yanıt veren genler yavaş ve devamlı yanıt verirler. Erken yanıt veren genlerin çevresel stres tepkisi için kritik olduğu düşünülmektedir (Mahajan ve Tuteja, 2005; Ouyang ve diğ. 2007; Zhang ve diğ. 2011). Pirinçte (*Oryza sativa*), NADPH oksidaza bağımlı H_2O_2 üretimi, tuzluluk stresinin ilk dakikalarında başlar ve bu durum köklerde erken bir adaptasyon sinyalini ve sürecini başlatır (Hong ve diğ. 2009; Schmidt ve diğ. 2013). Benzer şekilde, oksidatif sinyaller tarafından tetiklenen erken stres tepkisi pirincin soğuk stresine adaptasyonu için büyük önem taşımaktadır

(Cheng ve diğ. 2007). Örneğin, buğdayda (*Triticum aestivum L.*) tuzluluk stresine erken yanıt veren 4 gen (WESR1–4) bulunduğu ve bu genlerin, 0.15 M NaCl uygulaması sonunda erken tepki vererek kısa süreli anlatım gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Nemoto ve Sasakuma, 2002). Jung ve diğ. (2012)'nin yaptıkları çalışmada, kullanıma açık veri tabanlarından topladıkları gen anlatım verilerine göre sıcaklık stresi altındaki pirinç bitkisinde en az 2 kat anlatım gösteren 244 erken tepki veren gen ve 238 geç tepki veren gen tespit etmişlerdir. Genel olarak yüksek sıcaklıklar, bitkilerde hayatta kalmak için önemli olan HSP genlerinin anlatımını arttırır (Chang ve diğ. 2007). Yapılan çalışmalarda, tuzluluk ve sıcaklık stresinde erken stres tepkisinin önemi vurgulanmaktadır.

Gupta ve diğ. (2015)'nin yaptıkları çalışmada dokuya özgü anlatımı yapılan F-box genlerinin büyük olasılıkla doku tipine özgü önemli işlevlere katıldığı, ancak her dokuda anlatımı yapılan F-box genlerinin genel hücresel mekanizmaya dahil olduğu sonucuna varılabileceğini ifade etmiştir. F-box protein genlerinin çoğunun tuzluluk, sıcaklık, kuraklık, su baskını, mineral toksisitesi ve ağır metal gibi abiyotik streslere, bakteri, virüs, mantar, parazit ve böceklerin sebep olduğu biyotik streslere yanıt verebildiği bildirilmiştir (Song ve diğ. 2015; Zhang ve diğ. 2018). Örneğin, farklı abiyotik stres koşullarına maruz kalan pirinç fidelerinde en az 43 F-box proteinini kodlayan genin farklı şekilde gen anlatımının yapıldığı bildirilmiştir (Jain ve diğ. 2007). Yapılan çalışmalar, SCF kompleksi ile F-box proteinlerinin bitki büyümesi ve gelişimine ek olarak, bitki abiyotik ve biyotik stres tepkilerinin düzenlenmesinde kritik roller oynadığını göstermiştir (Lechner ve diğ. 2006).

Arabidopsis thaliana bitkisinde bulunan F-box proteinlerinin stres yanıtlarında rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin, F-box AtPP2-B11 geninin hem transkript hem de protein seviyelerinin tuzluluk stresi ile arttığı belirlenmiştir. Transgenik Arabidopsis bitkisi ile yapılan bir çalışmada, AtPP2-B11 geninin anlatımının aşırı artması ile yüksek tuzluluğa tolerans belirlenmiştir. Tuz stresi altında, bir SCF E3 ligazı olan AtPP2-B11'in 4000'den fazla genin anlatımını düzenleyebildiği belirlenmiştir (Li ve diğ. 2014b; Zhou ve diğ. 2014; Zhang ve diğ. 2018). AtPP2-B11 geni, "phloem protein 2-B11" proteinini kodlar. Bu protein 257 amino asit uzunluğunda olup yalnızca F-box ve PP2 motifini içermektedir. Bu çalışma ile yanlızca bu 2 motifi içeren bir proteinin kritik işlevi ortaya konulmuştur. İlave olarak, AtPP2-B11, oksidatif strese duyarlı bir anahtar gen olan annexin1 geninin anlatımını da düzenler. Ayrıca AtPP2-B11, tuzluluk stresi altında Na+ homeostaz genlerinin anlatımını düzenleyebilir. AtP2-B11'in

anlatımının yüksek olduğu transgenik bitkilerde daha düşük hücresel Na^+ konsantrasyonu olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, AtPP2-B11'in Arabidopsis'te tuz stresine yanıt olarak pozitif bir düzenleyici olarak işlev gördüğünü göstermektedir (Li ve diğ. 2014b).

Diğer bir örnek ise, *A. thaliana* F-box proteini AtFBP7'nin sıcaklık stresine duyarlı olduğu ve stres sırasında doğru protein translasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir. Sıcaklık ve soğuk stresine yanıt olarak, *AtFBP7* ifadesinin yukarı yönlü anlatımı ani ve geçici olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, *AtFBP7* gen anlatımının sıcaklık stresleri tarafından aktive edildiğini göstermektedir. AtFBP7'nin protein sentezi için gerekli olup olmadığı ayrıca test edilmiştir. *A. thaliana fbp7-2, fbp7-3, fbp7-4* mutantları ve 35S metiyonin etiketleme metodu ile yapılan çalışmalar, yabani *A. thaliana* ile karşılaştırıldığında translasyonda gelişen kusurun AtFBP7 gen fonksiyonu kaybıyla bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Calderón-Villalobos ve diğ. 2007).

Calderón-Villalobos ve diğ. (2007) çalışmalarında, AtFBP7 ve Met30 ortologlarını incelemiştir. AtFBP30'lar sadece F-box motifini içerirken, Met30'lar ise hem F-box motifini ve hem de WD40 tekrarlarını içermektedir. SKP1 dışında, SCF işlevi için önemli olan Cdc34, Rbx1/Hrt1 ve Sgt1 diğer üç proteindir. Met30 proteini ise Cdc34 proteini ile $Cdc34/SCF^{Met30}$ kompleksini oluşturmaktadır. Cdc34 ubikitin konjüge edici enzimdir ve tanımlanan çoğu SCF substratının ubikitinasyonunda aktif rol alır. SCF bileşenleri ve bunlarla ilişkili proteinler arasında, substrat spesifikliği sağlayan ise F-box proteinidir. Veri tabanı araştırmaları, yüzlerce F-box proteini olduğunu öngörmektedir (yalnızca *A. thaliana*'da en az 700 F-box proteini). Farklı F-box proteinleri, farklı SCF komplekslerini tanımlamaktadır (Kaiser ve diğ. 2000). SCF kompleksinde Cdc34 ile etkileşimde bulunan Met30, sülfür amino asit metabolizmasında yer alan genlerin düzenlenmesinde kusurlu olan *S. cerevisiae* mutantlarına yönelik bir taramada ilk kez tanımlanmıştır (Thomas ve diğ. 1995).

Kaiser ve diğ. (2000)'nin çalışmasına göre, F-box/WD40 proteini Met30, ubikitin ligaz $Cdc34/SCF^{Met30}$ kompleksinde bulunarak substrat tanıma görevini üstlenir. $Cdc34/SCF^{Met30}$'un kritik substratı ise transkripsiyon faktörü Met4 olduğu çalışmalarında kanıtlanmıştır. Met4'ün hücre içerisindeki miktarının Met30 ile ilişkili olmadığı, ancak Met4 transkripsiyon faktörünün hedef genlerinin baskılanması $Cdc34/SCF^{Met30}$-bağımlı ubikitinasyon ile ilişkilidir. Dolayısıyla, hücre içerisinde fonksiyonel olarak bulunan Met4, hedef promotörler ile etkileşime girer ancak fonksiyonel transkripsiyon kompleksleri oluşturmada başarısız olur. Bu durumda

Met4'ün 26S proteazom tarafından degredasyonu aktive edilmez, bunun yerine Met4'ün transkripsiyonel aktivitesi doğrudan inhibe edilir. Ayrıca, Cdc34/SCF'nin proteolizden bağımsız yeni bir düzenlenme şekli ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini doğrudan düzenlemek için kullanılabileceğini göstermektedir.

S. cerevisiae'da transkripsiyon faktörü Met4'ün, Cdc34/SCF^{Met30} aracılığı ile düzenlendiği bildirilmiştir (Kaiser ve diğ. 2000; Flick ve diğ. 2004). Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen biyoinformatik analizlerle bulunan F-box/WD40 proteinlerinin, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinleri olabileceği ve AtMet30 ve WD40/YVTN ile aralarında dizi benzerliği olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, >%90 dizi benzerliğinin bir sonucu olarak 3 boyutlu protein modelleri arasında da büyük benzerlik bulunmaktadır. Dizi benzerlikleri değerlendirildiğinde baklagillerde bulunan XP_003617076.1, XP_007141583.1 ve XP_004491170.1 proteinlerinin Met30 proteinleri olduğu; XP_003599502.1, XP_007149035.1 ve XP_004514570.1 proteinlerinin Met30-benzeri proteinler olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında yapılan STRING analizleri sonucunda, olası baklagil Met30 proteinleri ile ilişkili trankripsiyon faktörleri belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre olası MtMet30 proteiniyle AES62083 (11425468) ve AES69309 transkripsiyon faktörleri arasında protein-protein etkileşimi belirlenmiştir. *S. cerevisiae* Met4 transkripsiyon faktörüyle benzer şekilde, AES69309 transkripsiyon faktöründe bZIP ailesine aittir. STRING analiziyle tespit edilen diğer transkripsiyon faktörleri ise basic/helix-loop-helix (bHLH30) ailesine aittir. *P. vulgaris* transkripsiyon faktörleri ise NCBI blast ile tespit edilmiştir. Proteolizden bağımsız olarak *S. cerevisiae* Met30 proteini ile aktivitesi düzenlenebilen Met4 transkripsiyon faktörü gibi baklagil transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin olası baklagil Met30 proteininin yer aldığı Cdc34/SCF$^{baklagil\text{-}met30}$ kompleksleri ile proteolizden bağımsız olarak düzenlenebileceğini düşündürmektedir.

S. cerevisiae Met4 transkripsiyon faktörünün aktif veya inaktif durumunu hücre içi SAM konsantrasyonuna bağlıdır. SAM konsantrasyonundaki düşüş Met4'ü aktif hale geçirmektedir (Flick ve diğ. 2004). Cdc34/SCF$^{baklagil\text{-}met30}$ ile ilişkili baklagil transkripsiyon faktörlerinin, S-adenosilmetiyonin sentetaz genlerinin transkripsiyonunu kontrol ettiğini düşündürmektedir. S-adenosilmetiyonin sentetaz (SAMS), metiyonin ve ATP'yi katalize ederek S-adenosil-L-metiyonin (SAM) oluşturur. Bitkilerde *SAMS* genleri karakterize edilmiş olup çoğunun gelişme ve stres tepkisine katıldıkları bildirilmiştir (He ve diğ. 2019). SAM'in sadece DNA, RNA,

proteinler ve lipidlerin metilasyonu için metil grupları sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda poliaminlerin ve bitki hormonu etilenin sentezine katıldığı bilinmektedir (Roje, 2006; Bürstenbinder ve diğ. 2007). He ve diğ. (2019) çalışmalarında, *Cucumis sativus* L.'de iki *SAMS* genini (*CsSAMS1* ve *CsSAMS2*) varlığını ortaya koymuştur. Bu genlerin NaCl, kuraklık, sıcaklık dahil olmak üzere çeşitli stres koşulları altında farklı gen anlatım profilleri sergiledikleri; bitki gelişimi ve strese verilen cevapta rol oynadıkları bildirilmiştir. Ayrıca, *CsSAMS1* anlatım seviyesindeki artışın, tuz toleransı ile ilgili olduğu bildirilmiştir.

Cdc34/SCF$^{\text{baklagil-met30}}$ ile ilişkili baklagil transkripsiyon faktörlerinin, S-adenosilmetiyonin dekarboksilaz (*SAMDC*) genlerinin transkripsiyonunu kontrol ettiği düşünülmektedir. Chen ve diğ. (2014)'nin yaptıkları çalışmada, poliaminlerin sentezini, bitki büyümesini, gelişimi ve ayrıca bitki stres tepkilerini düzenleyen anahtar bir enzim olan SAMDC incelemişlerdir. Poliaminler, bitki büyümesini, gelişimini ve ayrıca bitkilerin abiyotik ve biyotik streslere adaptasyonunu düzenler. Putresin (Put), spermidin (Spd) ve spermin (Spm), bitkilerde en çok bulunan poliamin tipleridir. Put, ornitinden veya argininden üretilebilir. S-adenosilmetiyonin (SAM) ise, Spd ve Spm'nin öncüsüdür. SAM dekarboksilaz tarafından katalize edilen SAM, dekarboksilatlı-SAM (dcSAM) metabolitne dönüştürülür. Transgenik pirinç bitkileri üzerinde yapılan çalışmada, SAMDC genlerinin azalan anlatımıyla, bitki uzunluğunun ve polen canlılığının azalmasına ilave olarak abiyotik strese toleransta gerileme belirlemişlerdir.

Bu tez çalışmasından yapılan GZ PZR analizleri sonucunda, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN transkriptleri uygulanan streslere karşı erken cevap tepkisi verdiği belirlendi. Kontrole göre, sıcaklık stresinde ilk bir saatte, tuzluluk stresinde ise ilk 6 saatte belirlenen transkript azalışı SAM miktarının artışı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Azalan olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN transkriptleri hücre içerisinde daha az protein konsantrasyonu yaratacağı, dolayısıyla olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin Cdc34/SCF kompleksinde daha az yer almaları ile Met4-benzeri baklagil transkripsiyon faktörlerinin ubikitinasyonunu azalmasıyla aktif hale geçeceği, hem bu tez çalışmasında alınan sonuçlara göre hem de Kaiser ve diğ. (2000) ve Flick ve diğ. (2004)'nin yaptığı çalışmaya göre yorumlanmaktadır. Bu yolla, SAM genlerinin Met4-benzeri transkripsiyon faktörleri ile etkileşiminin artacağını düşündürmektedir.

WD40-tekrar proteinleri, tüm ökaryotlarda bulunan geniş bir aile olup, sinyal transdüksiyonu, transkripsiyon düzenlemesi, hücre döngüsü kontrolü, otofaji ve apoptoza kadar çeşitli

fonksiyonlarda rol oynar (Stirnimann ve diğ. 2010). Tüm WD40 tekrar proteinlerinin temelde yatan ortak işlevi, protein etkileşimleri için iskele oluşturmaktan sorumlu çok proteinli yapıları koordine etmeleridir. WD40 tekrarları yüksek oranda korunduğundan, WD40 proteinlerinin özgüllüğü, tekrarların dışındaki diziler tarafından belirlenir (Schapira ve diğ. 2017; Jain ve Pandey, 2018). WD40 tekrarlarının, F-box motifleriyle birlikte dahil olduğu komplekslerden bir tanesi de E3 ubikitin ligazdır.

WD40 tekrarlarının transkripsiyon düzenlemesinde rol aldığı literatürdeki çalışmalar ile desteklenmiş olup, F-box motifi ve WD40 tekrarları içeren proteinlerin transkripsiyon faktörlerini tanımada görevli olduğu, ayrıca proteolizden bağımsız ubikitinasyonu sağladığı düşünülmektedir. Baklagillerdeki F-box/WD40 proteinlerinin işlevlerinin ise tez çalışmasında elde edilen bulgular ışığında, *S. cerevisiae* Met30 ve Met4 ilişkisinden yararlanılarak açıklanabileceği ve başta sıcaklık, tuzluluk stresi olmak üzere diğer abiyotik stres mekanizmalarında önemli rol aldıkları düşündürmektedir.

Günümüzde, çok az sayıda hem F-box hem de WD40 tekrarı içeren protein bitkilerde tanımlanabilmiştir. Bu tez çalışmasının ilk aşaması olan biyoinformatik analizler sonucunda, tüm genom dizilimleri bulunan baklagillerden *M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinum*'da toplamda 6 adet F-box/WD40 proteini tanımlanmıştır. Song ve diğ. (2015)'nin yaptıkları GZ PZR analizleri sonucunda, F-box protein genlerinin sıcaklık, kuraklık, salisilik asit, absisik asit, tuzluluk gibi abiyotik streslere yanıt verebildiğini doğrulanmıştır. Çalışmalarında inceledikleri 38^{o}C sıcaklık ve 180 mM tuzluluk (NaCl) stresi, bu tez çalışmasında *M. truncatula, P. vulgaris* ve *C. arietinum* bitkilerine abiyotik stres olarak uygulanmıştır. *In vitro* koşullarda yetiştirilen *M. trunctula, P. vulgaris* ve *C. arietinum* bitkilerindeki olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin gen anlatım düzeylerindeki erken stres tepkisi 38^{o}C sıcaklık ve 180 mM NaCl stres uygulaması sonunda GZ PZR ile belirlenmiştir. GZ PZR analizleri, F-box/WD40 genlerinin sıcaklık ve tuzluluk stresleri altında dokuya özgü anlatım yaptığını göstermiştir. Yani, uygulanan stres süresine ve bitki dokusuna göre genlerin anlatımı istikrarlı bir artış veya düşüş göstermiştir.

Olası baklagil Met30 gen anlatımı, *M. truncatula* ve *P. vulgaris* bitkilerinin özellikle kök ve gövde dokularında sıcaklık stresi uygulamasının 2. saatinde kontrole göre 2,5-3 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. Aksine, *C. arietinum* bitkisinin yaprak dokusunda sıcaklık stresi uygulamasının 1. ve 2. saatinde anlatımın kontrole göre yaklaşık 2,4 kat arttığı belirlenmiştir.

Olası baklagil Met30 gen anlatımı sıcaklık stresi altındaki *M. truncatula* ve *P. vulgaris* bitkilerininde kök ve gövde dokularında artarken, *C. arietinum* bitkisinde ise yaprak dokularında artmıştır. Olası baklagil WD40/YVTN gen anlatımı ise sıcaklık stresi uygulamasının 2. saatinde *M. truncatula* yaprak dokularında, sıcaklık stresi uygulamasının 1. saatinde *C. arietinum* bitkilerinin yaprak dokularında kontrole göre arttığı belirlendi. Ancak, Olası baklagil WD40/YVTN gen anlatımı *P. vulgaris* bitkisinin kök dokularında sıcaklık stresi uygulamasının 2. saatinde, gövde dokularında 1. saatte artığı belirlendi.

M. truncatula, P. vulgaris ve *C. arietinum* bitkilerinde tuzluluk stresi uygulaması sonunda olası baklagil Met30 transkript anlatımlarının farklı dokularda ve farklı uygulama sürelerinde arttığı belirlendi. MtMet30 gen anlatımı *M. truncatula* kök dokusunda 6. saatte ve 24. saatte kontrole göre artmıştır. *C. arietinum* bitkisinde ise kök dokularında 24.saatte, yaprak dokularında 24. saatte ve 48. saatte gen anlatımının arttığı belirlendi. *P. vulgaris* bitkisinde ise kök dokularında 24.saatte, gövde dokusunda 24. saatte ve 48. saatte, yaprak dokusunda 6. saatte ve 24. saatte PvWD40/YVTN gen anlatımının arttığı belirlendi. *M. truncatula* bitkisinde sadece kök dokularında kontrole göre gen anlatımı artarken, *C. arietinum* bitkisinde kök ve yaprak dokularında kontrole göre gen anlatımının arttığı belirlenmiştir. *M. truncatula* ve *C. arietinum* bitkilerinin aksine, *P. vulgaris* bitkisinin tüm dokularında kontrole göre gen anlatımının arttığı belirlendi. MtWD40/YVTN gen anlatımı ise *M. truncatula* bitkisini gövde dokularında stres uygulamasının 6.saatinde ve 24. saatinde kontrole göre arttığı belirlendi. Aksine, PvMet30 gen anlatımı *P. vulgaris* ve *C. arietinum* bitkilerinin tüm dokularında kontrole göre arttığı belirlendi. GZ PZR sonuçlarına göre, F-box/WD40 proteinlerinin farklı dokularda anlatımının azaldığı veya güçlü bir şekilde arttığı belirlendi. Yapılan GZ PZR analizleri, F-box/WD40 proteinlerinin yüksek sıcaklığa (38°C) ve 180 mM NaCl stresine yanıt verdiğini ortaya koymuştur.

Bu bulgular, baklagil F-box/WD40 proteinlerinin sıcaklık ve tuzluluk stresine erken tepkide dokuya özgü rol aldığını düşündürmektedir. Baklagil bitkilerindeki F-box/WD40 protein dizilerinde ve üç boyutlu yapılarındaki benzerlik kadar farklılıklar da dikkat çekmektedir. Protein dizilerindeki bu farklılık aynı aileden olan bitkilerdeki farklı dokularda yapılan transkript anlatımlarını açıklayabilir. Özellikle C-terminalde bulunan WD40 tekrarlarındaki dizi farklılıkları protein-protein etkileşimini etkileyebilir. Çünkü proteinlerdeki bağlanma özgüllüğü, bir motifin tercihen bir molekülü bağlama yeteneğini ifade eder. Bu etkileşim, substratına bir kalıp gibi uyacak şekilde tasarlanmış bir protein üzerindeki ligand bağlanma

bölgesinin yapısına, yani proteinin üç boyutlu yapısına bağlıdır. Yüksek afiniteli ve oldukça spesifik etkileşimlerin oluşması için, bağlanma bölgesinin şekli ve kimyasal yüzeyi substrat moleküle tamamlayıcı olmalıdır (Lodish ve diğ. 2000).

NCBI veri tabanından bulunan insan FBXW7 proteini temel alınarak 3 boyutlu yapıları oluşturulan baklagil F-box/WD40 proteinlerinin, *A. thaliana* Met30 ve WD40/YVTN proteininin 3 boyutlu yapılarının, özellikle proteinin bağlanma bölgesinin baklagiller arasında yüksek oranda korunduğu belirlendi. Proteinlerin bağlanma bölgesini oluşturan WD40 tekrarlarında, WD40/YVTN proteinlerinde 304-364 amino asit dizileri arasında ve Met30 proteinlerinde 432-521 amino asit dizileri arasında dikkat çeken farklılıkların, protein-protein etkileşiminde değişiklikliklere, özellikle substrat seçiciliğine, neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu bölgeler proteinin C-terminalinde bulunan ve protein-protein etkileşiminde spesifik etkileşim gösteren WD40 tekrarlarını kapsamaktadır.

STRING veri tabanı kullanılarak farklı fonksiyonlara sahip olan proteinlerden oluşan bir protein-protein etkileşim ağı oluşturulmuştur. Protein–protein etkileşiminin beklendiği gibi çoğunlukla ubikitin proteazom sisteminde bulunan proteinler arasında gerçekleştiğini görülmüştür. F-box proteinlerinin transkripsiyon faktörleriyle etkileşimleri olduğu literatürde bilinmekte olup, STRING analizi sonuncunda bu çalışmada belirlenen olası baklagil Met30 proteinlerinin, transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girdikleri de belirlenmiştir. Olası MtMet30 proteini Cdc34/SCF^{MtMet30} kompleksinde yer alarak *M. truncatula* AES69309 ve AES62083 transkripsiyon faktörleriyle, PvMet30 proteini Cdc34/SCF^{PvMet30} kompleksiyle XP_007143790.1 ve XP_007153337.1 transkripsiyon faktörleriyle, CaMet30 proteini Cdc34/SCF^{CaMet30} kompleksinde yer alarak XP_004490274.1 ve XP_00496205.1 transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girdikleri belirlendi.

Sonuç olarak, F-box/WD40 proteinleri biyoinformatik analizlerle *M. truncatula*, *P. vulgaris* ve *C. arietinum* bitkilerin tüm genom dizilerinde bulundu. Bulunan diziler üzerinde yapılan biyoinfomatik analizler, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin *S. cerevisiae* ve *A. thaliana* Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin homologları olduğunu göstermektedir. STRING ve NCBI blast analizleri ile ortaya konan transkripsiyon faktörleri ise, çoklu dizi analizleri sonuçlarına göre *S. cerevisiae* Met4 transkripsiyon faktörlerinin homoloğu olabileceğini düşündürmektedir.

Analizler sonucunca, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin sıcaklık ve tuzluluk stresine yanıt verdiği GZ PZR analizleri ile belirlendi. Literatürde yer alan çalışmalarda ifade edildiği gibi F-box proteinleri abiyotik streslere yanıt verebildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise olası baklagil MtMet30, PvMet30, CaMet30, MtWD40/YVTN, PvWD40/YVTN ve CaWD40/YVTN proteinlerinin abiyotik stresler olan sıcaklık ve tuzluluk stresine yanıt verdiği belirlenmiştir. Bu proteinlerin fonksiyonları ve SCF kompleksindeki rolü, dahil olduğu stres tepki mekanizmaları ve protein-protein etkileşiminde bağlandıkları çoklu dizi hizalama yöntemi, filogenetik ağaç, 3 boyutlu protein yapıları ve STRING analizleri ile belirlenmiştir. Sonuçlar, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin Cdc34/SCF ubikitinasyon kompleksinin alt birimi olarak görev aldığını ve *S. cerevisiae* Met4 homoloğu veya benzeri transkripsiyon faktörleri ile protein-protein etkileşimine girerek, bu transkripsiyon faktörlerini ubikitinlenmesini sağladığını göstermektedir. Ubikitine edilen transkripsiyon faktörlerinin aktif durumdan pasif duruma geçtiği ve 26S proteazom tarafından parçalanmadığı literatürdeki bilgiler ışığında öngörülmektedir.

AtPP2-B11 geninin kodladığı "phloem protein 2-B11" proteininde olduğu gibi, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinleri de sadece iki motif içermektedir. AtPP2-B11 proteindeki F-box ve PP2 motifinin ile abiyotik stres mekanizmalarında kritik görevlere sahip olduğu bildirilmiştir (Li ve diğ. 2014b). Yapılan bu çalışmada ise F-box motifini ve WD40 tekrarlarını bulunduran olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin abiyotik streslere tepkide rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca, bu tepkinin ubikitinasyon proteazom sistemiyle ilgili olduğu, baklagil transkripsiyon faktörlerinin ubikinasyonunu sağladığı, dolayısıyla abiyotik stresle ilgili genlerin anlatımını düzenlediğini düşündürmektedir. STRING analizleri ile de bu transkripsiyon faktörlerinin *SAM* genlerini düzenlediğini öngörülmektedir.

Bu çalışma, ekonomik önemi yüksek baklagil türleri olan *M. truncatula*, *P. vulgaris* ve *C. arietinum* bitkilerinde F-box/WD40 motiflerini içeren olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin varlığına ve işlevlerine ilişkin ilk bilgileri sağlamaktadır. Özetle, biyoinformatik yaklaşımlarla bulunan olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinleri, sıcaklık ve tuzluluk streslerinin çeşitli aşamalarında dokuya özgü gen anlatımları göstermiş ve seçilen abiyotik stresler sırasında transkript anlatımlarının dokuya özgü olarak gerçekleştiği belirlendi. Bu çalışma ile sağlanan sonuçlar, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin abiyotik stres koşullarındaki rolünün ve Cdc34/SCF kompleksindeki fonksiyonunun kanıtlanmasındaki

yolu açacak ve dolayısıyla baklagillerin abiyotik strese tolerans kazanması yolundaki genetik mühendisliği çalışmalarına hedef oluşturacaktır. Bulgularımız, olası baklagil Met30 ve WD40/YVTN proteinlerinin tuzluluk ve sıcaklık stresine verdikleri erken tepki ile bu stresleri daha iyi anlaşılmasına ve WD40 tekrarlarını içeren F-box proteinlerinin rolleri hakkında gelecekte yapılacak çalışmalara katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

Abd-Alla, M. H., 2011, Nodulation and nitrogen fixation in interspecies grafts of soybean and common bean is controlled by isoflavonoid signal molecules translocated from shoot, *Plant, Soil and Environment*, 57(10), 453-458.

Abd-Hamid, N. A., Ahmad-Fauzi, M. I., Zainal, Z., Ismail, I., 2020, Diverse and dynamic roles of F-box proteins in plant biology, *Planta*, 251(3), 1-31.

Abu Kwaik, Y., Price, C. T., 2010, Exploitation of host polyubiquitination machinery through molecular mimicry by eukaryotic-like bacterial F-box effectors, *Frontiers in microbiology*, 1, 122.

Ahmad, P., Prasad, M. N. V. (Eds.)., 2011, *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*, Springer Science, Verlag New York, ISBN: 978-1-4614-0634-1

Al-Lawati, A., Al-Bahry, S., Victor, R., Al-Lawati, A. H., Yaish, M. W., 2016, Salt stress alters DNA methylation levels in alfalfa (*Medicago spp*), *Genetics and Molecular Research*, 15(1), 1-16.

Alet, A. I., Sánchez, D. H., Cuevas, J. C., Marina, M., Carrasco, P., Altabella, T., Ruiz, O. A., 2012, New insights into the role of spermine in *Arabidopsis thaliana* under long-term salt stress, *Plant Science*, 182, 94-100.

Alwine, J. C., Kemp, D. J., Stark, G. R., 1977, Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5350-5354.

Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Yılmaz, B., 2019, Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), ve glutatyon peroksidaz (GPx), *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 26(3).

Atkinson, N. J., Urwin, P. E., 2012, The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field, *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.

Arıkan, B., Çakır, Ö., Turgut KARA, N., 2016, Molecular cloning of cDNA encoding WD40 repeat sequences from Legume Species, *Journal of Molecular Biology and Genetics*, 1, 27-32.

Bita, C., Gerats, T., 2013, Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops, *Frontiers in plant science*, 4, 273.

Bokszczanin, K. L., Fragkostefanakis, S., 2013, Solanaceae Pollen Thermotolerance Initial Training Network C Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance, *Fronteirs Plant Science*, 4, 315.

Boyer, J. S., 1982, Plant productivity and environment, *Science*, 218(4571), 443-448.

Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., Buchannan, B., Jones, R., 2000, Responses to abiotic stresses. In: Biochemistry and molecular biology of plants, *American Society of Plant Biologists, Rockville, MD*, 149-158, ISBN: 978-0-470-71421-8.

Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J., 2003, Beans (Phaseolus spp.) –model food legumes, *Plant and soil*, 252(1), 55-128.

Broughton, W. J., Jabbouri, S., Perret, X., 2000, Keys to symbiotic harmony, *Journal of bacteriology*, 182(20), 5641-5652.

Bussell, J. D., Zhou, W., Estavillo, G., Smith, S. M., Pogson, B., 2010, Signaling from the Endoplasmic Reticulum Activates Brassinosteroid Signaling and Promotes Acclimation to Stress in Arabidopsis, *Science Signal*, 28;3(141).

Bürstenbinder, K., Rzewuski, G., Wirtz, M., Hell, R., Sauter, M., 2007, The role of methionine recycling for ethylene synthesis in Arabidopsis, *The Plant Journal*, 49(2), 238-249.

Calderón-Villalobos, L. I. A., Nill, C., Marrocco, K., Kretsch, T., Schwechheimer, C., 2007, The evolutionarily conserved *Arabidopsis thaliana* F-box protein AtFBP7 is required for efficient translation during temperature stress, *Gene*, 392(1-2), 106-116.

Callis, J., Vierstra, R. D., 1989, Ubiquitin and ubiquitin genes in higher plants, *Oxford surveys of plant molecular and cell biology*, ISSN: 0264-861X.

Caparrotta, S., Boni, S., Taiti, C., Palm, E., Mancuso, S., Pandolfi, C., 2018, Induction of priming by salt stress in neighboring plants, *Environmental and Experimental Botany*, 147, 261-270.

Chang, H. C., Tang, Y. C., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U., 2007, SnapShot: molecular chaperones, Part I, *Cell*, 128(1), 212-e1.

Chen, M., Chen, J., Fang, J., Guo, Z., Lu, S., 2014, Down-regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase genes results in reduced plant length, pollen viability, and abiotic stress tolerance, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 116(3), 311-322.

Chen, Y., Li, C., Zhang, B., Yi, J., Yang, Y., Kong, C., Gong, M., 2019, The role of the late embryogenesis-abundant (LEA) protein family in development and the abiotic stress response: a comprehensive expression analysis of potato (*Solanum Tuberosum*), *Genes*, 10(2), 148.

Cheng, C., Yun, K. Y., Ressom, H. W., Mohanty, B., Bajic, V. B., Jia, Y., de los Reyes, B. G., 2007, An early response regulatory cluster induced by low temperature and hydrogen peroxide in seedlings of chilling-tolerant japonica rice, *BMC genomics*, 8(1), 175.

Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhou, T., Zhu, J. K., 2007, Small RNAs: big role in abiotic stress tolerance of plants. In Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops, *Springer, Dordrecht*, 223-260

Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., Millán, F., 1999, Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates, *Food Chemistry*, 67(3), 269-274.

Coakley, S. M., Scherm, H., Chakraborty, S., 1999, Climate change and plant disease management, *Annual review of phytopathology*, 37(1), 399-426.

Compant, S., Van Der Heijden, M. G., Sessitsch, A., 2010, Climate change effects on beneficial plant–microorganism interactions, *FEMS microbiology ecology*, 73(2), 197-214.

Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., Tavladoraki, P., 2006, Reactive oxygen species production in the plant apoplastic environment, *Trends in Plant Science*, 2(11), 80-88.

Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., Jaskiewicz, M. R., 2015, Priming for Enhanced Defense, *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 97–119.

Craig, K. L., Tyers, M., 1999, The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction, *Progress in biophysics and molecular biology*, 72(3), 299-328.

Cui, F., Liu, L., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Q., Lin, B., Xie, Q., 2012, Arabidopsis ubiquitin conjugase UBC32 is an ERAD component that functions in brassinosteroid-mediated salt stress tolerance, *The Plant Cell*, 24(1), 233-244.

Cushman, J. C., Bohnert, H. J., 2000, Genomic approaches to plant stress tolerance, *Current opinion in plant biology*, 3(2), 117-124.

Das, A., Rushton, P. J., Rohila, J. S., 2017, Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine max* L.) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress, *Plants*, 6(2), 21.

De Castro, E., Sigrist, C. J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Hulo, N., 2006, ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins, *Nucleic acids research*, 34, W362-W365.

Derveaux, S., Vandesompele, J., Hellemans, J., 2010, How to do successful gene expression analysis using real-time PCR, *Methods*, 50(4), 227-230.

Deng, Y., Humbert, S., Liu, J. X., Srivastava, R., Rothstein, S. J., Howell, S. H., 2011, Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7247-7252.

Deshaies, R. J., 1999, SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases, *Annual review of cell and developmental biology*, 15.

Devasirvatham, V., Gaur, P. M., Mallikarjuna, N., Tokachichu, R. N., Trethowan, R. M., Tan, D. K., 2012, Effect of high temperature on the reproductive development of chickpea genotypes under controlled environments, *Functional Plant Biology*, 39(12), 1009-1018.

Diniz, W., Canduri, F., 2017, Bioinformatics: an overview and its applications, *Genetics and Molecular Research*, 16(1), 17.

Doyle, J. J., Luckow, M. A., 2003, The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context, *Plant physiology*, 131(3), 900-910.

Duranti, M., 2006, Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Fitoterapia*, 77(2), 67-82.

Fa-Qing Xu., H. X., 2019, The ubiquitin-proteasome system in plant responses to environments, *Plant Cell Environ*ment, 42, 2931–2944.

Fahad, S., Chen, Y., Saud, S., Wang, K., Xiong, D., Chen, C., Huang, J., 2013, Ultraviolet radiation effect on photosynthetic pigments, biochemical attributes, antioxidant enzyme activity and hormonal contents of wheat, *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(3,4), 1635-1641.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011, FAO statistical database, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC, [Ziyaret tarihi: 14 Ekim 2020].

Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, 2013, FAOSTAT: FAO Statistical databases, Rome: Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC, [Ziyaret tarihi: 16 Ekim 2020].

Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, 2014, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division, http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC, [Ziyaret tarihi: 23 Ekim 2020].

Farooq, M., Nadeem, F., Gogoi, N., Ullah, A., Alghamdi, S. S., Nayyar, H., Siddique, K. H., 2017, Heat stress in grain legumes during reproductive and grain-filling phases, *Crop and Pasture Science*, 68(11), 985-1005.

Feldman, R. R., Correll, C. C., Kaplan, K. B., Deshaies, R. J., 1997, A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p, *Cell*, 91(2), 221-230.

Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J. A., Capati, C., McDonald, W. H., Yates, J. R., Kaiser, P., 2004, Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain, *Nature Cell Biology*, 6(7), 634-641.

Flowers, T. J., Gaur, P. M., Gowda, C. L., Krishnamurthy, L., Samineni, S., Siddique, K. H., Colmer, T. D., 2010, Salt sensitivity in chickpea, *Plant, cell & environment*, 33(4), 490-509.

Fong, H. K., Hurley, J. B., Hopkins, R. S., Miake-Lye, R., Johnson, M. S., Doolittle, R. F., Simon, M. I., 1986, Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the CDC4 gene and identification of related mRNAs, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(7), 2162-2166.

Fougère, F., Le Rudulier, D., Streeter, J. G., 1991, Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant physiology*, 96(4), 1228-1236.

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006, Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks, *Current opinion in plant biology*, 9(4), 436-442.

Gachomo, E. W., Jimenez-Lopez, J. C., Baptiste, L. J., Kotchoni, S. O., 2014, GIGANTUS1 (GTS1), a member of Transducin/WD40 protein superfamily, controls seed germination, growth and biomass accumulation through ribosome-biogenesis protein interactions in *Arabidopsis thaliana*, *BMC plant biology*, 14(1), 37.

Gachon, C., Mingam, A., Charrier, B., 2004, Real-time PCR: what relevance to plant studies?, *Journal of experimental botany*, 55(402), 1445-1454.

Geil, P. B., Anderson, J. W., 1994, Nutrition and health implications of dry beans: a review, *Journal of the American College of Nutrition*, 13(6), 549-558.

Genschik, P., Parmentier, Y., Durr, A., Marbach, J., Criqui, M. C., Jamet, E., Fleck, J., 1992, Ubiquitin genes are differentially regulated in protoplast-derived cultures of Nicotiana sylvestris and in response to various stresses, *Plant molecular biology*, 20(5), 897-910.

Georgieva, K., 1999, Some mechanisms of damage and acclimation of the photosynthetic apparatus due to high temperature, *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 25(3-4), 89-99.

Gill, S. S., Tuteja, N., 2010, Polyamines and abiotic stress tolerance in plants, *Plant signaling & behavior*, 5(1), 26-33.

Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D., Boyse, E. A., 1975, Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(1), 11-15.

Graham, P. H., Ranalli, P., 1997, Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Field Crops Research*, 53(1-3), 131-146.

Graham, P. H., Vance, C. P., 2003, Legumes: importance and constraints to greater use, *Plant physiology*, 131(3), 872-877.

Gujjar, R. S., Akhtar, M., Singh, M., 2014, Transcription factors in abiotic stress tolerance, *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(4), 306-316.

Gull, A., Lone, A. A., Wani, N. U. I., 2019, Biotic and Abiotic Stresses in Plants, *Abiotic and Biotic Stress in Plants*, 1-19.

Guo, Q., Zhang, J., Gao, Q., Xing, S., Li, F., Wang, W., 2008, Drought tolerance through overexpression of monoubiquitin in transgenic tobacco, *Journal of plant physiology*, 165(16), 1745-1755.

Gupta, B., Huang, B., 2014, Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization, *International journal of genomics*, volume 2014.

Gupta, S., Garg, V., Kant, C., Bhatia, S., 2015, Genome-wide survey and expression analysis of F-box genes in chickpea, *BMC genomics*, 16(1), 67.

Gurley, W. B., 2000, HSP101: a key component for the acquisition of thermotolerance in plants, *The Plant Cell*, volume 12, 457-460.

Hanson, A. A., Barnes, D. K., Hill, R. R., 1988, *Alfalfa and alfalfa improvement*. G. H. Heichel, K. T. Leath, O. J. Hunt, G. C. Marten, M. B. Tesar, S. H. Mickelson, C. W. Stuber (Ed.), Madison, WI: American society of agronomy.

Hanzawa, Y., Imai, A., Michael, A. J., Komeda, Y., Takahashi, T., 2002, Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS letters*, 527(1-3), 176-180.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M., Roychowdhury, R., Fujita, M., 2013a, Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants, *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9643-9684.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., 2013b, Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages, *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*, In: Ahmad, Parvaiz, Azooz, Mohamed Mahgoub, Prasad, M.N.V. (Eds.), Springer, New York, NY, 27-87.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., Bohnert, H. J., 2000, Plant cellular and molecular responses to high salinity, *Annual review of plant biology*, 51(1), 463-499.

He, M. W., Wang, Y., Wu, J. Q., Shu, S., Sun, J., Guo, S. R., 2019, Isolation and characterization of S-Adenosylmethionine synthase gene from cucumber and responsive to abiotic stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 431-445.

Hershko, A., Ciechanover, A., 1998, The ubiquitin system, *Annual review of biochemistry*, 67(1), 425-479.

Hirsch, A. M., Lum, M. R., Downie, J. A., 2001, What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?, *Plant physiology*, 127(4), 1484-1492.

Ho, M. S., Tsai, P. I., Chien, C. T., 2006, F-box proteins: the key to protein degradation, *Journal of biomedical science*, 13(2), 181-191.

Hong, C. Y., Chao, Y. Y., Yang, M. Y., Cheng, S. Y., Cho, S. C., Kao, C. H., 2009, NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is

mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid, *Plant and soil*, 320(1-2), 103-115.

Hong, M. J., Kim, J. B., Seo, Y. W., Kim, D. Y., 2020, F-Box Genes in the Wheat Genome and Expression Profiling in Wheat at Different Developmental Stages, *Genes*, 11(10), 1154.

Hua, Z., Zou, C., Shiu, S. H., Vierstra, R. D., 2011, Phylogenetic comparison of F-Box (FBX) gene superfamily within the plant kingdom reveals divergent evolutionary histories indicative of genomic drift, *PLoS ONE*, 6(1), e16219.

Huang, J., Wang, M. M., Bao, Y. M., Sun, S. J., Pan, L. J., Zhang, H. S., 2008, SRWD: a novel WD40 protein subfamily regulated by salt stress in rice (*Oryza sativa* L.), *Gene*, 424(1-2), 71-79.

Hudson, A. M., Cooley, L., 2008, Phylogenetic, structural and functional relationships between WD-and Kelch-repeat proteins, *The coronin family of proteins*, In: Christoph S. C., Ludwig E., Vasily R. (eds.), Springer, New York, NY, 6-19.

Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A., 2018, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.

Jain, B. P., Pandey, S., 2018, WD40 repeat proteins: signalling scaffold with diverse functions, *The Protein Journal*, 37(5), 391-406.

Jain, M., Nijhawan, A., Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Sharma, P., Khurana, J. P., 2007, F-box proteins in rice, Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress, *Plant physiology*, 143(4), 1467-1483.

James, R. A., Blake, C., Byrt, C. S., Munns, R., 2011, Major genes for Na+ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1; 4 and HKT1; 5), decrease Na+ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions, *Journal of experimental botany*, 62(8), 2939-2947.

Jia, F., Wu, B., Li, H., Huang, J., Zheng, C., 2013, Genome-wide identification and characterisation of F-box family in maize, *Molecular Genetics and Genomics*, 288(11), 559-577.

Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R. C., Elledge, S. J., Pagano, M., Harper, J. W., 2004, Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins, *Genes & development*, 18(21), 2573-2580.

Johnson, D. W., Smith, S. E., Dobrenz, A. K., 1992, Selection for increased forage yield in alfalfa at different NaCl levels, *Euphytica*, 60(1), 27-35.

Johnson, R. R., Wagner, R. L., Verhey, S. D., Walker-Simmons, M. K., 2002, The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences, *Plant Physiology*, 130(2), 837-846.

Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., Walker, G. C., 2007, How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium–Medicago model, *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619-633.

Journot-Catalino, N., Somssich, I. E., Roby, D., Kroj, T., 2006, The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Cell*, 18(11), 3289-3302.

Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., Chibbar, R. N., 2012, Chickpea: nutritional properties and its benefits, *The British Journal of Nutrition*, 108, S11-S26.

Jung, K. H., Ko, H. J., Nguyen, M. X., Kim, S. R., Ronald, P., An, G., 2012, Genome-wide identification and analysis of early heat stress responsive genes in rice, *Journal of Plant Biology*, 55(6), 458-468.

Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., Reed, S. I., 2000, Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCFMet30-mediated inactivation of the transcription factor Met4, *Cell*, 102(3), 303-314.

Kaymakanova, M., Stoeva, N., 2008, Physiological reaction of bean plants (*Phaseolus vulg*aris L.) to salt stress. *General and Applied Plant Physiology*, Special issue, (34), 3-4.

Kipreos, E. T., Pagano, M., 2000, The F-box protein family, *Genome biology*, 1(5), 1-7.

Kır, B., Soya, H., 2008, Kimi mera tipi yonca çeşitlerinin bazı verim ve kalite özellikleri üzerinde bir araştırma, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 45(1), 11-19.

Knight, H., Knight, M. R., 2001, Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk, *Trends in plant science*, 6(6), 262-267.

Kobe, B., Kajava, A. V., 2001, The leucine-rich repeat as a protein recognition motif, *Current opinion in structural biology*, 11(6), 725-732.

Kong, D., Li, M., Dong, Z., Ji, H., Li, X., 2015, Identification of TaWD40D, a wheat WD40 repeat-containing protein that is associated with plant tolerance to abiotic stresses, *Plant cell reports*, 34(3), 395-410.

Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., Scharf, K. D., 2007, Complexity of the heat stress response in plants, *Current opinion in plant biology*, 10(3), 310-316.

Kumar, S., Shanker, A., 2018, Bioinformatics Resources for the stress biology of plants, *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, Springer, Singapore, ISBN:978-981-10-9028-8, 367-386.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.

Kumar, S. V., Wigge, P. A., 2010, H2A. Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis, *Cell*, 140(1), 136-147.

Kurepa, J., Smalle, J., 2008, To misfold or to lose structure? Detection and degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome: Detection and degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome, *Plant signaling & behavior*, 3(6), 386-388.

Kuroda, H., Takahashi, N., Shimada, H., Seki, M., Shinozaki, K., Matsui, M., 2002, Classification and expression analysis of Arabidopsis F-box-containing protein genes, *Plant and Cell Physiology*, 43(10), 1073-1085.

Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T., Takahashi, Y., 2007, The polyamine spermine rescues Arabidopsis from salinity and drought stresses, *Plant Signaling & Behavior*, 2(4), 251-252.

Läuchli, A., Epstein, E., 1990, Plant responses to saline and sodic conditions, *Agricultural salinity assessment and management*, 71, 113-137.

Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., Genschik, P., 2006, F-box proteins everywhere, *Current opinion in plant biology*, 9(6), 631-638.

Li, Q., Zhao, P., Li, J., Zhang, C., Wang, L., Ren, Z., 2014a, Genome-wide analysis of the WD-repeat protein family in cucumber and Arabidopsis, *Molecular genetics and genomics*, 289(1), 103-124.

Li, Y., Jia, F., Yu, Y., Luo, L., Huang, J., Yang, G., Zheng, C., 2014b, The SCF E3 ligase AtPP2-B11 plays a negative role in response to drought stress in Arabidopsis, *Plant molecular biology reporter*, 32(5), 943-956.

Lim, C. J., Yang, K. A., Hong, J. K., Choi, J. S., Yun, D. J., Hong, J. C., Lim, C. O., 2006, Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells, *Journal of plant research*, 119(4), 373-383.

Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C. S., Zhu, J. K., 2006, The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3730-3734.

Liu, X. P., Yu, L. X., 2017, Genome-wide association mapping of loci associated with plant growth and forage production under salt stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Frontiers in Plant Science*, 8, 853.

Liu, Y., Li, J., Zhu, Y., Jones, A., Rose, R. J., Song, Y., 2019, Heat stress in legume seed setting: effects, causes, and future prospects, *Frontiers in plant science*, 10, 938.

Liu, Z. H., Zhang, H. M., Li, G. L., Guo, X. L., Chen, S. Y., Liu, G. B., Zhang, Y. M., 2011, Enhancement of salt tolerance in alfalfa transformed with the gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase, *Euphytica*, 178(3), 363-372.

Lluch C, Tejera N, Herrera-Cervera JA, Lopez M, BarrancoGresa JR, Palma FJ, Gozalvez M, Iribarne C, M. E., A, O., 2007, Saline stress tolerance in legumes, *Lotus Newslett*, 37(2), 76–77.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000, *Functional design of proteins*, Molecular Cell Biology. 4th edition, In: WH Freeman (eds.), Section 3.3, ISBN: 10: 0-7167-3136-3

Lyzenga, W. J., Stone, S. L., 2012, Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination, *Journal of experimental botany*, 63(2), 599-616.

Maathuis, F. J., Ahmad, I., Patishtan, J., 2014, Regulation of Na+ fluxes in plants, *Frontiers in plant science*, 5, 467.

Maathuis, F. J., Amtmann, A. N. N. A., 1999, K+ nutrition and Na+ toxicity: the basis of cellular K+/Na+ ratios, *Annals of botany*, 84(2), 123-133.

Ma, L., Zhang, H., Sun, L., Jiao, Y., Zhang, G., Miao, C., Hao, F., 2012, NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na+/K+ homeostasis in Arabidopsis under salt stress, *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 305-317.

Magori, S., Citovsky, V., 2011, Hijacking of the host SCF ubiquitin ligase machinery by plant pathogens, *Frontiers in plant science*, 2, 87.

Mahajan, S., Tuteja, N., 2005, Cold, salinity and drought stresses: an overview, *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.

Manchanda, G., Garg, N., 2008, Salinity and its effects on the functional biology of legumes, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 595-618.

Maphosa, Y., Jideani, V. A., 2017, The role of legumes in human nutrition, *Functional Food-Improve Health through Adequate Food*, 1, 13.

Maróti, G., Kondorosi, É., 2014, Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis?, *Frontiers in Microbiology*, 5, 326.

Matysik, J., Alia, Bhalu, B., Mohanty, P., 2002, Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants, *Current Science*, 525-532.

Mayor, P. J., Bernardo, R., 2009, Genomewide selection and marker-assisted recurrent selection in doubled haploid versus F2 populations, *Crop Science*, 49(5), 1719-1725.

Mazzucotelli, E., Belloni, S., Marone, D., De Leonardis, A. M., Guerra, D., Di Fonzo, N., Mastrangelo, A. M., 2006, The E3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation, *Current genomics*, 7(8), 509-522.

Migliori, V., Mapelli, M., Guccione, E., 2012, On WD40 proteins: propelling our knowledge of transcriptional control?, *Epigenetics*, 7(8), 815-822.

Miller, J. C., Chezem, W. R., Clay, N. K., 2016, Ternary WD40 repeat-containing protein complexes: evolution, composition and roles in plant immunity, *Frontiers in Plant Science*, 6, 1108.

Miller, P. R., McConkey, B. G., Clayton, G. W., Brandt, S. A., Staricka, J. A., Johnston, A. M., Neill, K. E., 2002, Pulse crop adaptation in the northern Great Plains, *Agronomy journal*, 94(2), 261-272.

Mishra, A. K., Puranik, S., Bahadur, R. P., Prasad, M., 2012, The DNA-binding activity of an AP2 protein is involved in transcriptional regulation of a stress-responsive gene, SiWD40, in *Foxtail millet*, *Genomics*, 100(4), 252-263.

Mittler, R., 2006, Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends in plant science*, 11(1), 15-19.

Mittler, R., Finka, A., Goloubinoff, P., 2012, How do plants feel the heat?, *Trends in biochemical sciences*, 37(3), 118-125.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Van Breusegem, F., 2011, ROS signaling: the new wave?, *Trends in plant science*, 16(6), 300-309.

Moreno, A. A., Orellana, A., 2011, The physiological role of the unfolded protein response in plants, *Biological research*, 44(1), 75-80.

Munns, R., Tester, M., 2008, Mechanisms of salinity tolerance, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.

Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Muratani, M., Tansey, W. P., 2003, How the ubiquitin–proteasome system controls transcription, *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(3), 192-201.

Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., Enju, A., Shinozaki, K., 2004, Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in Arabidopsis: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray, *Plant molecular biology*, 55(3), 327-342.

Negrão, S., Schmöckel, S. M., Tester, M., 2017, Evaluating physiological responses of plants to salinity stress, *Annals of botany*, 119(1), 1-11.

Nemoto, Y., Sasakuma, T., 2002, Differential stress responses of early salt-stress responding genes in common wheat, *Phytochemistry*, 61(2), 129-133.

Nichols, P. G. H., Malik, A. I., Stockdale, M., Colmer, T. D., 2009, Salt tolerance and avoidance mechanisms at germination of annual pasture legumes: importance for adaptation to saline environments, *Plant and Soil*, 315(1-2), 241.

Oldroyd, G. E., 2013, Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants, *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252-263.

Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., Downie, J. A., 2011, The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis, *Annual review of genetics*, 45, 119-144.

Onyekachi, O. G., Boniface, O. O., Gemlack, N. F., Nicholas, N., 2019, *The Effect of Climate Change on Abiotic Plant Stress: A Review*, Abiotic and Biotic Stress, Abiotic and Biotic Stress in Plants, de Oliveria, A. B., Chapter 1, IntechOpen, 71-83

Ouyang, B., Yang, T., Li, H., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, J., Ye, Z., 2007, Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis, *Journal of experimental botany*, 58(3), 507-520.

Öten, M., Albayrak, S., 2018, Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Genotiplerinin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 27(2), 55-61.

Pal, S. K., Bandyopadhyay, S., Ray, S. S., 2006, Evolutionary computation in bioinformatics: A review, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, Part C (Applications and Reviews), 36(5), 601-615.

Pandey, A., Chakraborty, S., Datta, A., Chakraborty, N., 2008, Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Molecular & cellular proteomics*, 7(1), 88-107.

Patriyawaty, N. R., Rachaputi, R. C., George, D., 2018, Physiological mechanisms underpinning tolerance to high temperature stress during reproductive phase in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), *Environmental and Experimental Botany*, 150, 188-197.

Polat, M., Karahan, A., 2009, Multidisipliner yeni bir bilim dalı: biyoinformatik ve tıpta uygulamaları, *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(3), 41-50.

Popelka, J. C., Terryn, N., Higgins, T. J. V., 2004, Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries?, *Plant Science*, 167(2), 195-206.

Porch, T. G., Jahn, M., 2001, Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*, *Plant, Cell & Environment*, 24(7), 723-731.

Priya, T. R., Manickavasagan, A. 2020, Common Bean, *Pulses*, Springer, 77-97.

Rahnama, A., James, R. A., Poustini, K., Munns, R., 2010, Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil, *Functional Plant Biology*, 37(3), 255-263.

Rensink, W. A., Iobst, S., Hart, A., Stegalkina, S., Liu, J., Buell, C. R., 2005, Gene expression profiling of potato responses to cold, heat, and salt stress, *Functional & Integrative Genomics*, 5(4), 201-207.

Ribaut, J. M., Jiang, C., Gonzalez-de-Leon, D., Edmeades, G. O., Hoisington, D. A., 1997, Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize, *Theoretical and Applied Genetics*, 94(6-7), 887-896.

Rizhsky, L., Davletova, S., Liang, H., Mittler, R., 2004, The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis, *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11736-11743.

Rodríguez, M., Canales, E., Borroto, C. J., Carmona, E., Lopez, J., Pujol, M., Borrás-Hidalgo, O., 2006, Identification of genes induced upon water-deficit stress in a drought-tolerant rice cultivar, *Journal of plant physiology*, 163(5), 577-584.

Rogers, M. E., Noble, C. L., 1991, The effect of NaCl on the establishment and growth of balansa clover (*Trifolium michelianum* Savi var. balansae Boiss.), *Australian Journal of Agricultural Research*, 42(5), 847-857.

Roje, S., 2006, S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor, *Phytochemistry*, 67(15), 1686-1698.

Roshandel, P., Flowers, T., 2009, The ionic effects of NaCl on physiology and gene expression in rice genotypes differing in salt tolerance, *Plant and Soil*, 315(1-2), 135-147.

Ruelland, E., Zachowski, A., 2010, How plants sense temperature, *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 225-232.

Salon, C., Jean-Christophe, A., Annabelle, L., Alain, O., Marion, P., Anne-Sophie, V., 2011, *Plant N fluxes and modulation by nitrogen, heat and water stresses: a review based on comparison of legumes and non legume plants*, Abiotic Stress in Plants–Mechanisms and Adaptations, Shanker, A., Chapter 5, Intech Open, 79-118.

Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y. G., Maathuis, F. J., Goloubinoff, P., 2009, The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane, *The Plant Cell*, 21(9), 2829-2843.

Sairam, R. K., Tyagi, A., 2004, Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants, *Current science*, 407-421.

Santner, A., Estelle, M., 2009, Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling, *Nature*, 459(7250), 1071-1078.

Saxena, S. C., Kaur, H., Verma, P., Petla, B. P., Andugula, V. R., Majee, M., 2013, Osmoprotectants: potential for crop improvement under adverse conditions. In *Plant Acclimation to Environmental Stress*, Springer, New York, NY, 197-232.

Sayed, H. E. S. A., El Sayed, A., 2011, Influence of NaCl and Na2SO4 treatments on growth development of broad bean (*Vicia Faba*, L.) plant, *Journal of Life Sciences*, 5(7), 513-523.

Schapira, M., Tyers, M., Torrent, M., Arrowsmith, C. H., 2017, WD40 repeat domain proteins: a novel target class?, *Nature reviews Drug discovery*, 16(11), 773.

Scherm, H., Coakley, S. M., 2003, Plant pathogens in a changing World, *Australasian Plant Pathology*, 32(2), 157-165.

Schlenker, W., Roberts, M. J., 2009, Nonlinear temperature effects indicate severe damages to US crop yields under climate change, *Proceedings of the National Academy of sciences*, 106(37), 15594-15598.

Schmidt, R., Mieulet, D., Hubberten, H. M., Obata, T., Hoefgen, R., Fernie, A. R., Mueller-Roeber, B., 2013, SALT-RESPONSIVE ERF1 regulates reactive oxygen species–dependent signaling during the initial response to salt stress in rice, *The Plant Cell*, 25(6), 2115-2131.

Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., Torres-Torres, M., 2014, A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications, *Nature genetics*, 46(7), 707-713.

Schoffl, F., Prändl, R., Reindl, A., 1998, Regulation of the heat-shock response, *Plant physiology*, 117(4), 1135-1141.

Šenberga, A., Dubova, L., Alsiņa, I., Strauta, L., 2017, Rhizobium sp.–a potential tool for improving protein content in peas and faba beans, *Rural Sustainability Research*, 37(332), 2-9.

Sharma, V., Sarkar, I. N., 2013, Bioinformatics opportunities for identification and study of medicinal plants, *Briefings in bioinformatics*, 14(2), 238-250.

Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J. K., 2000, The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na+/H+ antiporter, *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(12), 6896-6901.

Shi, H., Lee, B. H., Wu, S. J., Zhu, J. K., 2003, Overexpression of a plasma membrane Na+/H+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Nature biotechnology*, 21(1), 81-85.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007, Gene networks involved in drought stress response and tolerance, *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000, Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways, *Current opinion in plant biology*, 3(3), 217-223.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Thompson, J. D., 2011, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Molecular systems biology*, 7(1), 539.

Singh, K. B., Foley, R. C., Oñate-Sánchez, L., 2002, Transcription factors in plant defense and stress responses, *Current opinion in plant biology*, *5*(5), 430-436.

Sita, K., Sehgal, A., HanumanthaRao, B., Nair, R. M., Vara Prasad, P. V., Kumar, S., Nayyar, H., 2017, Food legumes and rising temperatures: effects, adaptive functional mechanisms

specific to reproductive growth stage and strategies to improve heat tolerance, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1658.

Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., Harper, J. W., 1997, F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex, *Cell*, 91(2), 209-219.

Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T. J., Babiychuk, E., Kushnir, S., Vierstra, R. D., 2003, The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling, *The Plant Cell*, 15(4), 965-980.

Smalle, J., Vierstra, R. D., 2004, The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway, *Annual Review Plant Biology*, 55, 555-590.

Song, J. B., Wang, Y. X., Li, H. B., Li, B. W., Zhou, Z. S., Gao, S., Yang, Z. M, 2015, The F-box family genes as key elements in response to salt, heavy mental, and drought stresses in *Medicago truncatula*, *Functional & integrative genomics*, 15(4), 495-507.

Stefanov, D., Petkova, V., Denev, I. D., 2011, Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines and cultivars using JIP-test, *Scientia horticulturae*, 128(1), 1-6.

Stirnimann, C. U., Petsalaki, E., Russell, R. B., Müller, C. W., 2010, WD40 proteins propel cellular networks, *Trends in biochemical sciences*, 35(10), 565-574.

Stone, S. L., 2019, Role of the ubiquitin proteasome system in plant response to abiotic stress, *International Review of Cell and Molecular Biology*, volume 343, 65-110.

Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F., Maule, A. J., 2009, The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 21(2), 642-654.

Sullivan, J. A., Shirasu, K., Deng, X. W., 2003, The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants, *Nature Reviews Genetics*, 4(12), 948-958.

Sun, C. W., Callis, J., 1997, Independent modulation of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes, *The Plant Journal*, 11(5), 1017-1027.

Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R., 2014, Abiotic and biotic stress combinations, *New Phytologist*, 203(1), 32-43.

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Jensen, L. J., 2019, STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, *Nucleic acids research*, 47(D1), D607-D613.

Takahashi, T., Kakehi, J. I., 2010, Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses, *Annals of botany*, 105(1), 1-6.

Tarhan, Ç., 2009, Mayada Ağır Metal Stresine Bağlı Olarak Anlatım Yapan Genlerin Karakterizasyonu, Doktora, İstanbul Üniversitesi.

Teixeira, E. I., Fischer, G., Van Velthuizen, H., Walter, C., Ewert, F., 2013, Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change, *Agricultural and Forest Meteorology*, 170, 206-215.

Thomas, D., Kuras, L., Barbey, R., Cherest, H., Blaiseau, P. L., Surdin-Kerjan, Y., 1995, Met30p, a yeast transcriptional inhibitor that responds to S-adenosylmethionine, is an essential protein with WD40 repeats, *Molecular and cellular biology*, 15(12), 6526-6534.

Thomashow, M. F., Gilmour, S. J., Stockinger, E. J., Jaglo-Ottosen, K. R., Zarka, D. G., 2001, Role of the Arabidopsis CBF transcriptional activators in cold acclimation, *Physiologia Plantarum*, 112(2), 171-175.

Tyers, M., Jorgensen, P., 2000, Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy, *Current opinion in genetics & development*, 10(1), 54-64.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G., 2012, Primer3—new capabilities and interfaces, *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.

Uygur, F. N., 1991, Yoncada *Cuscuta spp.* (küsküt, verem otu) kontrolü. *Herboloji Haberleri, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü*, 2(3), 1-5.

Van Nocker, S., Ludwig, P., 2003, The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function, *BMC genomics*, 4(1), 50.

Varshney, R. K., Ribaut, J. M., Buckler, E. S., Tuberosa, R., Rafalski, J. A., Langridge, P., 2012, Can genomics boost productivity of orphan crops?, *Nature biotechnology*, 30(12), 1172-1176.

Vierstra, R. D., 2009, The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6), 385-397.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M. R., 2007, Heat tolerance in plants: an overview, *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.

Wan, X., Mo, A., Liu, S., Yang, L., Li, L., 2011, Constitutive expression of a peanut ubiquitin-conjugating enzyme gene in Arabidopsis confers improved water-stress tolerance through regulation of stress-responsive gene expression, *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(4), 478-484.

Wang, D., Yang, S., Tang, F., Zhu, H., 2012, Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualism, *Cellular microbiology*, 14(3), 334-342.

Wang, F., Deng, X. W., 2011, Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling, *Cell research*, 21(9), 1286-1294.

Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, *Planta*, 218(1), 1-14.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Lepore, R., 2018, SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.

Waters, E. R., 2003, Molecular adaptation and the origin of land plants, *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(3), 456-463.

West, D. W., Taylor, J. A., 1981, Germination and growth of cultivars of Trifolium subterraneum L. in the presence of sodium chloride salinity, *Plant and Soil*, 221-230.

Wise, R. R., Olson, A. J., Schrader, S. M., Sharkey, T. D., 2004, Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature, *Plant, Cell & Environment*, 27(6), 717-724.

Xu, G., Ma, H., Nei, M., Kong, H., 2009, Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 835-840.

Yang, Z., Zhou, Y., Wang, X., Gu, S., Yu, J., Liang, G., Xu, C., 2008, Genomewide comparative phylogenetic and molecular evolutionary analysis of tubby-like protein family in Arabidopsis, rice, and poplar, *Genomics*, 92(4), 246-253.

Yeo, A., 1998, Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology, *Journal of Experimental Botany*, 49(323), 915-929.

Yu, L., Smith, T. F., Gaitatzes, C., 2000, Thirty-plus functional families from a single motif, *Protein Science*, 9(12), 2470-2476.

Zhang, L., Wang, S., Chen, Y., Dong, M., Fang, Y., Zhang, X., Zhang, X., 2020, Genome-wide identification of the F-box gene family and expression analysis under drought and salt stress in barley, *Phyton*, 89(2), 229.

Zhang, W. J., Wang, T., 2015, Enhanced salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) by rstB gene transformation, *Plant Science*, 234, 110-118.

Zhang, X., Zhen, J., Li, Z., Kang, D., Yang, Y., Kong, J., Hua, J., 2011, Expression profile of early responsive genes under salt stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(3), 626-637.

Zhang, X., Gonzalez-Carranza, Z. H., Zhang, S., Miao, Y., Liu, C. J., Roberts, J. A., 2018, F-Box proteins in plants, *Annual Plant Reviews Online*, 307-328.

Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D. B., Huang, Y., Durand, J. L., 2017, Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), 9326-9331.

Zhou, G. A., Chang, R. Z., Qiu, L. J., 2010, Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in Arabidopsis, *Plant molecular biology*, 72(4-5), 357-367.

Zhou, S., Sun, X., Yin, S., Kong, X., Zhou, S., Xu, Y., Wang, W., 2014, The role of the F-box gene TaFBA1 from wheat (*Triticum aestivum* L.) in drought tolerance, *Plant physiology and biochemistry*, 84, 213-223.

Zhu, J. K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Bohnert, H. J., 1997, Molecular aspects of osmotic stress in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(3), 253-277.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Haluk ÇELİK
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	25.01.1994
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	+90 543 248 74 96
E-Posta Adresi	halukcelik@ogr.iu.edu.tr
Web Adresi	www.linkedin.com/in/halukcelik



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Bilgi Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Bölümü	Genetik ve Biyomühendislik
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik, Tezli Yüksek Lisans Programı (Örgün Öğretim)

Makale ve Bildiriler
Turgut-Kara, N., Arıkan, B., Çelik, H., 2020, Epigenetic memory and priming in plants, *Genetica*, 148, 47–54, DOI: 10.1007/s10709-020-00093-4