



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ZEYTİN BİTKİSİNDE (*Olea europaea* L.)
KURAKLIK STRES TOLERANS
MEKANİZMASININ BELİRLENMESİNDE
KARŞILAŞTIRMALI TRANSKRİPTOM VE
PROTEOM YAKLAŞIMLARI

BİHTER UÇAR

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Filiz VARDAR

EŞ-DANIŞMAN

Doç. Dr. Birsen CEVHER KESKİN

İSTANBUL, 2025



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ZEYTİN BİTKİSİNDE (*Olea europaea* L.)
KURAKLIK STRES TOLERANS
MEKANİZMASININ BELİRLENMESİNDE
KARŞILAŞTIRMALI TRANSKRİPTOM VE
PROTEOM YAKLAŞIMLARI**

BİHTER UÇAR

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Filiz VARDAR

EŞ-DANIŞMAN

Doç. Dr. Birsen CEVHER KESKİN

İSTANBUL, 2025

TEŞEKKÜR

Öncelikle tezimin her aşamasında büyük bir titizlik ve özveriyle yardımlarını esirgemeyen, bilgisini ve tecrübesini her zaman içtenlikle paylaşan, bu tez çalışmasının gerçekleşmesindeki destek ve katkılarından dolayı değerli eş danışmanım Sayın **Doç. Dr. Birsen CEVHER KESKİN'e**,

Lisans eğitimimden doktora eğitimime kadar bilgi ve tecrübeleri ile beni geliştiren, tez sürecimin her aşamasında görüşleriyle beni destekleyen, samimiyetini içtenlikle hissettiğim, danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Filiz VARDAR'a**,

Proteomik çalışmalar kapsamında biyoinformatik analizlerde bana yardımcı olup bilgisiyle ışık tutan Sayın hocam **Dr. Merve ÖZTUĞ'a**, tez izleme komitemde bulunarak desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın hocam **Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT** ve Sayın hocam **Dr. Öğr. Üyesi Salim SÜNER'e**,

Tez sürecimin her aşamasında yanımda olan ve her zorlukta desteğini hissettiğim **Beyazıt Cem TEPELER'e**,

Tez sürecimde bana destek olan **Betül TINAZ, Berkay ASLAN, Semanur GÜNER, Demirkan DEMİR, Senem KÜÇÜK, Tanyel KANKAVİ BAŞKAYA, Dr. Şenay KÖM** ve ayrıca teknik destekleri için **Merve KESEK'e**,

Doktora sürecim boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen, büyük anlayış ve sabır gösteren **ailem, Alya Duru KESEK** ve **ODİN'e**,

TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü bünyesindeki bana destek ve yardımcı olan **tüm hocalarıma**,

Tez sürecimde doktora bursiyeri olarak beni destekleyen **“TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-A Yurtiçi Genel Doktora Burs Programı"na**, **“Zeytin Bitkisinde (*Olea europaea* L.) Kuraklık Stresi Yanıtında Epigenetik Regülasyon”** başlıklı 217O401 nolu **COST (European Cooperation in Science and Technology) projesine**, **TÜBİTAK 2250 - Lisansüstü Bursları Performans Programı'na** ve **TÜBİTAK 2247 - C Stajyer Araştırmacı Burs Programı'na (STAR)**,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak emeklerinin karşılığını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim, bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman yanımda ve destek olup her zorlukla başa çıkmamda yardımcı olan, verdiğim bütün kararların arkasında durmamı sağlayan **Şule ÜNAL'a** sonsuz teşekkürlerimle bu doktora tezimi ithaf ediyorum.

Aşağıda gösterilen makale, sözlü ve poster sunumları bu tez kapsamında üretilmiştir.

- **Uçar, B.**, Öztuğ, M., Tör, M., Çelik-Öztürk, N., Vardar, F., & Cevher-Keskin, B. (2025). Comparative Analysis of Protein Extraction Protocols for Olive Leaf Proteomics: Insights into Differential Protein Abundance and Isoelectric Point Distribution. *ACS Agricultural Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.4c00642>
- **B. Uçar**, B. Cevher-Keskin, M. Oztug Kılinc, Comparative proteomic analyses revealed the response mechanism of drought-tolerant and susceptible olive cultivars (*Olea europaea* L.) under drought stress and recovery. *1st International Congress on Biotech Solutions for Sustainability*, Gebze, Kocaeli. Turkey, 07-10 May 2024 (Sözlü Sunum).
- **B. Uçar**, A. H. Sekmen-Çetinel, N. Uluçay, K. Şanlı, E. Erdik, A. Gökçe, Ü. Kaya, B. Cevher-Keskin, Gene Expression Patterns and Activities of Antioxidant Enzymes in Olive Leaves in Response to Drought Stress and Recovery, *IV. International Agricultural, Biological & Life Science Conference*, Edirne, Turkey, 29-31 August 2022, (Sözlü Sunum).
- **B. Uçar**, A. H. Sekmen Cetinel, K. Şanlı, N. Uluçay, E. Erdik, A. Gökçe, Ü. Kaya & B. Cevher-Keskin, Proteomic and Transcriptomic Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) in The Response to Drought Stress and Recovery, *III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference*, Edirne, Turkey, 1-3 September 2021 (Poster Sunum).

Haziran, 2025

Bihter UÇAR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
YENİLİK BEYANI.....	xiv
SEMBOLLER	xvi
KISALTMALAR	xxv
ŞEKİL LİSTESİ	xxix
TABLO LİSTESİ	xli
1. GİRİŞ.....	1
1.1. GENEL BİLGİLER.....	3
1.1.1 Zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) Hakkında Genel Bilgiler	3
1.1.1.1 Zeytin Bitkisinin Tarihçesi.....	4
1.1.1.2 Zeytin Bitkisinin Taksonomik Sınıflandırılması.....	5
1.1.1.3 Zeytin Bitkisinin Genel Morfolojik Özellikleri	6
1.1.1.4 Zeytin Bitkisinin Kimyasal Bileşenleri ve Besin Değeri Açısından Önemi	7
1.1.1.5 Zeytin Bitkisinin İklim ve Toprak İstekleri.....	11
1.1.1.6 Zeytin Bitkisinin Ekonomik Önemi	12
1.1.2 Kuraklık Stresi ile Bitkilerde Oluşan Morfolojik, Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Mekanizmalar.....	26
1.1.2.1 Kuraklık ve Bitki Morfolojisi Üzerindeki Etkisi.....	28
1.1.2.2 Kuraklık ve Bitki Fizyolojisi Üzerindeki Etkisi.....	29
1.1.2.3 Kuraklığın Bitkilerde Biyokimyasal Etkileri	32

1.1.2.4	Kuraklık Stresi Altında Bitkilerde Gelişen Moleküler Mekanizmalar	37
1.1.2.4.1	Bitki Kuraklık Stres Sinyallerinin Hücre İçi İletim Yolları ve Düzenleme Mekanizmaları.....	38
1.1.2.4.1.1	Kuraklık Stres Yanıtında ABA (Absisik Asit) Sinyal İletim Yolu ve Düzenleme Mekanizmaları	40
1.1.2.4.1.2	Kuraklık Cevabında Yer Alan Başlıca TF (Transkripsiyon faktörü) Aileleri	43
1.1.2.4.1.2.1	DREB/CBF Ailesi.....	43
1.1.2.4.1.2.2	NAC/ZFHD Ailesi	44
1.1.2.4.1.2.3	MYB/MYC Ailesi.....	44
1.1.2.4.1.2.4	bZIP (AREB/ABF) Ailesi.....	45
1.1.2.4.1.3	Kuraklık Stres Yanıtında Ca ²⁺ Sinyal İletim Yolu ve Düzenleme Mekanizmaları	46
1.1.2.4.2	Kuraklık Stresi Altında Gen İfadesi ve Gen Ürünlerinin Düzenleme Modelleri	49
1.1.2.4.2.1	Su kanal Proteinleri/ Aquaporin (AQP).....	51
1.1.2.4.2.2	Geç Embriyogenez Bol Protein (LEA)	54
1.1.2.4.2.3	Dehidrin (DHN)	56
1.1.2.4.2.4	Isı şoku proteinleri (HSP)	58
1.1.2.4.2.5	Osmolit (Prolin, Betain, Şekerler) Sentezi İçin Gerekli Anahtar Enzimler	59
1.1.2.5	Bitkilerde Transkriptomik Yaklaşımlar	59
1.1.2.6	Bitkilerde Proteomik Yaklaşımlar.....	66
2.	MATERYAL VE YÖNTEM	69
2.1.	STRES UYGULAMASI	72
2.2.	TRANSKRİPTOM ÇALIŞMALARI.....	73

2.2.1	RNA Ekstraksiyonu.....	73
2.2.1.1	RNeasy® Plant Mini Kit.....	73
2.2.1.2	DNase I Uygulaması	74
2.2.1.3	RNA Konsantrasyon, Saflık ve Kalite Parametre Ölçümleri.....	75
2.2.1.4	NanoDrop	75
2.2.1.5	Bioanalyzer.....	76
2.2.1.6	Qubit.....	78
2.2.2	RNA Dizileme Çalışmaları.....	78
2.2.2.1	Transkriptom (cDNA) Kütüphanesinin Hazırlanması	79
2.2.2.1.1	Protokol: First-Strand cDNA Sentezi	80
2.2.2.1.2	Protokol: PCR1- Illumina Adapter ve İndexlerinin Eklenmesi	81
2.2.2.1.3	Protokol: AMPure Beadler Kullanılarak RNA-Seq Kütüphanesinin Pürifikasyonu.....	82
2.2.2.1.4	Protokol: scZapR ve scR-Probes ile Ribosomal cDNA'nın Uzaklaştırılması.....	83
2.2.2.1.5	Protokol: PCR2 – Final RNA-Seq Kütüphanesinin Çoğaltılması	85
2.2.2.1.6	Protokol: AMPure Beadler Kullanılarak Final RNA-Seq Kütüphanesinin Pürifikasyonu	86
2.2.2.2	cDNA Kütüphanelerinin Bioanalyzer ile Uzunluk ve Saflıklarının Kontrol Edilmesi	87
2.2.2.3	cDNA Kütüphanelerinin Qubit Florometre ile Miktar Ölçümleri	89
2.2.2.4	cDNA Kütüphanelerinin NovaSeq 6000 Cihazına Yüklenmesi	90
2.2.2.5	Transkriptom Datasının Biyoinformatik Analizi	90
2.2.2.5.1	Kalite Kontrol	90
2.2.2.5.2	Karşılaştırmalı Ekspresyon Analizi	91
2.2.2.6	Validasyon Çalışmaları	92

2.2.2.6.1	Primer Düzenlemesi.....	92
2.2.2.6.2	cDNA Sentezi	92
2.2.2.6.3	qRT-PCR	95
2.3.	PROTEOM ÇALIŞMALARI.....	96
2.3.1	Protein Ekstraksiyonu.....	97
2.3.1.1	Protein Ekstraksiyonu A (Kaynatma Metodu).....	97
2.3.1.2	Protein Ekstraksiyonu B (CHAPS Metodu).....	98
2.3.1.3	Protein Ekstraksiyonu C (TCA Metodu).....	99
2.3.2	Protein Miktar Ölçümleri	100
2.3.3	Triptik Peptitlerin Hazırlanması	101
2.3.4	Protein Tanımlama ve Miktar Tayini için LC–MS/MS Analizi	102
2.3.5	Kalite Kontrol	103
2.3.6	Karşılaştırmalı Grup Analizi	104
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	105
3.1.	TRANSKRİPTOM ANALİZ SONUÇLARI	105
3.1.1	Toplam RNA’ların Kalite Parametre Ölçüm Sonuçları	105
3.1.2	RNA-Seq Kütüphane Hazırlık Sonuçları	108
3.1.3	cDNA Kütüphanelerinin Kalite Parametre Ölçüm Sonuçları.....	110
3.1.4	Transkriptom Datasının Biyoinformatik Analiz Sonuçları	111
3.1.5	Karşılaştırmalı Ekspresyon Analiz Sonuçları.....	113
3.1.6	Transkriptomik Gen Ontoloji Analizleri	123
3.1.6.1	Hüresel Bileşenler	125
3.1.6.2	Moleküler Fonksiyonlar	130
3.1.6.3	Biyolojik Süreçler	134
3.1.7	Transkriptom Analizi Validasyonu	139

3.1.7.1	cDNA Sentez Kontrolü	141
3.1.7.2	Real Time (qRT-PCR) PCR Sonuçları	142
3.1.7.2.1	Metabolizma ve Biyosentez ile İlişki Genler.....	143
3.1.7.2.1.1	Karbonhidrat metabolizması ile İlişki Genler.....	144
3.1.7.2.1.1.1	Galactinol synthase 2-like.....	144
3.1.7.2.1.2	Sterol ve Triterpen Biyosentezi ile İlişki Genler	146
3.1.7.2.1.2.1	(-)-germacrene D synthase-like	147
3.1.7.2.1.2.2	Squalene monooxygenase-like	150
3.1.7.2.1.2.3	Beta-amyrin 28-oxidase-like.....	154
3.1.7.2.1.3	İkincil Metabolit Biyosentezi ile İlişki Genler	157
3.1.7.2.1.3.1	Chalcone synthase J-like.....	157
3.1.7.2.1.3.2	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 2	160
3.1.7.2.1.4	Azot Metabolizması ile İlişki Genler.....	163
3.1.7.2.1.4.1	Glutamate dehydrogenase B, transcript variant X2	163
3.1.7.2.2	Hücrel Taşınım ve Sinyal İletimi ile İlişki Genler	166
3.1.7.2.2.1	Su taşınımı ile İlişki Genler	166
3.1.7.2.2.1.1	Aquaporin PIP2-2-like	166
3.1.7.2.2.1.2	Aquaporin TIP1-1-like.....	167
3.1.7.2.2.2	İyon taşınımı ile İlişki Genler	172
3.1.7.2.2.2.1	Zinc transporter 5-like	172
3.1.7.2.2.2.2	copper-transporting ATPase HMA4-like.....	176
3.1.7.2.2.3	Sinyal İletimi ve Hormon Regülasyonu ile İlişki Genler	180
3.1.7.2.2.3.1	Absciscic acid receptor PYL4-like	180
3.1.7.2.2.3.2	Glutamate receptor.....	186
3.1.7.2.2.3.3	Ethylene-responsive transcription factor 5-like	189

3.1.7.2.3	Savunma ve Oksidatif Stres Yanıtı ile İlişki Genler	193
3.1.7.2.3.1	Antioksidan Gen Grubu	193
3.1.7.2.3.1.1	Peroxidase 12-like.....	194
3.1.7.2.3.1.2	Probable glutathione peroxidase 8.....	195
3.1.7.2.3.1.3	Ascorbate peroxidase	196
3.1.7.2.3.1.4	Catalase	197
3.1.7.2.3.1.5	Copper/zinc superoxide dismutase	198
3.1.7.2.3.1.6	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase	203
3.1.7.2.4	DNA, RNA ve Hücrel Düzenleme ile İlişki Genler	205
3.1.7.2.4.1	Genetik Materyal Düzenlemesi ile İlişki Genler	206
3.1.7.2.4.1.1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like	206
3.1.7.2.4.1.2	Histone H1-like.....	211
3.1.7.2.4.2	Epigenetik Düzenleme ile İlişki Genler.....	213
3.1.7.2.4.2.1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase CMT2-like.....	213
3.1.7.2.4.3	Hücre Adezyonu ve Yapısal Düzenleme ile İlişki Genler...	216
3.1.7.2.4.3.1	Pinin-like.....	216
3.1.7.2.5	Hücre Duvarı ve Büyüme ile İlişki Genler	218
3.1.7.2.5.1	Hücre Zarı Düzenlemesi ile İlişki Genler	219
3.1.7.2.5.1.1	Phospholipase D alpha 1-like, transcript variant X1	219
3.1.7.2.5.2	Hücre genişlemesi ile İlişki Genler.....	223
3.1.7.2.5.2.1	Expansin B3 like	223
3.2.	PROTEOMİK ANALİZ SONUÇLARI	227
3.2.1	Protein Ekstraksiyonu Optimizasyon Sonuçları.....	229
3.2.2	Karşılaştırmalı Proteomik Analiz Sonuçları.....	245

3.2.2.1	Kuraklık Stres Tepkisi ile İlişkili Başlıca Protein İfadelerinin Çeşitler ve Stres Grupları Arası Karşılaştırmalı Analizi.....	267
3.2.2.2	Kuraklık Stres Tepkisi ile İlişkili Değişiklik Gösterdiği Tespit Edilen Protein İfadelerinin Çeşitler ve Stres Grupları Arası Karşılaştırmalı Analizi ..	275
3.2.2.2.1	Transkripsiyonel ve Post-Transkripsiyonel Regülasyon İle İlişkili Proteinler	278
3.2.2.2.1.1	Glycine-Rich RNA-Binding Protein 2 (GRP2)	278
3.2.2.2.1.2	Argonaute 1C (AGO1C)	280
3.2.2.2.1.3	Pre-mRNA-Processing-Splicing Factor 8B (PRPF8B)	281
3.2.2.2.1.4	Probable Mediator of RNA Polymerase II Transcription Subunit 37c (MED37c).....	282
3.2.2.2.2	Sekonder Metabolizma İle İlişkili Proteinler	283
3.2.2.2.2.1	Geraniol 8-Hydroxylase (G8H)	283
3.2.2.2.2.2	Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL).....	284
3.2.2.2.3	Redoks ve Antioksidan Savunma İle İlişkili Proteinler	285
3.2.2.2.3.1	NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase Subunit H (NDH-H) ..	285
3.2.2.2.4	Metabolizma ve Enerji Yönetimi ile İlişkili Proteinler	286
3.2.2.2.4.1	Bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4	287
3.2.2.2.4.2	Isocitrate dehydrogenase (NAD-dependent)	288
3.2.2.2.4.3	Ferredoxin-dependent glutamate synthase (Fd-GOGAT) ...	288
3.2.2.2.4.4	β -Amilaz (Beta-Amylase).....	289
3.2.2.2.4.5	Carbamoyl-Phosphate Synthase Large Chain, Chloroplastic	290
3.2.2.2.4.6	6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2)	290
3.2.2.2.5	Hücrel Ulaşım ve Taşıyıcı ve Depolama ile İlişkili Proteinler	291

3.2.2.2.5.1	Allergen Ara h 1 (clone P41B)	291
3.2.2.2.5.2	ABC Transporter E Family Member 2	292
3.2.2.2.6	Protein Katlanması, Stabilizasyonu ve Korunması (Şaperonlar ve İnhibitörler) ile İlişkili Proteinler	293
3.2.2.2.6.1	Heat shock protein 21 (HSP21)	294
3.2.2.2.6.2	T-complex Protein 1 Subunit Delta (TCP-1δ)	295
3.2.2.2.6.3	Serpin-Z1B.....	296
3.2.2.2.6.4	Alpha-amylase/Trypsin Inhibitor CM3 (ATI-CM3).....	296
3.2.2.2.6.5	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor (ASI)	297
3.2.2.3	Proteomik Analiz Sonuçlarına Göre Elde Edilen Gen Ontolojisi (GO) Sonuçları	298
3.2.2.3.1	Gemlik (26) Çeşidine Ait GO Analiz Sonuçları	298
3.2.2.3.2	Memecik (94) Çeşidine Ait GO Analiz Sonuçları	302
3.2.2.4	Gen Ontoloji Analizlerinin Çeşitler Arası Karşılaştırılması	306
3.2.2.4.1	Biyolojik Süreçler	306
3.2.2.4.2	Hücrel Bileşenler	307
3.2.2.4.3	Moleküler Fonksiyonlar	308
3.3.	KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK VE TRANSKRİPTOMİK ANALİZLER	310
4.	SONUÇLAR.....	317
4.1.	Kuraklık Stresi (D) Altında Çeşide Bağlı Gelişen Transkriptom Düzeyinde Yanıtlar	317
4.2.	Kuraklık Stresi (D) Altında Çeşide Bağlı Gelişen Proteom Düzeyinde Yanıtlar	318
4.3.	İyileşme (Recovery, R) Döneminde Çeşide Bağlı Transkriptom Düzeyinde Gelişen Yanıtlar	320

4.4. İyileşme (Recovery, R) Döneminde Çeşide Bağlı Proteom Düzeyinde Gelişen Yanıtlar	321
4.5. Toleranslı (Memecik-94) ve Hassas (Gemlik-26) Zeytin Çeşitlerinin Karşılaştırmalı Moleküler Yanıtları	322
4.6. Kuraklık Toleransının Moleküler Temelleri.....	324
4.7. Proteomik Analizlerde Ekstraksiyon Yönteminin Önemi	326
4.8. Transkriptom ve Proteom Düzeylerinin Bütüncül Değerlendirilmesi.....	327
4.9. Öneriler.....	327
KAYNAKLAR.....	328
EKLER	422
ÖZGEÇMİŞ.....	429

ÖZET

Kuraklık, özellikle Akdeniz iklim kuşağında yer alan bölgelerde yetiştirilen zeytin bitkisinin (*Olea europaea* L.) tarımını kısıtlayan en önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir. Bu çalışmada, kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve kuraklığa toleranslı (Memecik-94) iki farklı zeytin çeşidinde kuraklık stresi ve sonrasında uygulanan iyileşme (recovery) koşullarına karşı gelişen moleküler tepkiler, RNA dizileme (RNA-Seq) yöntemi ile transkriptom, Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi kullanılarak proteom düzeyinde bütüncül bir yaklaşımla incelenmiştir.

Transkriptomik analiz sonuçları, sekiz transkriptin (pinin-like, beta-amyrin 28-oxidase-like, phospholipase D alpha 1-like, probable glutathione peroxidase 8, chalcone synthase J-like, glutamate dehydrogenase B-like, galactinol synthase 2-like ve DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like) kuraklık stresiyle karşı belirgin şekilde farklılaştığını ve potansiyel biyobelirteç adayları olduğunu ortaya koymuştur. Proteomik düzeyde yapılan analizlerde ise üç proteinin (pre-mRNA-processing-splicing factor 8B, glycine-rich RNA-binding protein 2 ve endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitör) ifade seviyelerinin hem stres hem de iyileşme süreçlerinde anlamlı olarak değiştiği ve kuraklık stresi için biyobelirteç potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca aquaporin PIP2-1, beta-amyrin 28-oxidase, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz ve Cu/Zn süperoksit dismutaz gibi transkript ve proteinlerin, stres yanıtında adaptif roller üstlendiği saptanmıştır. Çeşitler arası karşılaştırmalı analizler Memecik-94 çeşidinin kuraklık stresi altında daha geniş kapsamlı ve etkili bir moleküler savunma ağını aktive ettiğini; Gemlik-26 çeşidinin ise daha sınırlı ve genellikle koruyucu mekanizmalara dayalı bir adaptif yanıt geliştirdiğini ortaya koymuştur.

Bu bulgular, zeytin bitkisinin kuraklığa karşı çeşitlere özgü savunma stratejileri geliştirdiğini ortaya koymakta ve stres toleransına sahip zeytin çeşitlerinin geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen ıslah programlarında kullanılabilecek potansiyel gen ve protein biyobelirteçlerinin tanımlanmasına olanak sağlayarak zeytin bitkisinde kuraklık toleransının moleküler temellerinin anlaşılmasına önemli katkılar sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Olea europaea*, kuraklık stresi, transkriptom, proteom, stres toleransı.

ABSTRACT

Drought is a major abiotic stress factor limiting olive (*Olea europaea* L.) cultivation, particularly in Mediterranean climate regions. In this study, molecular responses to drought stress and subsequent recovery conditions were investigated comparatively at transcriptomic and proteomic levels in two olive varieties: drought-sensitive Gemlik-26 and drought-tolerant Memecik-94. Transcriptomic responses were analyzed through RNA sequencing (RNA-Seq), and proteomic changes were examined using Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

Transcriptomic analysis revealed significant differential expression of eight transcripts (pinin-like, beta-amyrin 28-oxidase-like, phospholipase D alpha 1-like, probable glutathione peroxidase 8, chalcone synthase J-like, glutamate dehydrogenase B-like, galactinol synthase 2-like, and DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like), highlighting their potential as biomarkers of drought stress. Proteomic analysis identified three proteins (pre-mRNA-processing-splicing factor 8B, glycine-rich RNA-binding protein 2, and endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor) whose expression levels significantly changed during both stress and recovery phases, suggesting their suitability as biomarkers. Furthermore, adaptive roles were confirmed for aquaporin PIP2-1, beta-amyrin 28-oxidase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, and Cu/Zn superoxide dismutase. Comparative analysis indicated that the drought-tolerant Memecik-94 variety activated a broader and more effective molecular defense network, whereas Gemlik-26 developed a more limited response primarily reliant on protective mechanisms.

These findings demonstrate that olive varieties employ cultivar-specific defense strategies against drought, contributing significantly to the understanding of the molecular basis of drought tolerance. The identification of potential genetic and protein biomarkers provides valuable insights for breeding programs aimed at developing drought-tolerant olive varieties.

Keywords: *Olea europaea*, drought stress, transcriptome, proteome, stress tolerance.

YENİLİK BEYANI

Bu tez çalışması, zeytin (*Olea europaea* L.) bitkisinin kuraklık stresine verdiği moleküler yanıtları hem transkriptomik (RNA-Seq) hem de proteomik (LC-MS/MS) yaklaşımlar kullanarak bütüncül olarak ele alan ilk kapsamlı çalışmalardan biridir. Çalışma kapsamında, kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve kuraklığa toleranslı (Memecik-94) iki farklı zeytin çeşidi üzerinde kuraklık stresi ve stres sonrası iyileşme (recovery) süreçlerinde ortaya çıkan moleküler yanıtlar eşzamanlı ve detaylı biçimde karşılaştırılmıştır. Böylece farklı tolerans düzeylerine sahip zeytin çeşitlerinde stres algılama, yanıt oluşturma ve iyileşme süreçlerinde devreye giren mekanizmalar ilk defa sistematik olarak ortaya konulmuştur.

Tez çalışması, zeytin bitkisinin kuraklık stresine karşı geliştirdiği moleküler adaptasyonların çok katmanlı ve dinamik doğasını vurgulamakta; hem erken dönem transkripsiyonel düzenlemeler hem de geç dönem protein temelli yanıtlar açısından çeşitlere özgü farklılıkları belirleyerek, zeytin bitkisinin stres yanıt mekanizmalarının anlaşılmasına öncü bir bilimsel katkı sağlamaktadır.

Araştırma kapsamında, daha önce zeytin bitkisinde (*Olea europaea* L.) tanımlanmamış olan Pinin-like geni, özellikle kuraklığa toleranslı çeşitlerde (Memecik-94) kuraklık stresi altında gösterdiği belirgin ifade artışıyla ilk defa bitkisel stres yanıtlarıyla ilişkilendirilmiştir. Hücre yapısının stabilizasyonu ve sinyal iletimi gibi temel süreçlerdeki olası görevleri göz önüne alındığında, literatürde bitkilerdeki işlevine dair mevcut bilgi eksikliği, bu tezin özgünlüğünü ve bilimsel değerini güçlendirmektedir. Benzer şekilde, beta-amyrin 28-oxidase-like geni, oleanolik asit biyosentezindeki bilinen işlevi ve özellikle kuraklığa toleranslı çeşitlerde sergilediği seçici ekspresyon profili nedeniyle, kuraklık stresine verilen yanıtın potansiyel bir moleküler göstergesi olarak ilk kez zeytin bitkisinde (*Olea europaea* L.) ortaya konmuştur. Bu kapsamda, triterpenoid metabolizmasının kuraklık stresi altındaki rolü de tez kapsamında sistematik biçimde değerlendirilmiş ve bitkisel stres biyolojisi alanına özgün bir bilimsel katkı sunulmuştur.

Transkriptom analizleri sonucunda tanımlanan sekiz genin (Pinin-like, beta-amyrin 28-oxidase-like, phospholipase D alpha 1-like, probable glutathione peroxidase 8, chalcone synthase J-like, glutamate dehydrogenase B-like, galactinol synthase 2-like ve DEAD-

box RNA helicase 7-like) kuraklık stresine duyarlılık ve toleransı yansıtan potansiyel biyobelirteçler olarak önerilmesi, zeytin bitkisi için biyobelirteç temelli yeni bir değerlendirme çerçevesi sunmaktadır.

Ayrıca proteom analizleri kapsamında tanımlanan pre-mRNA-processing-splicing factor 8B, glycine-rich RNA-binding protein 2 ve endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor proteinleri, hem stres hem de toparlanma dönemine özgü ifade paternleri ile dikkat çekmiş; zeytinde iyileşme süreçlerini de içeren dinamik stres yanıtlarının moleküler düzeyde izlenebilirliğini sağlayan yenilikçi biyobelirteçler olarak ortaya konmuştur.

Bu tezde ayrıca zeytin gibi fenolik bileşiklerce zengin bitkilerde uygun ekstraksiyon yöntemlerinin (Protokol A ve B karşılaştırması) protein profillemeye başarısındaki etkisi değerlendirilmiş; Protokol B'nin hidrofilik ve asidik proteinlerin verimli ekstraksiyonundaki üstünlüğü vurgulanarak, zeytin türü için optimize edilmiş yeni bir ekstraksiyon yaklaşımı sunulmuştur.

Elde edilen bulgular, kuraklık stresine karşı zeytin bitkisinin çok yönlü savunma stratejileri geliştirdiğini, bu stratejilerin çeşitlere özgü olarak farklılaştığını ve bu farkların antioksidan savunma, enerji metabolizması, genetik regülasyon ve hücresel taşıyım gibi temel moleküler mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma, hem transkriptomik hem de proteomik düzeyde eşzamanlı ve bütüncül analizlerle kuraklık stresi yanıtlarının çözümlenmesi, biyobelirteç gen/proteinlerin tanımlanması ve zeytin bitkisinin kuraklık ve benzer stres koşullarında sürdürülebilir üretim stratejilerinin geliştirilmesine yönelik bilimsel zemin oluşturması bakımından orijinal ve öncü niteliktedir.

SEMBOLLER

26	: Gemlik
94	: Memecik
%	: Yüzde (Percent)
/	: Bölü (Per)
~	: Yaklaşık (Approximately)
°C	: Santigrat derece (Degrees Celsius)
µg/µL	: Mikrogram/mikrolitre (Microgram per microliter)
µl	: Mikrolitre (Microliter)
µM	: Mikromolar (Micromolar)
4HPT	: 4-hidroksifenilpirüvat dioksijenaz (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)
6-SFT	: Sükroz:fruktan 6-fruktoziltransferaz (Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase)
ABA	: Absisik Asit (Absciscic Acid)
ABA8'-OH 3	: ABA 8'-hidroksilaz (ABA 8'-hydroxylase)
ABC	: ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı proteini (ATP-binding cassette transporter)
ABD	: Aktin bağlayıcı bölge (Actin binding domain)
ABF	: ABA tepkili element bağlayıcı faktör (ABA Responsive : element binding factor)
ABRE	: ABA-tepkili gen düzenleyici bölge (ABA-responsive element)
ACN	: Asetonitril (Acetonitrile)
Act D	: Aktinomisin D (Actinomycin D)
AGO / AGO1C	: Argonaut proteini / Argonaut 1C (Argonaute / Argonaute 1C)
AP2	: APETALA2 Transkripsiyon Faktörü (APETALA2 Transcription Factor)
AP2 DBD	: AP2'nin DNA bağlayıcı bölgesi (DNA binding domain of AP2)
APX	: Askorbat peroksidaz (Ascorbate peroxidase)
AQP	: Akuaporin - Su kanalı proteini (Aquaporin)
AR5	: Muhtemelen oksin tepkili 5 (Possibly auxin response 5)

AREB	: ABA-tepkili element bağlayıcı protein (ABA-responsive element binding protein)
ASH	: Absisik asit stresle olgunlaşma proteini homoloğu (Absciscic acid stress ripening protein homolog)
ASI	: Absisik asit ile İndüklenen Protein (Absciscic acid-induced protein)
ATAF	: Arabidopsis transkripsiyon aktivasyon faktörü (Arabidopsis transcription activation factor)
ATI-CM3	: Otofajiyle ilişkili triptofan zengini protein CM3 (Autophagy-related tryptophan-rich protein CM3)
a-toc	: Alfa-tokoferol - E Vitamini (Alpha-tocopherol)
ATP / ATPsyn	: Adenozin trifosfat / ATP sentaz (Adenosine triphosphate / ATP synthase)
Aux	: Oksin hormonu (Auxin hormone)
BADH	: Betain aldehit dehidrogenaz (Betaine aldehyde dehydrogenase)
BAS	: Beta-amirin sentaz (Beta-amyrin synthase)
bZIP	: Temel lösün fermuarı motifli transkripsiyon faktörü (Basic leucine zipper transcription factor)
C5-Mtaz	: C-5 Metiltioadenozin (C-5 Methylthioadenosine)
CA	: Karbonik anhidraz (Carbonic anhydrase)
Ca²⁺	: Kalsiyum iyonu (Calcium ion)
CaM	: Kalmodulin (Calmodulin)
CAMTA	: Kalmodulin bağlayıcı transkripsiyon aktivatörü (Calmodulin-binding transcription activator)
CAS	: Kalsiyum algılayıcı reseptör (Calcium sensing receptor)
CAT	: Katalaz (Catalase)
CBL	: Kalsinörin B-benzeri protein (Calcineurin B-like protein)
CCT/TRiC	: Şaperonin içeren TCP1 kompleksi (Chaperonin-containing TCP1 complex)
Cd	: Kadmiyum (Cadmium)
CDPK	: Kalsiyuma bağımlı protein kinaz (Calcium-dependent protein kinase)

CET	: Döngüsel elektron taşınımı (Cyclic electron transport)
CFC	: Sistein ve histidin zengini C1 bölgesi proteini (Cysteine- and histidine-rich C1 domain protein)
CH₄	: Metan (Methane)
CHCl₃	: Kloroform (Chloroform)
CHS	: Kalkon sentaz (Chalcone synthase)
CIPK	: CBL etkileşimli protein kinaz (CBL-interacting protein kinase)
CML	: Kalmodulin benzeri protein (Calmodulin-like protein)
CMT	: Kromometilaz (Chromomethylase)
CO	: Karbon monoksit (Carbon monoxide)
CO₂	: Karbon dioksit (Carbon dioxide)
COQ2	: Para-hidroksibenzoat-polipreniltransferaz (parahydroxybenzoate-polyprenyltransferase)
CPK	: Kalsiyuma bağımlı protein kinaz (Calcium-dependent protein kinase)
CPS	: Kopalil difosfat sentaz (Copalyl diphosphate synthase)
CRT	: Kalretikulin (Calreticulin)
CS	: Sitrik sentaz (Citrate synthase)
Cu	: Bakır (Copper)
CUC	: Kupa şeklinde kotiledon (Cup-shaped cotyledon)
Cu-SOD	: Bakır-süperoksit dismutaz (Copper-superoxide dismutase)
D	: Kuraklık stres grubu (Drought stress group)
DAG	: Diacylgliserol (Diacylglycerol)
ddH₂O	: Çift distile su (Double-distilled water)
DEH	: Dehidrataz (Dehydratase)
DEPC	: Dietilpirokarbonat (Diethylpyrocarbonate)
DHN	: Dehidrin (Dehydrin)
DNMT2	: DNA (sitozin-5)-metiltransferaz 2 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 2)
DRE	: Dehidrasyona tepkili element (Dehydration responsive element)
DREB	: DRE bağlayıcı protein (DRE-binding protein)

DRM	: Yapısal olarak yeniden düzenlenmiş metiltransferaz (Domains rearranged methyltransferase)
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat (Deoxythymidine triphosphate)
dUTP	: Deoksiüridin trifosfat (Deoxyuridine triphosphate)
EJC	: Ekzon birleşim kompleksi (Exon junction complex)
ERD1	: Kuraklığa erken tepki 1 (Early response to dehydration 1)
ERF	: Etilen tepki faktörü (Ethylene Response Factor)
ERG1	: Ergosterol biyosentez proteini 1 (Ergosterol biosynthesis protein 1)
ET	: Etilen (Ethylene)
EXLA/B	: Ekspansin benzeri A / B (Expansin-like A / B)
EXPA/B	: Ekspansin A / B (Expansin A / B)
Fd-GOGAT	: Ferredoksin-glutamat sentaz (Ferredoxin-glutamate synthase)
Fe	: Demir (Iron)
Fe-SOD	: Demir-süperoksit dismutaz (Iron-superoxide dismutase)
FSA	: Fruktoz-6-fosfat aldolaz (Fructose-6-phosphate aldolase)
g	: Gram
g/mol	: Gram/mol (Gram per mole)
G8H	: Geraniol-8-hidroksilaz (Geraniol-8-hydroxylase)
GA	: Giberellik asit (Gibberellic acid)
GABA	: Gamma-aminobütirik asit (Gamma-aminobutyric acid)
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GB	: Glisin betain (Glycine betaine)
Gbp	: Gigabaz çifti (Gigabase pair)
GDH	: Glutamat dehidrogenaz (Glutamate dehydrogenase)
GDS	: Germakren D sentaz
GLR	: Glutamat reseptör benzeri protein (glutamate receptor-like protein)
GolS	: Galaktinol sentaz (Galactinol synthase)
GPx	: Glutasyon peroksidaz (Glutathione peroxidase)
GR	: Glutasyon redüktaz (Glutathione reductase)

GRAS	: GAI-RGA-SCR Transkripsiyon Faktörü Ailesi (GAI-RGA-SCR TF Family)
GRP2	: Glisin-zengin RNA bağlayıcı protein 2 (Glycine-rich RNA binding protein 2)
GR-RBP	: Glisin-zengin RNA bağlayıcı protein (Glycine-rich RNA-binding protein)
GSH	: Glutasyon (Glutathione)
GST	: Glutathione S-transferase
H	: Hidrojen / Proton (H^+) - Hydrogen / Proton (H^+)
H1	: Histon 1 (Histone 1)
H₂O	: Su (Water)
H₂O:ACN	: Su:Asetonitril (Water:Acetonitrile)
H₂O₂	: Hidrojen peroksit (Hydrogen peroxide)
H3K9	: Histon 3 Lizin 9 (Histone 3 Lysine 9)
HMA	: Ağır metal ATPaz (Heavy metal ATPase)
HMG	: Yüksek hareketli grup proteini (High mobility group protein)
HSP	: Isı şok proteini (Heat shock protein)
IAA	: İndol-3-asetik asit - Oksin (Indole-3-acetic acid - Oksin)
IDH	: İzositrat dehidrogenaz (Isocitrate dehydrogenase)
IP3	: İnozitol 1,4,5-trisfosfat (Inositol 1,4,5-trisphosphate)
JERF	: Jasmonat ve etilen tepki faktörü (Jasmonate and ethylene response factor)
K	: Potasyum
K⁺	: Potasyum iyonu (Potassium ion)
kDa	: Kilodalton (Kilodalton)
kV	: Kilovolt (Kilovolt)
LAS	: Lanosterol sentaz (Lanosterol synthase)
LDH	: Laktat dehidrogenaz (Lactate dehydrogenase)
LEA	: Geç embriyo gelişimi bol protein (Late embryogenesis abundant protein)
M	: Molarite (Molar)
m/v	: Ağırlık/hacim oranı (Mass/volume)

m/z	: Kütle/yük oranı (Mass-to-charge ratio)
MAPK	: Mitogenle aktive edilen protein kinaz (Mitogen-activated protein kinase)
MDA	: Malondialdehit (Malondialdehyde)
MDH	: Malat dehidrogenaz (Malate dehydrogenase)
MDHAR	: Monodehidroaskorbat redüktaz (Monodehydroascorbate reductase)
MED37c	: Ara kompleks alt birimi 37c (Mediator complex subunit 37c)
MeJa	: Metil jasmonat (Methyl jasmonate)
MET	: Metiyonin / Metiltransferaz (Methionine / Methyltransferase)
mg g⁻¹	: Gram başına miligram (Milligram per gram)
mM	: Milimolarite (Millimolar)
mm/yıl	: Milimetre/yıl (Millimeter per year)
mmol L⁻¹	: Litre başına milimol (Millimole per liter)
Mn	: Manganez (Manganese)
Mn-SOD	: Manganez-süperoksit dismutaz (Manganese-superoxide dismutase)
mol L⁻¹	: Litre başına mol (Mole per liter)
MTD	: Mitokondri hedefli dehidrogenaz (Mitochondria-targeted dehydrogenase)
MTP	: Metal tolerans proteini (Metal tolerance protein)
MTR4	: mRNA taşıma düzenleyici 4 (mRNA transport regulator 4)
MW	: Moleküler ağırlık (Molecular weight)
MYB	: Miyeloblastozisle ilişkili TF (Myeloblastosis-related TF)
MYBA	: Antosiyanin düzenleyici MYB TF (Anthocyanin-regulating MYB TF)
MYBRS	: MYB bağlanma düzenleyici dizi (MYB binding regulatory sequence)
MYC	: Miyelositomatozisile ilişkili TF (Myelocytomatosis-related TF)
MYCR/MYBR	: MYC tanıma / bağlanma bölgesi (MYC recognizing / binding region)
MYCRS	: MYC düzenleyici dizi (MYC regulatory sequence)

n	: Örnek sayısı (Sample number)
N₂O	: Azot protoksit (Nitrous oxide)
NAC	: NAM, ATAF, CUC TF Ailesi
NaCl	: Sodyum klorür (Sodium chloride)
NACRS	: NAC Bağlanma Dizisi (NAC Binding Regulatory Sequence)
NADP(H)	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NAM	: Apikal meristemi olmayan (No apical meristem)
NaOAc	: Sodyum asetat (Sodium acetate)
NCED	: 9-cis-epoksikrotenoid dioksijenaz (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase)
NDH-H	: NAD(P)H dehidrogenaz alt birimi H (NAD(P)H dehydrogenase subunit H)
ng µl⁻¹	: Mikrolitre başına nanogram (Nanogram per microliter)
ng/ml	: Mililitre başına nanogram (Nanogram per milliliter)
NH₄-OAc-MeOH	: Amonyum asetat-metanol (Ammonium acetate-methanol)
NIT	: Nitrat Redüktaz / Nitrilaz (Nitrate Reductase / Nitrilase)
nL/dk	: Dakikada nanolitre (Nanoliter per minute)
nM	: Nanomolarite (Nanomolar)
NO	: Nitrik oksit (Nitric oxide)
NOD	: Nitrik oksit dioksijenaz (Nitric oxide dioxygenase)
O₂	: Oksijen (Oxygen)
O₂•⁻	: Süperoksit anyonu (Superoxide anion)
O₃	: Ozon (Ozone)
OAT	: Ornitin δ-aminotransferaz (Ornithine aminotransferase)
OG	: Oligogalakturnid (Oligogalacturonide)
P	: Fosfor (Phosphorus)
P5CR	: Pirölin-5-karboksilat redüktaz (Pyrroline-5-carboxylate reductase)
PA	: Fosfatidik asit (Phosphatidic Acid)
PAL	: Fenilalanin amonyak liyaz (Phenylalanine ammonia lyase)

PFK-2/FBPase-2	: Fosfofruktokinaz-2 (6-fosfofrukto-2-kinaz , PFK-2) / fruktoz bisfosfataz-2 (FBPase-2)
pg	: Pikogram (Picogram)
pH	: Potansiyel hidrojen (Potential hydrogen)
PHB	: Prohibitin (Prohibitin)
pI	: İzoelektrik nokta (Isoelectric point)
PLC	: Fosfolipaz C (Phospholipase C)
PLD	: Fosfolipaz D (Phospholipase D)
PNN	: Pinin
PO / POD / PRX	: Peroksidaz (Peroxidase)
PP2A	: Protein fosfataz 2A (Protein phosphatase 2A)
PP2C	: Protein fosfataz 2C (Protein phosphatase 2C)
PPO	: Polifenol oksidaz (Polyphenol oxidase)
PPT	: Fosfoenolpirüvat fosfotransferaz (Phosphoenolpyruvate phosphotransferase)
Pro	: Prolin (Proline)
ProDH	: Prolin dehidrogenaz (Proline Dehydrogenase)
PRPF8B	: Pre-mRNA işleme-parçalama faktörü 8B (Pre-mRNA processing-splicing factor 8B)
PYL	: Pyrabactin direnç benzeri protein - ABA reseptörü (Pyrabactin resistance-like protein - ABA receptor)
PYR	: Pyrabactin direnç proteini (Pyrabactin resistance protein)
R	: İyileştirme grubu (Recovery group)
RAV	: ABI3/VP1 ilgili transkripsiyon faktörü (Related to ABI3/VP1 transcription factor)
RCAR	: ABA Reseptörlerinin Düzenleyici Bileşeni (Regulatory component of ABA receptors)
REH	: RNA helikaz (RNA Helicase)
RO	: Ters ozmoz suyu (Reverse Osmosis water)
RuBisCo	: Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)
S	: Kükürt / Serin (Sulfur / Serine)

SA	: Salisilik asit (Salicylic acid)
Serpin	: Serin proteaz inhibitörü (Serine protease inhibitor)
SF2	: Parçalama faktörü 2 (Splicing Factor 2)
SF6	: Sülfür hekzaflorür (Sulfur Hexafluoride)
SMM	: S-Metilmetiyonin (S-Methylmethionine)
SnRK2	: SNF1 ilişkili protein kinaz 2 (SNF1-related protein kinase 2)
SOD	: Süperoksit dismutaz (Superoxide dismutase)
SOS1	: Son of sevenless homolog 1
SQLE/SM	: Skualen epoksidaz benzeri / Skualen mono-oksijenaz (Squalene epoxidase-like / Squalene monooxygenase)
SQS	: Skualen sentaz (Squalene synthase)
SQS/SQE/SE	: Skualen sentaz ve epoksidaz (Squalene synthase and epoxidase)
SS	: Sükroz sentaz (Sucrose synthase)
TCP-1δ	: T-kompleks proteini 1 delta alt birimi (T-complex protein 1 subunit delta)
TIA	: Terpenoid indol alkaloidleri (Terpenoid indole alkaloid)
TPP	: Trehaloz-6-fosfat fosfataz (Trehalose-6-phosphate phosphatase)
Tris-HCl	: Tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorür (Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride)
UQ	: Ubikinon - koenzim Q (Ubiquinone)
v/v	: Hacim/hacim oranı (Volume/volume)
ZFHD	: Çinko parmak homeodomain proteini (Zinc finger homeodomain protein)
Zn	: Çinko (Zinc)
Zn-SOD	: Çinko-süperoksit dismutaz (Zinc-superoxide dismutase)
ZRT	: Çinko taşıyıcı protein ailesi

KISALTMALAR

1D-RP	: Tek Boyutlu Ters Faz Kromatografisi (One-Dimensional Reversed Phase Chromatography)
BP	: Biyolojik Süreçler (Biological Process)
bp	: Baz Çifti (Base Pair)
BPC	: Baz Tepe Kromatogramları (Base Peak Chromatograms)
BR	: Geniş Aralık (Broad Range)
C18	: C18 Ters Faz Kromatografi Kolonu (C18 Reversed Phase Column)
CA, USA	: Kaliforniya, ABD (California, United States)
CC	: Hücresel Bileşenler (Cellular Component)
cDNA	: Tümlayıcı DNA (Complementary DNA)
CHAPS	: Zwitteriyonik Deterjan (Zwitterionic Detergent)
DDA	: Veri Bağımlı Toplama (Data-Dependent Acquisition)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit (Deoxyribonucleic Acid)
dscDNA	: Çift Sarmallı Tümlayıcı DNA (Double-Stranded cDNA)
ER	: Endoplazmik Retikulum (Endoplasmic Reticulum)
FA	: Yağ Asidi (Fatty Acid)
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
FASP	: Filtre Destekli Örnek Hazırlama (Filter-Aided Sample Preparation)
FDR	: Yanlış Keşif Oranı (False Discovery Rate)
GC	: Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography)
gDNA	: Genomik DNA (Genomic DNA)
GO	: Gen Ontolojisi (Gene Ontology)
HISAT2	: Transkriptlerin Bölünmüş Hizalanması için Hiyerarşik İndeksleme (Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts)
HS	: Yüksek Hassasiyet (High Sensitivity)
Inc.	: Şirket (Incorporated)
IOC	: Uluslararası Zeytin Konseyi (International Olive Council)
IPCC	: Hükümetlerarası İklim Paneli (Intergovernmental Panel on Climate Change)
IRT	: Demir Düzenlemeli Taşıyıcı (Iron-Regulated Transporter)

i5	: Sekanslama Adaptörü (Illumina Index 5)
i7	: Sekanslama Adaptörü (Illumina Index)
KO	: Gen Susturma (Knockout)
LC	: Sıvı Kromatografi (Liquid Chromatography)
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi (Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry)
LFQ	: Etiketlemesiz Miktarlaştırma (Label-Free Quantification)
logFC	: Logaritmik Kat Değişimi (Log Fold Change)
LS	: Yaprak Yaşlanması (Leaf Senescence)
LTP	: Lipit Taşıyıcı Protein (Lipid Transfer Protein)
MF	: Moleküler Fonksiyon (Molecular Function)
MIP	: Major İçsel Proteinleri (Major Intrinsic Protein)
MIQE	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yayınlanması İçin : Minimum Bilgiler (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)
miRNA	: MikroRNA (microRNA)
mRNA	: Mesajcı RNA (Messenger RNA)
MS	: Kütle Spektrometrisi (Mass Spectrometry)
MS AGC	: Otomatik Kazanç Kontrolü (Automatic Gain Control)
MS/MS	: Tandem Kütle Spektrometrisi (Tandem Mass Spectrometry)
nc-RNA	: Kodlamayan RNA (Non-coding RNA)
NGS	: Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)
NIP	: Nodulin-26 Zar Proteinini (Nodulin-26 Intrinsic Protein)
NSC	: Yapısal Olmayan Karbonhidratlar (Non-structural Carbohydrates)
PAL	
aktivitesi	: PAL Enzim Aktivitesi
PCA	: Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis)
PCD	: Programlanmış Hücre Ölümü (Programmed Cell Death)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PIP	: Plazma Zarı İçi Protein (Plasma Membrane Intrinsic Protein)
PR	: Hastalık İlişkili Protein (Pathogenesis-Related protein)
PSI	: Fotosistem I (Photosystem I)

PSII	: Fotosistem II (Photosystem II)
PSM	: Tespit Edilen Toplam Peptit Sayısı (Peptide spectrum matches) - Bitki Sekonder Metabolitleri (Plant Secondary Metabolites)
PTGS	: Transkripsiyon Sonrası Gen Susturma (Post-transcriptional Gene Silencing)
PTM	: Translasyon Sonrası Modifikasyon (Post-translational Modification)
Q 30	: Phred Kalite Skoru 30 (Phred Quality Score 30)
qRT-PCR	: Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR (Quantitative Reverse Transcription PCR)
R	: R Programlama Dili (R Programming Language)
RF	: Radyo Frekansı (Radio Frequency)
RFO	: Raffinoz Ailesi Oligosakkaritleri (Raffinose Family Oligosaccharides)
RIN	: RNA Bütünlük Numarası (RNA Integrity Number)
RNA	: Ribonükleik Asit (Ribonucleic Acid)
RNAi	: RNA Girişimi (RNA interference)
RNA-seq	: RNA Dizilemesi (RNA sequencing)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
RP-HPLC	: Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography)
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
RRI	: RNA Tanıma Motifi İçeren Protein (RNA Recognition Motif-containing protein)
rRNA	: Ribozomal RNA (Ribosomal RNA)
RT	: Ters Transkriptaz / Oda Sıcaklığı (Reverse Transcriptase / Room Temperature)
RWC	: Bağlı Su İçeriği (Relative Water Content)
scZapR	: Smart-Seq3 scRNAseq Enzimi (Smart-Seq3 scRNAseq enzyme)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SIP	: Stresle İndüklenen Protein / Küçük İntegral Protein (Stress-Induced Protein / Small Integral Protein)
siRNA	: Küçük Girişimci RNA (Small Interfering RNA)
TCA	: Trikarboksilik Asit Döngüsü (Tricarboxylic Acid Cycle)

TE	: Transpozon - Hareketli Genetik Eleman (Transposable Element)
TF	: Transkripsiyon Faktörü (Transcription Factor)
TGS	: Transkripsiyonel Gen Susturma (Transcriptional Gene Silencing)
TIP	: Tonoplast İçsel Proteini (Tonoplast Intrinsic Protein)
TMM	: Trimmed Mean of M-values (Trimmed Mean İstatistiği)
TOB	: Tarım ve Orman Bakanlığı
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu (Turkish Statistical Institute)
UPLC	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography)
UV	: Ultraviyole (Ultraviolet)
VIS	: Görünür Spektrum (Visible Spectrum)
WT	: Yabani Tip (Wild Type)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Zeytin bitkisinin tarihsel gelişimi.....	5
Şekil 1.2 Zeytin meyvesinin kesit şeması (Valvez ve ark., 2021).....	7
Şekil 1.3 <i>O. europaea</i> L.'de bulunan bazı, fenolik asit, basit fenol, flavanoid ve sekoiridoidler.	9
Şekil 1.4 2021 verilerine göre hazırlanan Dünya zeytinlik alanlarını temsil eden harita.	13
Şekil 1.5 Dünya tane zeytin üretimi (IOC, 2023).....	14
Şekil 1.6 Dünya sofralık zeytin tüketim verileri (IOC, 2023).....	15
Şekil 1.7 Dünya sofralık zeytin üretimi (IOC, 2023).	16
Şekil 1.8 Dünya sofralık zeytin tüketimi (IOC, 2023).	17
Şekil 1.9 Dünya zeytinyağı üretim tüketim verileri (IOC, 2023).....	18
Şekil 1.10 Dünya zeytinyağı üretimi (IOC, 2023).	19
Şekil 1.11 Dünya zeytinyağı tüketimi (IOC, 2023)	20
Şekil 1.12 2020-2021 Dünya sofralık zeytin ithalat ihracat verileri (ton).....	22
Şekil 1.13 2020-2021 Dünya zeytinyağı ithalat ihracat verileri (ton).	23
Şekil 1.14 Kuraklık stresinin bitkideki etkileri ve stres yanıtları.	28
Şekil 1.15 Kuraklık stresi altında bitkide gerçekleşen mekanizmalar.....	31
Şekil 1.16 Reaktif oksijen türlerinin (ROS) temizleme mekanizmasında antioksidan enzimlerin rolü (Farooq ve ark., 2012).....	33
Şekil 1.17 ROS üretiminin bitkilerde oluşturduğu etkiler ve bitkilerin ROS üretimine karşı geliştirdiği savunma sistemleri.	34
Şekil 1.18 Kuraklık stresinin bitki büyümesi ve işleyişi üzerindeki hormonal etkilerinin şematik özeti.....	36
Şekil 1.19 Bitki kuraklık stres sinyallerinin gelişme süreci (Yang ve ark., 2021).	39

Şekil 1.20 Kuraklık stres yanıtında genel sinyal iletim yolu ve düzenleme mekanizmaları.	40
Şekil 1.21 Kuraklık stres toleransında bitkilerde ABA'ya bağlı ve ABA'dan bağımsız sinyal iletim yolu (Anami ve ark., 2009; Kuromori ve ark., 2014; Liu ve ark., 2015; Gahlaut ve ark., 2016; Jan ve ark., 2017; Tesfa, 2022).	42
Şekil 1.22 Kuraklık stres yanıtında Ca ²⁺ sinyal iletim yolu (Sun ve ark., 2021; Mahajan ve Tuteja, 2005; Yang ve ark., 2021; Defalco ve ark., 2010).	47
Şekil 1.23 Kuraklık stresine karşı cevap ve toleransta indüklenen gen ürünleri: fonksiyonel proteinler (kuraklık toleransı ve hücrel adaptasyonda rol oynayan) ve düzenleyici proteinler (stres yanıtında, gen ekspresyonunda ve sinyal iletiminde işlev gören).	50
Şekil 1.24 Çeşitli organel zarlarında lokalize bitki akuaporinlerinin şematik diyagramı (Katsuhara ve ark., 2008).	52
Şekil 1.25 Aquaporin ve su molekülünün iletimi.	53
Şekil 1.26 LEA proteinlerinin şaperon benzeri fonksiyon modeli.	55
Şekil 1.27 Isı şoku proteinlerinin iki işlevi. A: Yeni proteinler üretilirken HSP'ler (ısı şoku proteinleri), proteinin fonksiyonel proteinlere katlanmasına yardımcı olur. B: Stresten sonra HSP aynı zamanda hasar görmüş veya denatüre olmuş proteinlerin yeniden katlanmasına veya bozulmasına da yardımcı olur. (Whitley ve ark., 1999).	58
Şekil 1.28 Standart bir RNA–Seq çalışmasının iş akış şeması.	61
Şekil 1.29 Illumina TruSeq total RNA dizileme protokolü.	63
Şekil 2.1 Transkriptom iş akış şeması.	70
Şekil 2.2 Proteomik iş akış şeması.	71
Şekil 2.3 Abiotik stres faktörlerine bitki tepkisinin dinamiklerinin genelleştirilmiş şeması (Kosová ve ark., 2011; Larcher, 2003).	72
Şekil 2.4 Bioanalyzer (Agilent 2100) cihazı ve RNA RIN değerlerinin kontrol edilmesinde kullanılan RNA 6000 Pico çip.	76
Şekil 2.5 Qubit® 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazı.	78

Şekil 2.6 SMART-Seq Stranded Kit transkriptom kütüphane oluşturma iş akışı.	79
Şekil 2.7 Bioanalyzer (Agilent 2100) cihazı ile kütüphane uzunluk ve saflığının kontrol edilmesinde kullanılan DNA HS çip.	88
Şekil 2.8 Protein ekstraksiyon metod optimizasyonunda karşılaştırılan farklı protein ekstraksiyon metotları (A: Kaynatma metodu, B: CHAPS metodu, C: TCA metodu)..	97
Şekil 3.1 <i>O. europaea</i> L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam RNA örneklerinin Bioanalyzer cihazı ile elde edilen RNA kalite parametre ölçüm sonuçları. 26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu	107
Şekil 3.2 SMART-Seq Stranded Kit transkriptom kütüphane oluşturma iş akışı.	108
Şekil 3.3 cDNA kütüphanelerinin uzunluklarının tespiti için dsDNA HS çipleri kullanılarak elde edilen Bioanalyzer sonuçları. 26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu.....	110
Şekil 3.4 Normalize edilmiş (EdgeR) verilere ait yoğunluk dağılım grafiği. 26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu. ..	114
Şekil 3.5 Tüm kuraklık ve kontrol örneklerini içeren PCA grafiği (Grafik ilk 2 temel bileşen baz alınarak oluşturulmuştur). 26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu.	115
Şekil 3.6 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı ekspresyon analizini özetleyen volkan grafiği.....	116
Şekil 3.7 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait kuraklık stresi altında anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen tüm genlerin (log) Z-skor ile normalize edilmiş (EdgeR) yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği.....	121
Şekil 3.8 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait kuraklık stresi altında en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen 50 gen (log) için Z-skor ile normalize edilmiş (EdgeR) yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği.	122
Şekil 3.9 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) çeşidinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin gen ontoloji analiz sonuçlarına göre karşılık geldiği terminolojiler ve logFC değerleri.	124

Şekil 3.10 Kuraklık stresi altında Memecik (94) çeşidinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin gen ontoloji analiz sonuçlarına göre karşılık geldiği terminolojiler ve logFC değerleri.	125
Şekil 3.11 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin hücresel bileşen (Cellular compartment, HB) alt ontolojisindeki spesifik görev dağılım sonuçları.	126
Şekil 3.12 Gemlik (26) çeşidinde hücresel bileşen alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.	127
Şekil 3.13 Memecik (94) çeşidinde hücresel bileşen alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.	128
Şekil 3.14 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin moleküler fonksiyon (Molecular Function; MF) alt ontolojisindeki spesifik görev dağılım sonuçları.	130
Şekil 3.15 Gemlik (26) çeşidinde moleküler fonksiyon alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.	131
Şekil 3.16 Memecik (94) çeşidinde moleküler fonksiyon alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.	132
Şekil 3.17 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin biyolojik süreçler (Biological Process, BP) alt ontolojisindeki spesifik görev dağılım sonuçları.	134
Şekil 3.18 Gemlik (26) çeşidinde biyolojik süreç alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.	135
Şekil 3.19 Memecik (94) çeşidinde biyolojik süreç alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.	136

Şekil 3.20 GAPDH primeri ile yapılan PCR uygulaması jel görüntüsü (1-26 K, 2-26 D, 5-94 K, 6-94 D, 7-26 KR, 8-26 DR, 11-94 KR, 12-94 DR, N-negatif kontrol).	141
Şekil 3.21 PP2A1, ATPsyn, SOS1, ProDH, JERF, HMG, GRAS primerleri için yapılan klasik PCR uygulaması sonucu elde edilen jel görüntüsü.	142
Şekil 3.22 Validasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen genler ve ait oldukları metabolik yollar.	143
Şekil 3.23 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların galactinol synthase 2-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	144
Şekil 3.24 Terpenoid biyosentetik yolunda yer alan ilgili genler (Ma ve ark., 2024)..	147
Şekil 3.25 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların (-)-germacrene D synthase-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	148
Şekil 3.26 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların squalene monooxygenase-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	150
Şekil 3.27 Sterol ve triterpenoid biyosentetik yolu.	151
Şekil 3.28 Siterol biyosentetik yolu. Skualen, skualen epoksidaz (SQE) tarafından oksitlenerek 2,3-oksido skualen üretir ve bu da membran sterolleri dahil olmak üzere steroidleri üretmek üzere metabolize edilir. BAS, b-amirin sentaz; CAS, sikloartenol sentaz; LAS, lanosterol sentaz; LS, lupeol sentaz; SQE, skualen monooksijenaz/epoksidaz; SQS, skualen sentaz (Ohshima ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2023).....	152
Şekil 3.29 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların beta-amyrin 28-oxidase-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	154

Şekil 3.30 Olenolik asit biyosentetik yolu. Mevalonat yolundan türetilen skualen oluşumu skualen sentaz (SQS) tarafından katalize edilir. Olenolik asit, skualen epoksidaz (SE) katalizinde skualenden sentezlenen aynı öncül olan 2,3-oksidoskualenden türetilir. Oksidoskualen, b-amirin sentaz katalizinde b-amirin'e dönüştürülür. B-amirin, b-amyrin oksidaz (BAO) tarafından katalize edilerek oleanane tipi olenolik aside dönüştürülür (Zhao ve ark., 2015; Martínez-Beamonte ve ark., 2020). 155

Şekil 3.31 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların chalcone synthase J-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol). 158

Şekil 3.32 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların caffeic acid 3-O-methyltransferase 2 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol). 161

Şekil 3.33 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların glutamate dehydrogenase B, transcript variant X2 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol). 164

Şekil 3.34 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların aquaporin PIP2-2-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol). 167

Şekil 3.35 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların aquaporin TIP1-1-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol). 168

Şekil 3.36 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların zinc transporter 5-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol). 172

Şekil 3.37 Çinko (Zn) tarafından tetiklenen kuraklık toleransı mekanizmaları.	174
Şekil 3.38 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların copper-transporting ATPase HMA4-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	176
Şekil 3.39 Basitleştirilmiş bir bitki hücresinde ağır metal P1B-ATPazları (HMA) için olası hücre altı konumları.	178
Şekil 3.40 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların abscisic acid receptor PYL4-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	181
Şekil 3.41 Bitkilerde ABA-bağımlı PYR/PYL aracılı PP2C aktivitesi ve ABA sinyallemesinin inhibisyonunun şematik gösterimi. ABF, ABA'ya duyarlı element bağlayıcı faktör; PP2C, Protein fosfataz 2C; PYR, pirabaktin direnci; PYL, PYR ile ilgili; SnRK2, sakarozu fermente etmeyen-1 ile ilişkili protein kinaz 2. (Santiago ve ark., 2009; Ng ve ark., 2014; Fernando ve Schroeder, 2016).	185
Şekil 3.42 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların glutamate receptor genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	187
Şekil 3.43 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların ethylene-responsive transcription factor 5-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	189
Şekil 3.44 ERF alt familyası transkripsiyon faktörlerinin bitkide kuraklık stresine verdiği tepkileri düzenleme mekanizmaları (Wu ve ark., 2022; Nie ve Wang, 2023; Ma ve ark., 2024).	190
Şekil 3.45 Stres koşulları altında bitkilerde ROS metabolizmasının ve sinyallemesinin yönetimi. Hücrel ROS birikimi üç ana yöntemle kontrol edilir: (1) ROS üretimi, (2) ROS temizleme ve (3) ROS taşınması. Bu yöntemler ROS konsantrasyonlarını korur ve	

çeşitli abiyotik faktör-tepki sinyal iletim yollarında sinyal görevi gören çeşitli ROS düzenlemeleri gerçekleştirir (Raza ve ark., 2022).	194
Şekil 3.46 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların peroxidase 12-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	195
Şekil 3.47 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların probable glutathione peroxidase 8 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	196
Şekil 3.48 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların ascorbate peroxidase genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	197
Şekil 3.49 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların catalase genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	198
Şekil 3.50 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların copper/zinc superoxide dismutase genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	199
Şekil 3.51 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase, mitochondrial-like, transcript variant X1 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	204
Şekil 3.52 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması	

sonrası sulama yapılan (R) grupların DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	206
Şekil 3.53 RH'ler Arabidopsis'te yer aldığı moleküler süreçler (Li ve ark., 2023).	207
Şekil 3.54 <i>Arabidopsis</i> RH'lerinin bitki yaşam döngüsünde rol aldığı aşamalar (Li ve ark., 2023).....	209
Şekil 3.55 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların histone H1-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	211
Şekil 3.56 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların DNA (cytosine-5)-methyltransferase CMT2-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	214
Şekil 3.57 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların pinin-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	217
Şekil 3.58 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların phospholipase D alpha 1-like, transcript variant X1 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	219
Şekil 3.59 Kuraklık stresi altında PLD'nın rolüne ilişkin önerilen model. Bu model yalnızca ABA aracılı stoma kapanmasında bilinen PLD/PA hedeflerini tasvir etmektedir. Diğer ABA düzenleyicileri bu modele dahil değildir.....	222
Şekil 3.60 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların expansin B3 like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).	223
Şekil 3.61 Bitki hücre duvarının ve ekspansinler tarafından gevşetilmesinin basitleştirilmiş bir modeli.	224

Şekil 3.62 Kuraklık stresi altında bitkilerde proteom seviyesinde gelişen başlıca stres cevapları.....	228
Şekil 3.63 Protein ekstraksiyon metod optimizasyonunda karşılaştırılan farklı protein ekstraksiyon metotları (A: Kaynatma metodu, B: CHAPS metodu, C: TCA metodu).229	
Şekil 3.64 Protein ekstraksiyon metod optimizasyonu için seçilen üç metod ile elde edilen peptitlerin LC-MS baz tepe kromatogramları; A) Protokol A-SDS, B) Protokol B-CHAPS ve C) Protokol C-Fenol/SDS. Tutma süresi 25-40 dakika olup hidrofobik peptitleri vurgulamaktadır.....	231
Şekil 3.65 Üç ekstraksiyon metodu için protein (X) ve peptit grupları (Y) seviyesinde oluşturulan Temel Bileşen Analizi (PCA) puan grafiği (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).	235
Şekil 3.66 Üç ekstraksiyon protokolü için farklı şekilde ifade edilen proteinleri gösteren ısı haritası (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).	236
Şekil 3.67 Üç ekstraksiyon protokolü kullanılarak elde edilen protein profillerini temsil eden Venn diyagramları (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).	237
Şekil 3.68 Protein bolluğuna dayalı farklı ekspresyonlu proteinlerin moleküler ağırlığını (MW) ve izoelektrik noktasını (PI) temsil eden dağılım grafikleri (log2 FC: 1, P < 0,05, FDR < %1,0). A) Protokol A'da Protokol B'ye kıyasla 2 kattan fazla bolluğa sahip 245 protein B) Protokol A'da Protokol C'ye kıyasla 2 kattan fazla bolluğa sahip 216 protein, C) Protokol B'de Protokol C'ye kıyasla 2 kattan fazla bolluğa sahip 75 protein.....	238
Şekil 3.69 Farklı ekspresyon metodları ile elde edilen proteinlerin izoelektrik noktalarının (PI) dağılımını temsil eden histogramlar (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).....	239
Şekil 3.70 Biyolojik süreç, hücresel bileşen ve moleküler fonksiyon için GO verilerini gösteren çubuk grafik (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).	244

Şekil 3.71 Tüm örnekler için protein seviyesinde oluşturulan Temel Bileşen Analizi (PCA) puan grafiği (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	248
Şekil 3.72 Tüm örneklerin tekrarlı analizinde tanımlanan farklı anlatım yapan proteinlerin ısı haritası (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	249
Şekil 3.73 <i>O. europaea</i> L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait tüm proteinlerin örneklerinin izoelektrik noktalarının (PI) dağılımını temsil eden histogram.	251
Şekil 3.74 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik (26) çeşidine ait gruplar için tanımlanan protein sayısı, peptit grupları ve peptit sekanslarına ait veriler.	252
Şekil 3.75 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Memecik (94)çeşidine ait gruplar için tanımlanan protein sayısı, peptit grupları ve peptit sekanslarına ait veriler.	253
Şekil 3.76 Gemlik (26) çeşidine ait kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı proteom analizini özetleyen volkan grafiği. A: 26K ve 26D örnekleri arasında artış ve azalış gösteren proteinler. B: 26D ve 26DR örnekleri arasında artış ve azalış gösteren proteinler (26: Gemlik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	255
Şekil 3.77 Memecik (94) çeşidine ait kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı proteom analizini özetleyen volkan grafiği. A: 94K ve 94D örnekleri arasında artış ve azalış gösteren proteinler. B: 94D ve 94DR örnekleri arasında artış ve azalış gösteren proteinler (94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	256
Şekil 3.78 Proteomik çalışmalarında kullanılan karşılaştırma grupları ve karşılaştırma sonucunda elde edilen yüksek oranda artış ve azalış gösteren protein miktarları (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	257
Şekil 3.79 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre kuraklık stresi ile ilişkili olduğu tespit edilen Gemlik ve Memecik çeşitlerindeki ortak proteinler ve ait oldukları metabolik yollar.	277

Şekil 3.80 Biyolojik süreçler için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (26: Gemlik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	299
Şekil 3.81 Hücresel bileşenler için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (26: Gemlik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	300
Şekil 3.82 Moleküler fonksiyon için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (26: Gemlik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	301
Şekil 3.83 Biyolojik süreçler için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	303
Şekil 3.84 Hücresel bileşenler için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	304
Şekil 3.85 Moleküler fonksiyon için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).	305
Şekil 3.86 Zeytin çeşitlerinde anlamlı artış ve azalış gösterdiği tespit edilen ortak transkript ve proteinlerin karşılaştırmalı ısı haritası.	313

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Zeytin bitkisinin taksonomik sınıflandırması.....	6
Tablo 1.2 Türkiye’de zeytin alanları, ağaç sayısı, üretim ve verim durumu (TÜİK, 2023).	25
Tablo 2.1 DNase I uygulamasında kullanılan bileşen ve hacimleri.	74
Tablo 2.2 Annealing Master Mix bileşenleri.....	80
Tablo 2.3 First-strand master mix bileşenleri.....	80
Tablo 2.4 ‘RT’ PCR programı protokolü.	81
Tablo 2.5 PCR1 master mix bileşenleri.....	81
Tablo 2.6 ‘PCR1’ PCR programı protokolü.....	82
Tablo 2.7 ‘PreZap’ PCR programı protokolü.....	83
Tablo 2.8 Zap master mix bileşenleri.	84
Tablo 2.9 ‘Zap’ PCR programı protokolü.	85
Tablo 2.10 Ultra-Low- ya da Low-Input iş akışının seçimi.	85
Tablo 2.11 PCR2 master mix bileşenleri.....	86
Tablo 2.12 ‘PCR2’ PCR programı protokolü.....	86
Tablo 2.13 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait cDNA sentezi için kullanılan RNA miktarları.	93
Tablo 2.14 Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu bileşenleri.	93
Tablo 2.15 Ters transkripsiyon reaksiyon bileşenleri.....	94
Tablo 2.16 GAPDH primeri için kullanılan PCR bileşenleri.	95
Tablo 2.17 GAPDH primerleri için kullanılan PCR protokolü.	95
Tablo 2.18 Real Time PCR için kullanılan PCR bileşenleri.	96
Tablo 2.19 Real Time PCR programı.....	96

Tablo 3.1 <i>O. europaea</i> L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam RNA örneklerinin NanoDrop cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	106
Tablo 3.2 <i>O. europaea</i> L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam RNA örneklerinin Bioanalyzer cihazı ile elde edilen RIN (RNA Integrity Number) ölçüm sonuçları.	106
Tablo 3.3 <i>O. europaea</i> L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam RNA örneklerinin Qubit cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçüm sonuçları.	108
Tablo 3.4 cDNA kütüphanesi oluşturmak için kullanılan toplam RNA'ların konsantrasyon ölçümleri ve kütüphane giriş seyreltme oranları.	109
Tablo 3.5 cDNA kütüphaneleri için seçilen ilgili adaptör listesi.	109
Tablo 3.6 cDNA kütüphanelerinin Qubit cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçüm sonuçları.	111
Tablo 3.7 cDNA kütüphane örneklerine ait kalite kontrol parametreleri.....	112
Tablo 3.8 Volkan grafiği baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.....	117
Tablo 3.9 Gemlik (26) çeşidi için kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı ekspresyon analiz sonucu en yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 gen.....	118
Tablo 3.10 Memecik (94) çeşidi için kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı ekspresyon analiz sonucu en yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 gen.....	119
Tablo 3.11 Isı haritası baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.....	123
Tablo 3.12 Hücresel bileşen alt ontolojisi baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.....	129
Tablo 3.13 Moleküler fonksiyon alt ontolojisi baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.....	133

Tablo 3.14 Biyolojik süreçler alt ontolojisi baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.....	138
Tablo 3.15 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitlerinin, transkriptom seviyesinde hiyerarşik olarak yapılandırılmış üç ana bağımsız alt ontolojiden (biyolojik süreçler, hücresel bileşenler ve moleküler fonksiyonlar) yararlanılarak elde edilen kuraklık stres yanıtlarındaki farklı stratejilerine ilişkin sonuçların özeti.....	139
Tablo 3.16 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait toplam RNA örneklerinin NanoDrop ve Qubit cihazlarından elde edilen kalite parametre ölçüm sonuçları.....	141
Tablo 3.17 Karşılaştırması yapılan üç protein ekstraksiyon yönteminden elde edilen proteinlerin Qubit florometrik okumaları (A: Kaynatma Metodu, B: CHAPS Metodu, C: TCA Metodu).	230
Tablo 3.18 Zeytin yaprağının üç ekstraksiyon yöntemi için protein, peptit grupları, peptit sekansları ve ham protein verim karşılaştırılması (FW = taze ağırlık). A) Protokol A-SDS, B) Protokol B-CHAPS ve C) Protokol C-Fenol/SDS.	231
Tablo 3.19 Kuraklık stresi ile ilişkili bitki hidrofilik ve hidrofobik proteinlerinin işlevleri.	232
Tablo 3.20 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin bitkisinde tespit edilen kuraklık stresi ile ilişkili proteinlerin moleküler ağırlık ve izoelektrik noktaları.	242
Tablo 3.21 <i>O. europaea</i> L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam protein örneklerinin Qubit cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçüm sonuçları.	246
Tablo 3.22 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) çeşidinde yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren proteinlerin listesi.....	258
Tablo 3.23 Kuraklık stresi altında Memecik (94) çeşidinde yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren proteinlerin listesi.....	259
Tablo 3.24 Kuraklık stresi sonrasında Gemlik çeşidi iyileşme (recovery) grubunda (26DR) çeşidinde yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren proteinlerin listesi....	261

Tablo 3.25 Kuraklık stresi sonrasında Memecik iyileşme (94DR) çeşidinde yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren proteinlerin listesi.	262
Tablo 3.26 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) çeşidinde yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren proteinlerin listesi.	263
Tablo 3.27 Kuraklık stresi altında Memecik (94) çeşidinde yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren proteinlerin listesi.	264
Tablo 3.28 Kuraklık stresi sonrasında Gemlik çeşidi iyileşme (recovery) grubunda (26DR) yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren proteinlerin listesi.	265
Tablo 3.29 Kuraklık stresi sonrasında Memecik çeşidi iyileşme (recovery) grubunda (94DR) yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren proteinlerin listesi.	266
Tablo 3.30 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin bitkisinde tespit edilen kuraklık stresi ile ilişkili proteinlerin kuraklık ve iyileşme gruplarındaki kat değişilikleri (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu, , +: normalde ifade edilmezken ifade edilmeye başlanan protein, -: normalde ifade edilirken, ifadesi yok olan protein).	268
Tablo 3.31 Proteomik analizler sonucunda kuraklık stresi ile ilişkili anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen ısı şoku proteinlerinin organizmadaki konum ve işlevleri.	270
Tablo 3.32 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik ve Memecik çeşitlerinde tespit edilen ortak proteinlerin kuraklık gruplarındaki kat değişilikleri (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, +inf: normalde ifade edilmezken ifade edilmeye başlanan protein).	275
Tablo 3.33 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik ve Memecik çeşitlerinde tespit edilen ortak proteinlerin iyileşme gruplarındaki kat değişilikleri (26: Gemlik, 94: Memecik, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu, +inf: normalde ifade edilmezken ifade edilmeye başlanan protein).	276
Tablo 3.34 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik ve Memecik çeşitlerinde tespit edilen ortak proteinlerin kuraklık gruplarındaki kat değişilikleri (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, -inf: normalde ifade edilirken, ifadesi yok olan protein).	276

Tablo 3.35 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik ve Memecik çeşitlerinde tespit edilen ortak proteinlerin iyileşme gruplarındaki kat değişiklikleri (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, R: İyileşme (recovery) grubu, -inf: normalde ifade edilirken, ifadesi yok olan protein).	276
Tablo 3.36 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel regülasyon ile ilişkili proteinlerin listesi.	278
Tablo 3.37 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan sekonder metabolizma ile ilişkili proteinlerin listesi.	283
Tablo 3.38 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan redoks ve antioksidan savunma ile ilişkili proteinlerin listesi.	285
Tablo 3.39 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan metabolizma ve enerji yönetimi ile ilişkili proteinlerin listesi.	287
Tablo 3.40 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan hücresel ulaşım ve taşıyıcı ve depolama ile ilişkili proteinlerin listesi.	291
Tablo 3.41 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan protein katlanması, stabilizasyonu ve korunması (şaperonlar ve inhibitörler) ile ilişkili proteinlerin listesi.	294
Tablo 4.1 Zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi altında transkriptom düzeyinde gelişen yanıtların karşılaştırılması	318
Tablo 4.2 Zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi altında proteom düzeyinde gelişen yanıtların karşılaştırılması.....	319
Tablo 4.3 Zeytin çeşitlerinde iyileşme döneminde transkriptom düzeyinde gelişen yanıtların karşılaştırılması	320
Tablo 4.4 Zeytin çeşitlerinde iyileşme döneminde proteom düzeyinde gelişen yanıtların karşılaştırılması.....	322
Tablo 4.5 Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) ve hassas (Gemlik-26) zeytin çeşitlerinin kuraklık stresine karşı moleküler düzeyde verdikleri yanıtların karşılaştırılması	323

1. GİRİŞ

Dünya genelinde tarımsal üretkenliği kısıtlayan en önemli çevresel stres faktörlerinden biri olan kuraklık, günümüzde insanoğlunun geleceğini tehdit eden en önemli küresel ve bölgesel çevre sorunlarının başında gelmektedir (IPCC, 2025). Küresel bazda meydana gelen bu değişimlerin tarımsal üretim üzerindeki etkileri her geçen yıl daha belirgin hale gelmekle birlikte özellikle su kaynaklarının azalması ve kuraklık periyotlarının şiddetlenmesi, bitkisel üretim için ciddi tehditler oluşturmaktadır (Lesk ve ark., 2016).

Bitkilerde kuraklık stresine verilen yanıtlar oldukça karmaşık bir ağ tarafından düzenlenmektedir. Bu yanıtlar gen ekspresyonu, protein sentezi, hormon sinyalleşmesi, antioksidan savunma sistemleri ve osmotik düzenleme gibi çok katmanlı biyolojik süreçleri içermektedir (Gupta ve ark., 2020). Bu bağlamda, transkriptomik ve proteomik teknolojiler, bitkilerin kuraklığa yanıt olarak sergilediği moleküler değişimleri anlamada tamamlayıcı ve güçlü araçlardır. Transkriptom analizleri, gen ekspresyon profillerinin ortaya konulmasını sağlarken; proteom analizleri ise post-transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel düzenlemeler sonucu oluşan protein düzeyindeki değişiklikleri ortaya koymaktadır (Li ve ark., 2022). Bu iki yaklaşımın bütünleşik olarak kullanılması, stres tolerans mekanizmalarının daha kapsamlı ve hassas bir şekilde tanımlanmasına olanak tanımaktadır.

Bitkilerde yapılan moleküler araştırmalardan biri olan gen ifade analizleri, transkriptom çalışmaları olarak da adlandırılmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında, transkript düzeyi ve çeşitliliği karakterize edilmekte, bitkilerin farklı çevresel koşullar altındaki translasyonel yanıtları izlenebilmektedir (Zomeno ve ark., 2014). Bu teknik kullanılarak kuraklıkla ilişkili genlerin belirlendiği pek çok çalışma literatürde yer almaktadır (Gil-Amado ve Gomez-Jimenez, 2013; Rasheed ve ark., 2016; Moschen ve ark., 2017). Ancak, bu çalışmalara ek olarak, çevresel stres koşullarında bitki proteomunda meydana gelen değişimlerin incelenmesi de büyük önem taşımaktadır. Çünkü proteinler, stres yanıtlarında doğrudan rol oynamakta; bu adaptif süreçlerde moleküler ve hücresel düzeyde gelişen stratejilerin çoğu, protein seviyesinde anlamlı değişiklikler ile karakterize edilmektedir (Gao ve ark., 2011; Jedmowski ve ark., 2014).

Bununla birlikte, bir organizmadaki proteinlerin yapısı, işlevi, miktarı ve çeşitliliği yalnızca DNA dizilimi üzerinden tam olarak anlaşılamamaktadır (Salekdeh ve ark., 2002). Bu durumun başlıca nedenleri arasında mRNA'ların farklı kararlılık düzeyleri, translasyonel etkinliklerindeki değişkenlik ve translasyon sonrası modifikasyonlar yer almaktadır. Ayrıca, proteinlerin dönüşüm oranları ve kararlılıkları; işlevlerine ve hücresel lokalizasyonlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu nedenle, yapılan araştırmalar genellikle transkript düzeyleri ile protein düzeyindeki değişiklikler arasında zayıf bir korelasyon bulunduğunu ortaya koymaktadır (Zivy ve Vienne, 2000; Gao ve ark., 2011; Zomeno ve ark., 2014).

Dolayısıyla, çevresel streslere karşı verilen protein düzeyindeki yanıtların anlaşılabilmesi için yalnızca transkript seviyelerinin ölçülmesi yeterli olmamakta; hücrelerdeki işlevsel birimler olan proteinlerin doğrudan analiz edilmesi, protein düzeyindeki değişimlerin daha doğru ve işlevsel bir şekilde ortaya konulmasını sağlamaktadır (Wang ve ark., 2016; Wang ve ark., 2017; Michaletti ve ark., 2018; Xin ve ark., 2018).

Dünyada tarımsal ürün olarak ekonomik öneme sahip olan Oleaceae familyası Lamiales takımının bir üyesi olan zeytin bitkisi (*Olea europaea* L.), yarı kurak iklimlere adapte olabilen bir tür olarak Akdeniz iklimine sahip bölgelerde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Zeytin bitkisinin ekonomik önemi de göz önünde bulundurulduğu zaman, tarımsal üretiminin yapıldığı alanlarda iklim değişikliği nedeniyle artması öngörülen ciddi kuraklık olaylarının ürün verim ve kalitesini etkilemesi kaçınılmazdır. Bu durumun birçok ülke ile birlikte dünyada zeytin üretiminde dördüncü, zeytinyağı üretiminde beşinci ülke olan Türkiye için de önemli sorunlar doğuracağı öngörülmektedir (FAO, 2024; TTO, 2020). Genel olarak kuraklığa toleranslı bir tür olarak bilinmesine rağmen farklı zeytin çeşitlerinin kuraklık stres faktörüne karşı gösterdiği tolerans düzeyleri değişiklik gösterdiği bilinmektedir (Gómez-Rico ve ark., 2023). Bu nedenle, zeytin çeşitleri arasında kuraklık stresine karşı toleransı belirleyen adaptif moleküler mekanizmaların aydınlatılması, hem genetik ıslah çalışmaları hem de sürdürülebilir tarımsal üretim stratejileri açısından kritik bir öneme sahiptir.

Zeytin bitkisi üzerine yapılan son çalışmalar, kuraklık stresi altında bazı genlerin (örn. LEA, DREB, NCED) ve proteinlerin (örn. antioksidan enzimler, ısı şok proteinleri) farklı düzeylerde ifade edildiğini göstermektedir (Zouari ve ark., 2021). Ancak, bu çalışmaların

çoğu ya sadece transkriptomik ya da yalnızca proteomik veriler üzerine odaklanmış olup, iki düzeydeki verilerin karşılaştırmalı olarak analiz edildiği bütüncül çalışmalar sınırlıdır. Bu durum, zeytin gibi ekonomik ve ekolojik açıdan önemli türlerde, stres yanıtına ilişkin moleküler mekanizmaların henüz tam anlamıyla çözülememiş olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışması, zeytin bitkisinde kuraklık stresine karşı gelişen adaptif moleküler mekanizmaları ortaya koymak amacıyla, farklı tolerans düzeylerine sahip çeşitler üzerinden yürütülecek karşılaştırmalı transkriptom ve proteom analizlerine dayanmaktadır. Bu kapsamda, elde edilen verilerle kuraklık toleransında rol oynayan aday gen ve proteinlerin belirlenmesi hedeflenmiş ve bu moleküler belirteçlerin gelecekteki ıslah programlarında kullanımı ve iklim değişikliğine toleranslı zeytin çeşitlerinin geliştirilmesi için bilimsel bir temel oluşturulması amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar ekonomik ve tarımsal öneme sahip olan zeytin bitkisinin ıslahında, tarımsal verim artışının sağlanmasında ve kuraklık stres koşullarında Türkiye'ye özgü zeytin çeşitlerinin tolerans seviyesinin tespit edilerek moleküler mekanizmalarının ortaya konulmasında yeni bir bakış açısı oluşturulması bakımından önem taşımaktadır. Bu yaklaşım, kuraklık stresine dayanıklı, yüksek verimli ve adaptif kapasitesi yüksek yeni bitki varyetelerinin geliştirilmesi açısından da stratejik bir öneme sahiptir.

1.1. GENEL BİLGİLER

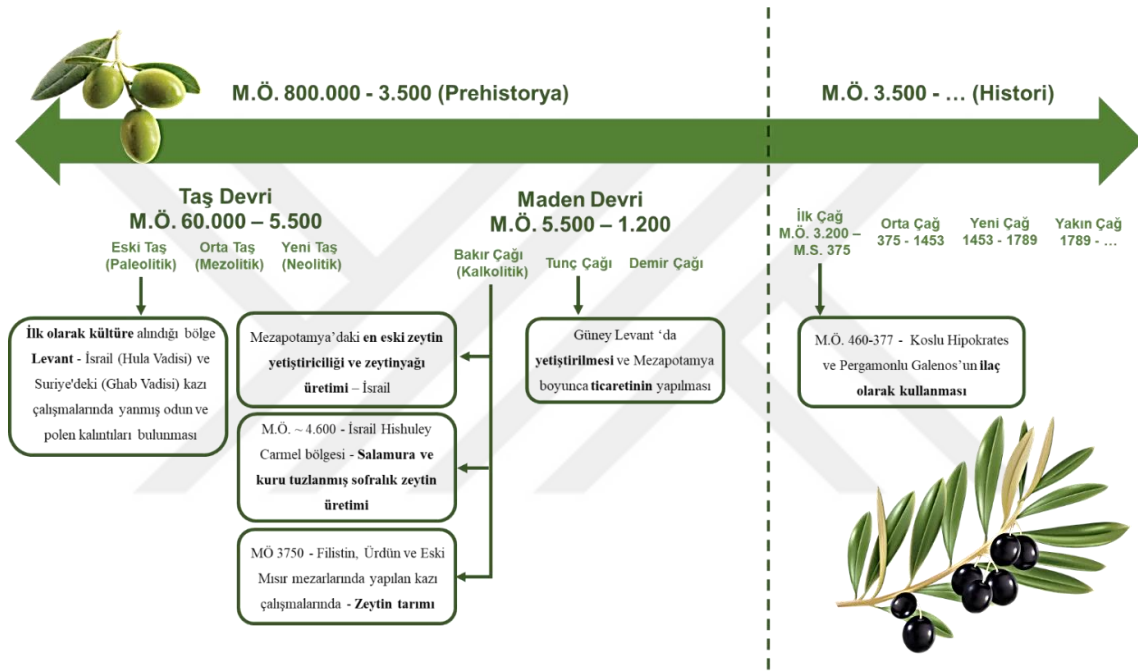
1.1.1 Zeytin (*Olea europaea* L.) Hakkında Genel Bilgiler

Dünyada tarımsal ürün olarak yüksek ekonomik öneme sahip Oleaceae familyası Lamiales takımının bir üyesi olan zeytin bitkisi (*Olea europaea* L.) 30 cins ve 600 türü ile Akdeniz bitki örtüsünün karakteristik bir bitkisidir (Johnson, 1957; Besnard ve ark., 2002). Diploit kromozoma ($2n=46$) sahip olan zeytinin genom büyüklüğü yaklaşık 1,38 Gb'dir (Calvo-Polanco ve ark., 2019) Zeytin bitkisi içeriğinde flavonoidler, fenolik bileşikler, sekoiridoidler ve sekoiridoid glikozitleri, triterpenler, biyofenoller, benzoik asit türevleri ve şekerler olmak üzere çok çeşitli biyokimyasallar barındırmaktadır (Gariboldi ve ark., 1986; Le Tutour ve Guedon, 1992; Ryan ve ark., 2002).

1.1.1.1 Zeytin Bitkisinin Tarihçesi

Moleküler ve arkeolojik veriler incelendiğinde zeytin bitkisinin kültüre alınması ve ekiminin yayılmasına ilişkin elde edilen bilgilere göre ilk kanıtlar 5 bin yıl öncesine dayanmaktadır (Muzzalupo, 2012; Besnard ve ark., 2013; Diez ve ark., 2015; Mousavi ve ark., 2017; Julca ve ark., 2020; Terral ve ark., 2021). İlk olarak kültüre alındığı bölgenin Levant adı verilen bölge olduğu, İsrail (Hula Vadisi) ve Suriye'de (Ghab Vadisi) yapılan kazı çalışmaları sonrasında bulunan yanmış odun ve polen kalıntılarının araştırılmasıyla bulunmuştur (Şekil 1.1). Levant bölgesindeki zeytin varlığının Paleolitik döneme kadar uzandığı tahmin edilmektedir (Kaniewski ve ark., 2012). Erken Tunç Çağı'nda zeytin üzüm ve incirin, Güney Levant'ın kuru tarım bölgelerinde yetiştirilen ve Mezapotamya boyunca ticareti yapılan en önemli üç ürününden biri olduğu bilinmektedir (Fall ve ark., 2002). Mezapotamyadaki en eski zeytin yetiştiriciliği ve zeytinyağı üretiminin İsrail'de bulunan arkeolojik (değirmenler ve zeytin sıkma kapları) ve arkeobotanik (polen, zeytin meyveleri, odun ve yapraklar) kanıtların araştırılmasıyla Bakır Çağı'na kadar uzanmakta olduğu bildirilmiştir. Yabani türlerden toplanan ilk zeytin kırma ve yağ çıkarma kalıntıları, İsrail'deki (Kfar Samir) kıyı yerleşimlerinde M.Ö. 5.000 olarak tarihlendirilmiştir (Galili ve ark., 1997). Zeytinyağı kalıntıları ve ezilmiş tohumlarla temsil edilen Kalkolitik döneme ait buluntular, bunların çeşit mi yoksa yabani zeytin mi olduğu konusunda ayırım yapılmasına izin vermemektedir. Yetiştiriciliğin başlangıcının ancak Erken Tunç Çağı'nda kesin olduğu bilinmektedir (Lipshitz ve ark., 1991). Yakın zamanda Orta Kalkolitik Çağ'da (M.Ö. ~4.600) İsrail'de Hishuley Carmel bölgesinde salamura ve kuru tuzlanmış sofralık zeytin üretildiği kanıtlanmıştır (Terral ve ark., 2021). Mezapotamya'da zeytin ekimi ve yağ çıkarımına dair diğer işaretler Minos Girit'inde ve Afrodit'in Kephali'sinde (Erken Minos I, MÖ ~3.200-2.700) bulunmaktadır (Koh ve Betancourt, 2010). Fenikeliler ürettikleri zeytinyağı ve fidanlarını ilk olarak Ege kıyı ve adalarına sonrasında da Yunanistan'a götürerek Akdeniz'in birçok ülkesine yayılmasında en önemli ve etkili rolü üstlenen uygarlık olmuşlardır. Roma imparatorluğunun geniş bir coğrafyaya yayılması da zeytinin Batı Akdeniz ve Ege denizinden Avrupa'nın iç kısımlarına doğru yayılmasında etkili olmuştur (Russo ve ark., 2020). MÖ 3750 yıllarında Filistin, Ürdün ve Eski Mısır'a ait mezarlarda yapılan kazı çalışmaları sonrasında zeytin tarımı yapıldığını gösteren bulgular ortaya çıkmıştır (Ünsal, 2019). Zeytinyağı, zeytin kültüre alınmadan önce "Oleaster" olarak bilinen yabani

Akdeniz zeytininden üretilerek aydınlatma, sağlık ve kozmetik alanında kullanılmıştır (Besnard ve ark., 2002). Zeytin ağacının kültüre alınıp farklı coğrafi bölgelere yayılmasıyla zeytinyağı üretimi gelişim göstermiş ve kullanım alanları artmıştır. Roma İmparatorluğu ticaret ile zeytinyağını Avrupa'ya taşımış ve zeytinyağının işlenmesiyle ilgili yeni teknikler gelişmiştir (Valvez ve ark., 2021). Zeytinyağı, M.Ö. 460-377 yılları arasında yaşamış olan Koslu Hipokrates ve Pergamonlu Galenos'un tavsiye ettikleri bir ilaç olmuştur. Modern tıpta zeytinyağının birçok hastalığa karşı faydasının olduğu bilinmektedir (Kaplan ve Arıhan, 2012).



Şekil 1.1 Zeytin bitkisinin tarihsel gelişimi.

1.1.1.2 Zeytin Bitkisinin Taksonomik Sınıflandırılması

Dünyada tarımsal ürün olarak yüksek ekonomik öneme sahip Oleaceae familyası Lamiales takımının bir üyesi olan zeytin bitkisi (*Olea europaea* L.) 30 cins ve 600 türü ile Akdeniz bitki örtüsünün karakteristik bir bitkisidir (Johnson, 1957; Besnard ve ark., 2002). Oleaceae familyası içerisinde *Olea* ve diğer 10 cins Oleaceae tribünün Oleinae alt tribünü içerisinde yer almaktadır (Wallander ve Albert, 2000). *Olea* cinsi yalnızca altı alt türün tanındığı zeytin kompleksinden (*Olea europaea*) oluşmaktadır (Vargas ve ark., 2001; Green, 2002). *Olea europaea*'nın altı doğal alt türü Dünya üzerinde geniş bir yayılım göstermektedir (Green, 2002; Besnard ve ark., 2008; Brito ve ark., 2008). *O.*

europaea subsp. europaea (Akdeniz Havzası), *O. europaea subsp. sylvestris*, *O. europaea subsp. cuspidata* (Güney Afrika'dan Doğu Afrika boyunca Arabistan ve Güneybatı Çin'e kadar), *O. europaea subsp. cerasiformis* (Madeira), *O. europaea subsp. guanchica* (Kanarya adaları), *O. europaea subsp. laperrinei* (Cezayir, Sudan, Nijerya), *O. europaea subsp. maroccana* (Fas). Alt türlerinden *O. europaea subsp. cerasiformis* tetraploid ve *O. europaea subsp. maroccana* hexaploiddir. Zeytinin yabancı olarak yetişen formları bazen *Olea oleaster* türü olarak adlandırılmaktadır (Besnard ve ark., 2009). Zeytin bitkisinin genel taksonomik sınıflandırması Tablo 1.1'de gösterilmektedir.

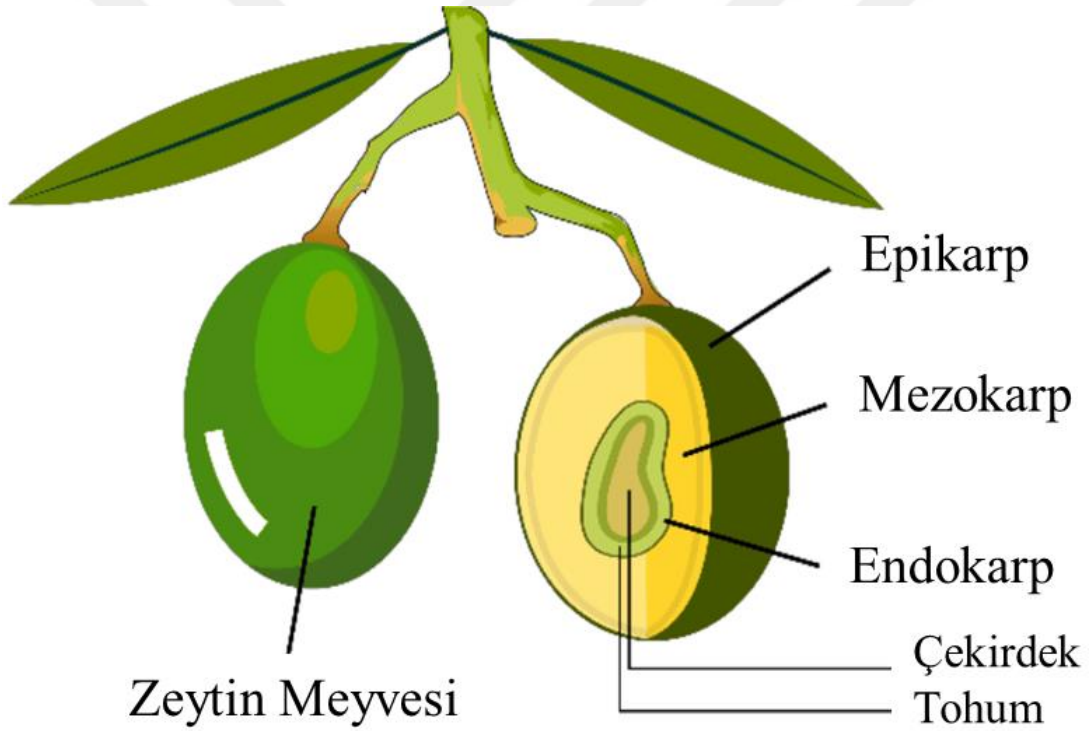
Tablo 1.1 Zeytin bitkisinin taksonomik sınıflandırması.

Alem	Plantae
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Lamiales
Familiya	Oleaceae
Cins	<i>Olea</i>
Tür	<i>Olea europaea</i> L.

1.1.1.3 Zeytin Bitkisinin Genel Morfolojik Özellikleri

Zeytin bitkisi Akdeniz bitki örtüsünün karakteristik bir bitkisi olarak her dem yeşil yapraklı, yaprak dökmeyen, sık dallı, yayvan tepeli, bodur (8-15 m) ağaç veya çalıdır. Geniş ve kıvrımlı bir gövdeye sahiptir (Rugini ve ark., 2016). Yaklaşık 2000 yıl kadar yaşayabilmektedir. Sürgünleri gri renkli, dikensiz ve üç köşelidir. Yaprak uzunlukları cinsine göre 20–86 mm ve eni 5–30 mm arasındadır. Yaprakları basit, tam kenarlı ve kenarlar alt yüze doğru hafif kıvrıktır. Yaprakların ucunda sivri bir çıkıntı bulunur. Yaprığın üst yüzü koyu gri-yeşil ve tüysüz, alt yüzü mavimsi gümüşü renkte ve beyaz sık ipeksi tüylerle kaplıdır. Meyvesi küçük, 1– 2,5 cm uzunluğunda, ince etli ve yabancı olanları daha küçüktür. Rüzgarların taşıdığı çiçek tozlarıyla döllenmiş çiçekler etli ve yağlı meyvelere dönüşür (Featherstone, 2015). Zeytin meyvesi, epikarp kısım (kabuk), mezokarp kısım (etli kısım) ve endokarp kısım (çekirdek) olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır (Şekil 1.2). Epikarp kısım sert çekirdekli meyve ağırlığının yaklaşık %1-

3'ünü oluşturan koruyucu bir dokudur. Dış yüzeyi, ağırlığının % 45 ile % 70'ini temsil eden bir balmumu tabakasıyla kaplıdır. Balmumu tabakasının ilgili işlevleri arasında hücrelere verilen mekanik hasarın en aza indirilmesinin yanı sıra mantar ve böcek saldırılarının engellenmesi de yer alır. Epikarp ayrıca zeytindeki ana pigmentler olan klorofil, karotenoid ve antosiyaninlerin dengesiz ve değişen konsantrasyonlarını içermesinden dolayı renk değişiminden sorumlu kısımdır. Mezokarp kısmı kabuğuyla birlikte zeytinin yenilebilir kısmını temsil etmekte ve tüm meyvenin %70-80'ini oluşturmaktadır. Zeytin meyvesinin çekirdeğine endokarp adı verilmekte ve bu kısmı zeytin ağırlığının %18-22'sini temsil etmektedir. Bu çekirdek lifli ligninden oluşmakta ve yapısı serttir. Çekirdek içerisinde bulunan tohum, meyve ağırlığının %3'ünü ve toplam meyve yağının %2-4'ünü kapsamaktadır (Bianchi, 2003; Niaounakis ve Halvadakis 2006).



Şekil 1.2 Zeytin meyvesinin kesit şeması (Valvez ve ark., 2021).

1.1.1.4 Zeytin Bitkisinin Kimyasal Bileşenleri ve Besin Değeri Açısından Önemi

Zeytin bitkisi içeriğinde flavonoidler, fenolik bileşikler, sekoiridoidler, sekoiridoid glikozitleri, triterpenler, biyofenoller, benzoik asit türevleri ve şekerler olmak üzere çok çeşitli biyokimyasallar barındırmaktadır (Gariboldi ve ark., 1986; Le Tutour ve Guedon, 1992; Ryan ve ark., 2002).

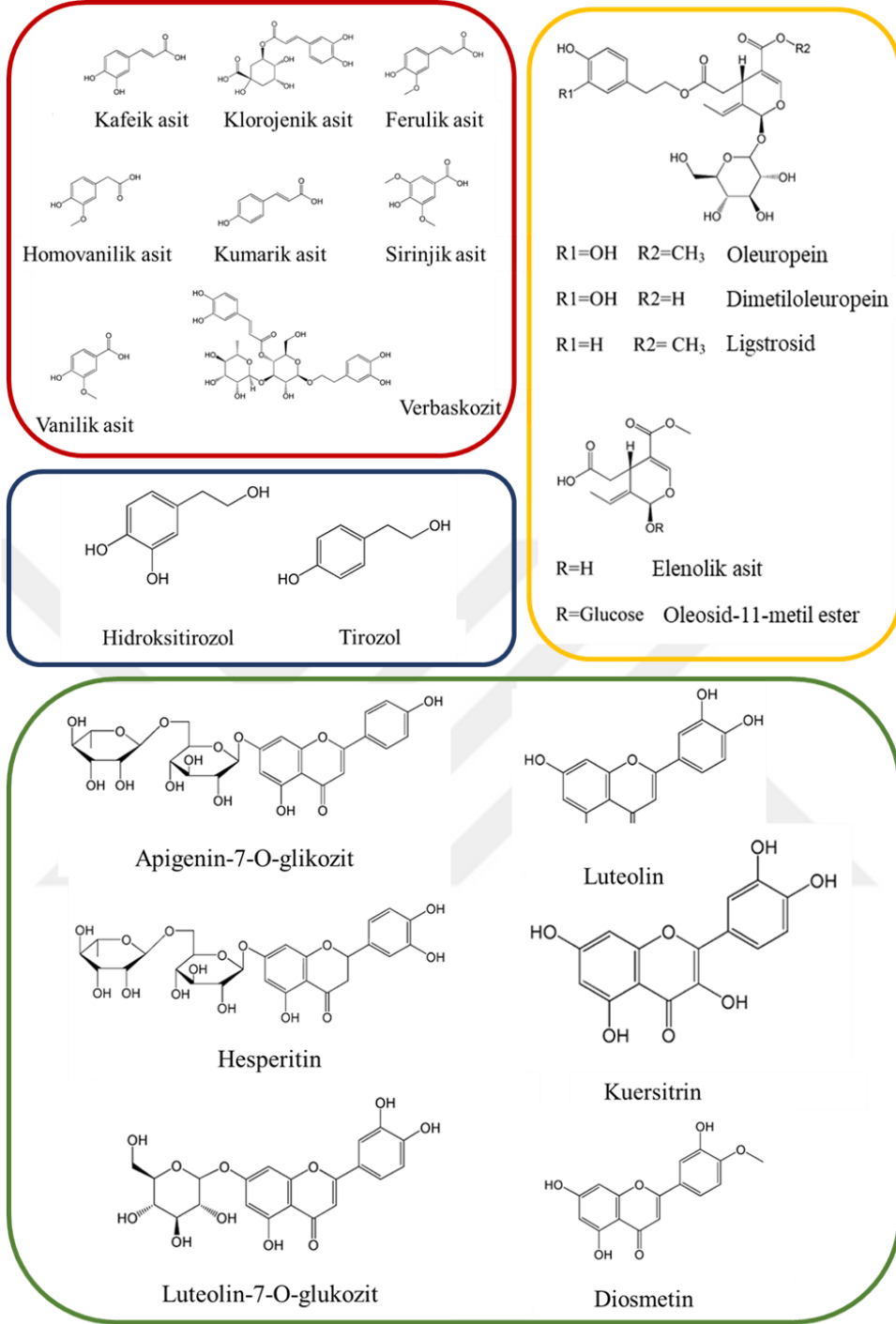
Zeytin yaprakları yüksek oranda ekstraktif madde (%36,52) içeren lignoselülozik materyallerin yanı sıra selüloz (%5,7), hemiselüloz (%3,8), lignin (%39,6), değişen değerlerde ham protein (%8,10 ile %9,34) ve az miktarda mannitol içermektedir (Romero-García ve ark., 2014; Contreras ve ark., 2019). Zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşikler moleküler yapısına göre; basit fenoller (tirozol, hidroksitirozol), lignanlar (pinoresinol, asetoksipinoresinol, siringaresinol), sekoiridoidler (oleuropein, ligstrosid, dimetiloleuropein ve oleosid, seloganosid, oleasin, elenolik asit), flavonoidler (flavonlar: luteolin-7-O-glukozit, apigenin-7-O-glikozit, diosmetin-7-O-glikozit, kuersitrin, luteolin, hesperitin ve diosmetin), flavonoidler (rutin, kaempferol, kuersetin, flavan-3 -oller: kateşin), sinamik asit türevleri (verbaskozit, izoverbaskozit) ve fenolik asitler (kafeik asit, sinamik asit, sirinjik asit, klorojenik asit, ellagik asit, vanilik asit, homovanilik asit, kumarik asit, ferulik asit) olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.3). Zeytin bitkisinde en çok bulunan fenol oleuropeindir ve bunu ana bozunma ürünü olan hidroksitirozol, luteolin, apigenin flavon-7-O- glikozitleri ve verbaskosid takip etmektedir (Abaza ve ark., 2015; Dini ve ark., 2020; Özcan ve Matthäus, 2017).

Fenolik asitler

Basit Fenoller

Sekoiridoidler

Flavanoidler



Şekil 1.3 *O. europaea* L.'de bulunan bazı, fenolik asit, basit fenol, flavanoid ve sekoiridoidler.

Zeytin bitkisinin meyve kısımlarından biri olan epikarp, ana pigmentler olan klorofil, karotenoid ve antosiyaninlerin dengesiz ve değişken konsantrasyonlarını içermektedir. Mezokarp kısım su (mezokarp ağırlığının %70-75'i) ve yağ (yeşil sofralık zeytinlerde

%14-15; siyah, olgun zeytinlerde yaklaşık %30'a kadar değişen) dahil olmak üzere tüm bileşenlerin depo kaynağıdır. Oksalik, süksinik, malik ve sitrik asitler değişen yüksek miktarlardaki serbest yağ asitleriyle birlikte zeytinlerde bulunan serbest organik asit fraksiyonunu temsil etmektedir. Şeker olarak sakkaroz ve mannitole (etli kısmın %3,5-6'sı) kıyasla glikoz ve fruktoz daha fazla bulunmaktadır. Protein içeriği meyve ağırlığının %1,5-2,2'si arasında değişmektedir. Hücreler arası lamellerin ana bileşenleri olan polisakkaritler ve pektik maddeler bağlayıcı bir işleve sahip olarak zeytin meyvesinin dokusunu belirlemektedir. Zeytin ağırlığının %1-3'ünü oluşturan serbest fenoller ve bunların glikozitleri, karmaşık bir yapı olan fenolik bileşikler oluştururlar. Endokarp kısmında bulunan çekirdek önemli miktarda yağ içerirken (%22-27), odunsu kabuk kısmı en fazla %1 oranında yağ içermektedir (Bianchi, 2003; Niaounakis ve Halvadakis 2006).

Zeytin meyvesi ve zeytinden elde edilen zeytinyağı özellikle insan sağlığı üzerine yararlı etkilerinden dolayı yüzyıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (Turktas ve ark., 2013). Zeytin meyvesi ham ve olgun halde salamura yapılarak yenmekte, ezilerek yağ çıkarılmakta, geriye kalan kısmı "prina" olarak adlandırılan küspe, gübre ve hayvan yemi şeklinde değerlendirilmektedir. Kozmetik alanında da tercih edilen zeytin, teknik amaçla lambaların yakıtı, makinaların yağı, sabunun hammaddesi olarak da kullanılmaktadır (Öksüz ve ark., 1998; Besnard ve ark., 2002). Zeytinin işlenmesi ile üretilen zeytinyağı, içerisinde bulunan dengeli yağ asidi bileşimi ve kendine özgü aromasını veren uçucu bileşiklerin oluşturduğu karakteristik yapısı ile diğer yağlardan ayrılarak hem geleneksel hem de modern tıpta önemli bir yere sahiptir (Sakouhi ve ark., 2008). Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, zeytin meyvesinin ve zeytinyağının tüketiminin sağlığa olan faydalarını ortaya çıkarmaktadır (Nan ve ark., 2014). Zeytinyağından laksatif ve inflamasyonu engelleme özelliğinden dolayı içilerek veya açık yaralara sürülerek uzun sürelerdir faydalanılmaktadır (Hashmi ve ark., 2015). Geleneksel yöntemlere ilaveten zeytinyağının antidiyabetik (Abdel-Kader ve ark., 2019), antikanser (Torić ve ark., 2019), antimikrobiyal (Caballero-Guerrero ve ark., 2022), anti hipertansif (Romero ve ark., 2016), antikolesterolemik (Indrastata ve ark., 2023) antioksidan ve antiinflamatuvar (Bucciantini ve ark., 2021) etkileri olduğuna yönelik birçok çalışma mevcuttur. Ayrıca zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktların biyoaktiviteleri ile ilgili olarak yapılan çeşitli çalışmalar, zeytin yaprağı ekstraktının antioksidan aktivite (Castillo ve ark., 2010; Čabarkapa ve ark., 2014), radyoaktivite koruyuculuk (Castillo ve ark.,

2010), apoptozu indükleyerek lösemi hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki (Salah ve ark., 2012; Abaza ve ark., 2007; Fares ve ark., 2011; Samet ve ark., 2014), insan meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik aktivite (Taamalli ve ark., 2012; Fu ve ark., 2010), anti-HIV virüsü etkisi (Lee-Huang ve ark., 2003), antifungal aktivite (Korukluoglu ve ark., 2006), mide koruyucu aktivite (Dekanski ve ark., 2009), diyabetik nöropatik ağrının hafifletilmesi (Kaeidi ve ark., 2011) ve gentamisin nefrotoksitesinin iyileştirilmesi (Tavafi ve ark., 2012) dahil olmak üzere geniş bir in vitro ve in vivo özellikler yelpazesi sergilediğini göstermiştir. Zeytin yapraklarının antioksidan, anti-aterosklerotik, hipoglisemik ve kardiyoprotektif etkileri gibi çeşitli biyolojik özellikleri de ayrıca yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (El ve Karakaya, 2009; Tsimidou ve Papoti, 2010; (Özcan ve Matthäus, 2017).

1.1.1.5 Zeytin Bitkisinin İklim ve Toprak İstekleri

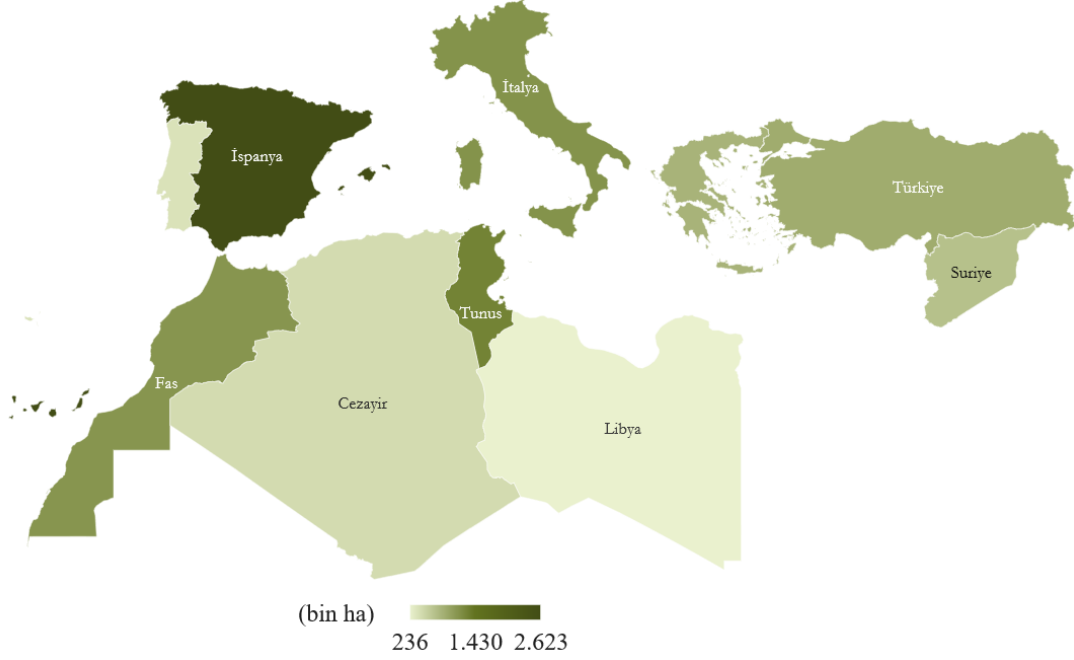
Zeytin bitkisinin anavatanı Güney Doğu Anadolu Bölgesini de içine alan Yukarı Mezopotamya bölgesi ve Güney Ön Asya'dır. Akdeniz bölgesi ana ekim alanı olmaya devam etse de günümüzde bu alan Güney Afrika, Güney ve Kuzey Amerika, Avustralya, Japonya ve Çin'e kadar uzanmaktadır. Akdeniz iklimi tipik olarak kış aylarında ılıman ve yağışlı, yaz aylarında ise UV radyasyonu içeren yüksek günlük ışınımalarla birlikte sıcak ve kuraktır (Giorgi ve Lionello, 2008). Sıcaklık zeytin yetiştirme alanlarını, su varlığı ise zeytin verimini sınırlayan en önemli faktördür. Genellikle zeytin bitkisinin vejetatif gelişimi için uygun sıcaklık 10°C ile 30°C arasında değişirken, karbonhidrat sentezi için uygun ortalama sıcaklık 20°C ile 30°C arasında değişmektedir. Zeytin bitki gelişimi için minimum yıllık ortalama sıcaklık 4°C iken maksimum 40°C'dir. Minimum sıcaklığın -7°C'nin altına düşmesi ağaçlara ciddi zarar verebilmektedir ve sıcaklığın -12°C'ye ulaşması öldürücü olabilmektedir. Zeytin bitkisi çiçeklenme döneminde tomurcuk farklılaşması için düşük sıcaklıklara (0-7 °C) ihtiyaç duymaktadır ve 16°C'nin üzerindeki sıcaklıklar tomurcuk farklılaşmasını engellemektedir (Therios, 2009; Tombesi ve Tombesi, 2007). Yüksek rakıma (>800 m) sahip bölgelerde don olaylarının görülmesi ve buna bağlı olarak vejetatif dönemin kısa olması bu bölgelerde zeytin yetiştiriciliğini sınırlamaktadır. Fakir, kuru, kireçli ve çakıllı topraklarda bile iyi büyüebilmesine rağmen, zeytin ağacının yıllık meyve vermesi için en iyi koşullar derin, nitrojen, fosfor, potasyum ve su ile yeterince beslenen kumlu topraklardır (Therios, 2009). Optimum

toprak pH değerleri ise 5,5 ile 8,5 arasında değişmektedir (Fernández ve Moreno, 2000). Her ne kadar bazı durumlarda zeytin ağaçları ortalama 200 mm/yıl yağışla yetişebilse de, ortalama yağışın 400 mm/yıl üzerinde olması sağlıklı gelişimi için önemlidir. Yağış koşullarına göre zeytin bitkisinin yeterli gelişimi için 600 mm/yıl, orta düzeyde gelişimi için 800 mm/yıl ve iyi gelişimi için 1000 mm/yıl olması gerekmektedir (Tombesi ve Tombesi, 2007). Yağmurla beslenen koşullar altında ticari zeytin veriminin alt sınırı 500 mm/yıl'dır (Ponti ve ark., 2013).

1.1.1.6 Zeytin Bitkisinin Ekonomik Önemi

Zeytin (*Olea europaea* L.), hem yağlık hem de sofralık olarak değerlendirilebilen, bunun yanı sıra çeşitli yan ürünleriyle de ekonomik katma değer sağlayan önemli bir tarımsal kültür bitkisidir. Zeytin yetiştiriciliği, bu bitkinin özgül iklim gereksinimleri nedeniyle, ağırlıklı olarak Akdeniz iklim kuşağında yer alan ülkelerde yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda İspanya, Tunus, İtalya, Fas, Türkiye, Yunanistan, Suriye, Cezayir, Portekiz ve Libya gibi ülkeler dünya zeytin üretiminde ön plana çıkmakta olup, mevcut zeytinlik alanların yaklaşık %93'ü bu ülkelerde bulunmaktadır. Dünya genelindeki zeytinlik alanlar incelendiğinde, İspanya %25,4'lük pay ile en fazla zeytinlik alana sahip ülke konumundadır. Onu sırasıyla Tunus (%12,4), İtalya (%10,9) ve Fas (%10,7) izlemektedir. Türkiye ise %8,6'lık zeytinlik alan payı ile dünya genelinde beşinci sırada yer almaktadır (Şekil 1.4).

2021 Dünya Zeytinlik Alanları

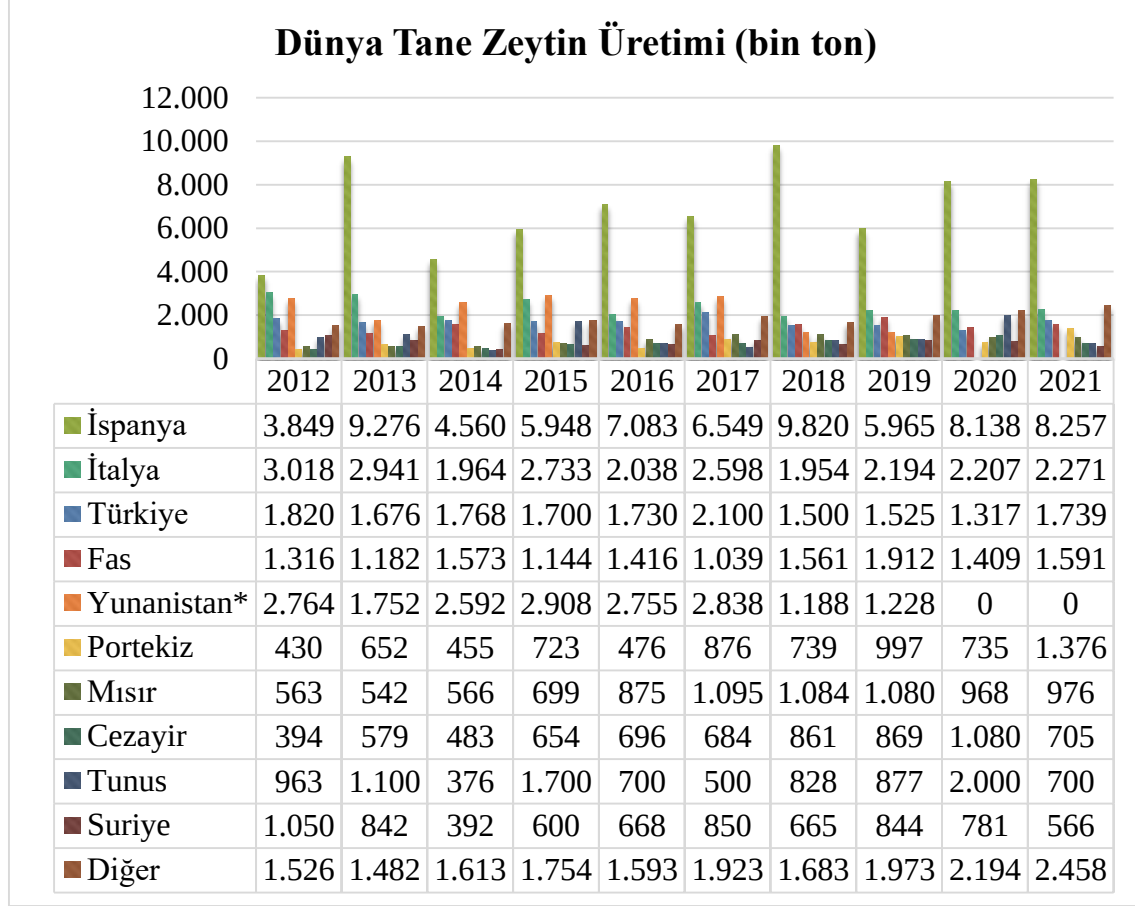


Şekil 1.4 2021 verilerine göre hazırlanan Dünya zeytinlik alanlarını temsil eden harita.

Zeytin bitkisi, kendine özgü iklim gereksinimleri nedeniyle ağırlıklı olarak Akdeniz kökenli bir tür olarak tanımlansa da, tüketimi dünya genelinde oldukça yaygındır (Özdemir Özgentürk ve ark., 2010; Türктаş ve ark., 2013; Ramos-Gómez ve ark., 2016). Günümüzde hem ülkemizde hem de uluslararası düzeyde önemli bir ticari ürün olan zeytin, yalnızca Akdeniz iklimine sahip bölgelerde yetiştirilebilmesi nedeniyle, dünya ticaretinde sınırlı sayıda ülkenin üretim ve ihracat üzerinde söz sahibi olmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, zeytin ve zeytinyağına olan talebin son yıllarda artış göstermesi, bu ürünlerin küresel ticaretteki stratejik önemini her geçen gün artırmaktadır.

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, 2024) verilerine göre, dünya genelinde tane zeytin üretimi; periyodisite, hastalıklar ve çevresel koşullar gibi etmenler nedeniyle bazı yıllarda dalgalanma gösterse de, uzun vadede üretim eğiliminin artış yönünde olduğu gözlemlenmektedir. 2021 yılı itibarıyla dünya genelinde 10,3 milyon hektarlık alanda yaklaşık 23 milyon ton tane zeytin üretilmiştir. Uluslararası Zeytin Konseyi (International Olive Council; IOC) 2021 verilerine göre, tane zeytin üretiminde en yüksek paya sahip ilk beş ülke sırasıyla İspanya, İtalya, Türkiye, Fas ve Yunanistan'tır. Aynı yıl içinde

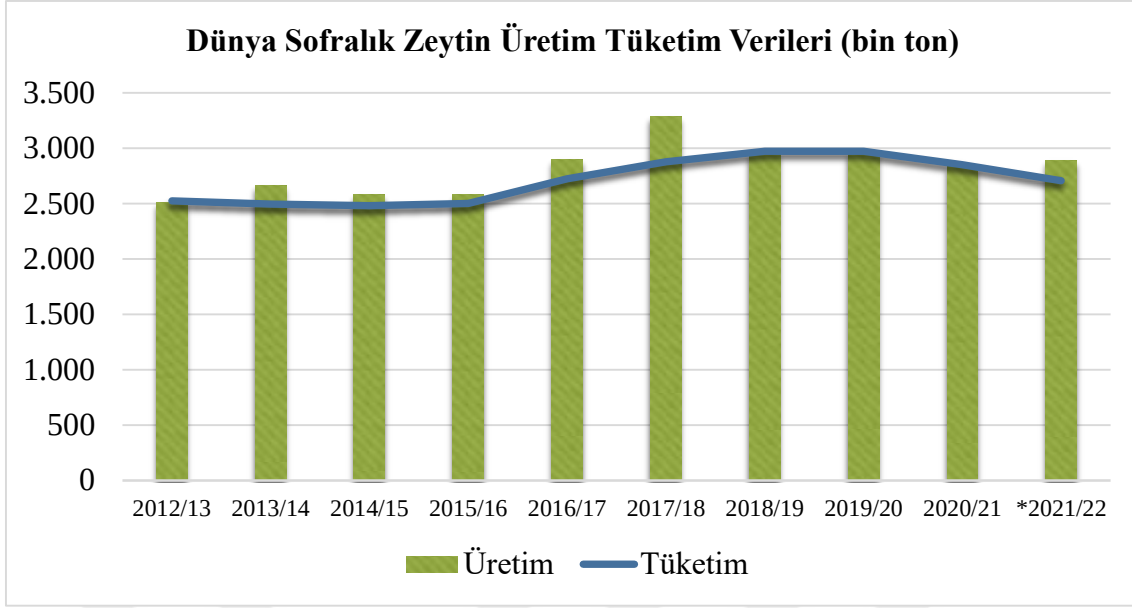
İspanya, 8,3 milyon tonluk üretim miktarı ile dünya lideri konumundayken, Türkiye 1,7 milyon tonluk tane zeytin üretimi ile İtalya'nın ardından üçüncü sırada yer almıştır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Dünya tane zeytin üretimi (IOC, 2023).

(*) son iki yıllık verisi bulunmamaktadır.

Dünya genelinde sofralık zeytin üretimi, son on üretim sezonunda bazı yıllarda dalgalanmalar göstermiş olsa da genel olarak artış eğilimindedir. 2020/21 üretim sezonunda küresel sofralık zeytin üretimi yaklaşık 2,9 milyon ton olarak gerçekleşmiş, 2021/22 sezonunda ise benzer üretim seviyelerine ulaşıldığı tahmin edilmektedir (Şekil 1.6).

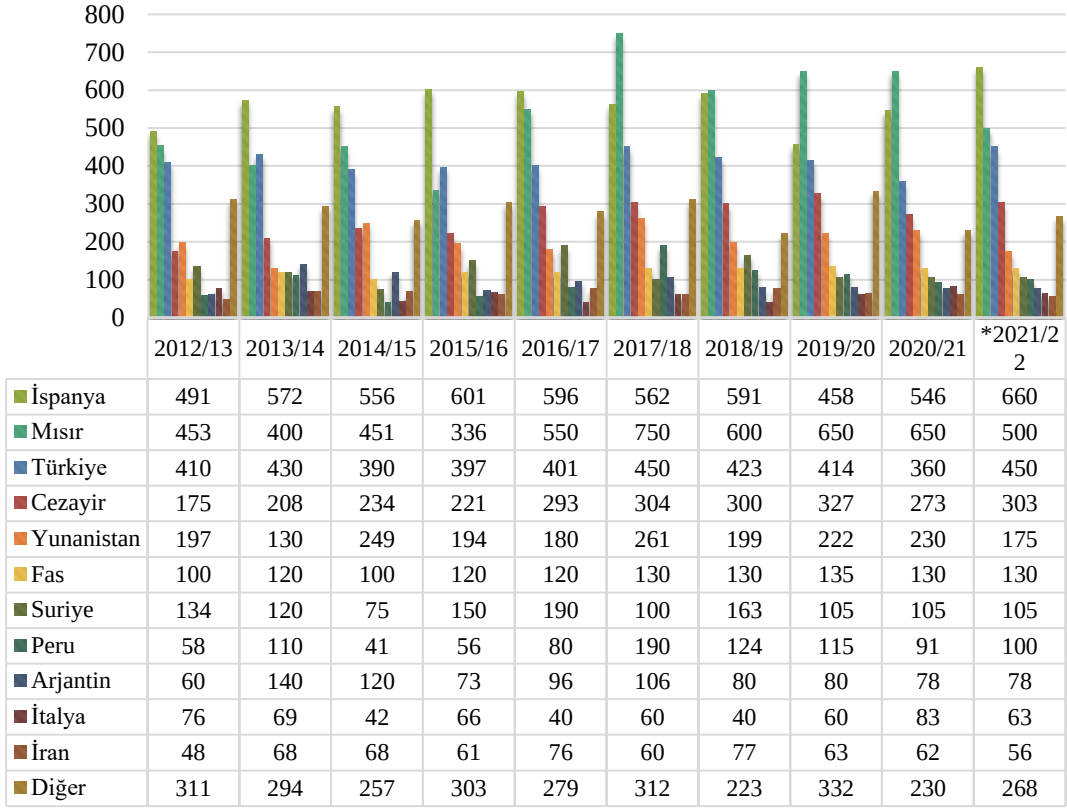


Şekil 1.6 Dünya sofralık zeytin tüketim verileri (IOC, 2023).

(*) Tahmini veriler.

Dünya sofralık zeytin üretiminde, 2020/21 üretim sezonu itibarıyla Mısır %22,9'luk pay ile ilk sırada yer alırken, Türkiye %12,7'lik üretim oranı ile yıllık 546 bin ton üretim gerçekleştiren İspanya'nın ardından üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1.7). 2021/22 üretim sezonu için en yüksek üretimi gerçekleştirmesi öngörülen üç ülke ise sırasıyla İspanya (%22,9), Mısır (%17,3) ve Türkiye (%15,6) olarak tahmin edilmektedir.

Dünya Sofralık Zeytin Üretimi (bin ton)



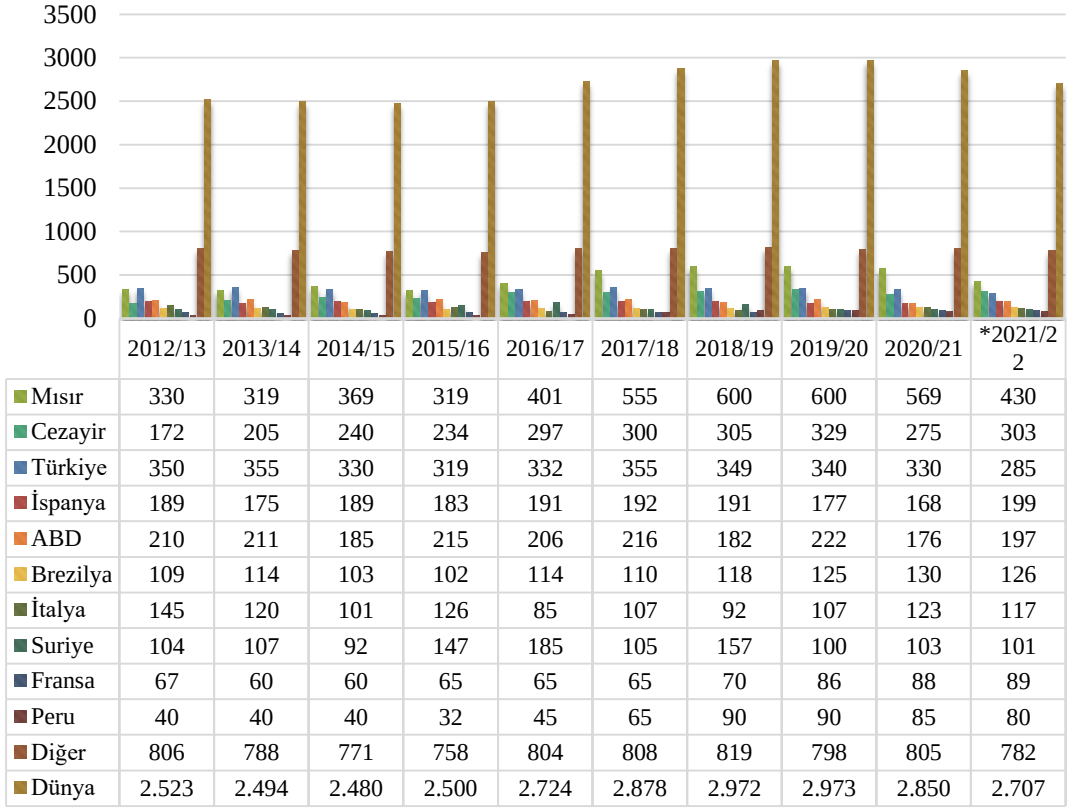
Şekil 1.7 Dünya sofralık zeytin üretimi (IOC, 2023).

(*) Tahmini veriler.

Dünya genelinde sofralık zeytin tüketimi son altı yılda düzenli bir artış göstermektedir. Ancak Uluslararası Zeytin Konseyi (IOC) verilerine göre, 2020/21 üretim sezonunda tüketim, bir önceki sezona göre %4 oranında azalarak yaklaşık 2,8 milyon ton seviyesine gerilemiştir.

Dünya sofralık zeytin tüketiminde, 2020/21 üretim sezonu itibarıyla Mısır %20'lik payla ilk sırada yer alırken, Türkiye %11,6'lık tüketim oranı ile ikinci sırada bulunmaktadır. Sofralık zeytin tüketiminde ilk beşte yer alan diğer ülkeler ise sırasıyla Cezayir (275 bin ton), Amerika Birleşik Devletleri (176 bin ton) ve İspanya (168 bin ton) olmuştur (Şekil 1.8).

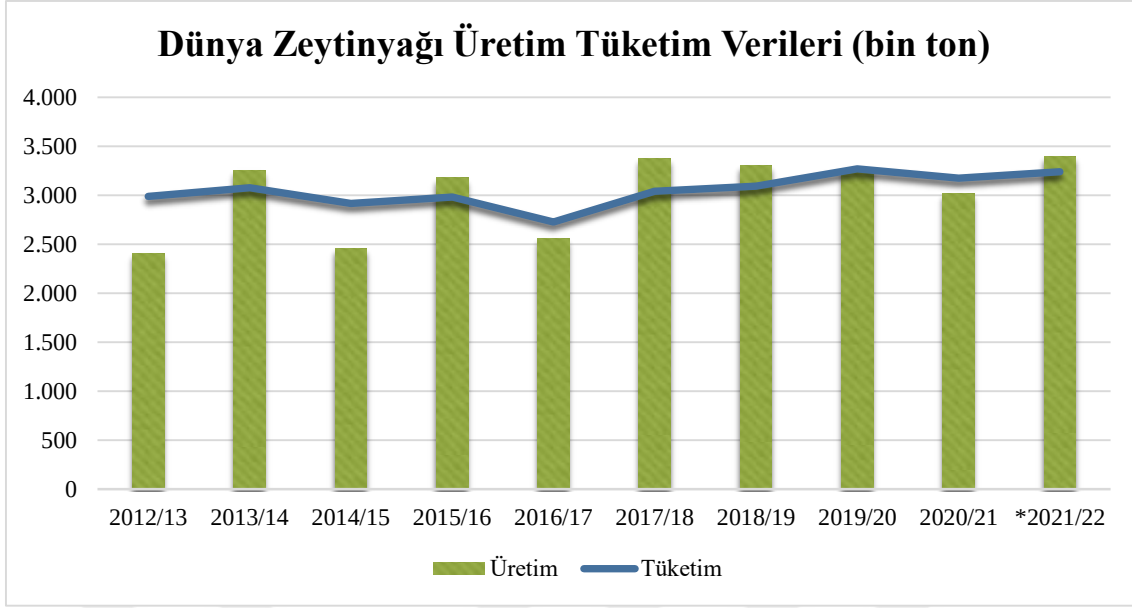
Dünya Sofralık Zeytin Tüketimi (bin ton)



Şekil 1.8 Dünya sofralık zeytin tüketimi (IOC, 2023).

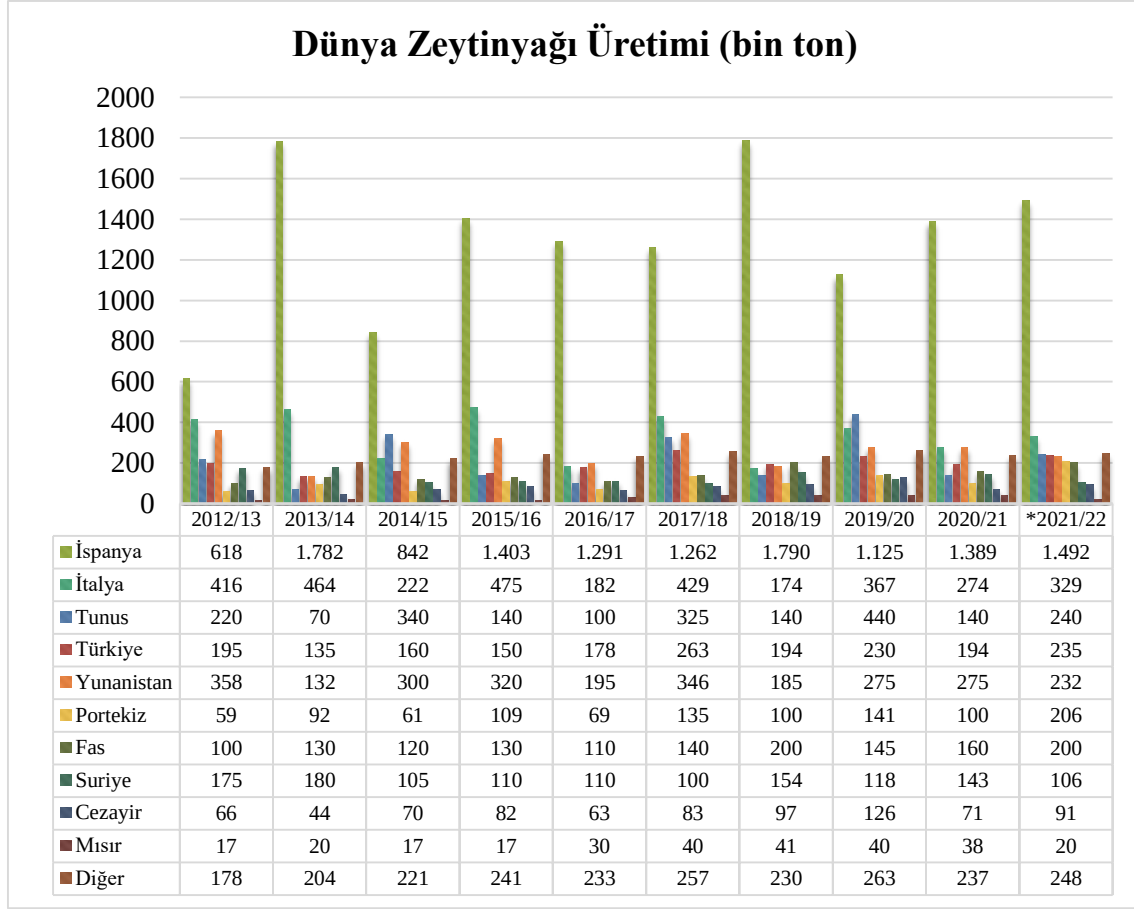
(*) Tahmini veriler.

Dünya zeytinyağı ihracatının yaklaşık %92,1'i, sınırlı sayıdaki on büyük üretici ülke tarafından gerçekleştirilmektedir. Zeytinyağı, birçok uzman tarafından insan sağlığı açısından en faydalı yağ çeşitlerinden biri olarak kabul edilmekte ve bu durum, ürünün küresel pazar değerini artırmaktadır. Özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sağlıklı beslenme bilincinin artmasıyla birlikte, doğal ve işlenmemiş gıdalara olan talep yükselmiş; bu eğilim zeytinyağının dünya ticaretindeki payının istikrarlı bir şekilde artmasına katkı sağlamıştır. FAO (2024) verilerine göre, bu eğilime paralel olarak son on yıllık dönemde küresel zeytinyağı ticareti yaklaşık %30 oranında artış göstermiştir. Ayrıca, Uzakdoğu ülkeleri ile Amerika kıtası ülkelerinde ithalat seviyelerinde dikkat çekici artışlar yaşandığı tespit edilmiştir. Zeytinyağı üretimi ise 2012/13 üretim sezonundan bu yana yıllık bazda dalgalanmalar gösterse de, genel anlamda büyük bir değişim yaşanmamıştır. 2020/21 üretim sezonunda ise dünya genelinde toplam zeytinyağı üretimi yaklaşık 3 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9 Dünya zeytinyağı üretim tüketim verileri (IOC, 2023).
(*) Tahmini veriler.

Uluslararası Zeytin Konseyi (IOC) verilerine göre, dünya zeytinyağı üretimi 2020/21 üretim sezonunda yaklaşık 3 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Bu üretimin %45,9'unu 1,4 milyon tonluk üretimiyle İspanya karşılamış ve açık ara lider konumda yer almıştır. Diğer önemli üretici ülkeler arasında bulunan Yunanistan, İtalya, Türkiye ve Tunus'un toplam üretim içerisindeki payları ise sırasıyla %9,1, %9,07, %6,4 ve %4,6 olarak kaydedilmiştir (Şekil 1.10).



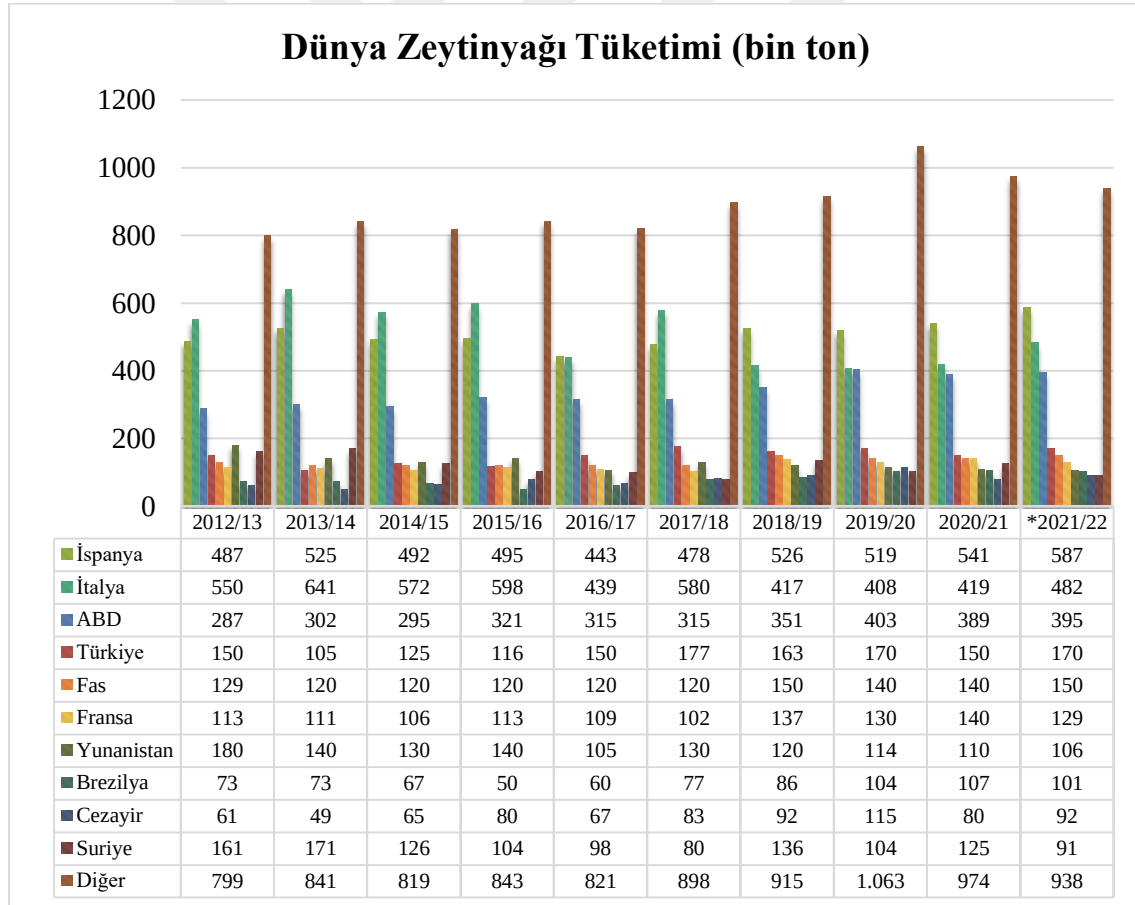
Şekil 1.10 Dünya zeytinyağı üretimi (IOC, 2023).

(*) Tahmini veriler.

Dünya genelinde zeytinyağı tüketimi oldukça geniş bir coğrafyaya yayılmış durumdadır. 2020/21 üretim sezonunda gerçekleşen yaklaşık 3 milyon tonluk küresel tüketimin %17'si İspanya, %13,2'si İtalya, %12,3'ü Amerika Birleşik Devletleri ve %4,7'si Türkiye tarafından gerçekleştirilmiştir. 2021/22 sezonu itibarıyla dünya zeytinyağı tüketiminde İspanya %18,1'lik pay ile ilk sırada yer alırken, diğer önde gelen tüketici ülkeler olan İtalya, ABD, Türkiye ve Fas'ın toplam tüketim içindeki payları sırasıyla %14,9, %12,2, %5,2 ve %4,6 olarak kaydedilmiştir (Şekil 1.11). Uluslararası Zeytin Konseyi (IOC) raporlarına göre, 2021/22 sezonunda dünya genelinde zeytinyağı tüketiminin bir önceki sezona kıyasla %2,1 oranında artarak yaklaşık 3,24 milyon ton seviyesine ulaştığı tahmin edilmektedir. Zeytinyağı üreticisi ülkeler aynı zamanda önemli tüketici ülkeler olarak da öne çıkmaktadır. Özellikle İspanya ve İtalya gibi ülkelerin ihracatlarında Avrupa Birliği (AB) içindeki pazarlara yönelmesi, bu bölgelerdeki tüketimin artmasına katkı sağlamıştır. Nitekim AB ülkelerinde kişi başına zeytinyağı

tüketimi, diğer ülkelere kıyasla daha yüksek seviyelerde seyretmektedir. Öte yandan, zeytinyağının sağlıklı bir yağ türü olarak kabul edilmesi, tüketici bilincinin arttığı pazarlarda da talep artışına neden olmuştur. Bu eğilim özellikle Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, Japonya, Avustralya ve Çin gibi ülkelerde zeytinyağına olan ilgiyi artırmış; küresel tüketim haritasının çeşitlenmesine yol açmıştır.

Uluslararası Zeytin Konseyi (IOC) verilerine göre, 2020/21 sezonunda kişi başına zeytinyağı tüketimi başta İspanya (11,4 kg), Yunanistan (10,3 kg), İtalya (7,1 kg) ve Portekiz (5,8 kg) olmak üzere önde gelen üretici ülkelerde 5 kg'ın üzerinde gerçekleşmiştir. IOC üyesi diğer ülkelerde ise kişi başı tüketim Cezayir'de 5,2 kg, Fas'ta 3,7 kg, Tunus'ta 2,5 kg ve Türkiye'de 1,8 kg olarak kaydedilmiştir. Bu veriler, Türkiye'nin kişi başına zeytinyağı tüketimi açısından dünya ortalamasının altında kaldığını göstermektedir.



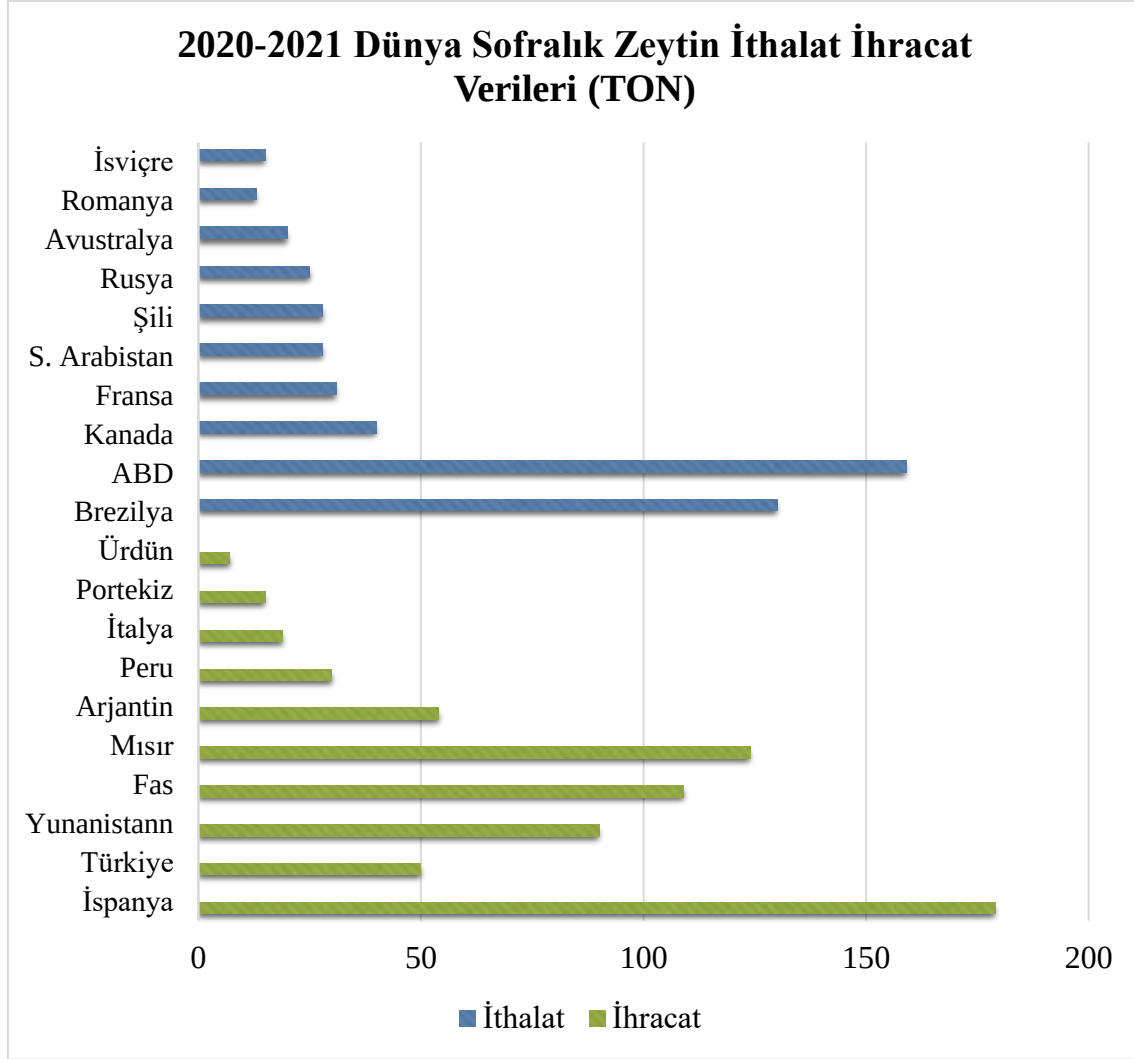
Şekil 1.11 Dünya zeytinyağı tüketimi (IOC, 2023) .

(*) Tahmini veriler.

Türkiye, coğrafi konumu ve Akdeniz iklim özellikleri sayesinde İtalya, İspanya, Yunanistan ve Tunus gibi ülkelerle birlikte dünyanın önde gelen zeytin ve zeytinyağı üreticileri arasında yer almaktadır. Zeytin tarımı, Türkiye’de istihdam, katma değer yaratma ve dış ticaret açısından önemli bir yer tutmakta; tarım ekonomisinde stratejik bir ürün konumundadır (Öztürk ve ark., 2009).

2021/22 pazarlama yılında dünya sofralık zeytin ihracatı toplamda 719 bin ton olarak gerçekleşmiş, bu miktar son on yılda %7,2 ve bir önceki yıla göre %1,6 oranında artış göstermiştir. Bu dönemde sofralık zeytin ihracatında öne çıkan ülkeler arasında İspanya, Türkiye, Yunanistan, Fas ve Mısır bulunmaktadır. İspanya, 203 bin tonluk ihracat ile dünya sofralık zeytin ihracatının %28,2’sini tek başına gerçekleştirmiştir. Türkiye ise 110 bin ton ihracatla %15,3 pay almış; Yunanistan ve Fas ise her biri 95 bin tonluk ihracatlarıyla %13,2’lik paya sahip olmuştur (Şekil 1.12).

Öte yandan, dünya sofralık zeytin ithalatı son on yılda %6,97 oranında artış göstermiş olmasına rağmen, 2021/22 sezonunda bir önceki yıla kıyasla %2,81’lik bir düşüş kaydedilmiştir. Aynı yıl itibarıyla küresel sofralık zeytin ithalatı toplam 691 bin ton olarak gerçekleşmiştir. En fazla ithalat yapan ülkeler sırasıyla Amerika Birleşik Devletleri (%22,8), Brezilya (%18,2), Kanada (%5,1) ve Fransa (%4,5) olarak sıralanmaktadır. Bu veriler, sofralık zeytin üreticisi olmayan ülkelerin zaman içerisinde bu ürüne yönelik talebinin istikrarlı bir şekilde arttığını göstermektedir (Şekil 1.12).



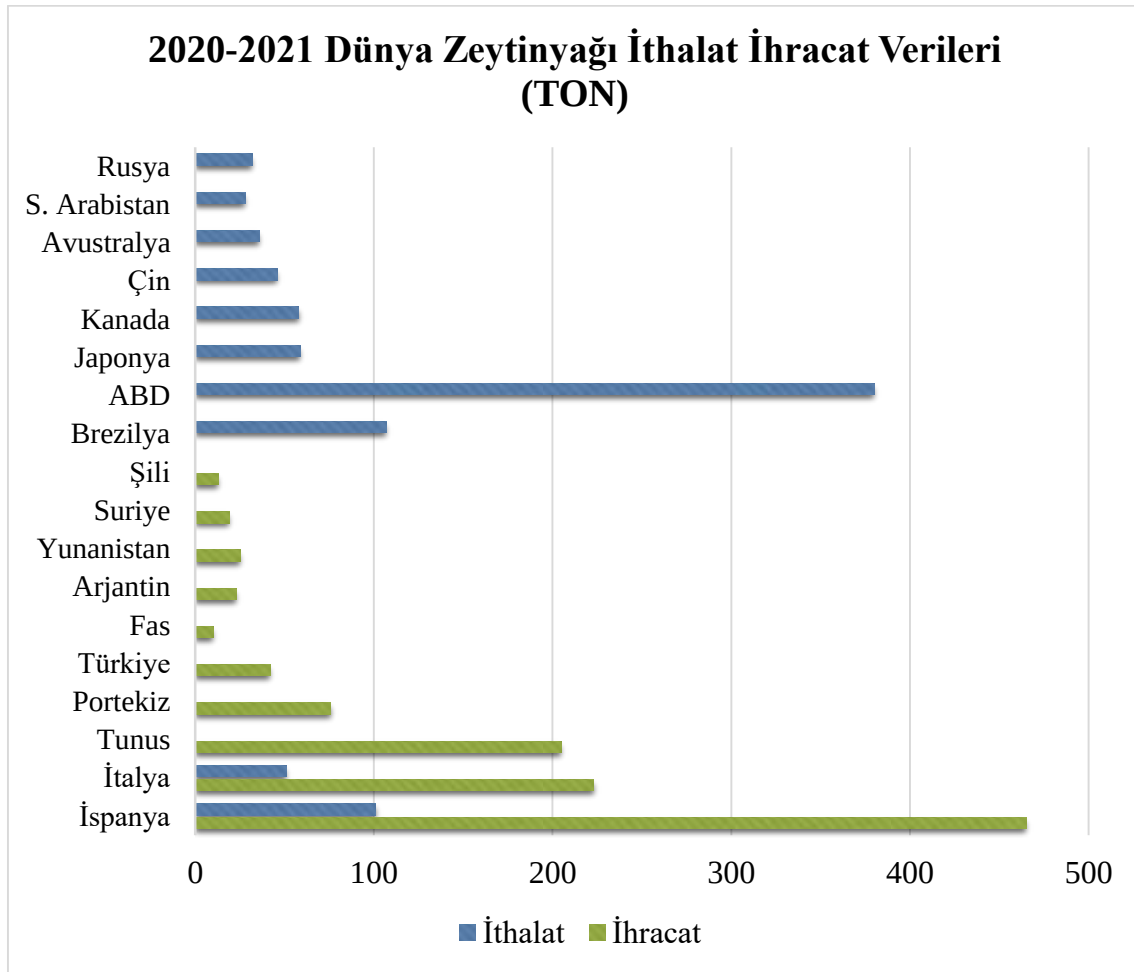
Şekil 1.12 2020-2021 Dünya sofralık zeytin ithalat ihracat verileri (ton).

2021/22 pazarlama yılı itibarıyla dünya genelinde zeytinyağı ihracatı yaklaşık 1,2 milyon ton olarak gerçekleşmiş olup, bu miktar son on yılda %42,3 oranında bir artışa işaret etmektedir. Ayrıca, bir önceki yıla göre %4,7 oranında bir artış kaydedilmiştir. Küresel zeytinyağı ihracatında öne çıkan başlıca ülkeler sırasıyla İspanya, İtalya, Tunus, Portekiz ve Türkiye'dir. İspanya, 468 bin tonluk ihracat hacmiyle dünya toplam zeytinyağı ihracatının yaklaşık %39'unu tek başına karşılamaktadır. İtalya, 234 bin ton (%19,5) ile ikinci, Tunus ise 205 bin ton (%17,1) ile üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1.13).

Aynı dönem itibarıyla dünya zeytinyağı ithalatı son on yılda %33,6 oranında artış göstermiştir. Ancak 2021/22 sezonunda, bir önceki yıla göre %0,6'lık hafif bir düşüş yaşanarak toplamda 1,14 milyon tonluk ithalat gerçekleşmiştir. Küresel zeytinyağı tüketiminde yaşanan artışla birlikte, özellikle Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya,

Kanada ve Japonya gibi ülkelerin ithalat hacimlerinde dikkate değer artışlar görülmüştür. Ayrıca, İsviçre, Fransa ve Fas gibi ülkelerin de ithalat eğilimleri yukarı yönlü bir seyir izlemektedir (Şekil 1.13).

Son on yıllık dönemde ithalat lideri konumunda bulunan ABD, ithalat miktarını %38,5 oranında artırarak 2021/22 sezonunda dünya genelindeki toplam zeytinyağı ithalatının %35'ini tek başına gerçekleştirmiştir. Bu dönemde zeytinyağı üreticisi ülkelere İspanya ve İtalya da kendi iç tüketimlerini desteklemek amacıyla sırasıyla %7,5 ve %4,5 oranlarında ithalat yapmıştır (Şekil 1.13).



Şekil 1.13 2020-2021 Dünya zeytinyağı ithalat ihracat verileri (ton).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, 2022 yılı itibarıyla Türkiye’de toplam 9 bin dekar zeytinlik alan mevcuttur. Bu alanların %74’ü yağlık, %26’sı ise sofralık zeytin üretimi amacıyla kullanılmaktadır. Son on yılda tane zeytin üretim alanı %9,1 oranında artış göstermiştir. Bu artış detaylı incelendiğinde, yağlık zeytin alanlarında %12,4

oranında bir artış gözlenirken, sofralık zeytin alanlarındaki artış %0,7 ile sınırlı kalmıştır (Tablo 1.2).

2022 yılı itibarıyla Türkiye’de yaklaşık 194,5 milyon zeytin ağacı bulunmakta olup, bu ağaçların %84’ü meyve veren, %16’sı ise henüz meyve vermeyen bireylerden oluşmaktadır. Zeytin üretimi, zeytin ağaçlarında gözlenen periyodisite nedeniyle yıllar arasında önemli dalgalanmalar gösterebilmektedir. Bu doğrultuda, 2022 yılında toplam 2,98 milyon ton tane zeytin üretimi gerçekleştirilmiş; bunun 2 milyon tonu yağlık (%68,5), 980 bin tonu ise sofralık (%31,5) olarak kaydedilmiştir (Tablo 1.2).

Türkiye’de sofralık zeytin üretimi genellikle yeşil ve siyah zeytin şeklinde değerlendirilmekte; salamura, konserve, dondurulmuş veya geçici konserve gibi yöntemlerle işlenmektedir. İç tüketim ve dış ticarete en yaygın işlem türü salamura zeytinlerdir. Türkiye, sofralık zeytin üretiminde dünya sıralamasında üçüncü sırada yer almakta olup, küresel tüketimdeki payı yaklaşık %10,5’tir. IOC verilerine göre, 2020/21 sezonu itibarıyla kişi başına sofralık zeytin tüketimi Suriye’de 5,6 kg, Cezayir’de 6,2 kg, Mısır’da 5,5 kg, Türkiye’de 3,9 kg, İspanya’da 3,5 kg ve Peru’da 2,5 kg olarak gerçekleşmiştir.

Türkiye’nin zeytinyağı ihracatı, 2013–2022 yılları arasında yıllık dalgalanmalar göstermiş olsa da genel olarak artış eğilimindedir. 2022 yılı itibarıyla toplam zeytinyağı ihracatı 93.265 ton olarak gerçekleşmiş; bunun %68’i saf zeytinyağı, %32’si ise rafine ve riviera gibi diğer zeytinyağı türlerinden oluşmuştur. Aynı yıl Türkiye’nin zeytinyağı ithalatı 36.601 ton seviyesinde olup, bu miktarın %98’i saf zeytinyağıdır. Toplam ithalatın %99,8’i Suriye’den gerçekleştirilen ham zeytinyağı alımlarından oluşmaktadır.

Sofralık zeytin ihracatının %99’u salamura veya konserve formunda gerçekleştirilmekte; kalan %1’lik kısmı ise taze/soğutulmuş ya da geçici konserve şeklinde ihraç edilmektedir. Sofralık zeytin ihracatında da son on yıllık dönemde artış eğilimi göze çarpmaktadır. Türkiye’nin yıllık sofralık zeytin ihracatı 2013 yılında 69 bin ton iken, bu miktar 2022 itibarıyla 101 bin tona yükselmiştir. Aynı yıl en fazla ihracat yapılan ülkeler arasında Irak (%23), Romanya (%23), Almanya (%13), Bulgaristan (%8) ve Amerika Birleşik Devletleri (%5) yer almaktadır. Öte yandan, Türkiye’nin sofralık zeytin ithalatı da son üç

yıldır artış göstermektedir. 2022 yılında gerçekleşen ithalatın %98,1'i Suriye'den ve geçici konserve formunda yapılmıştır.

Tablo 1.2 Türkiye’de zeytin alanları, ağaç sayısı, üretim ve verim durumu (TÜİK, 2023).

		2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Alan	(bin da)								
	Sofralık zeytin	2.236	2.263	2.265	2.100	2.341	2.335	2.303	2.326
	Yağlık zeytin	6.133	6.193	6.196	6.545	6.450	6.536	6.589	6.685
	Toplam	8.369	8.455	8.461	8.644	8.792	8.871	8.892	9.011
Ağaç sayısı	(bin adet)								
	M. veren/sofralık	46.362	47.315	47.676	42.288	48.032	50.469	50.142	51.617
	M. veren/yağlık	98.398	100.088	100.587	108.781	106.005	108.913	107.708	111.418
	Meyve Veren	144.760	147.403	148.263	151.069	154.037	159.382	157.849	163.035
	M. vermeyen/sofralık	9.482	8.653	8.552	8.681	10.002	9.338	8.965	8.923
	M. vermeyen/yağlık	17.750	17.702	17.779	18.093	18.037	18.443	21.864	22.561
	Meyve vermeyen	27.232	26.355	26.331	26.775	28.039	27.781	30.830	31.484
	Toplam	171.992	173.758	174.594	177.844	182.076	187.163	188.679	194.519
Üretim	(bin ton)								
	Sofralık zeytin	400	430	460	427	415	513	556	938
	Yağlık zeytin	1.300	1.300	1.640	1.073	1.110	803	1.183	2.038
	Toplam	1.700	1.730	2.100	1.500	1.525	1.317	1.739	2.976
Verim									
	Sofralık zeytin	9	9	10	10	9	10	11	18
	Yağlık zeytin	13	13	16	10	10	7	11	18

Zeytin bitkisinin ekonomik önemi göz önünde bulundurulduğunda, tarımsal üretiminin yapıldığı bölgelerde iklim değişikliğine bağlı olarak artması öngörülen kuraklık olaylarının, ürün verim ve kalitesini olumsuz etkilemesi kaçınılmaz görünmektedir. Bu durum, birçok ülkeyi olduğu gibi, dünya zeytin üretiminde dördüncü ve zeytinyağı üretiminde beşinci sırada yer alan Türkiye için de önemli tehditler oluşturmaktadır. Bu nedenle, zeytin bitkisinin kuraklık stresine karşı verdiği yanıtların moleküler düzeyde anlaşılması ve bu stres koşulları altında verimin artırılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

1.1.2 Kuraklık Stresi ile Bitkilerde Oluşan Morfolojik, Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Mekanizmalar

Dünya nüfusunun sürekli artışı ve hızlı sanayileşme, sera etkisinin oluşumunda rol oynayan karbondioksit (CO_2), metan (CH_4), azot oksit (N_2O), ozon (O_3), kloroflorokarbonlar (CFCs) ve su buharı (H_2O) gibi gazların atmosferde yoğunlaşmasına neden olmaktadır. Bu durum, yeryüzüne yakın atmosfer tabakalarında ve yüzey sıcaklıklarında yapay bir artışa yol açmakta; bunun sonucunda ise küresel ısınma ve iklim değişikliği ortaya çıkmaktadır (Çepel, 2003; Houghton, 2009). Küresel ısınma yalnızca bilim insanlarının gündeminde yer alan bir endişe kaynağı olmanın ötesinde; ekonomi, siyaset, sosyoloji ve jeopolitik gibi pek çok alanı doğrudan etkileyen, dolayısıyla bireylerin yaşamını da yakından ilgilendiren küresel bir sorun hâline gelmiştir (Houghton, 2005; Alaca, 2019). İklim değişikliği senaryoları, gelecekte atmosfer sıcaklığında artış, buharlaşma oranlarında yükselme ve kar ile yağmur yağışlarının mevsimsel dağılımında bozulmalar yaşanacağını öngörmektedir. Bu değişimlerin, dünyadaki kullanılabilir su kaynaklarını ve tarımsal üretimi olumsuz yönde etkilemesi beklenmektedir (TOB, 2017).

Küresel düzeyde yaşanan bu iklimsel değişiklikler, yeryüzündeki tüm canlıları ve ekosistemleri doğrudan etkilemektedir. Günümüzdeki iklim koşulları göz önüne alındığında, Türkiye özelinde iklim değişikliğinin etkileri; su kaynaklarının azalması, kuraklık olaylarının artması, sıcak hava dalgalarının sıklaşması, sel felaketlerinde yükseliş ve tarımsal verimlilikte düşüş şeklinde kendini göstermektedir. Hükümetler Arası İklim Değişikliği Paneli (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) tarafından 2014 yılında yayımlanan 5. Değerlendirme Raporu'nda (AR5), iklim değişikliğinin fiziksel temellerine ve etkilerine ilişkin senaryolar, sıcaklık artışı ile birlikte yağış rejiminde değişiklikler yaşanacağını ve bunun daha yüksek buharlaşma talebine ve toprak suyu mevcudiyetinde azalmaya yol açacağını öngörmektedir. Raporda ayrıca, gece sıcaklıklarındaki artışın gündüze oranla daha fazla olmasının, kuraklık olayları ile sıcak hava dalgalarının sıklığını ve şiddetini artıracığı vurgulanmaktadır (Stocker ve ark., 2014). Akdeniz Havzası ve Türkiye özelinde beklenen bu iklim değişiklikleri, söz konusu durumun ciddiyetini ortaya koymaktadır (IPCC, 2025). Özellikle Türkiye'de halihazırda gözlemlenen ve ilerleyen dönemlerde şiddetlenerek artması beklenen kuraklık sorunu, öncelikli çevresel tehditlerden biri olarak öne

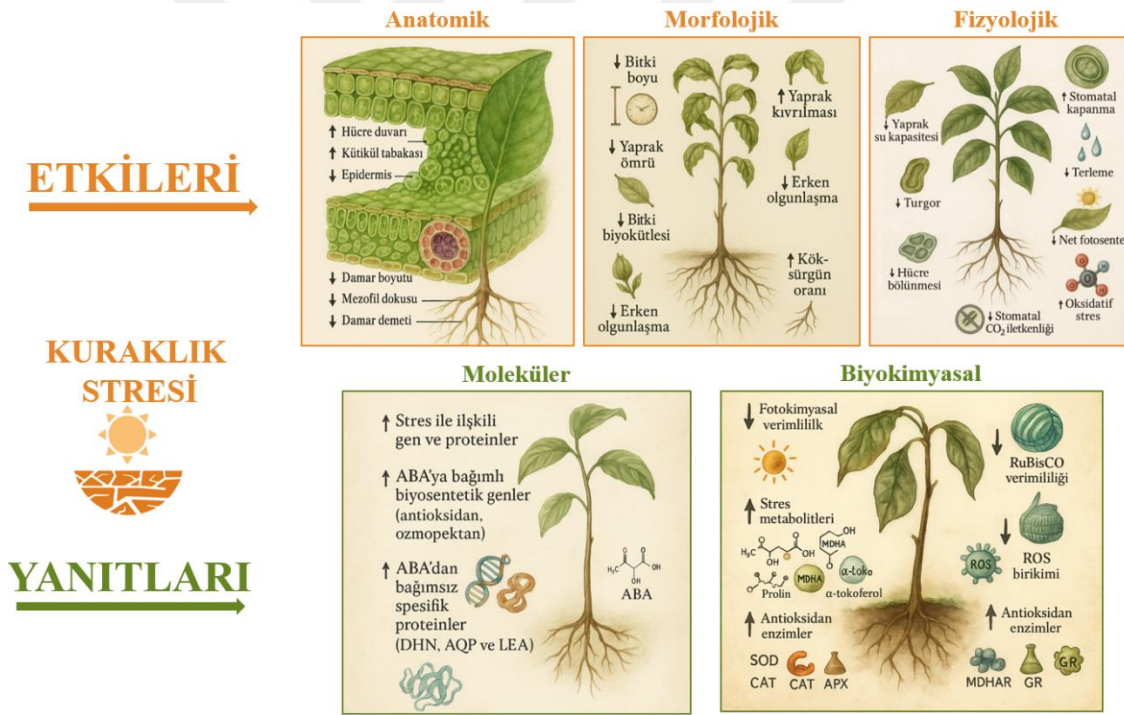
çıkılmaktadır (Farooq ve ark., 2009). 1900–2004 yılları arasında elde edilen küresel veriler, kuraklığın yaklaşık 1,9 milyar insanı doğrudan veya dolaylı olarak etkilediğini ve toplamda 80,4 milyar dolarlık ekonomik kayba neden olduğunu göstermektedir (Sheffield ve Wood, 2012). Kuraklık, bu sonuçlar doğrultusunda insanlığın geleceğini tehdit eden en önemli küresel ve bölgesel çevre sorunlarından biri olarak değerlendirilmektedir (Yiğit ve ark., 2016; Turan, 2018). İklim değişikliğine bağlı olarak daha sık ve şiddetli şekilde ortaya çıkması beklenen kuraklık olayları, atmosferik buharlaşma kayıplarını artırarak birçok tarım ürününde verim düşüşlerine yol açacaktır. Bu tür zararların önüne geçebilmek için, kuraklık stresine karşı bitkilerde gelişen fizyolojik ve moleküler mekanizmaların ayrıntılı şekilde ortaya konulması büyük önem taşımaktadır (Teuling ve ark., 2013; Örs ve Ekinci, 2015).

Kuraklık uzun süreli yağışsız dönem olarak tanımlanan meteorolojik bir ifadedir ve terleme (transpirasyon) ile kaybedilen suyun topraktan alınan sudan daha fazla olduğu durumlarda bitkiler için bir stres etkenine dönüşür (Jones, 1992; Kacar ve ark., 2002). Kuraklığın şiddeti öngörülebilir bir durum değildir. Bu durum; yağmura, yağmurun yağma sıklığına, topraktan suyun buharlaşma hızına ve toprağın su tutma kapasitesine bağlıdır (Wery ve ark., 1994; Farooq ve ark., 2009).

Bitkiler, gelişim dönemleri boyunca ihtiyaç duydukları besin maddelerini kök sistemleri aracılığıyla topraktan alırlar. Bu besin maddelerinin bitki tarafından etkin bir şekilde alınabilmesi için suda çözünmüş hâlde bulunmaları gerekmektedir. Bu nedenle su, bitki gelişimi açısından temel bir unsur olarak kabul edilmektedir. Su; bitki besin maddelerinin çözünmesini, taşınmasını ve metabolik süreçlerde kullanılmasını sağlayarak organik madde sentezine katkıda bulunur. Aynı zamanda, bitkinin ısı dengesinin korunmasında da önemli rol oynar. Tarımsal açıdan değerlendirildiğinde, suyun miktarı ve sürekliliği; bitkinin tüm gelişim evrelerinde gerçekleşen biyolojik ve kimyasal süreçlerin sürekliliği açısından kritik bir öneme sahiptir. Buna ek olarak, toprakta bitki bulunmadığı dönemlerde bile su, mikroorganizmaların faaliyetleri, organik ve inorganik maddelerin ayrışması ile bitki besin maddelerinin bitkiler tarafından kullanılabilir forma dönüştürülmesi gibi dolaylı biyokimyasal süreçlerde de önemli rol üstlenmektedir. Ancak su sıkıntısının yaşandığı dönemlerde bitkinin gelişimi, kuraklık stresinin şiddeti ve süresi ile doğrudan ilişkilidir. Kuraklık stresi; toprakta bitkinin ihtiyaç duyduğu suyun yetersiz kalması ya da atmosferik koşullar nedeniyle terleme (transpirasyon) ve buharlaşma

yoluyla su kaybının artması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu stresin etkisi, bitkinin genetik yapısına (genotipine), strese karşı tolerans düzeyine, stresin süresi ve şiddetine, ayrıca bitkinin buharlaşma ve terleme hızına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Kacar ve ark., 2002).

Bitkiler, aktif hareket yeteneklerinin sınırlı olması nedeniyle çevresel değişimlere karşı doğrudan kaçınma stratejileri geliştiremezler. Bu nedenle, kuraklık gibi olumsuz koşullara karşı hayatta kalabilmek için çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Kuraklık stresine karşı geliştirilen bu savunma stratejileri, su kaybını azaltmaya, su kullanım verimliliğini artırmaya ve hücresel düzeyde hasarı en aza indirmeye yöneliktir. Bitkilerde kuraklık stresinin etkileri ile bu strese karşı geliştirilen savunma mekanizmaları genel hatlarıyla Şekil 1.14'te özetlenmiştir.



Şekil 1.14 Kuraklık stresinin bitkideki etkileri ve stres yanıtları.

1.1.2.1 Kuraklık ve Bitki Morfolojisi Üzerindeki Etkisi

Bitkilerde kuraklığa karşı geliştirilen ilk savunma mekanizması morfolojik adaptasyonlardır. Kurak koşulların olduğu ilk dönemlerde bitkilerde daha fazla suya ulaşabilmek için gövde uzaması yavaşlayıp kök gelişimi hızlanır. Buna karşın, kurak

koşulların bitkide hasara yol açabilecek kadar uzun sürmesi durumunda hem gövde hem de kök gelişimi durarak, yaprak alanı ve yaprak sayısı azalır (Anjum ve ark., 2011). Kuraklık etkisi ile bitkinin su içeriği azaldıkça hücreler küçülür, hücre duvarı gevşer ve bu durum turgor kaybına, yaprak su potansiyelinde ve hücre bölünmesinde bir azalmaya neden olur (Farooq ve ark., 2012; Farooq ve ark., 2009). Gelişimin erken safhalarında kuraklık, hücre genişlemesinin engellenmesi sonucu yaprak alanının azalmasına neden olurken geç safhalarında ise yaprak yaşlanması ve kaybına sebep olmaktadır (Farooq ve ark., 2012). Dal sayısı ve büyüme hızındaki azalmayla ilişkili olarak yaprak sayısı da etkilenebilir (Farooq ve ark., 2012; Taiz ve Zeiger., 2006). Bu tepkiler fotosentetik alanı sınırlandırır ve dolayısıyla fotosentez oranında azalma meydana gelir (Taiz ve Zeiger, 2006). Toprağın kuruması sırasında veya buharlaşma talebi yüksek olduğunda, yaprakların terlemesi sıklıkla su taşıma kapasitesini aşmaktadır. Bu durumda bitkinin ksilem su potansiyeli azalır ve kavitasyona (havanın terleme akışına aspirasyonu) duyarlılığı artar. Kavitasyon olayları havanın tüm ksilem kanalını doldurması, suyun taşınmasını engellemesi, fonksiyonel kanalların sayısının azalması ve hidrolik direncin artması nedeniyle emboliye neden olabilmektedir (Fernandez, 2014).

1.1.2.2 Kuraklık ve Bitki Fizyolojisi Üzerindeki Etkisi

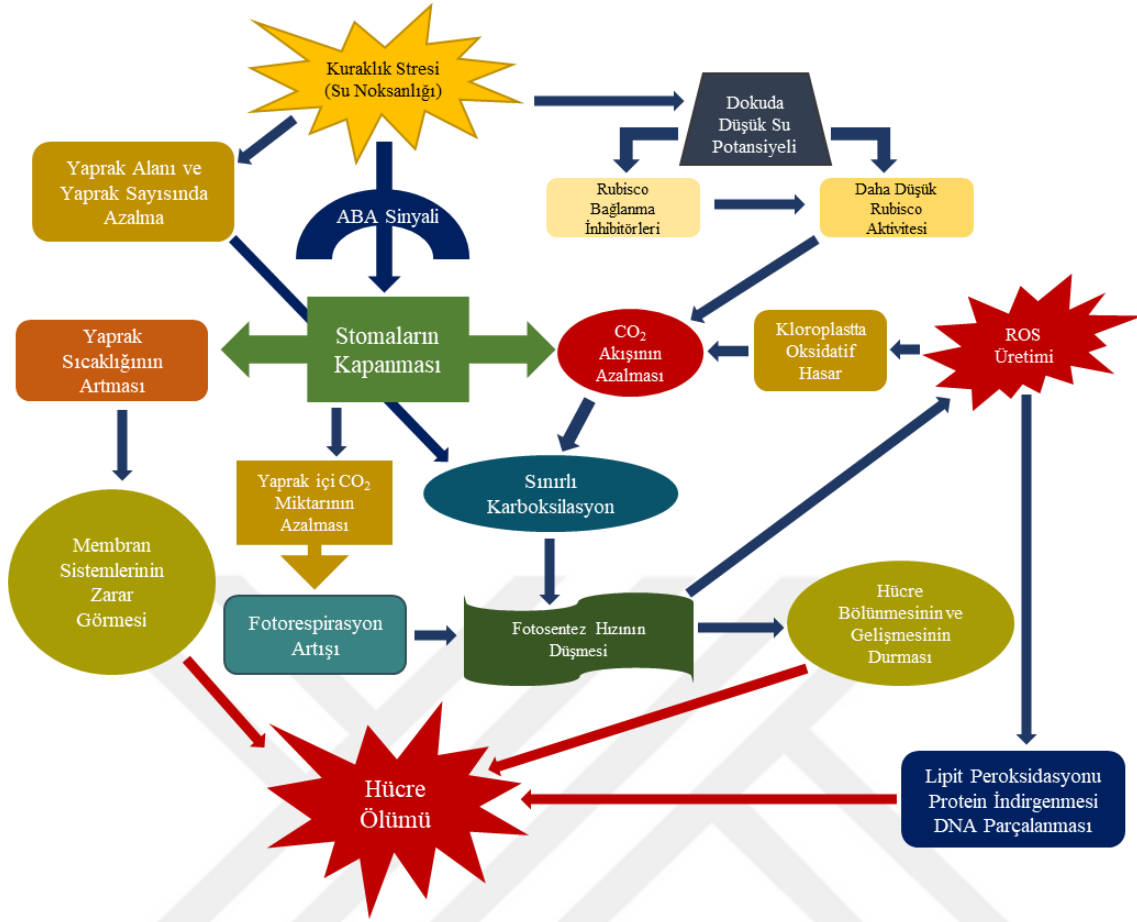
Kuraklığa karşı geliştirilen adaptasyon mekanizmalarından biri, su kaybını azaltmak amacıyla kloroplastlarda CO₂ difüzyonunu sınırlayan stoma kapanmasıdır (Osakabe ve ark., 2014). Kuraklık stresi sırasında stomaların kapanmasını tetikleyen iki temel sinyal yolundan söz edilmektedir: hidrolik sinyaller (örneğin yaprak su potansiyeli, hücre turgoru) ve kimyasal sinyaller. Bu süreçte en önemli kimyasal sinyal moleküllerinden biri absisik asittir (ABA).

Topraktaki su yetersizliği kökler tarafından algılandığında, ABA üretimi artar ve bu hormon yapraklardaki bekçi hücrelere taşınır. ABA, bu hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak potasyum iyonlarının (K⁺) taşınmasını düzenler ve stoma açıklığının azalmasına, dolayısıyla su kaybının sınırlandırılmasına neden olur. Bununla birlikte, ABA yalnızca stomal kapanmayı düzenlemekle kalmaz; aynı zamanda gen ekspresyonunda değişikliklere neden olarak kuraklık koşullarına uyum sürecinde metabolizmanın yeniden yapılandırılmasında da kritik rol oynar (Shanker ve ark., 2014). Kuraklık stresi sırasında ABA seviyesindeki geçici artışlar; genlerin ifadesinin

indüklenmesi, uyumlu çözünen maddelerin ve koruyucu proteinlerin birikimi, antioksidan savunma sistemlerinin güçlenmesi ve enerji tüketen metabolik yolların baskılanması gibi çeşitli hücresel yanıtları tetikler (Bartels ve Sunkar, 2005; Taiz ve Zeiger, 2010). Ayrıca yapılan çalışmalar, ABA'nın henüz tam olarak aydınlatılamamış bazı mekanizmalar aracılığıyla klorofil sentezini azalttığını, kloroplastlarda yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olduğunu ve fotosentez ürünlerinin birikimi, taşınımı ve dağıtımını etkileyerek fotosentez sürecinin düzenlenmesinde de etkin rol oynadığını göstermektedir (Anjum ve ark., 2011; Dolferus, 2014).

Kuraklık stresi koşullarında bitkiler, terleme yoluyla su kaybını önlemek amacıyla stomalarını hızla kapatarak stomal iletkenliği sınırlar. Ancak bu kapanma, karbondioksit (CO_2) alımını da azaltarak fotosentez oranında düşüşe yol açar. Fotosentez, bitki büyüme ve gelişmesi için gerekli karbonhidratların ve enerjinin üretildiği temel süreç olduğundan, bu azalma doğrudan bitki gelişimini olumsuz etkilemektedir (Şekil 1.15).

Kuraklık stresine bağlı stomal kapanmanın bir diğer sonucu ise yaprak sıcaklığının artmasıdır. Yeterli transpirasyonun gerçekleşmemesi nedeniyle artan sıcaklık, özellikle membran sistemlerinde yapısal hasarlara ve dolayısıyla hücre ölümüne yol açabilir (Farooq ve ark., 2009; Dolferus, 2014). Fotosentez oranındaki azalma yalnızca stomaların kapanmasından kaynaklanmamakta, aynı zamanda kloroplast içi süreçlerdeki bozulmalarla da ilişkilidir. Özellikle su kaybına bağlı olarak biyokimyasal reaksiyonlarda aksamalar meydana gelmekte, bu da kloroplastın stroma bölgesinde yer alan ve CO_2 fiksasyonunda görevli olan Rubisco (rübuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz) gibi enzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. Rubisco'nun azalması, CO_2 'ninorganik bileşiklere dönüştürülmesini engelleyerek fotosentezin etkinliğini önemli ölçüde düşürmektedir (Çırak ve Esendal, 2006).



Şekil 1.15 Kuraklık stresi altında bitkide gerçekleşen mekanizmalar.

Kuraklık stresi, bitkide reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengeyi bozarak, oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin birikmesine neden olur. Mevcut su miktarının azalması üzerine bitkiler stomalarını kapatır (ABA sinyali yoluyla) ve bu durum CO_2 akışını azaltır. Stoma kapanması ile CO_2 akışı ve yaprak iç CO_2 miktarının azalması, sadece karboksilasyonu doğrudan azaltmakla kalmaz, aynı zamanda daha fazla elektroni reaktif oksijen türleri oluşturmaya yönlendirir. Şiddetli kuraklık koşulları, ribuloz-1, 5-bifosfat karboksilaz / oksijenaz (RuBisCo/RuBPCase) aktivitesini azaltarak fotosentezi sınırlar. Hücre bölünmesinin veya genişlemesinin durması su noksanlığı nedeniyle fotosentez oranının düşmesi ile doğrudan ilişkilidir. Bitki dokularındaki düşük su potansiyeli ayrıca RuBisCo bağlanma inhibitörlerinin aktivitesini de artırır. Kuraklık, yaprak alanı ve yaprak sayısının azalması nedeniyle de fotosentezi sınırlar (Farooq ve ark., 2012).

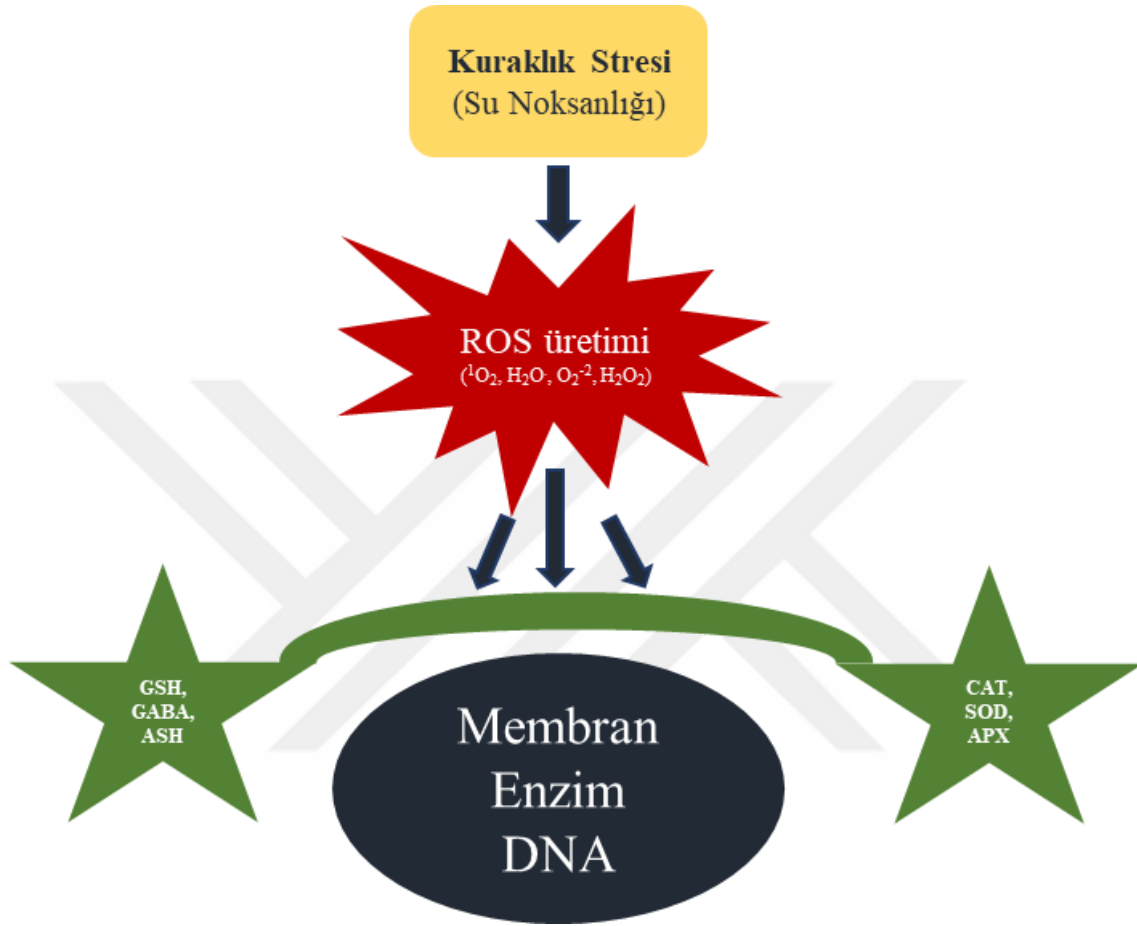
Kuraklık stresi bitkide minerallerin alımını, taşınımını ve dağılımını etkileyerek bitki beslenmesinde dengesizliğe neden olmaktadır (da Silva ve ark., 2011). Bu dengesizlik fizyolojik fonksiyonlarda ve biyokütle birikiminde önemli bozulmalara neden olabilmektedir Brito ve ark., 2018a; Brito ve ark., 2018b). Çünkü mineraller bitkilerde makromoleküllerdeki yapısal bileşenler, enzimatik reaksiyonlarda ko-faktörler ve ozmotik çözünen maddeler olarak çok sayıda fonksiyona hizmet etmektedirler (Grusak, 2001).

Bitkilerde azalan su mevcudiyeti sınırlı besin alımıyla sonuçlanmaktadır (da Silva ve ark., 2011). Çünkü (i) kuraklık, düşük stoma iletkenliği nedeniyle bitkinin terleme oranını azaltır (Brito ve ark., 2018a); (ii) toprağın su potansiyelini azaltarak besin maddelerinin toprak matrisi ile kök yüzeyi arasındaki difüzyon hızını yavaşlatır (Farooq ve ark., 2009); (iii) mineralizasyon yoluyla besin alımını etkiler (Sanaullah ve ark., 2012); (iv) kök besin alım proteinlerinin konsantrasyonunu azaltır (Bista ve ark., 2018); (v) besin asimilasyonunda yer alan enzimlerin aktivitesini ve membran geçirgenliğini bozarak besin alımını etkiler (da Silva ve ark., 2011; Ramos ve ark., 2018).

1.1.2.3 Kuraklığın Bitkilerde Biyokimyasal Etkileri

Kuraklık stresi altında bitki hücrelerinde gözlenen en önemli biyokimyasal değişikliklerden biri, fotosentez hızındaki azalmaya da bağlı olarak reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumunun artmasıdır. Kuraklık stresi bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengeyi bozarak, oksidatif stresin ortaya çıkmasına ve ROS birikiminin artmasına neden olmaktadır (Abdallah ve ark., 2018; Brito ve ark., 2018b). Bu bileşikler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli oksijen ($^1O_2$), hidroksil radikali (OH^-), peroksil radikali ($ROO^\bullet$) ve alkoksi radikali ($RO^\bullet$) gibi çeşitli ROS formları yer almaktadır (Bhargava ve Sawant, 2013; Farooq ve ark., 2009). Reaktif oksijen türleri, hücre metabolizmasının doğal yan ürünleri olmakla birlikte, stres koşullarında artış göstererek sinyal iletim mekanizmalarında düzenleyici rol oynamaktadır (Anjum ve ark., 2011; Cabello ve ark., 2014). Ancak aşırı ROS birikimi, hücre zarları, proteinler, enzimler ve nükleik asitler üzerinde oksidatif hasara yol açmakta; böylece hücrelerin yapısal bütünlüğü ve fizyolojik işlevleri olumsuz etkilenmektedir (Şekil 1.16). Reaktif oksijen türlerinin indirgenmesi ve

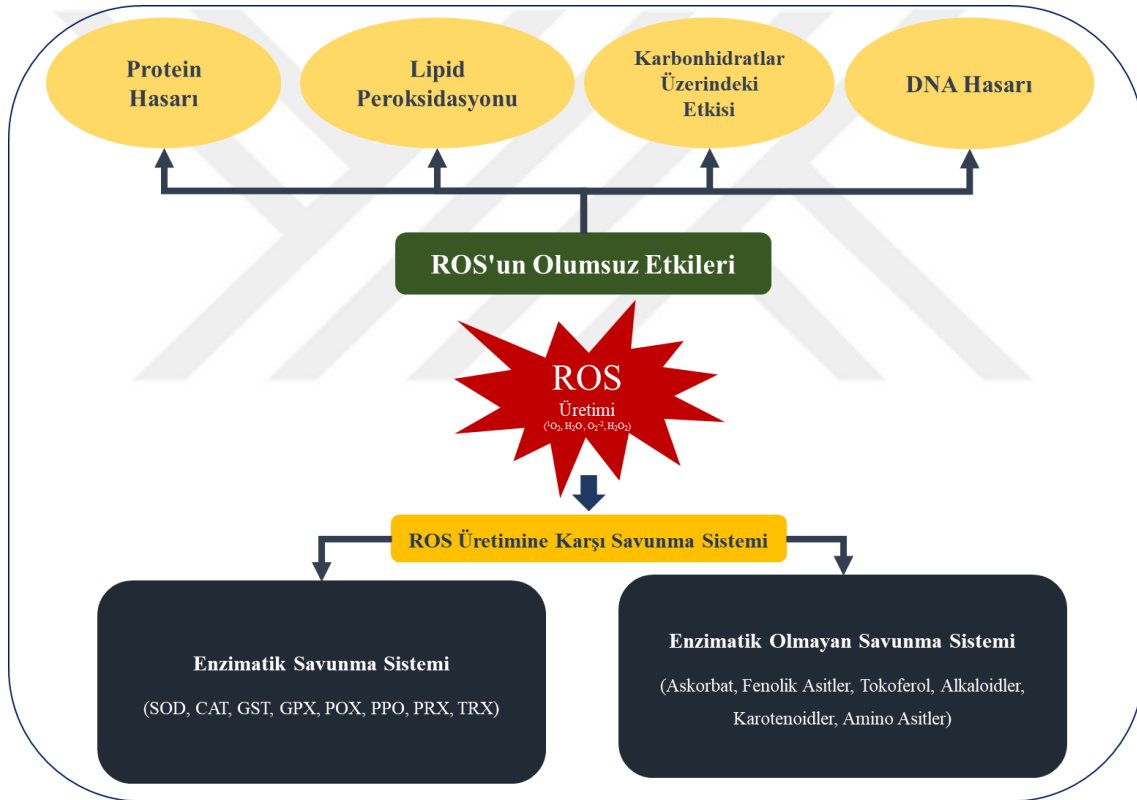
hücre içinde birikimlerinin engellenmesi, bitkilerin kuraklık gibi çevresel stres koşullarına karşı geliştirdiği başlıca savunma mekanizmalarından biridir (Öztürk, 2015).



Şekil 1.16 Reaktif oksijen türlerinin (ROS) temizleme mekanizmasında antioksidan enzimlerin rolü (Farooq ve ark., 2012).

Aşırı ROS birikimleri durumunda ise lipit peroksidasyonunu, protein indirgenmesini ve DNA parçalanmasını indükleyerek hücre ölümüne yol açabilmektedirler (Dolferus, 2014; Osakabe ve ark., 2014; Yıldız, 2020). Genellikle hafif ve orta dereceli kuraklık altında bitkiler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların konsantrasyonunu arttırmaktadır (Flexas ve ark., 2012; Brito ve ark., 2018b). Enzimatik bileşenler arasında peroksidaz (POD), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPx) glutatyon S-transferaz, glutatyon (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) bulunurken enzimatik olmayan bileşenler ise askorbik asit (ASH), camino bütirik asit (GABA), glutatyon (GSH), α -tokoferol (a-toc) karotenoid ve flavonoidlerdir

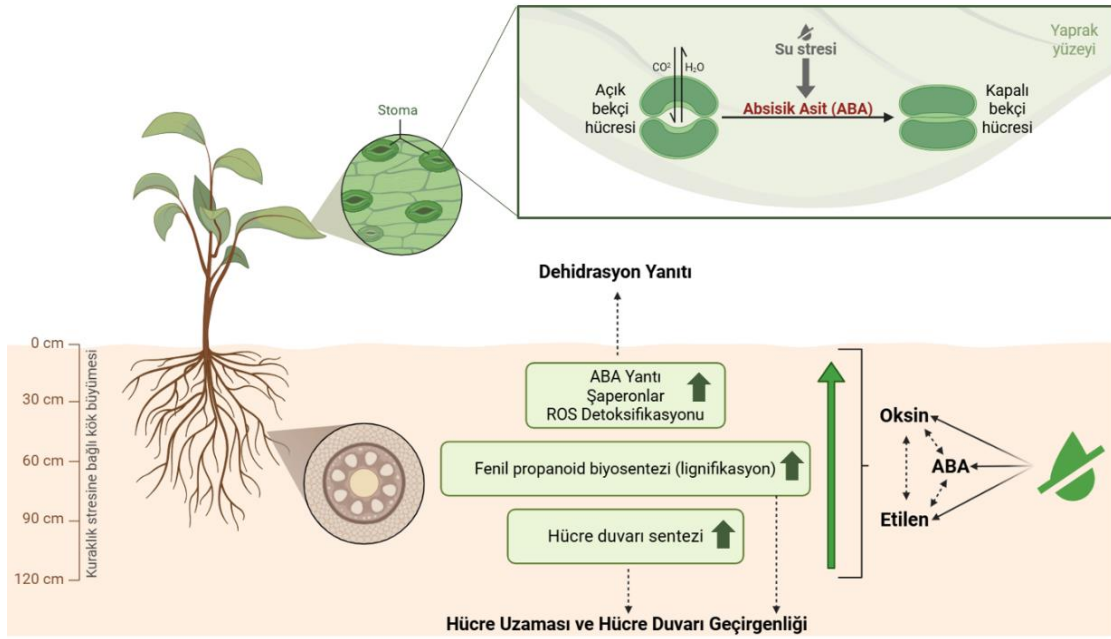
(Reddy ve ark., 2004; Srivalli ve ark., 2003; Jung, 2004; Pinheiro ve ark., 2004; Farooq ve ark., 2012; Yıldız, 2020). Bitki kuraklık stresine maruz kaldığında, toleranslı hücreler antioksidan savunma sistemlerini aktive ederek ROS'u temizlemeye ve hücreyi korumaya başlar (Farooq ve ark., 2012). Şiddetli kuraklık stresi altında, ROS üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında bir dengesizlik meydana gelebilir (Taiz ve Zeiger, 2006). Bu durum lipitlere, proteinlere, karbonhidratlara, pigmentlere ve deoksiribonükleik asitlere (DNA) zarar verebilmektedir (Şekil 1.17). Ayrıca bu durum hücrel membran hasarının ve elektrolit sızıntısının artmasına neden olmaktadır (Guerfe ve ark., 2009; Petridis ve ark., 2012; Bacelar ve ark., 2006; Bacelar ve ark., 2007; Farooq ve ark., 2009; Abdallah ve ark., 2018; Brito ve ark., 2018b).



Şekil 1.17 ROS üretiminin bitkilerde oluşturduğu etkiler ve bitkilerin ROS üretimine karşı geliştirdiği savunma sistemleri.

Bitkiler fizyolojilerini ve biyokimyalarını değiştiren olumsuz koşullar altında genellikle fitohormonların üretimi, dağıtımı ve sinyal iletimindeki değişiklikleri teşvik etmektedir. Genellikle ana stres hormonu olarak kabul edilen ABA biyosentezi ve birikimi, stoma iletkenliği düzenlemesindeki anahtar rol ile bağlantılı olarak kuraklık tarafından uyarılmaktadır. Ancak su eksikliği aynı zamanda diğer stres sinyal yollarını da

etkilemektedir (Pantin ve ark., 2013). Kuraklık stresi altında farklı bitki organları içinde ve arasında ABA eşit olmayan bir şekilde dağılmaktadır (Brito ve ark., 2018a; Brito ve ark., 2018b; De Diego ve ark., 2013; Brito ve ark., 2019). Kuraklık stresi altında, diğer bir önemli stres hormonu olan etilen (ET), bitki büyümesini engellemekte (Xiong, 2007), yaprak dökülmesinde rol oynamakta, su kaybının azaltılmasında etkili olmakta (Gómez-Cadenas ve ark., 1996), minerallerin yapraklardaki tekrar hareketini teşvik etmekte (Xiong, 2007), çözünen madde birikimini arttırmakta ve oksidatif stres hasarını azaltmaktadır (Cui ve ark., 2015). Stres altında ABA ve ET'nin ilişkisi antagonistir (Wilkinson ve ark., 2012). Etilen ABA birikimini önleyerek ABA kaynaklı stoma kapanmasını engellemektedir (Tanaka ve ark., 2005). Yüksek ABA konsantrasyonu aşırı ET üretimini baskılayarak kuraklık koşulları altında sürgün ve kök büyümesini teşvik etmektedir (Sharp ve LeNoble, 2002). Kuraklık stresine karşı ABA ve ET tepkileri karşılaştırıldığında, büyüme hormonları oksin (Aux) ve gibberellinlerin (GA) tepkileri konusunda henüz bir fikir birliğine varılamamıştır. Yapılan çalışmalara göre GA, büyüme baskılayıcıları olan aspartik asit, glutamik asit, lösin ve alanin proteinlerinin birikimini inhibe ettiğini ve böylece sinyal yollarında oluşan baskılanmanın bitki büyümesini kısıtladığını göstermektedir (Colebrook ve ark., 2014). Öte yandan kuraklığa karşı Aux tepkileri artış (De Diego ve ark., 2012; Pustovoitova ve ark., 2004) ve azalış (Man ve ark., 2011; Du ve ark., 2013) göstermesi nedeniyle çelişkilidir. Yapılan bir başka çalışmada kuraklığa adaptasyonun ilk aşamasında geçici bir artışla birlikte Aux'da belirgin bir azalma olduğunu bildirmiştir (Wang ve ark., 2008). Ayrıca yapılan diğer çalışmalar kuraklık stresi altında bitkilerde Aux taşınmasındaki değişikliklerin Aux konsantrasyonunu ve dağılımını etkilediğini ve bu durumun bitkisel büyüme ile hayatta kalma arasında bir dengenin korunmasına izin verdiğini göstermiştir (Shen ve ark., 2010; Shojaie ve ark., 2015). Stres sinyali sırasında oksine duyarlı genlerin anlatım yaptığı bulunmuş ve Aux'un doğrudan veya dolaylı olarak bir stres hormonu olarak hareket edebileceği bildirilmiştir (Sharma ve ark., 2015). Bununla birlikte, farklı bitki hormonları arasındaki sinerjistik veya antagonistik etkileşimler nedeniyle hormon etkilerinin tek başına düşünülmemesi gerekmektedir (Peleg ve Blumwald., 2011). Bitkide kuraklık stresi altında hormonal mekanizmaların bir arada çalışmasıyla birlikte gerçekleşen diğer durumlar ise (Şekil 1.18) şaperon üretimi, ROS detoksifikasyonu, hücre duvarı sentezi, fenil propanoid biyosentezi (lignifikasyon)'dır (Dalal ve ark., 2018).



Şekil 1.18 Kuraklık stresinin bitki büyümesi ve işleyişi üzerindeki hormonal etkilerinin şematik özeti.

Kuraklık stresi altında bitkiler, hücrelerin su kaybından en az düzeyde etkilenmesini sağlamak amacıyla ozmotik dengeleme mekanizmaları geliştirerek turgor basıncında düzenlemeye giderler (Morgan, 1990). Bu süreçte, “ozmolit” olarak adlandırılan çeşitli çözünür maddeler sentezlenip hücre içinde biriktirilir. Ozmolitler, hücre içi su potansiyelini düşürerek suyun hücre içinde tutulmasına katkı sağlar ve turgor basıncının korunmasında önemli rol oynar (Öztürk, 2015). Bu bileşikler; serbest amino asitler (asparajin, prolin, glisin), kuaterner aminler (betain), bazı organik asitler ve çeşitli karbonhidratlar gibi farklı gruplardan oluşmaktadır (Liang ve ark., 2013). Ozmolitlerin varlığı doğrudan kuraklık toleransını artırmasa da, yaprak su potansiyelini dengeleyerek stoma iletkenliğinin korunmasına ve dolayısıyla fotosentezin devamlılığına olanak tanır. Bu durum, bitki büyüme süreçlerinin minimum düzeyde de olsa sürdürülebilmesine katkı sağlar.

Kuraklık koşullarında ozmolitler aracılığıyla sağlanan bu su dengesi ve metabolik istikrar, bitkilere kısa süreli bir dayanıklılık kazandırmaktadır. Ancak, stresin uzun süre devam etmesi durumunda ozmolit birikimi, turgor kaybını dengelemek için yeterli olmamakta ve hücre fonksiyonlarında geri dönüşü olmayan bozulmalar meydana gelebilmektedir (Öztürk, 2015).

1.1.2.4 Kuraklık Stresi Altında Bitkilerde Gelişen Moleküler Mekanizmalar

Bitki büyümesi, kuraklık gibi çevresel abiyotik streslerden büyük ölçüde etkilenmekte ve bitkiler hayatta kalabilmek için bu streslere uyum sağlamak zorundadır. Buna bağlı olarak bitkiler, özellikle de etkin bir hareket mekanizmasına sahip olmadıklarından sınırlı çevresel koşullara adapte olabilmek için bu olumsuz etkileri azaltacak ya da engelleyecek birtakım savunma mekanizmaları geliştirmektedir. Bu nedenle, abiyotik streslere karşı toleransın genetik kontrolü yalnızca çok karmaşık olmakla kalmaz, aynı zamanda diğer çevresel faktörlerden ve bitkinin gelişim aşamasından da oldukça etkilenir. Bitkilerde transkripsiyonel düzeyde kuraklığa yanıt olarak çeşitli genler indüklenmekte ve bu gen ürünlerinin kuraklığa toleransta işlev gördüğü bilinmektedir (Kavar ve ark., 2008). Bu streslere transkripsiyonel düzeyde yanıt veren birkaç yüz gen tanımlanmıştır (Seki ve ark., 2002; Mahalingam ve ark., 2003; Rabbani ve ark., 2003; Zhou ve ark., 2007; Gil-Amado ve Gomez-Jimenez, 2013; Rasheed ve ark., 2016; Moschen ve ark., 2017). Bitkilerde kuraklık stres cevabı moleküler düzeyde birçok genin birbirleriyle karmaşık ve entegre iletişim mekanizmasını içermektedir (Agarwal ve ark., 2006; Cattivelli ve ark., 2008). Stresle uyarılan genlerin fonksiyonlarını analiz etmek, yalnızca stres toleransının moleküler mekanizmalarını ve yüksek bitkilerin tepkilerini anlamak için değil, aynı zamanda gen manipülasyonu yoluyla mahsullerin stres toleransını geliştirmek için de önemlidir (Bartels ve Sunkar, 2005). Bununla birlikte, bu genlerin artan ekspresyonunun sıklıkla bitki büyüme hızında bir yavaşlamaya neden olduğu bildirilmektedir. Bitkilerde kuraklığa tolerans mekanizmasının moleküler temellerinin aydınlatılması özellikle de stratejik öneme sahip mahsullerin ıslahında, tarımsal verim artışının sağlanmasında ve çeşitlerin stres direnç seviyesini tanımlayarak moleküler mekanizmalarının ortaya konulmasında yeni bir bakış açısı oluşturması bakımından önem kazanmaktadır (Muthamilarasan ve ark., 2013; Hussain ve ark., 2018). Bu yaklaşım, kurak çevrede tolerans gösteren ve yüksek verim potansiyeli sunabilen yeni bitki varyetelerinin geliştirilmesine de olanak tanıyacaktır (Cho ve Hong, 2006; Bhatnagar-Mathur ve ark., 2008).

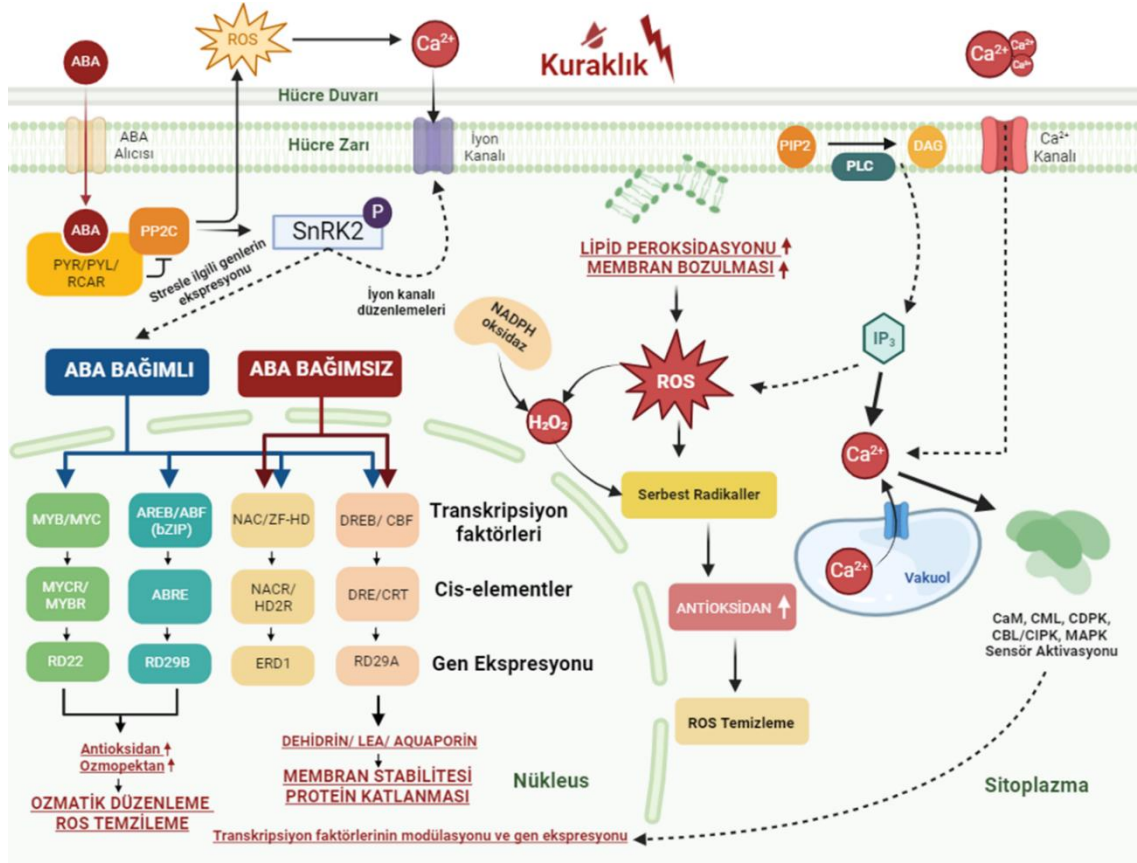
1.1.2.4.1 Bitki Kuraklık Stres Sinyallerinin Hücre İçi İletim Yolları ve Düzenleme Mekanizmaları

Kuraklık koşulları altında bitkiler su stresi sinyallerini algılamaktadır ve absisik asit (ABA), Ca^{2+} , inositol-1, 4, 5-trifosfat (IP3), reaktif oksijen türleri (ROS) gibi sinyal molekülleri üretmektedir. Bu durum sinyal iletimi yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak bitkilerde morfolojik ve fizyolojik değişikliklere yol açmaktadır. Dolaylı olarak kuraklık stres sinyalleri, stresle ilgili genlerin ekspresyonunu tetiklemektedir (Şekil 1.19). Bitkilerin kuraklık stresi altında prolin (pro), glisin betain (GB), çözünür şeker (SS), geç embriyogeneze bol miktarda bulunan (LEA) proteinler ve akuaporin (AQP) gibi fonksiyonel gen ürünleri ve kalsiyuma bağımlı protein kinaz (CDPK), kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaM), kalsinörin B benzeri proteinler/ kalsinörin B-Benzeri proteinler (CBL/CIPK), kalmodulin benzeri proteinler (CML), mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK), ABA'ya duyarlı element bağlayıcı protein/ABA-bağlayıcı faktör - lörin çinko parmak proteini (AREB/ABF - bZIP), miyelositomatoz/ miyeloblastoz (MYC/MYB), nitrojen asimilasyon kontrol proteini/ çinko parmak homeodomain proteinleri (NAC/ ZFHD) ve dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı proteinler/ nitrojen asimilasyon kontrol proteini (CBF/DREB) gibi düzenleyici gen ürünleri sinyal transdüksiyon yolları ile transkripsiyon faktörlerini aktive ederek bitki morfolojisi ve fizyolojisinde değişikliklere yol açarak kuraklık stresi altında stres toleransını arttırmaktadır (Todaka ve ark., 2015).



Şekil 1.19 Bitki kuraklık stres sinyallerinin gelişme süreci (Yang ve ark., 2021).

Kuraklık koşulları altında bitkiler su stresi sinyallerini algılayarak absisik asit (ABA) ve Ca²⁺ gibi sinyal molekülleri üreterek sinyal iletimi yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak bitkilerde morfolojik ve fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır (Şekil 1.20).



Şekil 1.20 Kuraklık stres yanıtında genel sinyal iletim yolu ve düzenleme mekanizmaları.

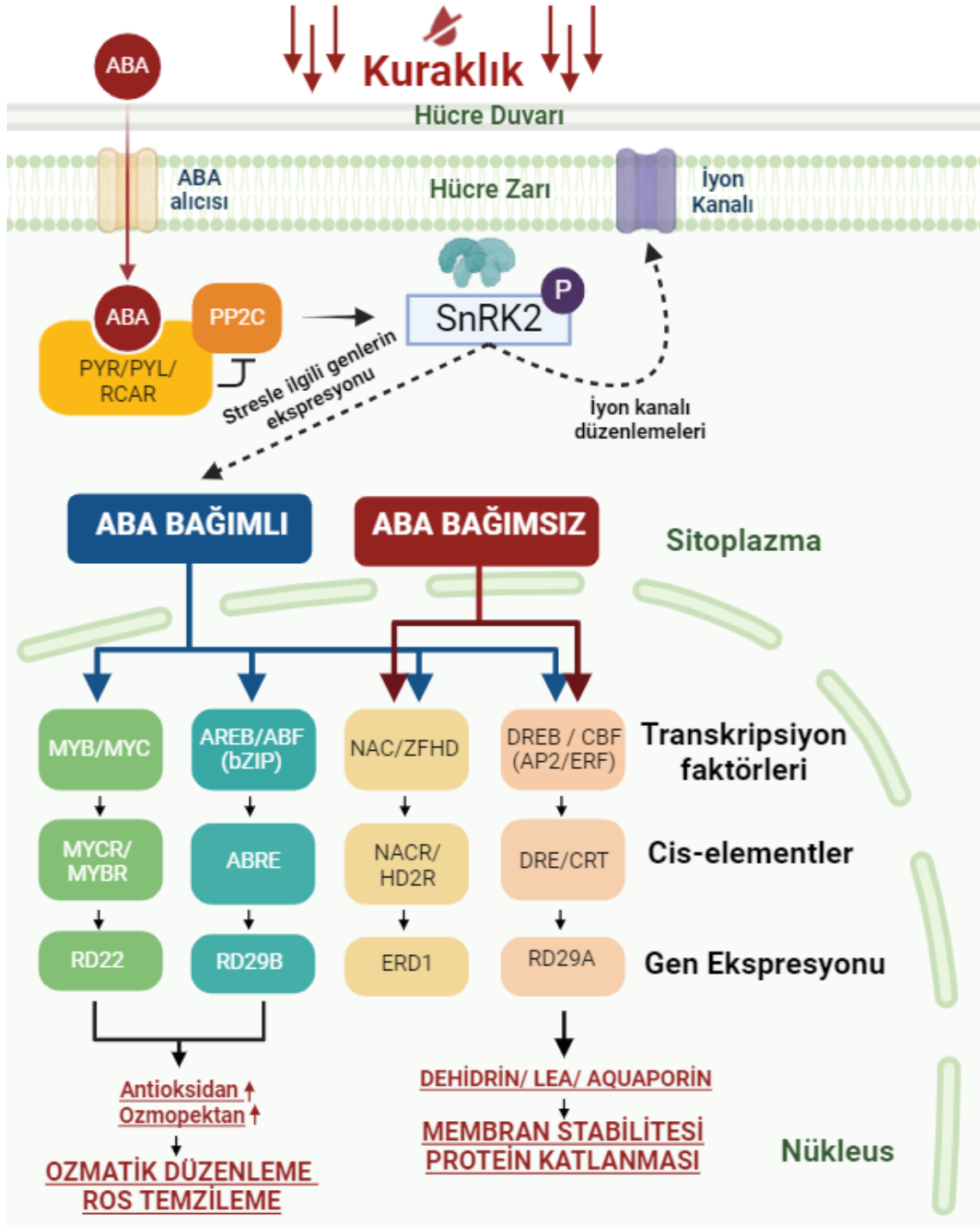
1.1.2.4.1.1 Kuraklık Stres Yanıtında ABA (Absisik Asit) Sinyal İletim Yolu ve Düzenleme Mekanizmaları

Bitki hormonları, strese duyarlı sinyal akışı ile ilgili rolleri nedeniyle bitkiler için hayati öneme sahiptir. ABA, çevresel stres alımı ile hücrel mekanizmaların düzenlenmesi, karbonhidrat ve lipid metabolizması gibi adaptif transkripsiyonel program arasında bir bağlantı olarak kullanılan önemli bir bitki hormonudur. Bitkilerde abiyotik stresin (özellikle kuraklık toleransı) temel düzenleyicisidir ve bitkilerin su eksikliği ile hayatta kalmasını sağlayan doğrudan karmaşık bir gen düzenleyici ağıdır (Kim ve ark., 2010).

Kuraklık stresi yaprağın bağıl su içeriğinin azaltarak ABA konsantrasyonunda bir artışa sebep olmaktadır. Bu durum ABA reseptörlerinin (PYR/PYL/RCAR'lar - pirabaktin direnci/piraktin direnci benzeri/düzenleyici) protein fosfataz 2C (PP2C) ile kompleks oluşturmaya neden olur (Yin ve ark., 2009; Yang ve ark., 2021). Böylece SNF1 ile ilişkili protein kinaz 2 (SnRK2'ler) birikmesine yol açar (Blattler ve Farnham, 2013).

SnRK2'ler ise AREB1, AREB2 ve AREB3 gibi ABA'ya duyarlı transkripsiyon faktörlerini (TF) tetikler. ABA'ya bağımlı gen ekspresyonunu düzenleyen bu TF'ler, stoma koruyucu hücrelerinin hareketi gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alır ve böylece kuraklığa toleransı artırır (Şekil 1.21).

ABA, stres adaptasyonuna müdahale ederken birçok genin ekspresyonunu indüklemektedir (Tesfa, 2022). Dehidrasyonla indüklenen genler, ABA'ya bağımlılıklarına göre ABA'ya bağımlı ve ABA'dan bağımsız olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Kim, 2014). ABA'ya bağımlı grup AREB/ABF-bZIP (ABA'ya duyarlı element bağlayıcı protein/ABA-bağlayıcı faktör-lösin çinko parmak proteini) ve MYC (miyelositomatoz) - MYB (miyeloblastoz) regulonlarından oluşmaktadır (Saibo ve ark., 2009; Zandkarimi ve ark., 2015; Nakashima ve ark., 2014; Singh ve Laxmi 2015). ABA'dan bağımsız grup ise NAC/ ZFHD (nitrojen asimilasyon kontrol proteini/ çinko parmak homeodomain proteinleri) ve dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı proteinler/ nitrojen asimilasyon kontrol proteini (CBF/DREB) regulonlarından oluşmaktadır (Nakashima ve ark., 2009; Phuong ve ark., 2015). Bununla birlikte bazı araştırmalar, AP2/EREBP (ERF) ailesinin stres tepkisinde hem ABA'ya bağımlı hem de bağımsız olarak çalıştığını ortaya çıkarmıştır (Nakashima ve ark., 2009). Bu tanınmış regulonların yanı sıra çok sayıda başka Transkripsiyon faktörü (TF) de bitkilerde stres durumlarında kritik roller oynamaktadır. Kuraklık stresi hücrenin ozmotik dengesini bozduğundan, büyük stres genlerinin yanı sıra bu transkripsiyon faktörlerinin de maksimum yanıt için hem ayrı hem de birbirleriyle çapraz iletişim kurması, bitkinin normal fizyolojisini eski haline döndürmesine yardımcı olmasında rol oynamaktadır (Kizis ve Pagès, 2002; Mahajan ve Tuteja, 2005).



Şekil 1.21 Kuraklık stres toleransında bitkilerde ABA'ya bağlı ve ABA'dan bağımsız sinyal iletim yolu (Anami ve ark., 2009; Kuromori ve ark., 2014; Liu ve ark., 2015; Gahlaut ve ark., 2016; Jan ve ark., 2017; Tesfa, 2022).

1.1.2.4.1.2 Kuraklık Cevabında Yer Alan Başlıca TF (Transkripsiyon faktörü) Aileleri

Transkripsiyon faktörleri, çoğunlukla korunmuş DNA bağlama bölgelerinin (DBD) karakteristik amino asit dizilerine dayalı olarak çeşitli aile gruplarına kategorize edilir (Golldack ve ark., 2014). Bunlar arasında DREB/CBF, NAC, MYB, WRKY, ve bZIP kuraklıkta rol oynayan başlıca TF'lerdir.

1.1.2.4.1.2.1 DREB/CBF Ailesi

Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı proteinler (DREB'ler) ailesi, bir dizi abiyotik stresle ilişkili genleri indükleyen ve böylece bitkilere stres toleransı kazandıran TF'lerin AP2/EREBF süper ailesinin bir parçasıdır. Bunlar, strese duyarlı genleri tetikleyen ABA'dan bağımsız yollarda yer alır. DREB/CBF TF'ler, dehidrasyona duyarlı C-tekrar (DRE/CRT) cis-elementine (5'-TACCGACAT-3') spesifik olarak bağlanan ve genlerin ekspresyonunu aktive eden yaklaşık 60 amino asit uzunluğunda AP2 DBD içermektedir. DREB ailesi üyelerinde AP2, bitkilerde son derece korunmuş bir bölgedir (Wang ve Dane, 2013). DREB/CBF TF'ler öncelikle kuraklığa duyarlı gen RD29A'nın promotöründe tanımlanmıştır (Kizis ve ark., 2001). Ayrıca *Brassica napus*, *Triticum aestivum*, *Atriplex hortensis* ve *Oryza sativa* gibi başka bitki türleri de bulunmuştur (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki, 1993). DREB1 ve DREB2, DREB alt ailesinin iki ana alt grubudur ve sırasıyla soğuk ve dehidrasyon altında iki farklı sinyal iletim yoluna katılmıştır (Dubouzet ve ark., 2003). DREB1'in doğal formunun ve yapısal olarak aktif bir DREB2 formunun aşırı ifadesinin transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin kuraklığa, yüksek tuzluluğa ve soğuğa karşı toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Yapılan bir başka çalışmada DREB2'nin aktif bir formunun, hedef stresle indüklenebilir genleri transgenik *Arabidopsis*'te kuraklık toleransını iyileştirdiği gösterilmiştir (Todaka ve ark., 2015). Ayrıca TaDREB1'in farklı buğday çeşitlerinin kuraklık, tuz ve soğuk stresleri altında ABA tarafından uyarılabileceği bildirilmiştir (Eckardt, 2019). Başka bir çalışmada ZmDREB1A ve ZmDREB2.7 transkripsiyon faktörlerinin mısırdaki kuraklık toleransına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Qin ve ark., 2004; Morran ve ark., 2011).

1.1.2.4.1.2.2 NAC/ZFHD Ailesi

Bitkiye özgü TF'lerin NAC ailesi, pirinçteki 149 üyeyle bitki genomundaki en büyüklerden biridir (Liu ve ark., 2013). NAM/ATAF/CUC (NAC) TF'ler, korunmuş bir N-terminal DBD'ye ve çeşitlendirilmiş C-terminal düzenleyici alana sahip benzersiz bir özelliğe sahiptir (Golldack ve ark., 2014). NAC, apikal meristemsiz (NAM), Arabidopsis transkripsiyon aktivasyon faktörü (ATAF) ve fınca şeklinde kotiledon (CUC) olarak adlandırılan üç genin kısa bir formudur. NAC TF'nin cis-elementi [NAC tanınan dizi (NACRS)] *Arabidopsis*'te de tanımlanmıştır (Xiong ve ark., 2005). TaNAC2 ve TaNAC69 genleri, buğday mahsulünde kuraklık ve tuzluluk koşullarında yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir (Tran ve ark., 2004; Mao ve ark., 2014). Ayrıca OsNAC045, OsNAC6/SNAC2 ve SNCA1'in aşırı ekspresyonunun, transgenik pirinçte ABA duyarlılığını teşvik ettiği ve kuraklık toleransı sağladığı bildirilmiştir (Lu ve ark., 2015). Bu nedenle NAC TF'ler, abiyotik stres koşulları altında başarılı bitki çoğalması için fizyolojik adaptasyonda vazgeçilmez bir rol oynamaktadır.

Kuraklık stres tepkisinde rol oynayan ABA'dan bağımsız transkripsiyon faktörlerinden çinko parmak homeodomain (ZFHD) proteinleri transkripsiyon faktörleri (TF'ler) ailesi, bitki büyümesini ve gelişimini düzenlemede çok önemli bir rol oynamaktadır (Nai ve ark., 2020). *Arabidopsis*'teki ZFHD1'in dehidrasyon stresine erken yanıt 1 (ERD1) promotöründeki ZFHD tanıma dizisine bağladığı ve böylece kuraklık stresine yanıt olarak bir transkripsiyonel aktivatör olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Tan ve Irish, 2006; Tran ve ark., 2007; Estrada-Melo ve ark., 2015; Phuong ve ark., 2015).

1.1.2.4.1.2.3 MYB/MYC Ailesi

Bitkilerde abiyotik strese bağlı artan ABA miktarı ile MYC ve MYB TF'leri abiyotik strese duyarlı genlerin yukarı regülasyonu için ABA'ya bağımlı stres sinyalleme yoluna katılmaktadır (Tesfa, 2022). MYB TF'ler, bir ila üç kusurlu tekrarlanan amino asit dizisi (R1, R2 ve R3) ile farklılaşan, MYB alanı adı verilen korunmuş bir DBD'ye sahiptir (Paz-Ares ve ark., 1987). Mısır bitkisiyle yapılan bir başka çalışmada kuraklık stresi altında ZmMYB-R1 geninin indüklendiği gösterilmiştir (Yanhui ve ark., 2006). Pirinç bitkisi ile yapılan bir çalışmada OsMYB3R-2, OsMYB4 ve OsMYB48-1 genlerinin aşırı ekspresyonunun transgenik bitkilerde kuraklık ve diğer streslere karşı adaptif tepkiyi

geliştirdiği bildirilmiştir. Buğday ile yapılan bir başka çalışmada ise TaMYB3R1 ve TaMYB30-B kuraklığa adaptasyonda potansiyel rol oynadığı bulunmuştur (Liu ve ark., 2012). *Arabidopsis thaliana* ile yapılan bir başka çalışmada ise kuraklık stresine duyarlı RD22 geninin uyarılmasına ABA aracılık ettiği bildirilmiş ve AtMYC2 (RD22BP1-MYC transkripsiyon faktörü) ve AtMYB2'nin (MYB transkripsiyon faktörü), sırasıyla RD22 promoterindeki cis-elementler olan MYCRS (MYC tanıma dizisi) ve MYBRS'ye (MYB tanıma dizisi) bağlanarak RD22 geninin ekspresyonunu birlikte aktive ettiği gösterilmiştir (Abe ve ark., 1997; Singh ve Laxmi 2015).

1.1.2.4.1.2.4 bZIP (AREB/ABF) Ailesi

Temel lösün fermuarı (bZIP) ailesi, hormon ve şeker sinyali ve organ gelişimi gibi çeşitli işlevlerde rol alan bir başka büyük TF grubudur (Wang ve ark., 2013). bZIP proteinleri genellikle DNA bağlanması için temel bir bölüm ve korunmuş bir lösün fermuar dimerizasyon motifi içermektedir (Zhang ve ark., 2015). Kuraklık stres tepkisi ile ilgili olarak, ABA'ya bağımlı stres sinyallerinin iletilmesinde ABRE bağlama proteinleri (AREB'ler) veya ABRE bağlama faktörlerinin (ABF'ler) transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzeyde yanıt vererek kuraklık stresi toleransını artırmaktadır (Choi ve ark., 2000; Jakoby ve ark., 2002). AREB veya ABF'ler, ABRE motifine bağlanan ve ABA'ya bağımlı gen ekspresyonunu aktive eden bZIP (temel lösün fermuarı) TF'leridir ve ilk olarak bir maya tek hibrit taramasında izole edilmiştir (Jakoby ve ark., 2002). Kuraklık stresi altında iki ABRE motifinin, ABA'ya bağlı gen ekspresyonunda RD29B gen ifadesini kontrol eden önemli cis-etkili element olduğu bulunmuştur (Yang ve Tan, 2014; Nakashima ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda filogenetik ağaçlar ve DNA bağlama motifleri incelenerek elde edilen sonuçlara göre arpa, pirinç, buğday ve mısırdaki çeşitli bZIP proteinlerinin abiyotik strese katkıda bulunduğu ortaya çıkmıştır. Kuraklık stresi koşullarında arpada 11 HvbZIP üyesi aşağı veya yukarı eksprese olurken, mısır - ZmbZIP37, pirinç - OsbZIP12 ve buğday - TabZIP60'da yüksek ekspresyonu kuraklık ve toleransını arttırmıştır. Benzer şekilde TabZIP60'ın aşırı ekspresyonu, transgenik *Arabidopsis*'te kuraklık ve dona toleransı arttırmıştır (Wang ve ark., 2013).

1.1.2.4.1.3 Kuraklık Stres Yanıtında Ca^{2+} Sinyal İletim Yolu ve Düzenleme Mekanizmaları

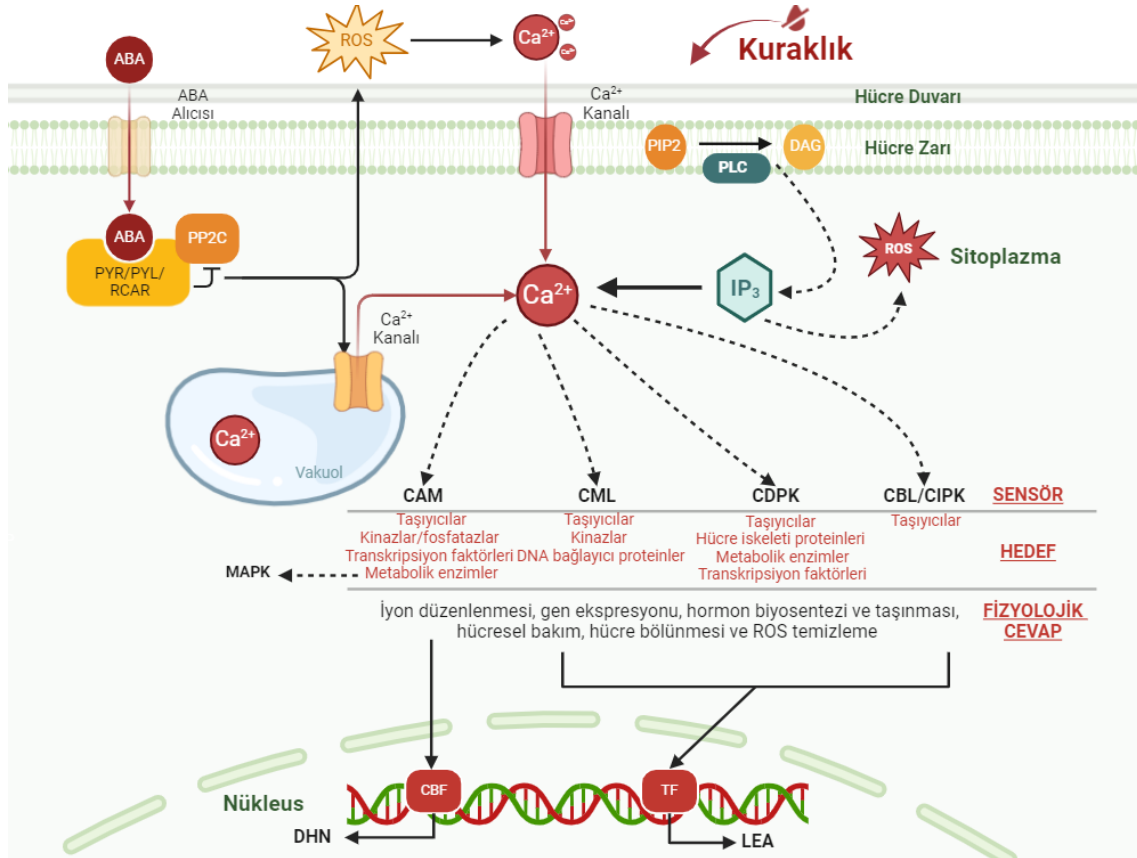
Bitkilerde esansiyel bir mineral element olan Ca^{2+} , hücre zarı ve hücre duvarı yapısının stabilitesinin korunmasında, hücre içi homeostazisinde, hücre yapısı ve fizyolojik fonksiyonlar açısından büyüme ve gelişmenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Case ve ark., 2007; Wang ve ark., 2012; Yang ve ark., 2021).

Bitkiler kuraklık stresi altında su kaybını azaltmak için stomaların kapanmasında rol oynayan ABA hormonunu sentezler. ABA, plazma zarı kalsiyum kanallarını çeşitli yollarla aktive eder ve hücre içi kalsiyum rezervuarlarını Ca^{2+} salımı için uyarır. Ca^{2+} , harici sinyalleri bitki hücrelerine ileten ve Ca^{2+} sensörleri aracılığıyla gen ekspresyonu gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenlemek için sinyalleri ileten ve stoma kapanması sürecinde rol oynayarak ozmotik stres yanıtında ikinci haberci olarak görev yapmaktadır (Case ve ark., 2007). Bekçi hücrelerinde kuraklığın neden olduğu hücre içi Ca^{2+} 'un geçici artışı stoma kapanmasını teşvik eder ve böylece bitki su kullanım verimliliğini artırır (Kim ve ark., 2010).

Kuraklık stres sinyali ilk olarak membran reseptörü tarafından algılanarak PLC'yi (fosfolipaz C) aktive eder. PLC, hücresel düzeyde temel olarak su Emilimi ve Çıkışından sorumlu olan plazma membranı içsel proteininin (PIP2- fosfoinositol-4,5-bisfosfat) diacylglycerol (DAG) ve inositol trifosfata (IP3) hidrolizini kataliz eder (Fotiadis ve ark., 2001). IP3 koruyucu hücrelerde Ca^{2+} konsantrasyonunu düzenleyen diğer ikinci habercidir. ABA, koruyucu hücrelerde IP3 konsantrasyonunu arttırırken IP3 de kalsiyum kanallarını aktifleştirir ve koruyucu hücrelerde Ca^{2+} konsantrasyonu artar. Bu durum iyon kanallarının birbirleriyle etkileşime girerek stoma kapanmasını teşvik eden bir dizi etki üretmesine neden olur (Li ve ark., 2006; McAdam ve Brodribb, 2014).

Ca^{2+} , protein reseptörleriyle etkileşime girerek hücre içi sinyal iletim sürecini başlatır (Kudla ve ark., 2010; Yang ve ark., 2021). Sitoplazmik Ca^{2+} seviyesindeki bu değişiklik, kinazlar ve/veya fosfatazlar gibi sinyal bileşenleriyle etkileşime giren kalsiyum sensörleri tarafından algılanır. Bitkilerde tanımlanan başlıca kalsiyum sensörleri, kalsiyuma bağımlı protein kinaz (CDPK), kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaM), kalsinörin B benzeri proteinler/ kalsinörin B-benzeri proteinler (CBL/CIPK), kalmodulin benzeri proteinler (CML) ve mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK)'dir (Şekil 1.22). Bu kalsiyum

sensörleri spesifik Ca^{2+} 'u tanıyarak transkripsiyon faktörleri ve gen ürünlerinin düzenlenmesinde rol alırlar. Bu proteinler, fizyolojik tepkilere yol açan başlıca strese duyarlı genlerin ifadesini etkiler bitkilerin kurak ortamda başarılı bir şekilde hayatta kalmasına olanak sağlar (Cheng ve ark., 2002; Liu ve Zhu, 1998; Sanders ve ark., 2002; Sopory ve Munshi, 1998; Pandey ve ark., 2000).



Şekil 1.22 Kuraklık stres yanıtında Ca^{2+} sinyal iletim yolu (Sun ve ark., 2021; Mahajan ve Tuteja, 2005; Yang ve ark., 2021; Defalco ve ark., 2010).

Mitojenle aktifleşen protein kinazlar (MAPK'ler), bitki büyümesinde, gelişmesinde, stres tepkisinde ve sinyal iletiminde rol oynayan önemli bir protein kinaz sınıfıdır. Aktive edilmiş MAPKK, transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve diğer proteinlerle etkileşimler yoluyla hücresel sinyal yanıtlarına neden olur (Yang ve ark., 2021).

Kalsiyuma bağımlı protein kinaz (CDPK'lar), fosforilasyon kademesi yoluyla gen ekspresyonunu ve ürün aktivitesini düzenlemektedir. Bu ürünler gen ekspresyonunun, enzim metabolizmasının, iyon ve su membranlar arası taşınmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Böylece bitkiler büyüme, gelişme ve stres direnci değişiklikleri gibi

makroskobik değişiklikler göstermektedir. Ca^{2+} sinyali ayrıca kuraklık stresine geç yanıtta yer alan CDPK aracılığıyla LEA (geç embriyogenez) proteini gibi bitki koruyucu proteinlerin ekspresyonunu düzenler ve sonuçta bitkilerin kuraklığa direncini artırır (Yang ve ark., 2021). Yapılan bir çalışmada CDPK'lerin, abiyotik stresle ilişkili birçok yola yanıt olarak TF'leri fosforile ettiğini bildirmiştir (Atif ve ark., 2019). Bir başka çalışma, buğdayda (*Triticum aestivum* L.) TaCDPK9-1'in, TabZIP 8, TabZIP 9 ve TabZIP 13'ü aktive ettiğini ve tuz stresi altında ABA sentezini ve birikimini düzenlediğini bildirmiştir (Zhang ve ark., 2020). Arabidopsis CPK4, CPK11 ve CPK32 kinazlarının ABF1 ve ABF4 gibi ABA'ya yanıt veren bZIP TF'leri fosforile ederek ABA sinyallemesinde yer alan Ca^{2+} 'yı pozitif olarak düzenlediği bulunmuştur (Choi ve ark., 2005; Zhu ve ark., 2007). Bu transkripsiyon faktörleri, hedef genlerin cis-etkili düzenleyici elemanlarına bağlanarak abiyotik strese karşı toleransını desteklediği bulunmuştur (Zhu ve ark., 2007).

Kalsinörin B benzeri proteinler (CBL'ler), kalsiyum sinyalinin rol oynayarak stres tepki mekanizmasını başlatmak için CIPK'ler ile birleşir (Tang ve ark., 2020). Abiyotik stres altında farklı CBL ekspresyonu, bu genin kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık ve ABA gibi çeşitli stres faktörlerine verilen yanıtlarda rol oynadığını göstermektedir. Son araştırmalar, CBL'lerin kuraklık ve tuz stresine maruz kalan transgenik pirinç fidelerinde farklı şekilde eksprese edildiğini göstermiştir (Jiang ve ark., 2020). Başka bir çalışmada yapılan ekspresyon analizi OsCBL5, OsCBL6 ve OsCBL7'nin pirinçte kuraklık toleransını arttırdığını göstermiştir (Liu ve ark., 2000; Liu ve Zhu, 1998). TaCIPK27'yi ektopik olarak aşırı eksprese eden ve kuraklık stresine maruz kalan Arabidopsis'te, ABA sinyallemesiyle ilgili RD29B ve SnRK2'ler ve kuraklık stres tepkisinde yer alan DREB genleri önemli ölçüde ekspresyonu artmış ve bu durumun kuraklık toleransını geliştirdiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2018).

Kalmodulin benzeri proteinleri (CML'ler) bitkilerde yaygın bir Ca^{2+} reseptörü olan EF el yapısına sahiptir (Ogunrinde ve ark., 2017). Arabidopsis'teki 50 CML'den CML20, dehidrin ekspresyonunu ve ABA'nın indüklediği stoma hareketini negatif olarak düzenlediği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada kuraklık stresinin bir CML20 mutantında RAB18, ERD10, COR47 ve RD29A gibi stres yanıt genlerinin ekspresyonun arttırdığı gösterilmiştir (Wu ve ark., 2017).

Kalmodulin bağımlı proteinler (CaM'ler) kinaz aktivitesinden yoksundur. Moleküler konformasyonları değiştirmek ve çeşitli proteinleri aktive etmek için Ca^{2+} ile kompleks oluşturmaları gerekmektedir (Li ve ark., 2019). Kalmodulin bağlayıcı transkripsiyonel aktivatör (CAMTA) ailesi, bZIP ve MYB ailelerindeki çeşitli TF'lerini içermektedir. DNA bağlama alanları içeren CAMTA'lar stres sinyallerinden ve ABA'dan etkilenen genlerin ekspresyonunu düzenlemek için CaM'larla etkileşime girerler (Jain ve ark., 2018; Yoo ve ark., 2005). Arabidopsis'te CaM3'ün aşırı ekspresyonunu RD29A'yı baskıladığı bildirilmiştir (Townley ve Knight, 2002).

1.1.2.4.2 Kuraklık Stresi Altında Gen İfadesi ve Gen Ürünlerinin Düzenleme Modelleri

Bitkilerin kuraklık stresine karşı geliştirdiği önemli adaptasyon mekanizmalarından biri, su stresi koşullarında ifade edilen ve hücre metabolizmasının yeniden düzenlenmesinde veya korunmasında rol oynadığı düşünülen proteinlerdir. Bu stres koşullarında sentezlenen kuraklıkla ilişkili proteinler, bitkilerin kuraklığa adaptasyon süreçlerinde koruyucu görev üstlenerek tolerans düzeylerinin artmasına katkı sağlamaktadır.

Kuraklık stresi altında indüklenen genler, metabolik proteinlerin üretimini tetikleyerek hücreleri su yetersizliğine karşı korurken, aynı zamanda stres yanıtında görev alan sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Bu gen ürünleri işlevlerine göre iki temel gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.23).

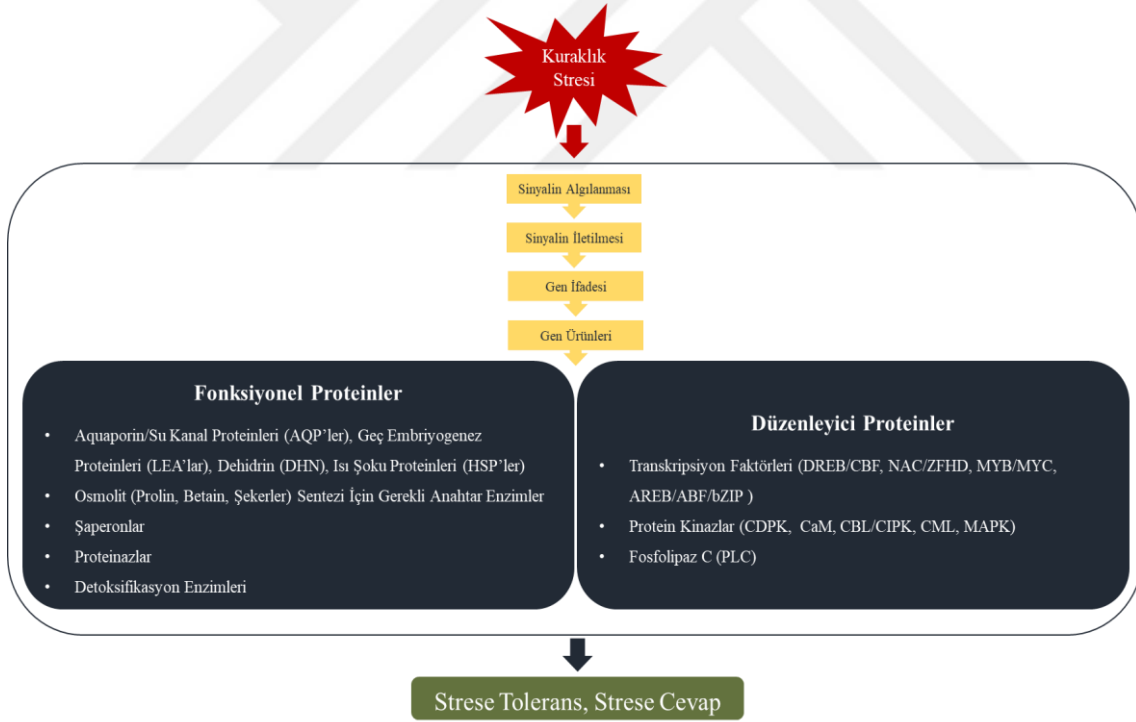
1. Fonksiyonel proteinler: Kuraklık stresine doğrudan yanıt oluşturan ve hücresel düzeyde koruyucu etki gösteren proteinlerdir. Bu grupta yer alan başlıca proteinler şunlardır:

- **Aquaporinler (AQP):** Hücre zarında su taşınımını düzenleyen su kanal proteinleridir.
- **Geç embriyogenezele ilişkili proteinler (LEA):** Hücre içi su kaybını önleyerek protein ve membran yapılarını stabilize eder.
- **Dehidrinler (DHN):** Hücresel kuruluğa karşı koruma sağlar, özellikle su eksikliği durumunda hücre içi yapıları stabilize eder.
- **Isı şoku proteinleri (HSP):** Proteinlerin katlanması, taşınması ve onarımında görev alarak hücresel bütünlüğü korur.

- **Osmolit sentezinde görevli anahtar enzimler:** Prolin, betain ve çeşitli şekerlerin sentezini sağlayarak hücre içi osmotik dengeyi destekler.
- **Şaperonlar, proteinazlar ve detoksifikasyon enzimleri** de bu gruba dahil edilerek hücresel hasarı sınırlayan çeşitli işlevleri yerine getirir.

2. Düzenleyici proteinler: Bu grup, kuraklık stresine karşı gen ekspresyonunun kontrolü ve sinyal iletimi süreçlerinde görev alan düzenleyici proteinleri içerir. Başlıca bileşenler şunlardır:

- **Transkripsiyon faktörleri:** DREB/CBF, NAC, ZFHD, MYB/MYC, AREB/ABF, bZIP gibi faktörler, stresle ilişkili genlerin aktivasyonunda görev alır.
- **Protein kinazlar:** CDPK, CaM, CBL/CIPK, CML ve MAPK gibi kinazlar, hücre içi sinyal iletim yollarını düzenler.
- **Fosfolipaz C (PLC):** Hücresel sinyal iletiminde görevli bir başka önemli düzenleyici proteindir.



Şekil 1.23 Kuraklık stresine karşı cevap ve toleransta indüklenen gen ürünleri: fonksiyonel proteinler (kuraklık toleransı ve hücresel adaptasyonda rol oynayan) ve düzenleyici proteinler (stres yanıtında, gen ekspresyonunda ve sinyal iletiminde işlev gören).

Kuraklık stresine karşı bitkilerin verdiği tepkilerde özellikle aquaporinler, LEA proteinleri, dehidrinler, ısı şoku proteinleri ve osmolit sentezinde görevli enzimler, işlevsel proteinler arasında öne çıkan başlıca bileşenlerdir.

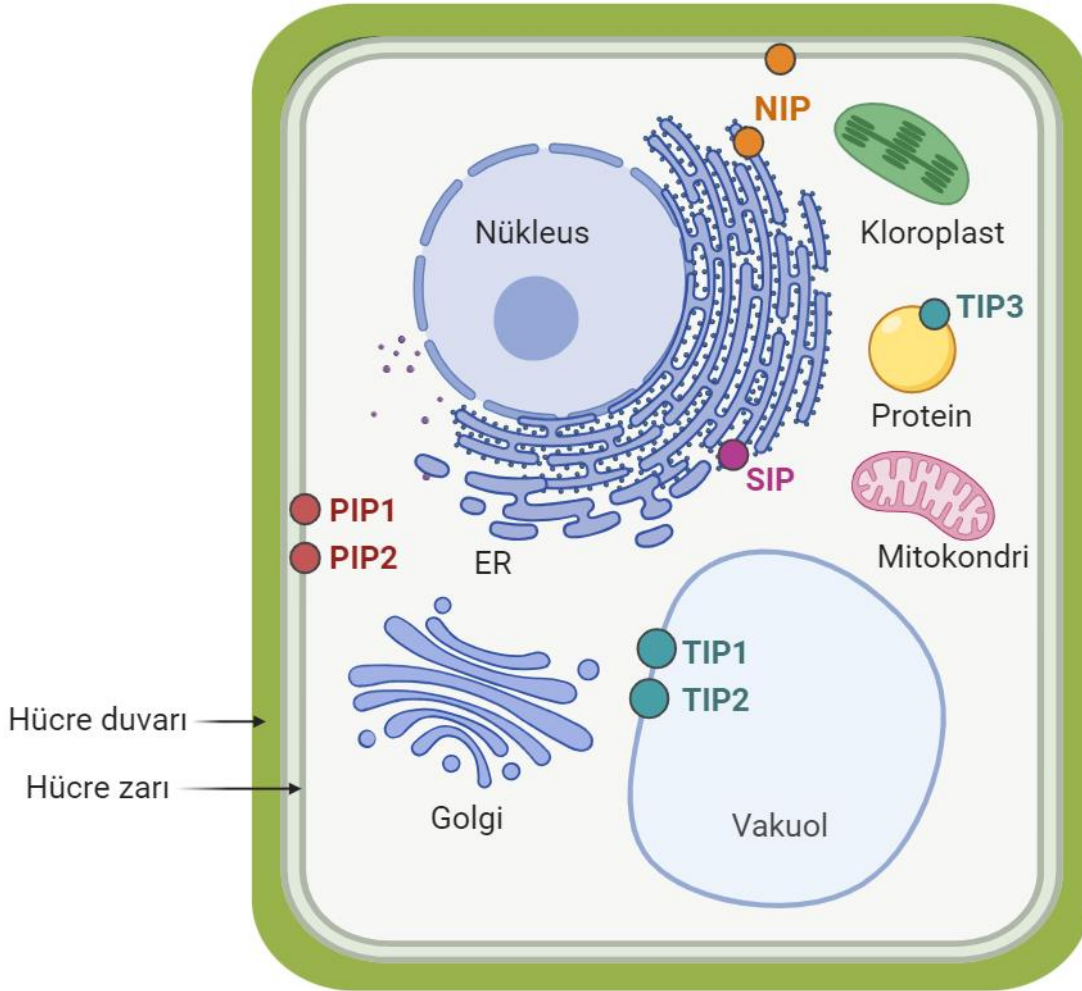
1.1.2.4.2.1 Su kanal Proteinleri/ Aquaporin (AQP)

Aquaporin/Su kanal Proteinleri (AQP), 26 kD ila 30 kD arasında değişen, suyu spesifik olarak taşıyan ve hücre altı seviyede esas olarak hücre zarı, vakuol zarı, endoplazmik retikulum zarı, kloroplast zarı ve mitokondriyal zar gibi zar sistemlerinde bulunan major içsel proteinleri (MIP) ailesine ait protein sınıfıdır (Tyerman ve ark., 2002; Johanson ve ark., 2001; Maurel ve ark., 2009; Wudick ve ark., 2009). AQP, kök epidermisi, dış korteks ve endodermis hücreleri, ksilem parankim hücreleri, floemle ilişkili hücreler ve stoma bekçi hücreleri gibi çok fazla su akışına ihtiyaç duyan doku ve organlarda yüksek oranda eksprese edilmektedir (Otto ve Kaldenhoff, 2000; Javot ve Maurel, 2002; Liu ve ark., 2008; Gattolin ve ark., 2011). AQP'nin fizyolojik işlevi, ekspresyon süresi ve konumu ile yakından ilişkilidir (Şekil 1.24). Genel işlevleri tohumun olgunlaşması ve çimlenmesi, kök büyümesi, polen ve ovül gelişimi, yaprak uzaması ve hareketi, hücre uzaması ve taç yaprağı genişlemesi gibi bir dizi fizyolojik süreci kapsamaktadır (Liu ve ark., 2008; Gattolin ve ark., 2011).

Amino asit dizilimleri ve yapısal özelliklerine dayalı olarak bitkilerdeki aquaporin (AQP) ailesi dört ana gruba ayrılmaktadır: plazma membranı içsel proteinleri (PIP'ler), tonoplast içsel proteinleri (TIP'ler), nodulin 26 benzeri içsel proteinler (NIP'ler) ve küçük içsel proteinler (SIP'ler) (Johanson ve ark., 2001). Bu sınıflar arasında PIP'ler, esas olarak plazma zarında yer almakta olup, N-terminal ve C-terminal bölgeleri arasındaki homoloji farklılıklarına göre PIP1, PIP2 ve bazı türlerde PIP3 olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır. Hücresel düzeyde PIP'ler, suyun hücreye alımı ve dışarı taşınımından sorumludur. Ayrıca, PIP'lerin karbon dioksit ve üre gibi bazı küçük nötr molekülleri de taşıdığı bilinmektedir (Katsuhara ve ark., 2008). TIP'ler, vakuolar zar (tonoplast) üzerinde lokalize olan önemli aquaporin alt gruplarından biridir. Farklı doku lokalizasyonlarına ve görevlerine göre TIP α , TIP β , TIP γ , TIP δ ve TIP ϵ olmak üzere beş alt gruba ayrılmaktadır (Fotiadis ve ark., 2001). Bu proteinler, turgor basıncının düzenlenmesinde görev alarak hücre bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamaktadır. Ayrıca üre, amonyak, gliserol ve hidrojen peroksit gibi moleküllerin taşınımında da rol

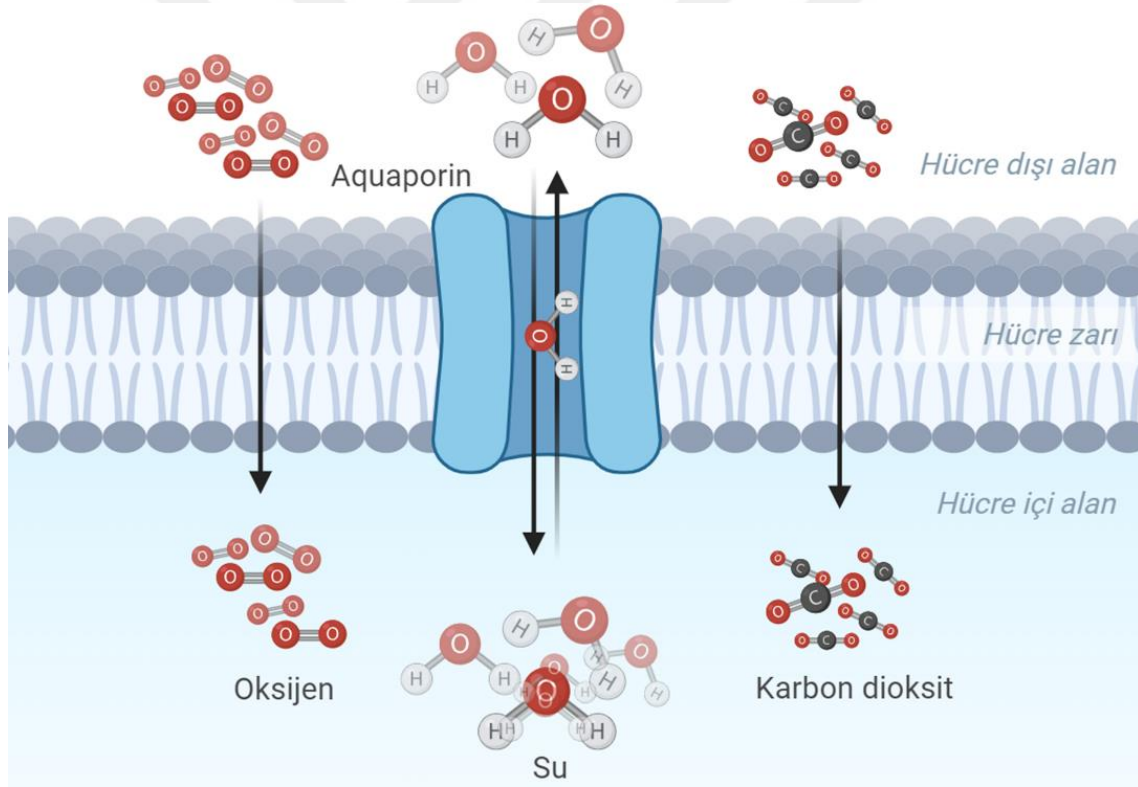
oynamaktadırlar (Katsuhara ve ark., 2008). NIP'ler, NOD26 adlı ilk üyesi ile tanımlanmış olup, suya ek olarak çeşitli küçük moleküllerin taşınmasında görev almaktadır. Bu moleküller arasında amonyak, üre, gliserol, bor, silikon, laktat ve arsenit yer almaktadır (Rougé ve Barre, 2008; Katsuhara ve ark., 2008). SIP'ler ise bitkilerde tanımlanan en küçük AQP ailesidir ve esas olarak endoplazmik retikulum zarında bulunurlar (Ishikawa ve ark., 2005; Mitani-Ueno ve ark., 2011). Bu proteinlerin fonksiyonları henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, hücre içi su dengesi ve zar dinamiklerinin düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir.

Akuaporinler, yalnızca su taşıyıcıları olarak değil, aynı zamanda fotosentez, mineral besin emilimi, hücre içi sinyal iletimi ve çevresel stres yanıtları gibi çok çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan önemli membran proteinleridir (Yang ve ark., 2021).



Şekil 1.24 Çeşitli organel zarlarında lokalize bitki akuaporinlerinin şematik diyagramı (Katsuhara ve ark., 2008).

AQP'ler hücre içi ve dışındaki su potansiyelini dengeleyerek suyun hücreye giriş ve çıkışını sağlayan ana yoldur (Şekil 1.25). Bitkilerde suyun membran arası taşınması sırasında karşılaşılan direnci azaltarak membran arası su taşınımını teşvik eder ve su potansiyeli gradyanı boyunca hücreler arasında su göçü hızını hızlandırır. Yapılan bir çalışmada AQP'lerin membranların hidrolik iletkenliğinin düzenlenmesinde ve su geçirgenliğinin artmasında on ila yirmi kat artış sağladıkları gösterilmiştir (Maurel ve Chrispeels, 2001). Yapılan başka çalışmalar AQP'in bitki kök hücrelerindeki hücre zarında, suyun %70~%90'ını düzenleyebildiğini ayrıca birçok bitkide, damar demetlerinde ve bitişik dokularında AQP ekspresyonunun yüksek olduğu göstermektedir (Yamada ve ark., 1995; Kaldenhoff ve ark., 1995). AQP'in ksilem parankim hücrelerinde terleme sırasında su potansiyeli dengesini koruduğu da bildirilmiştir (Netting, 2000).



Şekil 1.25 Aquaporin ve su molekülünün iletimi.

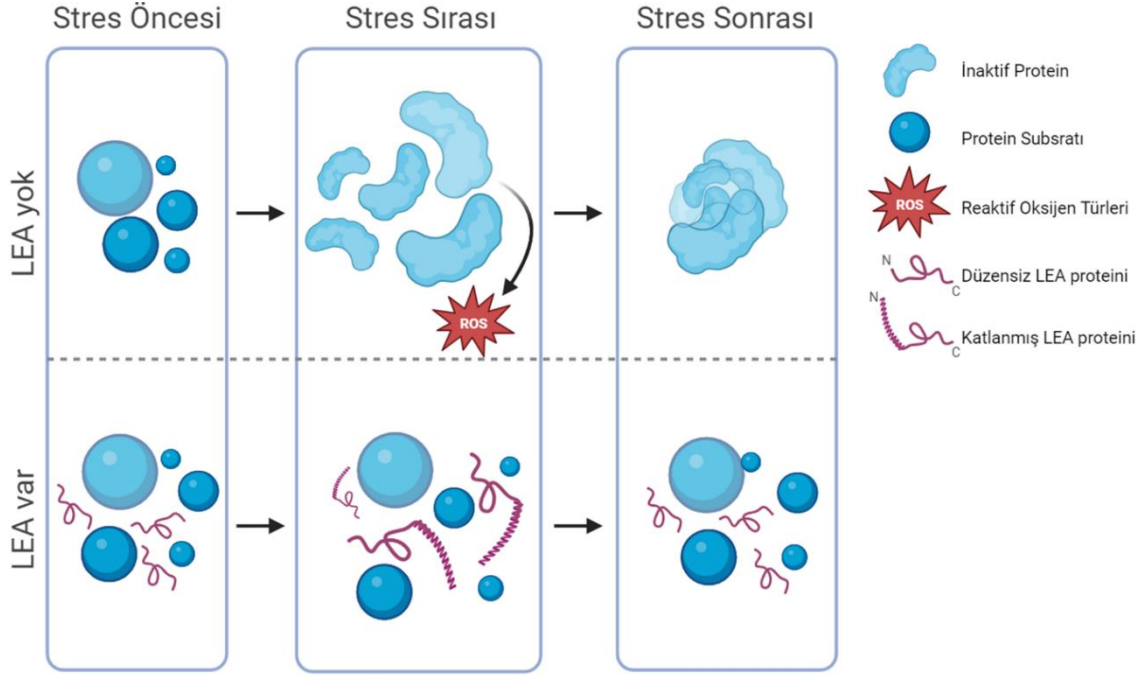
Plazma ve vakuol zarlarında yer alan su-seçici akuaporin proteinlerinin birikimi ile fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarla aktivitelerinin düzenlenmesi, su sıkıntısının yaşandığı koşullarda bitkilerin hücre içi, hücreler arası ve dokular arası su

dağılımını etkin bir şekilde gerçekleştirmesinde önemli rol oynamaktadır (Schäffner, 1998; Chrispeels ve ark., 1999; Kalefetoğlu ve Ekmekci, 2005; Afzal ve ark., 2016).

1.1.2.4.2.2 Geç Embriyogenez Bol Protein (LEA)

Geç embriyogenez bol proteini (LEA), çoğu 10 ila 30 kD arasında ve birkaçı 30 kD'nin üzerinde olan lizin ve glisin açısından zengin dehidre edici koruyucu bir proteindir (Bies-Etheve ve ark., 2008). Çoğu LEA proteini yüksek oranda polar amino asit içermektedir. Bu nedenle yüksek hidrofilikliğe sahip olan LEA proteinleri, çok sayıda su molekülünü bağlayarak bitkilerin şiddetli dehidrasyon koşulları altında nispeten stabil bir durumda kalmasını sağlamaktadır (Soulages ve ark., 2003; Ingram ve Bartels, 1996). Ayrıca protein ve membran kararlılığının devamlılığının sağlanması, kademeli iyon geçişinin korunması ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinin azaltılarak stres altında bitki gelişiminin arttırılması gibi başka fonksiyonlara da+ sahiptirler (Hossain ve ark., 2014).

Çoğu LEA proteini bazı korunmuş diziler içermektedir. Bu diziler stres koşullarında yüksek sarmal katlanmalar oluşturabilmekte ve bu yapı bazı denatüre proteinlerin membran sistemi ile hidrofobik etkileşime girmesinde rol oynamaktadır (Şekil 1.26). Oluşturulan bu yüksek sarmal katlanmalar LEA proteinlerinin “moleküler kalkan” veya şaperonlara benzer bir rol oynayarak abiyotik stres altında bitkilerde protein agregatlarının oluşumunu azaltmaktadır (Nguyen ve ark., 2020; Hanin ve ark., 2011; Hand ve ark., 2011; Veeranagamallaiah ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada *Polypedilum vanderplanki*'den gelen bir grup LEA3 proteini PvLEA4, a-kazein agregasyonunu azaltarak moleküler bir kalkan görevi gördüğünü belirtilmiştir (Hatanaka ve ark., 2013). *Medicago truncatula* ile yapılan bir başka çalışmada MtPM25'in, kuraklık ve soğuk stresleri altında suda çözünen proteinlerin agregasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Boucher ve ark., 2010). Ayrıca bir dizi LEA proteini, hücrel enzimatik kararlılığın sağlanması için laktat dehidrojenaz (LDH), malat dehidrojenaz (MDH), sitrat sentaz, fumaraz ve rodanez gibi önemli metabolik enzimlerini kuraklık ve soğuk streslerinden koruduğu bildirilmiştir (Grelet ve ark., 2005; Reyes ve ark., 2005).



Şekil 1.26 LEA proteinlerinin şaperon benzeri fonksiyon modeli.

Kuraklık stresine karşı bitkilerde önemli işlevlere sahip olan LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteinlerinin bir diğer temel görevi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) temizlenmesidir. Olumsuz çevresel koşullar altında, güçlü oksidatif özelliklere sahip ROS birikimi, hücre zarları ve protein yapıları üzerinde ciddi hasarlara yol açabilmektedir. LEA proteinleri, bu oksidatif stresin etkilerini hafifletme kapasitesi sayesinde bitkilerin stres koşullarında hayatta kalmalarında önemli bir koruma mekanizması oluşturur.

Liu ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, *Boea hygrometrica* bitkisinden izole edilen *LEA1* ve *LEA2* genleri, transgenik *Nicotiana tabacum* bitkisine aktarılmış ve bu transgenik bitkilerde süperoksit dismutaz (SOD) ile peroksidaz (POD) enzim aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda yaprak su içeriği artmış ve protein stabilitesi iyileşmiştir; bu da LEA proteinlerinin hem antioksidan savunmada hem de hücresel su dengesinin korunmasında etkili olduğunu göstermektedir.

LEA proteinleri yalnızca fonksiyonel antioksidan görevler üstlenmekle kalmaz, aynı zamanda lipid membranlarla etkileşime girerek membran stabilitesini sağlar ve büyük miktarda su kaybını önler. Bu özellikleri sayesinde hücre içi metabolizmayı dış ortam koşullarının zararlı etkilerinden korur. Koag ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan araştırmalar, LEA proteinlerinin membran yapıları ile etkileşimlerini doğrulamıştır. Hara

ve arkadaşları (2003), tütünde *CuCOR19*'un aşırı ekspresyonunun lipid membran peroksidasyonunu inhibe edebildiğini göstermiştir. Benzer şekilde, Thalhammer ve arkadaşları (2010), *Arabidopsis* bitkisinde LEA proteinlerinden COR15A ve COR15B'nin kuraklık koşullarında lipid membranlara bağlanarak koruyucu bir rol oynadığını ortaya koymuştur.

LEA genlerinin çoğu, promotör bölgelerinde absisik asit (ABA) yanıt elemanları taşımaktadır. Bu nedenle, kuraklık stresine yanıt olarak ABA seviyesinin artması, LEA gen ekspresyonunun da artmasına yol açmaktadır (Hundertmark ve Hinch, 2008). Nitekim bazı LEA genlerinin aşırı ekspresyonu, bitkilerde kuraklık toleransının artırılmasında etkili olmaktadır. Wang ve arkadaşları (2009), buğdaydan izole edilen *TaLEA3* geninin *Leymus chinensis* bitkisine aktarımı sonucunda kuraklığa karşı toleransın anlamlı şekilde arttığını rapor etmiştir.

1.1.2.4.2.3 Dehidrin (DHN)

LEA-II ailesinin bir üyesi olan dehidrin (DHN), yaklaşık 9-200 kDa moleküler ağırlığa sahip, yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan, geç embriyogenez sırasında üretilen, eksojen ABA'ya yanıt veren, glisin ve lisin açısından zengin, sistein ve triptofan içermeyen, oldukça hidrofilik bir proteindir. DHN proteini sabit bir üç boyutlu yapıya sahip olmayan, yapılandırılmamış ve düzensiz bir protein formuna sahiptir (Allagulova ve ark., 2003; Battaglia ve ark., 2008). Tipik olarak kuraklık, tuz ve hücre dışı soğuk stresi altında vejetatif dokularda birikmektedirler (Close, 1996; Zhang ve ark., 2018). DHN regülasyonu hem ABA'ya bağımlı (ABRE) hem de ABA'dan bağımsız (DRE) sinyal yolları tarafından kontrol edilmektedir (Liu ve ark., 2011; Yu ve ark., 2018).

Kuraklık stresi sıklıkla bitkilerde hücrel duygun azalmasına bağlı olarak membran lipid çift katmanlarının yüzeyindeki hidrasyon koruma sistemini yok eder, membran lipid çift katmanları arasındaki boşluğu azaltır ve membran füzyonuna ve membran yapısının ciddi şekilde tahrip olmasına neden olur (Allagulova ve ark., 2003). DHN proteini, yüksek hidrasyon yeteneğinden dolayı membran lipidlerine bağlanarak hücrelerde aşırı su kaybının önlenmesinde, membran yapısındaki hidrasyon koruma sisteminin korunmasında, membran lipid çift katman aralığının azalmasının önlenmesinde ve böylece membran füzyonunu ve biyofilm yapısının tahrip olmasının önlenmesinde rol oynamaktadır (Hara ve ark., 2001; Joshi ve ark., 2016).

DHN'ler, proteinlerin bozulmadan korunması ve denatüre ya da hasar görmüş proteinlerin uzaklaştırılmasında işlev gören proteinazlara yardımcı olarak diğer proteinler veya yapılar için koruyucu bir ortam oluşturmaktadır (Close, 1996). Dehidrin ayrıca oluşturduğu amfipatik sarmal ile kısmen denatüre proteinin hidrofobik noktasına bağlanabilir ve proteinin daha fazla denatüre olmasını önlemek için moleküler bir şaperon olarak görev alır (Mahajan ve Tuteja, 2005). Ayrıca hücrel dehidrasyon sırasında su bağlama kapasitesini arttırarak yoğunlaşan iyonların tutulmasında da önemli rol oynamaktadır (Gorantla ve ark., 2006).

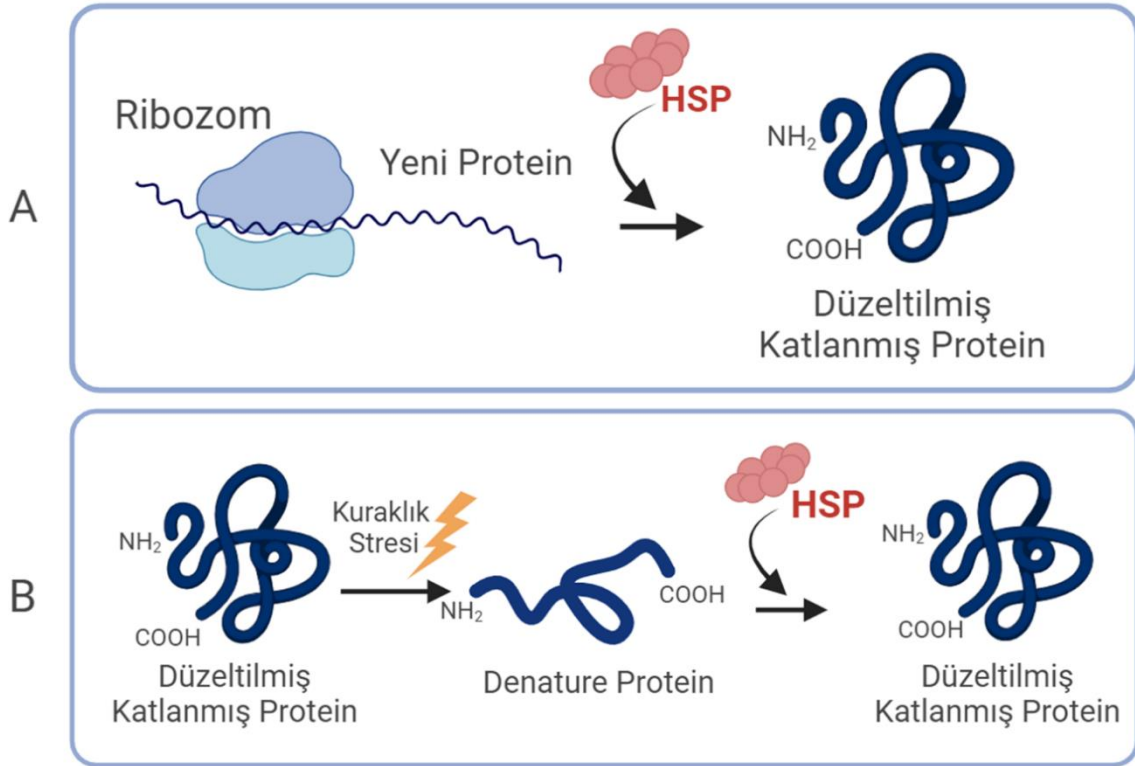
Bitkilerin strese karşı tepkilerine odaklanan bir dizi fizyolojik çalışmada, DHN gen ve protein oluşumu ile bitki kuraklık stresine adaptasyonu arasında pozitif bir korelasyon ortaya çıkmıştır (Hundertmark ve Hinch, 2008). Karami ve arkadaşları (2013), kuraklık stresi altında arpa yaprağında çeşitli dehidrin tipi proteinlerin (YnSKm-Dhn1, Dhn3, Dhn5, Dhn7 ve Dhn9) indüklendiğini bildirmiştir. Ayrıca *Hordeum vulgare*'da bulunan HVA1 geninin, transgenik mısırdaki kuraklığa karşı tolerans sağladığı gösterilmiştir (Nguyen ve Sticklen 2013).

Kuraklığa toleranslı çeşitlerin veya genotiplerin, daha az toleranslı çeşitlere göre daha yüksek DHN transkriptleri ve protein içeriğine sahip olduğu bulunmuştur (Kosová ve ark., 2019). *Triticum boeoticum*'dan gelen buğday DHN geni WDHN13'ün, kuraklık koşulları altında başka bir toleranslı çeşitteki (Sirvan) ve diğer yabani türlerdeki seviyelerle karşılaştırıldığında yüksek bir ekspresyon seviyesi sergilediği bildirilmiştir (Mehrabad Pour-Benab ve ark., 2019). Kuraklığa karşı farklı toleransa sahip iki arpa çeşidinde yapılan bir çalışmada, bitkiler azalan tarla nemine maruz bırakıldığında düşük moleküler dehidrinlerde hem niceliksel hem de niteliksel farklılıklar bulunmuştur (Škodáček ve Prášil, 2011).

Hara ve arkadaşları (2004), *Citrus reticulata*'daki dehidrin CuCOR19'un hidroksil radikallerini ve hidrojen peroksiti temizleyebildiğini ve serbest reaktif oksijen radikallerinin bitkilere verdiği zararı azaltabildiğini bulmuştur. Dean ve arkadaşları (1997), turuncgil dehidrinini CuCOR19'daki toplam glisin, lizin ve histidin içeriğinin %40'ın üzerinde olduğunu bulmuştur. Bu nedenle LEA proteini, üç amino asit aracılığıyla serbest radikallerin bir kısmını temizleyerek bitkiler üzerinde koruyucu bir rol oynadığını bildirmiştir.

1.1.2.4.2.4 Isı şoku proteinleri (HSP)

Isı şoku proteinleri (HSP'ler), moleküler şaperonlar olarak görev yapmaktadırlar. Diğer proteinlerin yapısını stabilize etmede rolleri vardır. Düşük moleküler ağırlıklı HSP'ler genellikle yalnızca çevresel strese, özellikle de yüksek sıcaklığa tepki olarak üretilir (Wahid ve ark., 2007). Ancak birçok HSP'nin kuraklık, anaerobik koşullar ve düşük sıcaklıklar gibi farklı stresler tarafından indüklendiği bilinmektedir (Coca ve ark., 1994). Stres durumunun olmadığı koşullarda translasyon sonrası protein katlanması ve membran taşıma sisteminde görevli olan ısı şoku proteinleri, kuraklık ve sıcaklık gibi stres durumlarında denatüre olan proteinlerin kümeleşmesini engelleyerek, küme oluşturmuş proteinlerin yeniden fonksiyonel yapılarını sağlamalarında yardımcı olmaktadır (Dolferus, 2014). Isı şoku proteinlerinin fonksiyonları Şekil 1.27'de gösterilmektedir.



Şekil 1.27 Isı şoku proteinlerinin iki işlevi. A: Yeni proteinler üretilirken HSP'ler (ısı şoku proteinleri), proteinin fonksiyonel proteinlere katlanmasına yardımcı olur. B: Stresten sonra HSP aynı zamanda hasar görmüş veya denatüre olmuş proteinlerin yeniden katlanmasına veya bozulmasına da yardımcı olur. (Whitley ve ark., 1999).

1.1.2.4.2.5 Osmolit (Prolin, Betain, Şekerler) Sentezi İçin Gerekli Anahtar Enzimler

Ozmotik düzenleme, su potansiyeli azaldığında bölünen hücrelerde çözünen madde birikimi süreci olarak tanımlanır ve böylece turgorun korunmasına yardımcı olmaktadır (Chaves ve Oliveira, 2004). İnorganik katyonlar, organik asitler, karbonhidratlar ve serbest amino asitler su stresine yanıt olarak biriken maddelerdir (Sauter ve ark., 2001).

Önceki çalışmalar, kuraklık stresi altında verim stabilitesi gösteren kuraklığa dayanıklı buğday çeşitlerinin, daha az dirençli çeşitlere göre daha büyük bir osmoregülasyon kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (Serraj ve Sinclair, 2002). Prolin ve glisin betain gibi uyumlu çözünen maddelerin birikmesi, bitkilerin yalnızca ozmatik düzenleme yoluyla değil aynı zamanda ROS'un detoksifikasyonu, membran bütünlüğünün korunması ve enzimlerin veya proteinlerin stabilizasyonu yoluyla kuraklık stresinin zararlı etkilerinden korunmasına yardımcı olmaktadır (Ashraf ve Foolad, 2007). Betain aldehit dehidrojenaz (BADH), pirolin-5-karboksilat redüktaz (P5CR) ve ornitin δ -aminotransferaz (OAT) gibi enzimler ozmatik düzenlemede önemli roller oynamaktadır. Arabidopsis EDT1/HDG11'in aşırı ekspresyonunun, prolin ve çözünür şekerler gibi çözünen maddelerin birikiminin artması yoluyla kavak ve pamuğun kuraklık toleransını arttırdığı ve aynı zamanda tarladaki pamuk veriminin de arttırdığı gösterilmiştir (Yu ve ark., 2016). Önceki çalışmalar, tütündeki *Psathyrostachys huashanica*'dan gelen sükroz:fruktan-6-fruktoziltransferaz (6-SFT) geninin ve pirinçteki (*Oryza sativa*) trehaloz-6-fosfat fosfataz geni OsTPP1'in aşırı ekspresyonunun abiyotik stres toleransı kazandırdığını göstermiştir (Ge ve ark., 2008; He ve ark., 2015; Basu ve ark., 2016).

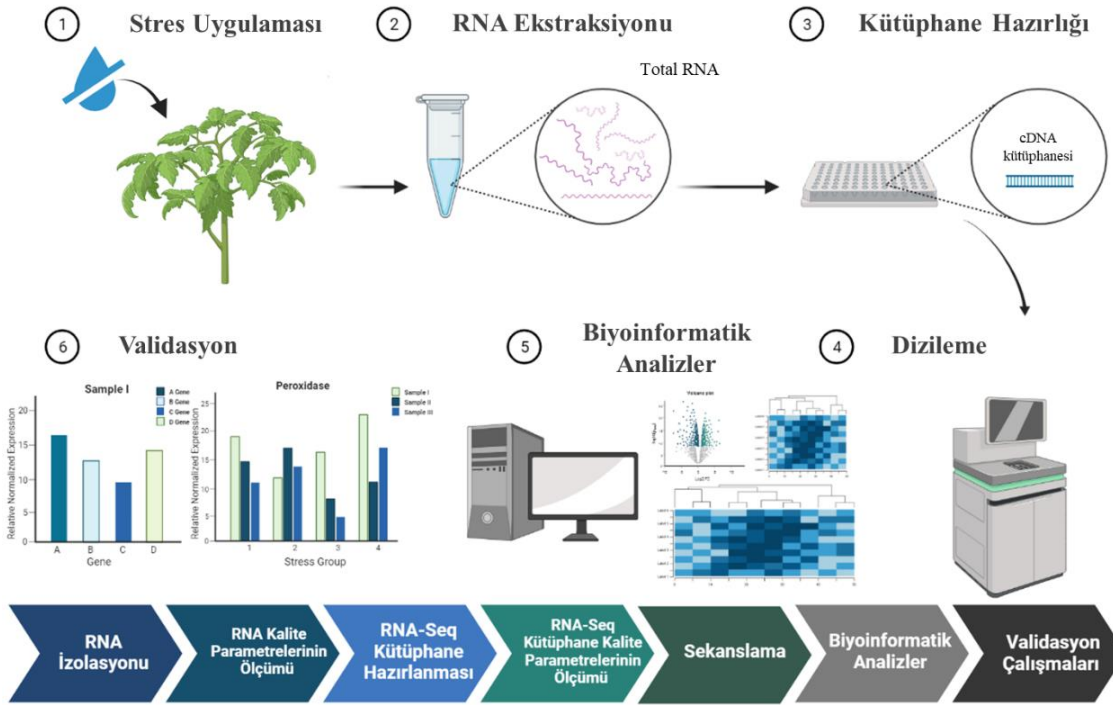
1.1.2.5 Bitkilerde Transkriptomik Yaklaşımlar

Transkriptom, mRNA (haberci RNA) ve nc-RNA'yı (kodlayıcı olmayan RNA) içeren, belirli bir fonksiyonel veya gelişim aşamasında belirli bir doku veya hücreden kopyalanan RNA moleküllerinin toplam sayısı olarak tanımlanmaktadır (Costa ve ark., 2010; Oszlak ve Milos, 2011; Martin ve Wang; 2011). Transkriptom dizilimi veya RNA dizilimi (RNA-Seq), yüksek çözünürlüklü, hassas ve yüksek verimli yeni nesil dizilemeyi kullanan bir transkriptom profil oluşturma teknolojisidir. RNA-Seq günümüzde, biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşenlerin mekanizmalarını anlamak, gen ontolojisini geliştirmek, yeni genleri tanımlamak ve bu genlerin fonksiyonel görevlerini tespit etmek,

transkriptomları yeniden yapılandırmak, diferansiyel gen ekspresyonlarını ve mRNA'ların diferansiyel eklenmesini analiz etmek için kullanılan önemli bir tekniktir (Tyagi ve ark., 2022).

Bu tekniğin günümüzde kullanımını arttıran en önemli özelliklerinden biri, model olmayan bitki türlerinde referans genom yokluğunda bir organizmanın veya bitkinin genel transkripsiyonel aktivitesini değerlendirmek için kullanılabilmesidir (Strickler ve ark., 2012). Ayrıca transkriptom, zaman ve mekan içinde değiştiğinden farklı zaman ve mekansal bölgelerdeki gen ekspresyonundaki farklılıklar hakkında bilgi elde etmek için de kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalara göre biyolojik olarak aktif bileşiklerin farklı bitki dokularında birikmesi, üretilme zamanının yanı sıra o dokunun gen ekspresyon düzeyine de bağlıdır. Bunun nedeni, bitkilerin aynı tür içinde bile farklı büyüme koşulları ve dönemlerine sahip olmasıdır. Sonuç olarak transkriptom, terapötik bitki bileşenleriyle ilgili genleri tanımlama açısından genomdan daha iyi performans gösterir (Wang ve ark., 2009).

RNA-Seq analizinde standart iş akışı; laboratuvarında RNA ekstraksiyonu ile başlamaktadır. Ardından ribozomal RNA'ların uzaklaştırılması, cDNA sentezi ve adaptör bağlanmış bir dizileme kütüphanesinin hazırlanması gelir. Kütüphane daha sonra yüksek verimli bir platformda (genellikle Illumina) numune başına 10-30 milyon okuma derinliğine kadar dizilenir. Sonrasında dizileme okumaları kalite kontrol analizinde listelenerek bir transkriptoma hizalama ve/veya birleştirme gerçekleştirilir. Sonrasında örnek grupları arasında bireysel genlerin ve/veya transkriptlerin ifade düzeylerindeki önemli değişikliklerin istatistiksel modellemesi yapılmaktadır (Stark ve ark., 2019). Aşağıdaki Şekil 28'de standart bir RNA-Seq iş akış şeması gösterilmektedir.

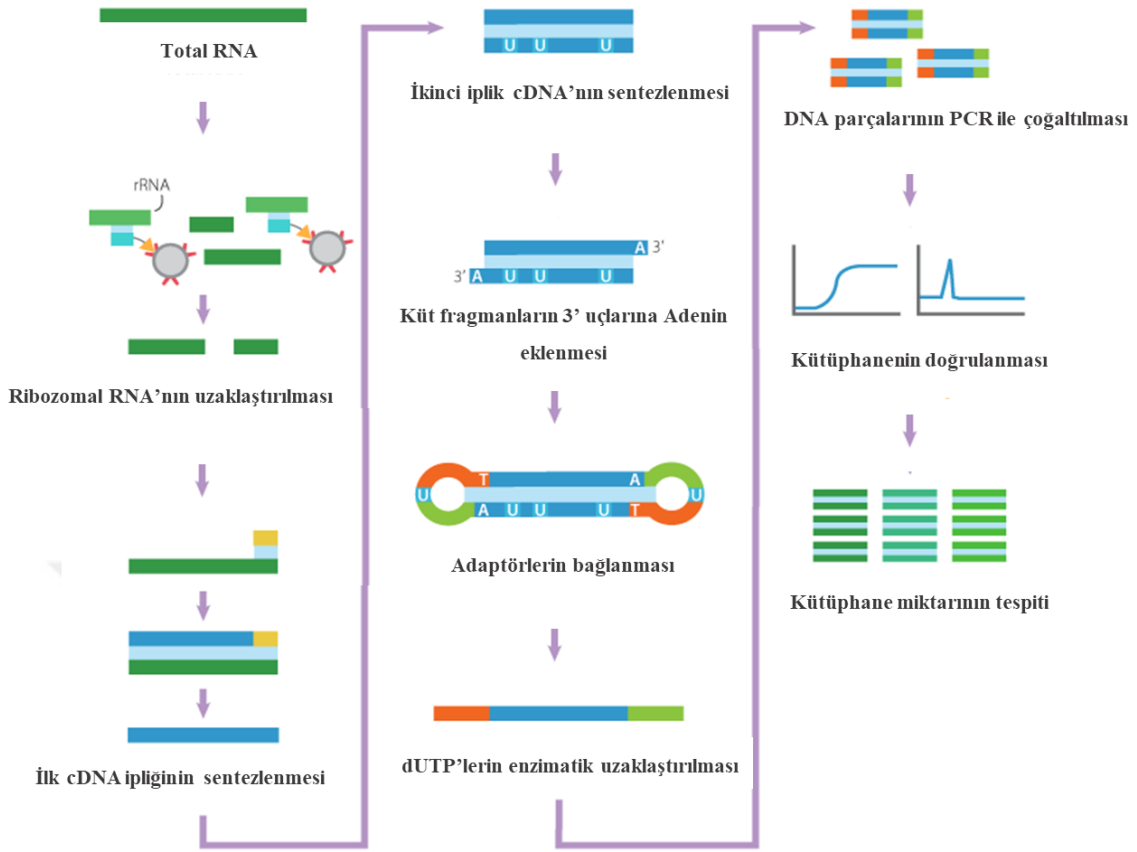


Şekil 1.28 Standart bir RNA-Seq çalışmasının iş akış şeması.

Kütüphane hazırlama, RNA-Seq'in önemli bir adımıdır, çünkü cDNA dizi verilerinin orijinal RNA popülasyonunu ne kadar yakından yansıttığını belirlemektedir (Rani ve ark., 2017). Standart RNA-Seq kütüphanesi oluşturma basamakları aşağıda verilmiştir (Şekil 1.29).

- 1. Ribozomal RNA'nın uzaklaştırılması:** mRNA'nın elde edilerek saflaştırılması ve fragmente edilmesi aşamasıdır. Bu aşamada ribozomal RNA, Ribo-zero rRNA uzaklaştıran boncuklar ile birleşen biyotin içeren hedefe özgü oligolarla uzaklaştırılmaktadır. poly-A içeren mRNA molekülleri poly-T oligo bağlı manyetik boncuklar (bead) kullanılarak iki aşamalı temizleme işlemine tabii tutulur. Saflaştırma sonrası RNA, divalent katyonlar kullanılarak artan sıcaklıkta küçük parçalara fragmente olmaktadır.
- 2. İlk cDNA ipliğinin sentezlenmesi:** Fragmente olmuş RNA'lar ile random primer ve reverse transkriptaz enzimi kullanılarak tek iplikli cDNA sentezi gerçekleştirilmesi aşamasıdır. Bu aşamada FSA (First Stand Synthesis Act D mix)'ya Actinomycin D eklenmesi DNA'ya bağlı sentezin gerçekleştirilmesini engellemektedir. RNA bağımlı sentez gerçekleştirilerek sentezin spesifikliği sağlanmaktadır.

3. **İkinci iplik cDNA'nın sentezlenmesi:** Çift iplik cDNA'nın sentezlenmesi ve RNA kalıbının uzaklaştırılması aşamasıdır. Bu aşamada SMM (Second Strand Marking Mix) deki dUTP ile dTTP yer değiştirerek DNA Polymerase I ve RNase H kullanılarak iki iplikli cDNA sentezleri spesifik gerçekleştirilmektedir. dUTP'nin ikinci ipliğin sentezinde dahil olması amplifikasyon sırasında ikinci ipliği engellemektedir. AMPure XP manyetik boncukları kullanılarak, çift zincir cDNA ürünleri, reaksiyonda kullanılan diğer kimyasallardan ayrıştırılmaktadır.
4. **Küt fragmanların 3' uçlarına A nükleotidinin eklenmesi:** Bu aşamada küt uçlu (Blunt-end) cDNA fragmanlarının her birinin 3' kısımlarına Adenin nükleotidi eklenerek, cDNA'ların birbirine bağlanması engellenmektedir. Adaptörün 3' ucundaki T nükleotidi adaptörün fragmana ligasyonu için uygunluk sağlamaktadır.
5. **Adaptörlerin bağlanması:** Bu basamak dscDNA'ların uçlarına çoklu adaptörlerin bağlanması aşaması olup örneklerin bağlanacağı flow cell de hibridizasyon için önem taşımaktadır. Bu basamakta çoklu adaptörler, farklı örneklerde farklı kombinasyonlar oluşturacak şekilde cDNA kütüphanesinin uç kısmına bağlanmaktadır.
6. **DNA parçalarının PCR ile çoğaltılması:** Bu basamakta PCR ile adaptörlerine bağlanmış olan cDNA fragmanları çoğaltılarak kütüphanenin büyütülmesi amaçlanmaktadır. Kütüphane miktarını çoğaltmak amaçlı kullanılan bu aşamada, kullanılan PCR primer karışımındaki primerler, adaptör uçlarına bağlanır. Elde edilen zenginleştirilmiş kütüphaneler manyetik boncuk yıkaması yapılarak adaptör dimeri, bağlanmamış primerler gibi tüm kirlilikten uzaklaştırılarak temizlenmektedir.
7. **Kütüphanenin doğrulanması ve miktarının tespit edilmesi:** Bu aşamada elde edilen kütüphanenin konsantrasyon, saflık ve kalite parametrelerine bakılarak sekanslama öncesi son hazırlıkları yapılmaktadır.



Şekil 1.29 Illumina TruSeq total RNA dizileme protokolü.

8. **Sekanslama:** Kütüphane hazırlığında kullanılan kit özelliklerine göre cihaz için örneklerin konsantrasyonları belirlendikten sonra her bir örnek birleştirilerek büyük havuz (pool) oluşturulmaktadır. Cihaza örneklerin yüklenmesi gerçekleşmeden önce normalizasyon, denatürasyon ve nötralizasyon işlemleri kullanılan flow cell tipine uygun olacak şekilde gerçekleştirilir. Ortalama 32 saat run süresi sonrası dataalar alınarak biyoinformatik analizlere geçilmektedir.
9. **Dizileme:** Illumina tarafından kullanılan sentez yoluyla dizileme “Sequencing-by Synthesis” yönteminde, DNA fragmanları öncelikle flow-cell adı verilen çipler üzerine yerleştirilmekte ve yerleştiği bölgede yüksek doğrulukta sinyal vermek için bölgesel olarak çoğaltılmaktadır (bridge-amplification) ve bunun sonucunda flow-cell üzerinde milyonlarca fragman kümeleri (cluster) oluşmaktadır. Her döngüde, DNA fragmanları farklı floresan boya ile işaretlenmiş 4 farklı nükleotide maruz bırakılmakta ve bir ışık kaynağı ile uyarılmaktadır. Uygun dinükleotitin bağlanmasını takiben floresans kamera ile o kümenin görseli alınmaktadır. Her bir kümeden gelen görseller

birleştirilmekte ve sonuçta ilgili kümelerin ışıma karakterlerinden nükleotit dizileri çıkarılmaktadır.

RNA-Seq tek başına veya RNA-protein bağlanması, RNA yapısı veya RNA-RNA etkileşimleri gibi RNA biyolojisinin diğer birçok yönünü analiz etmek için farklı biyokimyasal analiz türleri ile birleştirilerek diğer fonksiyonel genomik yöntemlerle kombinasyon halinde kullanılabilir (Conesa ve ark., 2016). Bu kapsamda transkriptom data analiz sonuçlarına göre anlamlı farklılık gösteren genler ile elde edilen primerlerle RNA-Seq datasının validasyonu yapılarak daha verimli sonuçlar elde edebilmektedir.

Transkriptom analizi (RNA-seq) bitkilerde yeni genlerin, transkripsiyon kalıplarının ve RNA'ların keşfedilmesine olanak tanıyarak gen ifadesini, hücre fonksiyonunu ve metabolik mekanizmaların anlaşılmasını desteklemektedir. Ayrıca adaptif özellikler için aday genler ile biyotik ve abiyotik stresler altında fenotipik varyasyonla bağlantılı moleküler belirteçlerin tanımlanması için de uygun maliyetli bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım kuraklığa uyumda ilgi duyulan aday genlerin listesini genişletmek, bitkilerde kuraklık stresinin altında yatan genetik ve moleküler mekanizmalar hakkında kapsamlı bilgi edinmek ve kuraklık stresi nedeniyle ortaya çıkan genom çapındaki transkripsiyonel yeniden programlamayı incelemek için de yaygın olarak uygulanmaktadır (Wang ve ark., 2020).

Her ne kadar bir bitki türünde kuraklık stresi nedeniyle yüksek oranda yukarı veya aşağı regüle edilen bazı genler diğer bitki türlerinde de benzer şekilde düzenlense de, gerçekleştirilen geniş ölçekli gen ekspresyon profili oluşturma çalışmalarından elde edilen bilgilere göre farklı hatta bazen aynı tür bitkilerde bile birçok genin ekspresyon modellerinde önemli farklılıklar gözlemlenmiştir (Chen ve Xiong, 2012). Ayrıca, model ve model olmayan bitkiler arasındaki fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerin ve bunların ardındaki moleküler mekanizmaların farklı olabileceği, ancak kuraklık tepki yollarının bazı kısımlarının aynı olabileceği iyi bilinmektedir. Bu nedenle kuraklık stresi sırasında model olmayan bitkilerde genom çapında ifade profillemesinin belirlenmesi, onlara özgü moleküler unsurların aydınlatılabilmesi açısından önemlidir (Wang ve ark., 2020).

Bitkilerde kuraklık stresi altında yapılan transkriptomik çalışmalar, gen ifadesinde önemli değişiklikler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Güncel çalışmalar, çeşitli fonksiyonel gruplara

ait çok sayıda genin, artan kuraklık stresine yanıt olarak farklı şekilde düzenlendiğini göstermektedir. Bu çalışmalar arasında *Solanum lycopersicum* (Wang ve ark., 2013), *Oryza sativa* (Huang ve ark., 2014), *Sorghum bicolor* (Johnson ve ark., 2014), *Gossypium herbaceum* (Ranjan ve Sawant 2015), *Ammopiptanthus mongolicus* (Pang, 2015), *Hordeum vulgare* (Zeng ve ark., 2016), *Arabidopsis thaliana* (Rasheed, 2016; Bouzid ve ark., 2019), *Prosopis juliflora* (George, 2017), *Zea mays* (Yang ve ark., 2019), *Rhododendron pulchrum* (Wang, 2020), *Pyrus bretschneideri* (Zhao ve ark., 2019), *Daucus carota* (Öztürk Gökçe ve ark., 2022) yer almaktadır. Bu çalışmalar toplu olarak bitkilerin kuraklık stresine karşı karmaşık ve çeşitli moleküler tepkilerini vurgulamaktadır.

Zeytin mahsulüyle ilgili olarak, zeytin ağacının kökeni ve evcilleştirilmesini (Gros-Balthazard ve ark., 2019; İpek ve ark., 2017), erken gelişimindeki değişimleri (Jiménez-Ruiz ve ark., 2018), olgunlaşma sırasındaki süreçleri (Skodra ve ark., 2021; Ferrari ve ark., 2023), farklı çeşitlerinde mahsul verimi, budama, ekim yoğunluğu ve hasadı etkileyen aday genleri (González-Plaza ve ark., 2016) ve farklı organlarındaki farklı gen ifade kalıplarını (Dastkar ve ark., 2020; Ramírez-Tejero ve ark., 2020; Bullones ve ark., 2023) araştıran çok sayıda transkriptomik çalışma vardır.

Kuraklık stresi hakkında kapsamlı bir literatür olmasına rağmen, zeytin mahsulleri için kapsam düzeyi oldukça sınırlıdır. Benny ve arkadaşları (2020) tarafından yürütülen bir RNA-seq meta-analizi, zeytin ağaçları da dahil olmak üzere beş meyve ağacı mahsulünü kuraklık ve tuzluluk stresi altında incelemiştir. Elde edilen sonuçlar savunma tepkisinin düzenlenmesi, transmembran taşınması ve metal iyon bağlanması yollarında rol oynayan gen ifadesi düzenlemelerinin bu iki abiyotik stres tepkisine karşı genel anahtar moleküler tepkiler olduğunu göstermektedir. Ayrıca kuraklık stresinin özellikle absisik asit, gibberellin, brassinosteroidler ve etilenle aktive edilen sinyal yolunda rol oynayan birden fazla geni uyardığı belirtilmektedir. Golmohammadi ve arkadaşlarının (2020) yaptıkları bir başka çalışma kuraklık stresinin zeytin çeşitlerinde farklı gen ifade düzenlemeleriyle fotosentetik performansı azalttığını tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada, bitkilerde önemli bir kuraklık tepkisi olarak fotosentezi engelleyen koşullarda bitkilerin hayatta kalmasını sağlayan karbon rezerv kullanımının zeytin ağaçlarındaki düzenlenmesini transkriptom seviyesinde araştıran Tsamir-Rimon ve arkadaşları (2021) uzun vadeli veya stres kaynaklı karbon depolamasıyla potansiyel olarak ilgili olan gen

ailesi üyelerini belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre kuraklık ve iyileşme sırasında yapısal olmayan karbonhidratlarla (NSC) ilişkili bir grup stresle düzenlenen nişasta metabolizması genini tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada Alowaiesh ve arkadaşları (2023) DREB, DHN ve CAT gibi kuraklıkla ilişkili genlerin ekspresyonunun farklı sulama rejimleri altındaki zeytin çeşitleri arasında değiştiğini göstermiştir.

Bu çalışmalar, zeytin bitkilerinin kuraklık stresine karşı karmaşık ve çeşitli tepkilerini toplu olarak göstermektedir. Ayrıca elde edilen bu bulgular potansiyel olarak artması öngörülen kuraklık stresine toleranslı zeytin bitkileri üretebilmek için kullanılabilecek yeni genlerin tespit edilmesine yardımcı olmaktadır.

1.1.2.6 Bitkilerde Proteomik Yaklaşımlar

Proteomik, organizma tarafından anlatımı yapılan farklı proteinlerin derinlemesine araştırılması olarak tanımlanmaktadır (Balotf ve ark., 2022). Amacı; yapısal, fiziko-kimyasal ve biyolojik açıdan mümkün olduğu kadar çok proteini karakterize etmektir (Jorin Novo, 2021). Bu amaçla yapılan proteomik çalışmalar toplam proteomun, onun niteliksel varlığının ve niceliksel bolluğunun, bir popülasyon içindeki çeşitliliğin ve lokalizasyonun eşzamanlı olarak incelenmesine olanak tanımaktadır (Balotf ve ark., 2022).

Son zamanlarda proteomik alanı, önceliği protein veya post translasyon sonrası modifikasyonları tanımlamak yerine hücresel aktiviteleri düzenleyen moleküler mekanizmaların açıklanmasını amaçlayan daha işlevsel yaklaşımlara doğru gelişmiştir (Elmore ve ark., 2021). Tanımlayıcı ve karşılaştırmalı proteomik yaklaşımlar bu kapsamda mevcut bitki proteomik literatüründe en çok temsil edilen alanlardan olmuştur. Yeni bitki sistemleri ve bitkilerde biyolojik süreçlerin moleküler mekanizmaları sürekli olarak rapor edilmektedir (Jorin Novo, 2020).

Proteomik teknikler, çekirdek platform olarak kütle spektrometrisine dayalı teknikleri içermektedir (Jorin Novo, 2021). Tandem kütle spektrometrisine (MS/MS) bağlı sıvı kromatografiyi (LC) kullanan kantitatif proteomik, protein bolluğunun ve translasyon sonrası modifikasyon seviyelerinin derin ve kantitatif analizleri için kullanılan en son teknolojiye sahip yaklaşımı temsil etmektedir (Song ve ark., 2020). Kütle spektrometresi (MS) bazlı, kantitatif proteomik, protein bolluğundaki küresel değişiklikleri ve post

translasyon sonrası modifikasyonların çeşitliliğinin biyotik ve abiyotik çevresel streslere karşı bitki tepkilerine nasıl katkıda bulunduğunu anlamak için gereklidir. (Elmore ve ark., 2021).

Bitkilerde fenotipik değişimlerin anlaşılmasında yalnızca DNA dizisi yeterli bilgi sağlamamaktadır; çünkü bir proteinin yapısı, işlevi, miktarı ve çeşitliliği doğrudan genetik dizilime bakılarak tam olarak belirlenememektedir (Skodra ve ark., 2021). Bu durumun temel nedenleri arasında; mRNA'ların farklı kararlılık düzeyleri, translasyon etkinliğindeki değişkenlikler ve translasyon sonrası modifikasyonlar yer almaktadır. Protein sentezinden sonra gerçekleşen bu post-translasyonel değişikliklerin türü ve oranı, proteinlerin işlevsel etkinliği ile hücresel lokalizasyonlarına göre farklılık gösterebilmektedir (Gao ve ark., 2011; Zomeno ve ark., 2014).

Bu nedenle, çevresel stres koşullarına karşı bitkilerin verdiği yanıtların tam olarak anlaşılabilmesi için yalnızca transkript düzeyinin ölçülmesi yeterli değildir. Aynı zamanda, transkripsiyon sonrası süreçlerin de dikkate alınarak protein düzeyindeki değişimlerin izlenmesi gerekmektedir (Skodra ve ark., 2021). Bu yaklaşım, bitkilerin çevresel streslere karşı geliştirdiği adaptif yanıtların daha bütüncül ve işlevsel düzeyde değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Kütle spektrometresi teknolojisinde ve veri analizi yöntemlerinde devam eden gelişmelerle birlikte, tam bir proteomun tanımlanması ve miktarının belirlenmesi mümkün hale gelmiştir. Ancak proteomik analizler çeşitli translasyon sonrası modifikasyonları ve protein etkileşimleri, protein lokalizasyonu ve protein katlanması gibi diğer yüksek dereceli özellikleri içeren proteomun önemli ölçüde karmaşıklığı nedeniyle zordur (Fernández-Costa ve ark., 2020). Proteomik analizin doğruluğu, proteinlerin izolasyonu, sindirimi, ayrılması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan yöntemler dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır (Balotf ve ark., 2022).

Protein ekstraksiyonu, proteomik iş akışında en kritik adımlardan biridir (Duong and Lee, 2023). Özellikle de bitki dokuları, protein analizinin ileri aşamalarına müdahale eden fenolikler, organik asitler, pigmentler ve polisakkaritler dahil olmak üzere büyük miktarlarda engelleyici bileşikler ürettiklerinden, bu durum yüksek kaliteli numunelerin üretilmesini zorlaştırmaktadır (Song ve ark., 2020). Son yıllarda, numune hazırlama sürecini iyileştirmeye, kolaylaştırmaya ve numune hazırlama ile fraksiyonlamayı entegre

etmeye yönelik yeni yöntemlerin zamanı azalttığı, verimi artırdığı ve tekrarlanabilirliği iyileştirdiği rapor edilmiştir (Duong and Lee, 2023).

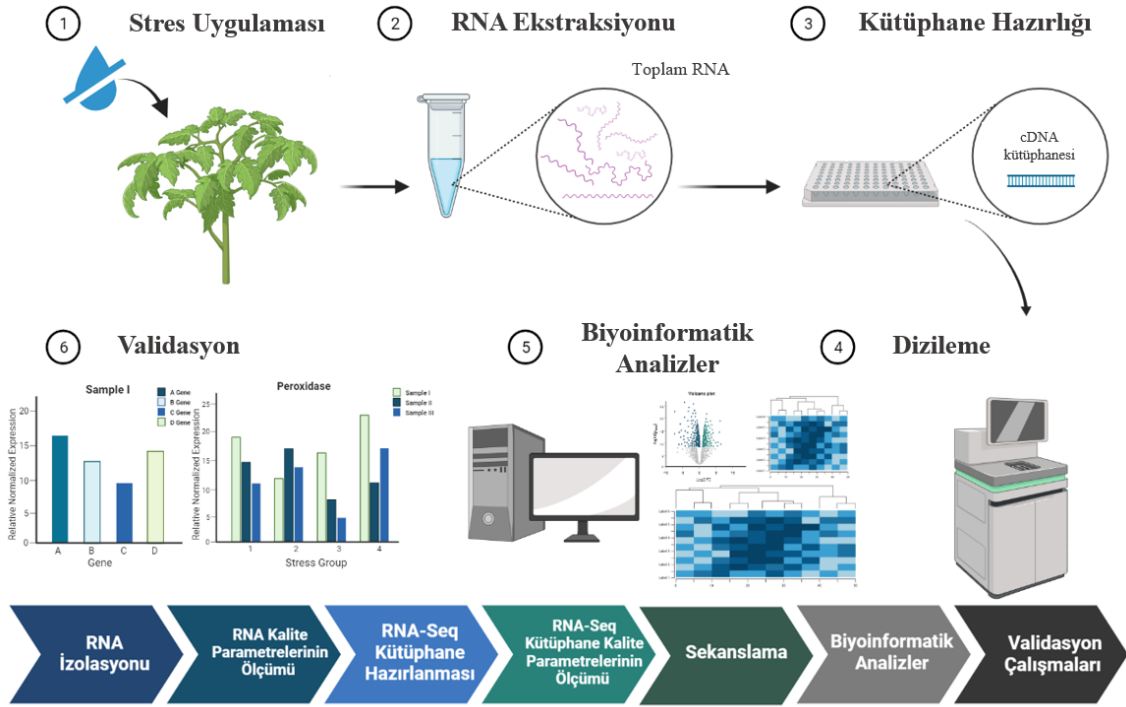
Biyoaktif bileşenler açısından zengin olması nedeniyle sağlık üzerinde birçok faydalı etkiye sahip olan *Olea europaea* L., biyolojik, besinsel ve ticari değeri olan bir bitkidir. Sekoiridoidler (oleuropein, ligstrosid, dimetiloleuropein), hidroksitirosol, tirosol, kafeik ve ferulik asitler ve flavonoidler (apigenin, luteolin, luteolin-7-O-glukozid vb.) gibi çok çeşitli fenolik bileşikler açısından zengindirler (Khelouf ve ark., 2023). *O. europaea* model olmayan bir bitki türü olarak zengin bileşik içeriğine sahip olmasına rağmen proteomik araştırma eksikliğiyle karşı karşıyadır (Alesci ve ark., 2022). Bunun en önemli nedenlerinden biri zeytin bitkisinin düşük kaliteli ekstraktlara yol açan fenolik ve lipit bileşikleri barındırmasının protein ekstraksiyon verimi düşürmesidir (Skodra ve ark., 2021).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu doktora tezi “Zeytin Bitkisinde (*Olea europaea* L.) Kuraklık Stresi Yanıtında Epigenetik Regülasyon” başlıklı 217O401 nolu Uluslararası COST projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Proje kapsamında İş Paketi I’ de Bornova Zeytin Araştırma Enstitüsü bünyesinde kuraklık stresi uygulamaları gerçekleştirilerek fizyolojik analizler (yaprak oransal su içeriği-YOSİ, yaprak su potansiyeli- Ψ , fotosentez, transpirasyon, su kullanım etkinliği analizleri, bitki boyu ve gövde çapı ölçümleri) kurum bünyesinde tamamlanmıştır. İş Paketi II’ de Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü bünyesinde biyokimyasal test çalışmaları (reaktif oksijen türlerinin ve süperoksit anyon radikal ($O_2^{\cdot-}$) miktarının belirlenmesi, antioksidan enzim – *SOD*, *CAT*, *POX*, *APX*, *GR*, *NOX* - ekstraksiyonu ve aktivite analizleri) tamamlanarak fizyolojik veriler ile değerlendirilmiş, kuraklığa hassas ve toleranslı zeytin çeşitleri tespit edilmiştir. Tespit edilen kuraklığa hassas ve toleranslı zeytin çeşitleri ile yapılan tüm transkriptomik, proteomik ve epigenetik çalışmalar TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Arazi Gen Bankasında yer alan tescilli 8 zeytin (*Olea europaea* L.) çeşidi için kuraklık stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Proje kapsamında diğer iş paketlerinde tamamlanan fizyolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve kuraklığa toleranslı (Memecik-94) olduğu tespit edilen ve kuraklık stresi uygulanan bitkilere RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Kalite parametreleri yönünden saf ve konsantrasyon değerleri uygun olan toplam RNA örnekleri için cDNA (RNA-Seq, transkriptom) kütüphanesi oluşturulmuştur. RNA dizileme çalışmalarında daha az miktarda toplam RNA ile çalışmaya olanak veren SMART-Seq® Stranded Kit (Takara Bio USA, Inc.) kit kullanılarak NovaSeq 6000 dizileme sistemi ile dizileme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen RNA dizi bilgisinden yararlanılarak, kuraklık stresi altında kuraklığa toleranslı (Memecik-94) ve hassas (Gemlik-26) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinde kuraklık (D) ve kontrol (K) grupları ile iyileşme (R-recovery) grupları arasında farklı anlatım yapan transkript dizileri tespit edilmiştir. Tespit edilen bu genler için ilgili primerler tasarlanarak sentezi gerçekleştirildikten sonra qRT-PCR tekniği kullanılarak RNA dizileme verilerinin validasyonları sağlanmış, kuraklık stresi altında

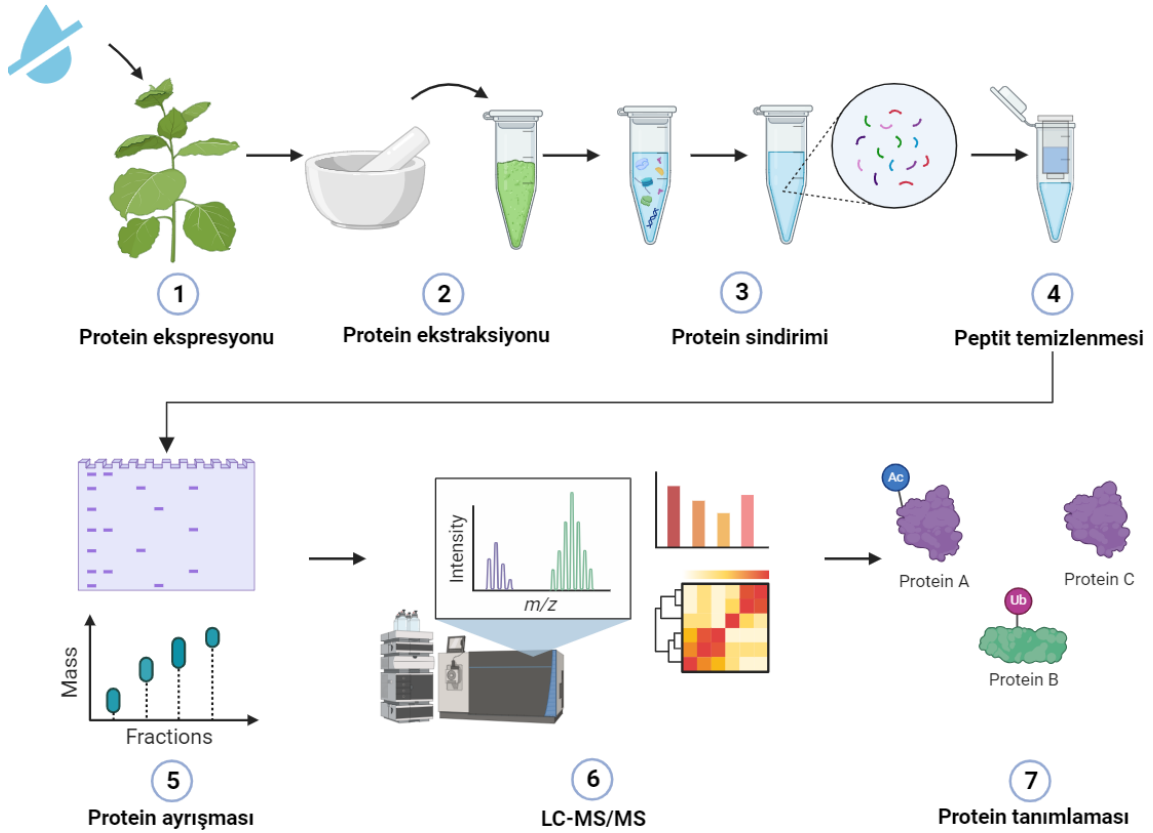
farklı çeşitlerin gen ifadelerinin profillemesi yapılmıştır. Validasyon çalışmalarında düşük konsantrasyonda toplam RNA ile çalışmaya olanak veren QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen) kit kullanılarak cDNA sentezleri gerçekleştirilmiş, SYBRGreen mix (BioRad) kullanılarak BioRad CFX96 cihazı ile ilgili genlere ait ekspresyon profilleri analiz edilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Transkriptom iş akış şeması.

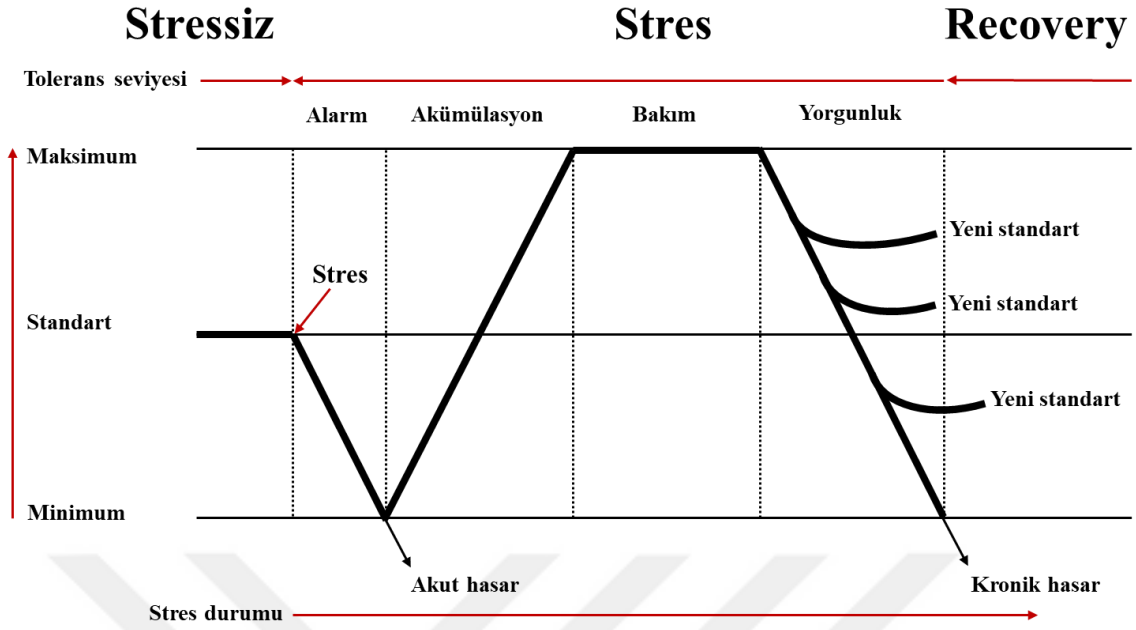
Proteomik çalışmalar kapsamında; Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinin kontrol (K), kuraklık (D) ve kuraklık uygulaması sonrası sulama yapılan (R) gruplarına ait yaprak dokularından proteomik çalışmada kullanılmak üzere belirlenen 3 farklı protein ekstraksiyon metodu (A: Kaynatma metodu, B: CHAPS metodu, C: TCA metodu) ile optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir (Wang ve ark., 2006; Capriotti ve ark., 2013). Yapılan analiz sonuçlarına göre en yüksek protein verisi elde edilen ekstraksiyon metodu (B: CHAPS ekstraksiyonu metodu) seçilerek proteomik çalışmalar için kullanılmıştır. Proteomik analizler ThermoScientific UltiMate 3000 RSLC Ultra Nano ultraperformans sıvı kromatografisi (UPLC) sistemi ve ThermoScientific EasySpray iyon kaynağıyla donatılmış bir ThermoScientific Q Exactive HF kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonrası çeşitler ve gruplar arasındaki proteomik farklılıklar Proteome Discoverer 2.4 yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir. Yüksek oranda artış ve

azalış gösteren kuraklık stresiyle ilişkili proteinlerin tanımlama ve kategorizasyonu yapılmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Proteomik iş akış şeması.

Çalışmada ayrıca, stres altında oluşan hasarın derecesi ile iyileşme sonrası metabolik düzeyde yeni denge noktalarının (yeni standartların) oluşumu analiz edilmiştir. Bu sayede, zeytin bitkisinde kuraklık toleransının sadece anlık stres yanıtı değil, aynı zamanda stres sonrası toparlanma kapasitesi ile de ilişkili olduğu ortaya konulmak istenmiştir. Bu amaçla kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) olduğu tespit edilen zeytin çeşitlerinin kuraklık süreci ve sonrasındaki iyileşme (recovery) sürecine verdikleri moleküler yanıtları analiz etmek için stres dinamiklerini temsil eden genel bir stres-yorgunluk-iyileşme modeli temel alınmıştır (Şekil 2.3) (Bruce ve ark., 2007; Chaves ve ark., 2009).



Şekil 2.3 Abiotik stres faktörlerine bitki tepkisinin dinamiklerinin genelleştirilmiş şeması (Kosová ve ark., 2011; Larcher, 2003).

Bu çalışmanın amacı kapsamında zeytin çeşitlerinde bu farklı zaman noktalarındaki süreçlerde gelişen moleküler stres yanıtları dinamik bir bakış açısıyla değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) olduğu tespit edilen zeytin çeşitleri arasında kuraklık stresinin etkisiyle ortaya çıkan farklı stres yönetim stratejileri, transkriptom ve proteom analizleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Transkriptom verilerinin doğrulaması için seçilen genler üzerinde kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizleri yapılmıştır (Bustin ve ark., 2009).

2.1. STRES UYGULAMASI

Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Arazi Gen Bankasında yer alan tescilli 2 zeytin (*Olea europaea* L.) çeşidi (kuraklığa hassas: Gemlik-26, kuraklığa toleranslı Memecik-94), çelik alıp köklendirme usulü ile yetiştirilmiştir. Yetiştirilen farklı zeytin çeşitlerine ait fidanlara, kuraklık stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Fidanlar kontrol grubu (I_{100} , tam sulama) ve kuraklık stres grubu (I_0 , susuz) olarak iki gruba ayrılmıştır. Her deney grubu için saksıların su tutma kapasiteleri belirlenmiştir. Saksıların su tutma kapasitelerini belirlemek amacıyla, 48 saat su dolu kap içerisine konularak doygun suya hale getirilmiştir. Daha sonra saksıların üst yüzeyi buharlaşmayı önleyecek şekilde

alüminyum folyo ile kapatılıp; su çıkışı duruncaya kadar serbest drenaja bırakılmıştır. Bu aşama sonunda saksılar tartılıp bu değer tarla kapasitesi olarak kaydedilmiştir. Tam sulama grubundaki saksılar iki günde bir aralıklarla tartılarak, su tutma kapasitesi seviyesinden kaybedilen su miktarı hesaplanıp sulama yapılmıştır. Kuraklık stres grubu için ise 1 hafta sulama yapılmamıştır. 1 hafta sonunda her iki grup hasat edilerek, 1 hafta süre ile gün aşırı sulama uygulamasıyla iyileşme (R-recovery) grupları oluşturulmuştur. 1 hafta sonunda iyileşme grupları da hasat edilerek, deneysel olarak kullanılıncaya kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2. TRANSKRİPTOM ÇALIŞMALARI

2.2.1 RNA Ekstraksiyonu

Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinin kontrol (K), kuraklık (D) ve kuraklık uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarına (R) ait yaprak dokularından RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak toplam RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. RNA ekstraksiyonu sonrası genomik DNA’nın uzaklaştırılması için DNase I (Thermo Scientific) uygulaması yapılmıştır. Kullanılan protokol aşağıda verilmiştir.

2.2.1.1 RNeasy® Plant Mini Kit

1. 0,15 gr dondurulmuş yaprak dokusu sıvı azot ile porselen havanda ezilerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında 15’lik falcon tüp içerisine alınan örnekler, tüm örneklerin homojenizasyonu bitene kadar buz üzerinde bekletilmiştir.
2. Homojenizasyon sırasında RLC tamponu içerisine %0,2 β -mercaptoethanol eklenmiştir. Karışım vortex yardımıyla karıştırılmıştır.
3. Homojenize edilmiş buz üzerinde bulunan örnekler, hazırlanan RLC tamponundan 700 μ l eklenerek 2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüp birkaç kez ters-düz edildi ve iyice karışması sağlanmıştır.
4. Karışım 56 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında tüpler ters düz edilmiştir.
5. İnkübasyondan sonra örnekler QIAshredder döndürme kolonuna (leylak) aktarılmıştır. 13 000 rpm’de 6 dk. santrifüj edilmiştir.

6. Santrifüj sonrasında süpernatant temiz 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktararak yarım hacim etanol (%96 -100) eklenmiştir. Karışım ters düz edilmiştir.
7. Ters düz edilerek karıştırılan örnekler RNeasy mini döndürme kolonuna (pembe) aktarılmıştır. 10 000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj sonrasında koleksiyon tüpünde bulunan sıvı dökülerek kolon üzerine 700 µl RW1 tamponu eklenmiştir. 10 000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrasında koleksiyon tüpünde bulunan sıvı dökülerek 500 µl RPE tamponu eklenmiştir. 8 000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiştir.
10. Santrifüj sonrasında koleksiyon tüpünde bulunan sıvı dökülerek 500 µl RPE tamponu eklenmiştir. 8 000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiştir.
11. RNeasy mini döndürme kolonuna steril ve RNase içermeyen 1,5 ml'lik ependorf toplama tüpü yerleştirilerek 30 µl nukleaz içermeyen su eklenmiş ve pelletin tamamen çözünmesi beklenmiştir. 13 000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
12. Santrifüj sonrasında koleksiyon tüpünde bulunan RNA örnekleri -80 °C'de saklanmıştır.

2.2.1.2 DNase I Uygulaması

1. Steril ve RNase içermeyen 1,5 ml'lik ependorf tüp içerisine Tablo 2.1'de verilen miktarlarda kimyasallar eklenmiştir.

Tablo 2.1 DNase I uygulamasında kullanılan bileşen ve hacimleri.

BİLEŞENLER	HACİM (µL)
Toplam RNA	44 (25 ng)
10X Reaction Buffer with MgCl₂	5
DNaz I, RNase-free	1 (1 U)
Toplam	50

2. Karışması sağlanarak 37 °C'de 30 dk. bekletilmiştir.
3. İnkübasyon sonrası RNA örnekleri üzerine 1:1 oranında nukleaz içermeyen su eklenmiştir.

4. Mevcut protein ve DNase I kontaminasyonunu uzaklaştırmak için fenol / CHCl₃ (3:1) uygulaması gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası 100 µl fenol/CHCl₃ ilave edilerek 30 saniye karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
5. Buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir.
6. Maksimum hızda (13 000 rpm) 5 dakika +4 °C’de santrifüj edilmiştir.
7. Üst faz alınarak steril bir tüpe aktarılmıştır.
8. Etanolle çöktürme aşaması için alınan üst faz üzerine 5 µl 3 M NaOAc (pH:5.2) ve 250 µl saf etanol ilave edilmiştir.
9. En az 1 saat olacak şekilde –80 °C’de bekletilmiştir.
10. Soğutmalı santrifüjde 10 dakika 13 000 rpm’de santrifüj edilerek RNA’lar çöktürülmüştür.
11. RNA pelleti üzerine DEPC’li ddH₂O ile hazırlanmış olan %70’lik etanol ilave edilerek 5 dakika 13 000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
12. Steril kabin içerisinde tüp kapakları açık şekilde tutularak etanolün uçması sağlanmıştır.
13. 20 µl DEPC’li ddH₂O ile RNA pelleti çözülerek –80 °C’de saklanmıştır.

2.2.1.3 RNA Konsantrasyon, Saflık ve Kalite Parametre Ölçümleri

Genomik DNA’dan uzaklaştırılan toplam RNA’ların konsantrasyon (ng/µl) ve saflık (260/280nm ve 260/230 nm) parametreleri NanoDrop™ 8000 Microvolume UV-VIS Spektrofotometre (Thermo Scientific™) cihazı ile ölçülmüştür. Konsantrasyon ölçümleri yapılan toplam RNA örneklerinin RIN (RNA Integrity Number) değerleri Bioanalyzer (Agilent 2100) cihazı ile kontrol edilmiştir. NanoDrop ve Bioanalyzer cihazlarından elde edilen değerler göz önünde bulundurularak saf ve sağlam olan toplam RNA örneklerine Qubit® 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazı ile konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır.

2.2.1.4 NanoDrop

Yaprak dokularından izole edilen toplam RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık ölçümleri NanoDrop™ 8000 Microvolume UV-VIS (ultraviyole-görünür bölge ışıık)

Spektrofotometre (Thermo Scientific™) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

1. Cihazın kendi programından uygulama modu olarak ‘nükleik asit’, örnek tipi olarak ‘RNA-40’ seçilmiştir.
2. Ölçüm yapılmadan önce cihazın yükleme haznesi 1 µl nükleaz içermeyen su ile temizlenmiştir.
3. Cihazın yükleme haznesine toplam RNA örneklerinden 1 µl olacak şekilde yüklenerek A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} nm UV absorbans değerleri ölçülmüştür (Toplam RNA örneklerine ait A_{260}/A_{280} nm dalga boyunda absorbans değerininin 2,0 - 2,2 ; A_{260}/A_{230} nm dalga boyunda absorbans değerininin 1,8 - 2,2 arasında olması yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir.).

2.2.1.5 Bioanalyzer

Konsantrasyon ölçümleri yapılan RNA örneklerinin Bioanalyzer (Agilent 2100) cihazı ile Agilent RNA 6000 Pico Kit ve çipleri (Şekil 2.4) kullanılarak RIN (RNA Integrity Number) değerleri kontrol edilmiştir. Kullanılan protokol aşağıda verilmiştir.



Şekil 2.4 Bioanayzer (Agilent 2100) cihazı ve RNA RIN değerlerinin kontrol edilmesinde kullanılan RNA 6000 Pico çip.

Jel Boya Karışımı:

1. RNA 6000 Pico gel matrix ve RNA 6000 Pico boyası 30 dk. oda sıcaklığına bekletilmiştir.

2. 550 µl RNA 6000 Pico gel matrix kolona yüklenerek 1 500 x g'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj edilen gel matrix 65 µl olacak şekilde alikodlanmıştır.
4. Alikodlu 65 µl'lik RNA 6000 Pico gel matrix içerisine 1 µl RNA 6000 Pico boyası eklenerek vortexlenmiş ve 13 000 x g'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.

Jel Yüklenmesi:

1. RNA 6000 Pico chip, chip priming stationa yerleştirilerek (G) kuyusuna 9 µl jel-boya karışımından yüklenmiştir.
2. Jelin dağılması için kilit kapatılarak enjektör indirilmiş ve 30 sn. bekletilerek kilit açılmıştır. Enjektörün 1 ml pozisyonuna gelmesi için 5 sn. bekletilmiştir.
3. Priming station açılarak diğer 2 G kuyusuna da 9 µl jel-boya karışımı yüklemeleri gerçekleştirilmiştir.

CS (Conditioning Solution) ve Marker Yüklenmesi:

1. Jel yüklemesinin ardından 9 µl CS solüsyonu CS ile belirtilen kuyuya yüklenmiştir.
2. Toplam 11 örnek ve 1 ladder için yüklenecek olan kuyulara marker 5 µl marker yüklemeleri gerçekleştirilmiştir.

Ladder Yükleme:

1. Kit içerisinde yer alan ladder tüpünden 1 µl olacak şekilde ladder kuyusuna yükleme gerçekleştirilmiştir.

Örnek Yüklenmesi:

1. İzole edilen RNA örneklerinden 1 µl her bir örnek kuyusuna yüklenmiştir. Örnek yüklenmeyen kuyulara 1 µl marker yüklemesi yapılmıştır.
2. Çip vortekse (IKA vortex mixer) yerleştirilerek 1 200 rpm de 2 dk horizontal olarak vortekslenmiştir.
3. Agilent Bioanalyzer cihazına örnek yüklemeleri yapılan çip yerleştirilerek Assay olarak uygun olan Plant RNA Pico programı seçilip program başlatılmıştır.

2.2.1.6 Qubit

NanoDrop ve Bioanalyzer cihazlarından elde edilen değerler göz önünde bulundurularak saf ve sağlam olan toplam RNA  rneklerine Qubit® 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazı ile konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır (şekil 2.5). Kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

1. Qubit RNA BR Kit içerisinde bulunan Qubit® Reagent 1:200 oranında floresan boya ile karıştırılarak Qubit®  alışma solüsyonu hazırlanmıştır.
2. Toplam okuma hacmi 200  l olacak şekilde; standart okuma tüplerine 10  l Standart 1 ve 2'den, örnek tüplerine de 1  l RNA  rneği 0,5 ml'lik Qubit assay tüplerinde konulmuştur.
3. Hazırlanan tüpler Qubit® Florometre cihazına konularak okumalar gerçekleştirilmiştir.



şekil 2.5 Qubit® 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazı.

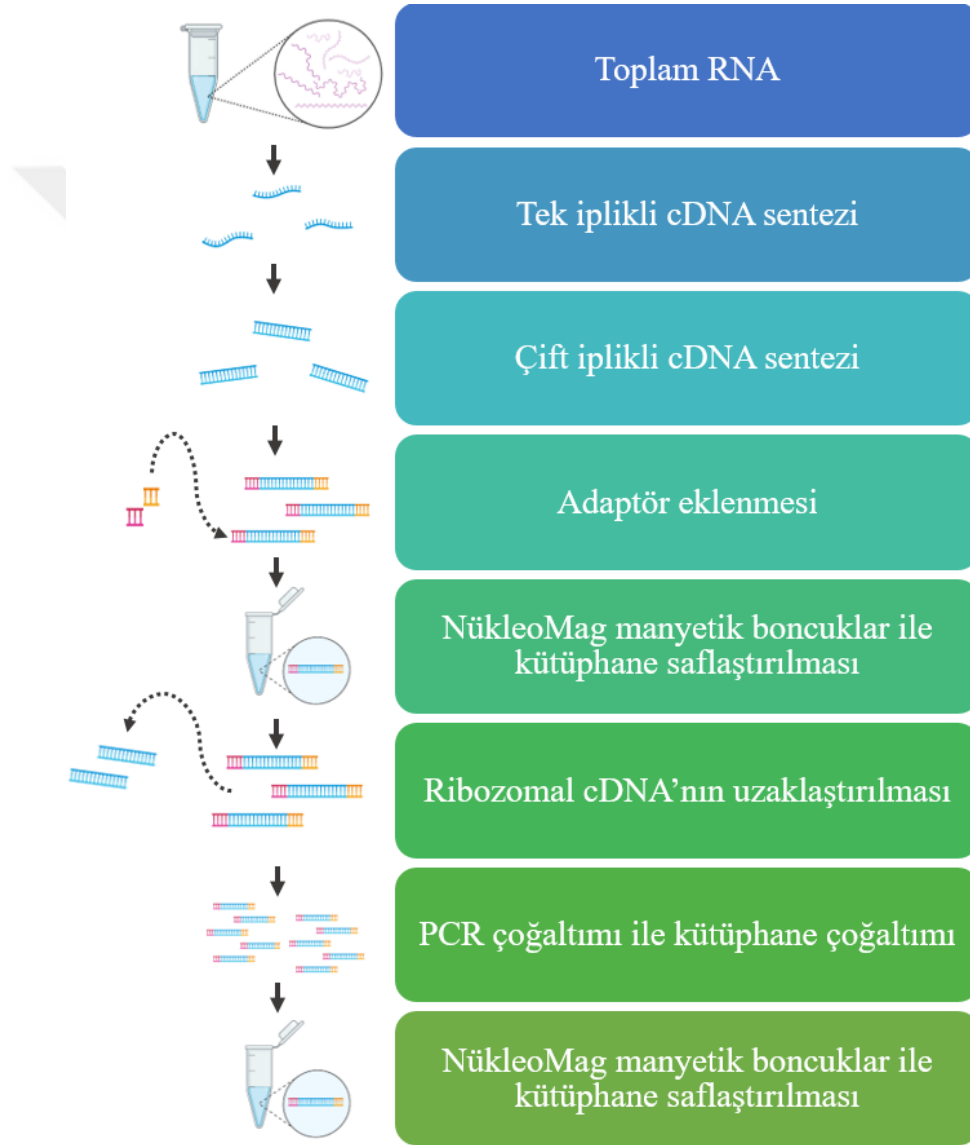
2.2.2 RNA Dizileme  alışmaları

Bir  nceki dönem raporunda belirtildiği şekilde RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak izole edilen toplam RNA  rnekleri Nanodrop 8000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific) cihazından elde edilen saflık ve konsantrasyon, Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, USA) cihazındaki RIN (RNA Integrity Number) değerleri ve son olarak Qubit® 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçümleri açısından değerlendirilmiştir. Kalite parametreleri

yönünden saf, temiz ve konsantrasyon değerleri uygun olan toplam RNA örnekleri için cDNA (RNA-Seq, transkriptom) kütüphanesi oluşturulmuştur.

2.2.2.1 Transkriptom (cDNA) Kütüphanesinin Hazırlanması

Kütüphane hazırlık aşamasında daha düşük RNA miktarı kullanımına izin veren SMART-Seq® Stranded Kit (Takara Bio USA, Inc.) kullanılmıştır. Kitin önerdiği protokolün basamakları aşağıda verilmiştir (Şekil 2.6)



Şekil 2.6 SMART-Seq Stranded Kit transkriptom kütüphane oluşturma iş akışı.

2.2.2.1.1 Protokol: First-Strand cDNA Sentezi

1. Toplam RNA'lar 2,5 ng ve son hacim 7µl olacak şekilde 0,2'lik PCR tüpüne aktarılmıştır. Son hacim 7 µl'den az ise üzeri RRI Water ile tamamlanmıştır (RNase Inhibitor "RRI" Water hazırlanışı: 398 µl nükleaz içermeyen su + 2 µl RNase Inhibitor. Vorteks ile karıştırılarak buz üstünde tutulmuştur).
2. Termal döngüleyicide "72-hold" programı için cihaz önceden ısıtılmıştır.
3. Annealing Master Mix, örnek sayısının %10 fazlası olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 2.2). Bütün kimyasallar buz üstünde bekletilmiştir.

Tablo 2.2 Annealing Master Mix bileşenleri.

BİLEŞEN	HACİM
10X liziz karışımı	1 µl
SMART scN6	1 µl
Reaksiyon başına toplam hacim	2 µl

4. Her reaksiyon tüpüne 2 µl Annealing Master Mix eklenmiş ve nazik bir şekilde hafifçe vurarak karıştırılmıştır, sonra spin down yapılmıştır.
5. Önceden ısıtılmış 72 °C olan termal döngüleyicide tüpler inkübe edilmiştir. Örnekler kapağı sıcak termal döngüleyicide tam olarak 3 dk tutulmuştur. Ardından 2 dk boyunca soğuk PCR rakı üzerine alınmıştır. Termal döngüleyici "RT" programı başlatılmış ve 7. Aşamaya kadar beklemeye alınmıştır.
6. First-Strand Master Mix, örnek sayısının %10 fazlası olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 2.3).

Tablo 2.3 First-strand master mix bileşenleri.

BİLEŞEN	HACİM
scRT Buffer	4 µl
SMART scTSO Mix	4,5 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
SMARTScribe RT	2 µl
Reaksiyon başına toplam hacim	11 µl

7. Her bir reaksiyon tüpüne 11 µl First-Strand Master Mix eklenmiştir. 2-3 saniye vortekslenip sonrasında spin down yapılmıştır.
8. Kapağı önceden ısıtılmış “RT” programında tüpler inkübe edilmiştir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4 ‘RT’ PCR programı protokolü.

SICAKLIK	SÜRE
42 °C	90 dk
70 °C	10 dk
4 °C	Sonsuz

2.2.2.1.2 Protokol: PCR1- Illumina Adapter ve İndexlerinin Eklenmesi

1. AMPure beadler buzdolabından çıkartılmış ve oda sıcaklığına gelmesi için 30 dk beklenmiştir.
2. Termal döngüleyicide “PCR1” programı çalıştırılmıştır.
3. PCR1 Master Mix, örnek sayısının %10 fazlası olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 2.5). Karışım iyice karıştırılıp spin down yapılmıştır.

Tablo 2.5 PCR1 master mix bileşenleri.

BİLEŞEN	HACİM
Nükleaz içermeyen su	2 µl
SeqAmp CB PCR Buffer (2X)	25 µl
SeqAmp DNA Polymerase	1 µl
Reaksiyon başına toplam hacim	28 µl

4. Reaksiyon tüplerine, 3’ index (i5) bütün tüplerde aynı, 5’ indexler her tüpte farklı olacak şekilde eklenmiştir.
5. Protokol A. 6. aşamadan gelen her bir reaksiyona, 29 µl (3’ PCR Primer Master Mix içerisine eklendiği için 29 µl) PCR1 master mix eklenmiştir.
6. Her bir reaksiyon tüpüne 1 µl 3’ ve 5’ PCR Primer HT eklenmiştir. Nazikçe vorteksle ya da tüpe vurarak karıştırılmış ve kısaca spin down yapılmıştır.

7. Tüpler kapağı önceden ısıtılmış termal döngüleyiciye yerleştirilmiştir. İntput seviyesine göre uygun döngü sayısı seçildiğine emin olunarak PCR1 programı başlatılmıştır (Tablo 2.6).

Tablo 2.6 ‘PCR1’ PCR programı protokolü.

SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
94 °C	90 dk	-
98 °C	15 sn	10
55 °C	15 sn	döngü
68 °C	30 sn	
68 °C	2dk	-
4 °C	Sonsuz	-

2.2.2.1.3 Protokol: AMPure Beadler Kullanılarak RNA-Seq Kütüphanesinin Pürifikasyonu

1. AMPure beadler kullanmadan yaklaşık 30 dk önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Her bir örneğe 35 µl AMPure bead eklenmiş ve 5 sn vortekslenmiştir.
2. Beadlerin DNA’ya bağlanması için 8 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.
3. Kısa spin down yapıldıktan sonra tüpler manyetik tutucuya yerleştirilip solüsyon tamamen berrak olana kadar bekletilmiştir (yaklaşık 5 dk).
4. Tüpler manyetik tutucu üzerindeyken süpernatant pipetle çekilmiş ve atılmıştır.
5. Tüpler manyetik tutucu üzerindeyken beadler dağıtılmamaya dikkat edilerek her bir tüpe 200 µl taze hazırlanmış %80 etanol eklenmiştir. 30 sn beklenip ardından etanol pipetle alınarak atılmıştır. Yıkama aşamasında cDNA beadlere bağlı durumdadır.
6. 5. adım tekrar edilmiştir.
7. Tüpte kalmış olabilecek etanolü toplamak için spin yapılmıştır (yaklaşık 2 000 g). Tüpler tekrar manyetik tutucu üzerine yerleştirilip kalan etanol pipetle alınıp atılmıştır.

8. Pelletler kuruyana kadar oda sıcaklığında tüplerin kapağı açık bir şekilde bekletilmiştir (5 dk).
9. 52 µl nükleaz içermeyen su eklenmiştir. Vorteksle iyice karıştırılmıştır.
10. 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.
11. Kısa spin down yapıldıktan sonra tüpler tekrar manyetik tutucuya yerleştirilip solüsyon tamamen berrak olana kadar bekletilmiştir (yaklaşık 5 dk).
12. Her örnek için 50 µl süpernatant ayrı plate kuyularına ya da tüplere alınmıştır.
13. 40 µl AMPure bead eklenmiş ve 5 sn vortekslenmiştir.
14. DNA'nın beadlere bağlanması için 8 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Bu inkübasyon süresi esnasında hemen bir sonraki bölüme geçilmiştir (Protokol D).

2.2.2.1.4 Protokol: scZapR ve scR-Probes ile Ribosomal cDNA'nın Uzaklaştırılması

1. scR-Probes ve ZapR buffer oda sıcaklığında çözölmüştür. scR-Probes çözölür çözölmez buz üzerine alınmış ve kullanıldıktan hemen sonra dondurucuya kaldırılmıştır. ZapR buffer oda sıcaklığında tutulmuştur.
2. Bir önceki protokolün 14. aşamasında 8 dk inkübe olan örnekler kısaca spin down yapılmıştır. Örnekler manyetik tutucu üzerine yerleştirilmiş ve solüsyon berrak oluncaya kadar bekletilmiştir (gerekliyse 5 dk'dan fazla beklenilebilir).
3. Bu bekleme aşamasında önceden soğutulmuş bir PCR tüpünün içerisine her örnek için 1,5 µl olacak şekilde örnek sayısına göre hesap yapıp (pipet hatasını önlemek için %10 fazla hesaplanır) scProbes eklenmiş ve buz üstünde tutulmuştur.
4. scProbes içeren PCR tüpü termal döngüleyiciye yerleştirilmiş ve PreZap programı çalıştırılmıştır (Tablo 2.7).

Tablo 2.7 'PreZap' PCR programı protokolü.

SICAKLIK	SÜRE
72 °C	2 dk
4 °C	Sonsuz

5. scProbes en az 2 dk ve 10 dakikayı geçmeyecek şekilde termal döngüleyicide inkübe edilmiştir.
6. 2. aşamada 5 dk manyetik tutucu üzerinde bekleyen örnekler berrak olduğunda süpernatant pipetle çekilip atılmıştır.
7. 200 µl taze hazırlanmış %80 ethanol eklenmiştir. 30 sn beklenip ardından ethanol pipetle alınarak atılmıştır.
8. 7. aşama tekrar edilmiştir.
9. Örnekler kısa bir süre çöktürülmüş (yaklaşık 2000g) ve tekrar manyetik tutucu üzerine yerleştirilmiştir. Kalan etanol varsa küçük hacimli bir pipetle çekilip atılmıştır.
10. Örnekler, pelletin kuruması için oda sıcaklığında kapaklar açık bir şekilde bekletilmiştir. Kuruma aşamasında 11. aşama için scZapR Master Mix hazırlanmıştır. scZapR Master Mix, örnek sayısının %10 fazlası olacak şekilde hazırlanmış (Tablo 2.8) ve iyice karıştırılıp spin down yapılmıştır. Kullanıldıktan sonra scZapR -20 °C'ye kaldırılmıştır.

Tablo 2.8 Zap master mix bileşenleri.

BİLEŞEN	HACİM
Nükleaz içermeyen su	16,8 µl
10X ZapR Buffer	2,2 µl
scZapR	1,5 µl
scR-Probes (önceden hazırlanmış ısıtılmış ve tekrar	1,5 µl
Reaksiyon başına toplam hacim	22 µl

11. 10. aşamada kurumuş olan AMPure beadlerin bulunduğu her bir tüpün üzerine 22 µl scZapR Master Mix eklenmiştir. Tüplerin kapağı kapatılıp manyetik tutucu üzerinden kaldırılmış ve resüspansiyon için vorteks yapılmıştır. Plate ile çalışırken pipetaj yapılmıştır.
12. Örneklerle 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.

13. Örnekler kısa bir süre çöktürülmüş ve tekrar manyetik tutucu üzerine alınmıştır, tamamen berrak oluncaya kadar manyetik tutucu üzerinde bekletilmiştir (1 dk ya da daha fazla).
14. Beadleri almamaya özen göstererek 20 µl süpernatant pipetle çekilmiştir, yeni bir PCR tüpüne ya da ayrı bir plate kuyusuna alınmıştır.
15. Süpernatant içeren PCR tüpü termal döngüleyiciye yerleştirilmiş ve “Zap” programı çalıştırılmıştır (Tablo 2.9).

Tablo 2.9 ‘Zap’ PCR programı protokolü.

SICAKLIK	SÜRE
37 °C	60 dk
72 °C	10 dk
4 °C	Sonsuz

2.2.2.1.5 Protokol: PCR2 – Final RNA-Seq Kütüphanesinin Çoğaltılması

Oluşturulan saf kütüphane, Illumina flow cell’i ile kümeleme (cluster) yapılmaya uygun sekansları içermektedir. PCR1'den sonra 12 örneğe kadar oluşturulabilecek pool seçimi aşağıda bulunan akışta çalışılacak örnek sayısını en aza indirerek daha fazla kullanım kolaylığı sağlamaktadır (Tablo 2.10).

Tablo 2.10 Ultra-Low- ya da Low-Input iş akışının seçimi.

Giriş Katagorisi	RNA Girişi	Son PCR1 Pooling	PCR1 Döngüsü	PCR1 Döngüsü	Son Yıkama	Final Sulandırma Hacmi (µl)
Çok düşük	10 pg	Evet	10	12-13	2	12
		Hayır	10	13		
	100 pg	Evet	10	10		
		Hayır	10	11-12		
	100-500 pg	Hayır	10	10		
Düşük	0,5-1 ng	Hayır	5	14	1	22
	5 ng	Hayır	5	13-14		
	10 ng	Hayır	5	12-13		

1. PCR2 programı önceden çalıştırılmış ve termal döngüleyici ısıtılmıştır.
2. PCR2 Master Mix, örnek sayısının %10 fazlası olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 2.11).

Tablo 2.11 PCR2 master mix bileşenleri.

BİLEŞEN	HACİM
Nükleaz içermeyen su	26 µl
SeqAmp CB PCR Buffer (2X)	50 µl
PCR2 Primers	2 µl
SeqAmp DNA Polymerase	2 µl
Reaksiyon Başına Toplam Hacim	80 µl

3. 80 µl PCR Master Mix bir önceki protokolün 16. aşamasından gelen tüp içerisindeki örneklerin üzerine eklenmiştir. Hafifçe vurarak ya da pipetaj ile karıştırılmış ve spin down yapılmıştır.
4. Tüpler termal döngüleyiciye yerleştirilmiş ve önceden hazırlanan PCR2 programı başlatılmıştır (Tablo 2.12).

Döngü sayısı giriş RNA'ya göre seçilir (Yapılan optimizasyon çalışması sonrası 13 cycle olarak karar verilmiştir).

Tablo 2.12 'PCR2' PCR programı protokolü.

SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
94 °C	1 dk	-
98 °C	15 sn	13
55 °C	15 sn	
68 °C	30 sn	
4 °C	Sonsuz	-

2.2.2.1.6 Protokol: AMPure Beadler Kullanılarak Final RNA-Seq Kütüphanesinin Pürifikasyonu

1. Kullanmadan 30 dk önce AMPure beadler oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her bir örneğe 100 µl AMPure bead eklenmiş ve 5 sn vortekslenmiştir.
2. Beadlerin cDNA'ya bağlanması için 8 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.

3. Kısa bir süre çöktürüldükten sonra örnekler manyetik tutucu üzerine yerleştirilmiş ve solüsyon tamamen berrak oluncaya kadar bekletilmiştir (yaklaşık 10 dk).
4. Solüsyon tamamen berrak olunca süpernatant çekilmiş ve atılmıştır.
5. Tüpler manyetik tutucu üzerindeyken beadler dağıtılmamaya dikkat edilerek her bir tüpe 200 µl taze hazırlanmış %80 etanol eklenmiştir. 30 sn beklenmiş ve ardından etanol pipetle alınarak atılmıştır.
6. 5. basamak tekrarlanmıştır.
7. Kısa bir süre çöktürüldükten sonra (yaklaşık 2 000 x g) örnekler tekrar manyetik tutucu üzerine yerleştirilmiş ve kalan etanol, varsa küçük hacimli bir pipetle tekrar çekilip atılmıştır.
8. Pellet kuruyana kadar 10 dk boyunca oda sıcaklığında kapaklar açık bir şekilde bekletilmiştir.
9. Pellet kurduğunda 22 µl Tris Buffer eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır.
10. 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.
11. Kısa bir süre çöktürüldükten sonra örnekler manyetik tutucu üzerine yerleştirilmiş ve solüsyon tamamen berrak oluncaya kadar bekletilmiştir (yaklaşık 10 dk).
12. 20 µl süpernatant yeni bir PCR tüpüne ya da kuyuya alınmıştır.

2.2.2.2 cDNA Kütüphanelerinin Bioanalyzer ile Uzunluk ve Safılıklarının Kontrol Edilmesi

Kütüphane hazırlık aşaması bittikten sonra Bioanalyzer (High Sensitivity Assay) ile elde edilen kütüphanenin kalitesi değerlendirilmiş kütüphane fragmanlarının doğru boyut dağılımı ve adaptör dimerlerinin olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Bioanalyzer (Agilent 2100) ile Agilent High Sensitivity DNA Kit ve çipleri kullanılarak kütüphane saflık ve uzunlukları kontrol edilmiştir. Elde edilen cDNA kütüphaneleri 1:10 dilüe edilerek çipe uygulanmıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Bioanalyzer (Agilent 2100) cihazı ile kütüphane uzunluk ve saflığının kontrol edilmesinde kullanılan DNA HS çip.

Jel Boya Karışımı:

1. High Sensitivity DNA gel matrix ve High Sensitivity DNA boyası 30 dk oda sıcaklığında bekletilip boya 10 sn santrifüj edilmiştir.
2. Boyadan 15 μ l alınarak gel matrikse ilave edilmiş ve 10 sn vorteksle karışması sağlanmıştır.
3. Jel-boya karışımı kit içinde bulunan filtreye aktarılmış ve 2 240 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
4. Jelin tamamı filtreden geçirildikten sonra jel kullanıma hazır hale gelmiştir.

Jel Yüklenmesi:

High Sensitivity DNA chip, chip priming stationa yerleştirilerek şekilde de görüldüğü üzere koyu renkteki G harfi ile belirtilmiş kuyuya jel-boya karışımından 9 μ l olacak şekilde yüklenmiştir (Şekil 6).

1. Jelin dağılması için kilit kapatılarak enjektör indirilmiş ve 60 sn bekletilerek kilit açılmıştır. Enjektörün 1 ml pozisyonuna gelmesi için 5 sn bekletilmiştir.
2. Priming station açılarak çip üzerinde bulunan diğer 3 adet G kuyularına da 9 μ l jel yüklemeleri gerçekleştirilmiştir.

Marker Yüklenmesi:

1. rnek ve ladder yüklenecek olan kuyulara 5 µl marker yüklemeleri gerçekleştirilmiştir. (Toplam 11 rnek ve 1 ladder için yüklenecek olan kuyulara marker yüklemeleri yapılmıştır).

Ladder Yükleme:

1. Kit içerisinde yer alan ladder tüpünden 1 µl olacak şekilde kuyuya yükleme gerçekleştirilmiştir.

rnek Yüklenmesi:

1. Hazırlanmış olan kütüphanelerin 1:10 dlsyonları yapılarak her bir kuyuya 1 µl yüklenmiştir. Kullanılmayan kuyulara 1 µl marker yükleme yapılmıştır.
2. ip vortekse (IKA vortex mixer) yerleştirilerek 1200 rpm de 2 dk horizontal olarak vortekslenmiştir.
3. Bioanalyzer (Agilent 2100) cihazına ip yerleştirilerek uygun olan High Sensitivity DNA programı seçilip program başlatılmıştır.

2.2.2.3 cDNA Kütüphanelerinin Qubit Florometre ile Miktar lmleri

Qubit® Florometre (Invitrogen) cihazı kullanılarak hazırlanmış olan kütüphanelerin miktarları Qubit ds DNA BR Kit ile ölçülmüştür (şekil 1.1.3.1). Kullanılan protokol aşağıdaki verilmiştir.

1. Qubit® Reagent 1:200 oranında floresan boya ile karıştırılarak Qubit® alışma Solüsyonu hazırlanmıştır.
2. Toplam okuma hacmi 200 µl olacak şekilde 0.5 ml’lik Qubit assay tüpleri kullanılarak standart okumaları için hazırlanan tüplere 10 µl Standart 1 ve 2’den, örnek okumaları için hazırlanan tüplere de 1 µl kütüphane rneğınden konulmuştur.
3. Hazırlanan tüpler Qubit® Florometre cihazına konularak okumalar gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.4 cDNA Kütüphanelerinin NovaSeq 6000 Cihazına Yüklenmesi

NovaSeq 6000 cihazına örnek yüklemesi gerçekleştirilmeden önce elde edilen kütüphane örneklerinin Qubit ile ng cinsinden elde edilen konsantrasyon değerleri, Bioanalyzer görüntülerinden elde edilen pik bp'ları (~ 500 bp) kullanılarak nM cinsine dönüştürülmüştür.

Kütüphane hazırlığında kullanılan kit özelliklerine göre cihaz için örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir. Her bir örnek birleştirilerek büyük havuz oluşturulmuştur. Büyük havuz 100 µl de 2,25 nM olacak şekilde hazırlanmıştır. Cihaza örneklerin yüklenmesi gerçekleşmeden önce normalizasyon, denatürasyon ve nötralizasyon işlemleri, kullanılan SP flow cell'ine uygun olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Normalizasyon: 0,6 µl 2,5 nM pHix kullanılarak büyük havuzun normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Denatürasyon: Normalize edilen büyük havuz içerisine 100 µl 0,2 N NaOH eklenerek denatürasyon işlemi başlatılmış ve sekiz dakika sürdürülmüştür.

Nötralizasyon: Denatürasyon işlemini sonlandırmak için 25 µl 400 mM Tris-HCl, pH 8.0 eklenerek büyük havuz nötralize edilmiştir.

Nötralizasyon işleminden sonra son hacmi 125,6 µl olan büyük havuz, kütüphane tüpü içerisine aktarılarak Novaseq 6000 cihazına yüklenmiştir.

Ortalama 32 saat run süresi sonrası datalar alınarak biyoinformatik analizlere geçilmiştir.

2.2.2.5 Transkriptom Datasının Biyoinformatik Analizi

2.2.2.5.1 Kalite Kontrol

Illumina NovaSeq 6000 cihazından alınan .bcl formatındaki ham dizi verileri öncelikle bcl2fastq (ver. 2.20) programı kullanılarak FastQ formatına dönüştürülmüştür. Sonrasında, FastQ verileri Fastp (ver. 0.23.4) çok yönlü kullanılan programı yardımıyla, adaptör dizilerinin ve düşük kalitedeki bazların kırılması suretiyle kapsamlı kalite kontrol filtrelemesine tabi tutulmuştur (Chen, 2023). Her bir FastQ dosyası için elde edilen toplam okumalar ve G+C yüzde parametreleri elde edilmiştir. Ayrıca her bir

dizileme çalışmasındaki okuma başına kalite değerlerini gösteren grafikler ayrı ayrı ve bütünleşik olarak sırasıyla FastQC (ver. 0.12.1) (Andrews, 2010) ve multiqc (ver. 1.15) (Ewels ve ark., 2016) programları kullanılarak oluşturulmuştur.

2.2.2.5.2 Karşılaştırmalı Ekspresyon Analizi

Zeytin bitkisinin (*Olea europaea* var. *sylvestris*) genomu ve genoma ait anotasyonlar OliveTree veritabanından indirilmiştir (Bullones ve ark., 2023). Kalite kontrole tabi tutulan FastQ formatındaki diziler HISAT2 (ver. 2.2.1) programı ile, yine HISAT2 programının indekisleme algoritmasıyla oluşturulmuş zeytin genom indeksine hizalanarak (Kim ve ark., 2019), akabinde SamTools (ver. 1.18) kullanılarak BAM dosyalarına çevrilip, sıralandı (Danecek ve ark., 2021), sonrasında Subread paketinde (ver. 2.0.6) bulunan FeatureCounts kullanılarak örneklerde bulunan genlerin yoğunluk değerleri sayı (count) cinsinden belirlenmiştir (Liao ve ark., 2014). Sonrasında kontrol ve kuraklık örneklerindeki gen yoğunlukları Trimmed Mean istatistiği (Trimmed Mean of M-values; TMM) ile normalize edilerek EdgeR (ver. 4.0.14) R kütüphanesi ile karşılaştırmalı ekspresyon analizine tabi tutulmuştur (Robinson ve Oshlack, 2010).

Karşılaştırmalı ekspresyon analizinde kuraklık örneklerinde kontrole göre en yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 gen listelenmiştir ve ayrıca anlamlı tüm genlerin anlamlılık durumları volkan grafiği ile gösterilmiştir.

Örneklere ait yoğunluk verileri Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis; PCA) yöntemi ile çok değişkenli uzayda incelenerek örneklerin lineer benzerlikleri gözlemlenmiştir. Örneklerin, yoğunluklarının benzerliklerine göre veri dağılımının ilk iki ve ilk üç temel bileşene izdüşümlerini yansıtacak şekilde, PCA grafikleri oluşturulmuştur.

Örneklerdeki gen yoğunlukları anlamlandırılarak, fonksiyonel zenginleştirme analizi yapıp, çeşitli gen ontolojisi (Gene Ontology; GO) veritabanındaki biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücrede bulunduğu lokasyon terminolojilerine karşılık gelecek şekilde hesaplanmış ve Z-skor (Z-score) normalize edilmiş ısı haritaları ile hiyerarşik kümeleme yöntemiyle grafiklendirilmiştir. Sonuç olarak elde edilen şekiller, grafikler ve tablolar pandas (ver. 2.2.3), scipy (ver. 1.14.1), numpy (ver. 2.1) kütüphaneleri ile Python 3 (ver. 3.11) programlama diline ek olarak, ggplot2 (ver. 3.5.1), plotly (ver. 4.10.4),

RColorBrewer (ver. 1.1-3) paketleri ile R (ver. 4.3.2) programlama dili kullanımında oluşturulmuştur.

2.2.2.6 Validasyon Çalışmaları

Elde edilen RNA dizi bilgisinden yararlanılarak, kuraklık stresi altında kuraklığa toleranslı (Memecik-94) ve hassas (Gemlik-26) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinde kuraklık (D) ve kontrol (K) grupları ile yeniden sulama yapılan iyileşme grupları (R) arasında farklı anlatım yapan transkript dizileri tespit edilmiştir. Tespit edilen bu genler için ilgili primerler dizayn edilerek sentezi gerçekleştirildikten sonra qRT-PCR tekniği kullanılarak validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışmalarında düşük konsantrasyonda toplam RNA ile çalışmaya olanak veren QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen) kit kullanılarak cDNA sentezleri gerçekleştirilmiş, SYBRGreen mix (BioRad) kullanılarak reaksiyonlar BioRad CFX96 cihazı ile gerçekleştirilerek ilgili genlere ait ekspresyon profilleri BioRad CFX96 Maestro software ile analiz edilmiştir.

2.2.2.6.1 Primer Düzenlemesi

Transkriptom datasından elde edilen karşılaştırmalı ekspresyon analizlerine göre, kontrol ve kuraklık gruplarına ait örneklerde yüksek oranda anlatım farklılığı gösteren genlere özgü primerler “Primer 3” programı kullanılarak düzenlenmiştir. Tüm primerlerin, housekeeping gen GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, OLEEUCI022518, F-CCTTCCGTGTGCCTACTGTT, R-GATGGCTGCCTTGATTTCAT) ile yakın primer bağlanma sıcaklık derecesine sahip olması (Tm:55 C) sağlanmıştır.

Ek olarak literatür taraması yapılarak kuraklık stresi ile ilişkili yapılan çalışmalarda kullanılan primerlerin sentezlenmesi sağlanmıştır. Sentezi gerçekleştirilen toplam 87 spesifik primer ve özellikleri EK 1-Tablo 1’de verilmiştir.

2.2.2.6.2 cDNA Sentezi

Real Time (qRT-PCR) çalışmalarında kullanılmak üzere cDNA sentezleri QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan RNA miktarları Tablo 2.13’deki gibidir.

Tablo 2.13 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait cDNA sentezi için kullanılan RNA miktarları.

Örnek Adı	RNA (250 ng) (µl)	Nükleaz İçermeyen Su (µl)
26K	6,44	5,56
26D	5,41	6,59
94K	5,58	6,42
94D	4,96	7,04
26KR	8,33	3,67
26DR	7,44	4,56
94KR	8,01	3,99
94DR	7,44	4,56

26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu.

Kullanılan QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen) kit protokolü aşağıda belirtilmiştir.

1. Kalıp RNA buz üzerinde çözdürülmüştür. gDNA Wipeout Buffer, Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix ve RNaz içermeyen su oda sıcaklığında (15–25°C) çözdürülmüştür. Tüplere hafifçe vurularak her bir solüsyon karıştırılmıştır. Tüpler, kenarlarında kalan sıvının toplanması için santrifüjlenmiş ve ardından buz üzerinde tutulmuştur.
2. Tablo 2.14'e göre, buz üzerinde genomik DNA eliminasyon reaksiyonu hazırlanmış ve karıştırılarak buz üzerinde tutulmuştur.

Tablo 2.14 Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu bileşenleri.

Reaksiyonu Bileşenleri	Hacim / Reaksiyon	Son Konsantrasyon
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl	1x
Kalıp RNA	Değişken (10pg - 1µg)	9
RNaz içermeyen su	Değişken	
Toplam Hacim	14 µl	-

3. Reaksiyon karışımı 42°C'de 2 dakika inkübe edilmiştir. Ardından hemen buzun üzerine koyulmuştur.
4. Ters transkripsiyon ana karışımı Tablo 2.15'e göre buz üzerinde hazırlanmış ve karıştırılarak buz üzerinde tutulmuştur. Ters transkripsiyon ana karışımı, kalıp RNA dışında birincil iplikli cDNA sentezi için gerekli tüm bileşenleri içermektedir.

Tablo 2.15 Ters transkripsiyon reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyonu Bileşenleri	Hacim / Reaksiyon	Son Konsantrasyon
Reverse-transcription master mix		
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl	
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl	1X
RT Primer Mix	1 µl	-
RNA	14 µl (5. adım)	
Toplam Hacim	20 µl	-

5. Ters transkripsiyon ana karışımını içeren her tüpe adım 3'ten (14 µl) kalıp RNA eklenmiştir ve karıştırılarak buz üzerinde tutulmuştur.
6. Reaksiyon karışımı 42°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir (Bazı nadir durumlarda; örneğin, RT-PCR ürünü 200 bp'den uzunsa veya çok yüksek derecede ikincil yapıya sahip RNA'lar analiz ediliyorsa), inkübasyon süresinin 30 dakikaya çıkarılması cDNA verimini artırabilir).
7. Quantiscript Ters Transkriptazı inaktive etmek için 95°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir.
8. Gerçek zamanlı PCR çalışmalarında kullanılmak üzere uzun süreli saklama için ters transkripsiyon reaksiyonları -20°C'de saklanmıştır.

Hazırlanmış olan cDNA'ların sentezlerinin olup olmadığının kontrolü housekeeping gen olarak kullanılan GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz) primeri kullanarak standart PCR ile %2'lik agaroz jel üzerinde kontrol edilmiştir. PCR reaksiyonu 5x MyTaq™ Reaction Buffer Red (BioLine) kullanılarak hazırlanmıştır. Kullanılan protokol ve PCR bileşenleri Tablo 2.16 ve Tablo 2.17'de belirtilmiştir.

Tablo 2.16 GAPDH primeri için kullanılan PCR bileşenleri.

PCR Bileşenleri	Hacim (µl)
5x MyTaq™ Red Reaction	5
MyTaq™ Polimeraz	0,25
Nükleaz içermeyen su	14,75
Primer F (10 µM)	1
Primer R (10 µM)	1
cDNA (1:10 dilüsyon)	3
Toplan Hacim	25

Tablo 2.17 GAPDH primerleri için kullanılan PCR protokolü.

Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
95	5 dk.	-
95	30 sn.	-
55	30 sn.	34
72	30 sn.	-
72	5 dk.	-
4	∞	-

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 80 dk. 120V'da yürütülmüştür. Ladder olarak GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) kullanılmıştır.

2.2.2.6.3 qRT-PCR

cDNA sentezinin standart PCR ile kontrolleri gerçekleştirildikten sonra SYBRGreen mix (BioRad) ile qRT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kuraklık stresi altında gen ifadelerinin profillenmesi için qRT-PCR çalışmaları, BioRad CFX96 cihazı kullanılarak yapılmıştır. İlgili gen ifadelerine ait grafikler için, bu sistemde kullanılan BioRad CFX965 Maestro Software programından yararlanılmıştır. qRT-PCR için kullanılan protokol ve PCR bileşenleri Tablo 2.18 ve Tablo 2.19'de belirtilmiştir.

Tablo 2.18 Real Time PCR için kullanılan PCR bileşenleri.

PCR Bileşenleri	Hacim (µl)
Nükleaz içermeyen su	5,5
Primer F	0.5
Primer R	0.5
SYBR	7,5
cDNA	1
Toplan Hacim	15

Tablo 2.19 Real Time PCR programı.

SICAKLIK	ZAMAN	DÖNGÜ
94 °C	3 dk.	-
94 °C	10 sn.	
50 °C	30 sn.	50
72 °C	40 sn.	
94 °C	1 dk.	-
53 °C	1 dk.	-
65 °C	5 sn.	Melt Curve
95 °C	0.5 °C	

2.3. PROTEOM ÇALIŞMALARI

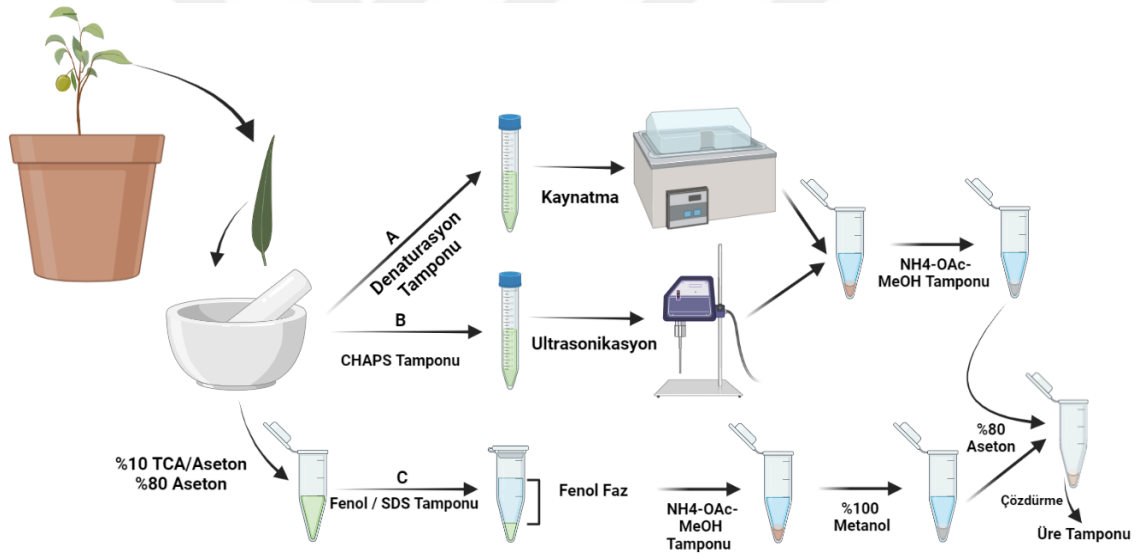
Proteomik çalışmalar kapsamında kuraklık stresi uygulanmış kuraklığa toleranslı (94-Memecik) ve hassas (Gemlik-26) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinde, kuraklık (D) ve kontrol (K) grupları ile yeniden sulama yapılan iyileşme grupları (R) arasında kuraklık stresinin oluşturduğu farklılıklar protein düzeyinde incelenmiştir. Bu kapsamda ekstrakte edilen toplam protein örneklerine, kütle spektrometri bazlı analizden önce Filtre Destekli Numune Hazırlama (FASP) metodu uygulanarak toplam proteinlerin filtre üzerinde peptitlerine ayrıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen triptik peptitler MS/MS analizi öncesi hidrofobik durumlarına göre ters faz sıvı kromatografisi (1D-RP) ile ayrıştırılmıştır. LC-MS/MS analizi için Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 RSLC

Ultra Nano ultra performanslı sıvı kromatografisi ve Thermo Scientific™ EasySpray™ iyon kaynağına sahip Thermo Scientific Q Exactive™ HF kütle spektrometresi kullanılmıştır. Proteome Discoverer Yazılımı kullanılarak Sequest HT taraması ile protein çeşitleri analiz edilmiştir.

2.3.1 Protein Ekstraksiyonu

Proteomik çalışmalar için belirlenen 3 farklı protein ekstraksiyon metodu (A: Kaynatma metodu, B: CHAPS metodu, C: TCA metodu) ile karşılaştırma yapılmıştır (Wang ve ark., 2006; Capriotti ve ark., 2013). Yapılan analiz sonuçlarına göre en yüksek protein verisi elde edilen ekstraksiyon metodu (B: CHAPS ekstraksiyonu metodu) seçilerek proteomik çalışmalar için kullanılmıştır.

Kullanılan metotların iş akış şeması Şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8 Protein ekstraksiyon metod optimizasyonunda karşılaştırılan farklı protein ekstraksiyon metotları (A: Kaynatma metodu, B: CHAPS metodu, C: TCA metodu).

2.3.1.1 Protein Ekstraksiyonu A (Kaynatma Metodu)

1. 0,5 g zeytin bitkisi yaprak dokusu havan ve tokmak yardımıyla sıvı azot içerisinde homojenize edilmiştir.
2. Homojenat 15 ml tüp içine aktarılarak üzerine 1,5 mL ekstraksiyon tamponu A ($0,125 \text{ mol L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.4), %5 (v/v) gliserol, %3 (m/v) SDS, 25 mmol L^{-1} DTT ve %1 (v/v) protease inhibitor karışımı) eklenmiştir.

3. Homojenat 15 ml'lik tüp içinde birkaç saniye vorteks ile karıştırılarak, 10 dakika kaynatılmıştır.
4. Homojenat 1,5 ml'lik tüpe alınarak oda sıcaklığındaki santrifüjde 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çözünmeyen materyal ve hücrel debrislerden uzaklaştırılmıştır.
5. Süpernatant 2 ml'lik tüpe aktararak 3 katı kadar soğuk metanol tamponu içindeki 0,1 M amonyum asetat ($\text{NH}_4\text{-OAc-MeOH}$) ile karıştırılmıştır.
6. Proteinler 21.000 xg'de soğuk santrifüjde 5 dk santrifüj edilerek pelet elde edilmiştir.
7. Elde edilen protein peleti 2 kez soğuk metanol tamponu içindeki 0,1 M amonyum asetat ($\text{NH}_4\text{-OAc-MeOH}$) ile yıkanmıştır.
8. %80 aseton içeren tampon ile (kısa vorteks yapılarak) pelet iki kez daha yıkanmıştır.
9. Pelet, 100 μl üre tamponu (50 mM Tris-HCl, pH:6.8, %0,2 SDS, 8 M üre ve 10 μl β -mercaptoethanol her 1 ml tamponda) ile çözündürülmüştür.
10. Toplam protein konsantrasyonları Qubit Protein Assay Kit kullanılarak florometrik olarak ölçülmüştür.

2.3.1.2 Protein Ekstraksiyonu B (CHAPS Metodu)

1. 0,5 g zeytin bitkisi yaprak dokusu havan ve tokmak yardımıyla sıvı azot içerisinde homojenize edilmiştir.
2. Homojenat 15 ml tüp içine aktararak üzerine 1,5 mL ekstraksiyon tamponu B (0,125 mol L^{-1} Tris-HCl (pH 7.4), 50 mmol L^{-1} NaCl, 3% (m/v) CHAPS ve 1% (v/v) protease inhibitor karışımı) eklenmiştir.
3. Homojenat 15 ml tüp içinde 3 döngülük 30 sn' lik %30'luk amplitüt ile ultrasonikasyona tabii tutulmuştur.
4. Homojenat 1,5 ml'lik tüpe alınarak oda sıcaklığındaki santrifüjde 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çözünmeyen materyal ve hücrel debrislerden uzaklaştırılmıştır.
5. Süpernatant 2 ml'lik tüpe aktararak 3 katı kadar soğuk metanol tamponu içindeki 0,1 M amonyum asetat ($\text{NH}_4\text{-OAc-MeOH}$) ile karıştırılmıştır.

6. Proteinler 21.000 x g'de soğuk santrifüjde 5 dk santrifüj edilerek pelet elde edilmiştir.
7. Elde edilen protein peleti 2 kez soğuk metanol tamponu içindeki 0,1 M amonyum asetat ($\text{NH}_4\text{-OAc-MeOH}$) ile yıkanmıştır.
8. %80 aseton içeren tampon ile (kısa vorteks yapılarak) pelet iki kez daha yıkanmıştır.
9. Pelet, 100 μl üre tamponu (50 mM Tris-HCl pH:6.8, %0,2 SDS, 8 M üre ve 10 μl β -mercaptoethanol her 1 ml tamponda) ile çözündürülmüştür.
10. Toplam protein konsantrasyonları Qubit Protein Assay Kit kullanılarak florometrik olarak ölçülmüştür.

2.3.1.3 Protein Ekstraksiyonu C (TCA Metodu)

1. 0,5 g zeytin bitkisi yaprak dokusu havan ve tokmak yardımıyla sıvı azot içerisinde homojenize edilmiştir.
2. Homojenat 15 ml tüp içine aktararak üzerine 0,2 ml %10 TCA/aseton karışımı eklenmiştir.
3. Homojenat birkaç saniye vorteks ile karıştırılarak 2 ml'lik tüpe aktarılmıştır.
4. 16.000 x g'de 10 dakika 4°C'de homojenat santrifüj edilmiştir.
5. Oluşan süpernatant üzerine %80 metanol içeren 0,1 M amonyum asetat eklenmiştir.
6. Oluşan karışım birkaç saniye vorteks ile karıştırılmış ve 16.000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir.
7. Süpernatant atılarak pelet üzerine %80 aseton eklenmiştir.
8. Karışım tamamen homojen olana kadar vortekslenmiş ve 16.000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant atılarak pelet içerisinde bulunan asetonun uçması için 50 °C'de 10 dakika bekletilmiştir.

10. Kurutulan pelet üzerine 5ml 1:1 fenol (pH:8.0, Sigma) / SDS tamponu (% 30 sükröz, %2 SDS, 0,1 M Tris-HCl pH:8.0, %1 β -mercaptoethanol) eklenerek birkaç saniye vorteks ile karıştırılmıştır.
11. Karışım 95 °C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında 16.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Süpernatant 2 ml'lik yeni bir tüpe alınmıştır.
13. Süpernatant üzerine 5 hacim % 80 metanol içeren 0,1 M amonyum asetat eklenerek - 20 °C'deki buzdolabına kaldırılarak tüm gece bekletilmiştir.
14. Buzdolabından çıkarılan protein karışımı 16.000 x g'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
15. Süpernatant atılarak, oluşan protein peleti 2 kez soğuk metanol tamponu (%100) 2 kez de %80 aseton içeren tampon ile (kısa vorteks yapılarak) yıkanmıştır.
16. Pelet, 100 μ l üre tamponu (50 mM Tris-HCl pH:6.8, %0,2 SDS, 8 M üre ve 10 μ l β -mercaptoethanol her 1 ml tamponda) ile çözündürülmüştür.
17. Toplam protein konsantrasyonları Qubit Protein Assay Kit kullanılarak florometrik olarak ölçülmüştür.

2.3.2 Protein Miktar Ölçümleri

Elde edilen toplam protein örneklerinin miktarları Qubit® 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazında Qubit Protein Assay Kit kullanılarak ölçülmüştür. Kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

1. Qubit® Protein Reagent 1:200 oranında floresan boya ile karıştırılarak Qubit® Çalışma Solüsyonu hazırlanmıştır.
2. Toplam okuma hacmi 200 μ l olacak şekilde; standart okuma tüplerine 10 μ l Standart (1, 2 ve 3), örnek tüplerine de 1 μ l protein örneği olacak şekilde 0,5 ml'lik Qubit assay tüpleri hazırlanmıştır.

3. Hazırlanan Qubit assay tüpleri 3 sn vorteks işleminden sonra oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edilmiştir.
4. Hazırlanan tüpler Qubit® 2.0 Florometre cihazına konularak önce standart okumaları sonra da protein örnek okumaları gerçekleştirilmiştir.

2.3.3 Triptik Peptitlerin Hazırlanması

Kütle spektrometri bazlı analizden önce proteinlerin filtre üzerinde sindirimi için Filtre Destekli Numune Hazırlama (FASP) metodu kullanılmıştır. İndirgenmiş sistein kalıntılarının alkillenmesi filtre üzerinde gerçekleştirilmiştir. Proteinler filtre üzerinde tripsin enziminin optimum tamponunda proteolize edilmiştir. Peptit eldesi FASP Protein Digestion Kit (Expedeon) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

1. Qubit Protein Assay kullanılarak protein miktarı tayin edilmiş örnekler kit içerisindeki amonyum bikarbonat ile 50 µL'ye seyreltilerek protein son konsantrasyonu 25 µg olacak şekilde ayarlanmıştır (0,5 µg/µL).
2. Protein örneği 30 kDa cut-off kolonlara transfer edilerek 200 µL üre solüsyonu ile karıştırılmıştır ve 14.000 x g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem toplam 2 defa tekrar edilmiştir.
3. Alt tüpe geçen filtrat boşaltılmıştır.
4. 100 µl 1x IAA çözeltisi ilave edilerek 1 dakika boyunca vorteks ile karıştırıldıktan sonra 20 dakika boyunca karıştırmadan karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir.
5. Örnekler 14.000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
6. Kolonlara 100 µL üre solüsyonu eklenerek 14.000 x g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 defa daha tekrar edilmiştir.
7. Alt tüpe geçen filtrat boşaltılmıştır.
8. Kolonlara 100 µL 50 mM amonyum bikarbonat eklenerek 14.000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 defa daha tekrar edilmiştir.

9. Kolonlara 50 µL tripsin kesim solüsyonu (20 µg tripsin (Promega), 1000 µL 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde) eklenmiştir (Protein-Enzim oranı 25:1).
10. Örnekler gece boyu (~16-18 saat) 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.
11. Filtre kolonları temiz ependorf tüplere transfer edilip, örneklerin üzerine 40 µL 50 mM amonyum bikarbonat eklenerek 14.000 x g’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 defa daha tekrar edilmiştir.
12. Kolonlara 50 µL 0,5 M NaCl solüsyonu eklenerek 14.000 x g’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
13. Alt tüpe geçen peptitler Proten-LoBind tüplere alınmış ve peptit konsantrasyonu NanoDrop ile ölçülmüştür.
14. Örneklerin son konsantrasyonu 150 ng/µL olacak şekilde % 0,1 formik asit ile seyreltilmiş ve cihaza uygun tüplere aktarılmıştır.

2.3.4 Protein Tanımlama ve Miktar Tayini için LC–MS/MS Analizi

Elde edilen triptik peptitler MS/MS analizi öncesi hidrofobik durumlarına göre ters faz sıvı kromatografisi (1D-RP) ile ayrıştırılmıştır. Analizlerde Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 RSLC Ultra Nano ultra performanslı sıvı kromatografisi ve Thermo Scientific™ EasySpray™ iyon kaynağına sahip Thermo Scientific Q Exactive™ HF kütle spektrometresi kullanılmıştır.

1. Analize başlamadan önce cihazın kalibrasyon ayarları yapılmıştır. Tuzak kolonunda (C18 PepMap100, 5 µm, 100A, 300 µm i.d x 5mm) alıkonulmuş ve ardından nano pompa ile oluşturulan asetronitril gradienti ile tuzak kolondan ayrılan peptitler, C18 (Easy-Spray ES804A RSLC C18, 2 µm, 100A 75 µm x 15cm) analitik kolonunda (kolon sıcaklığı 40 °C) 300 nL/dk akış hızında 50 dk’lık ters faz kromatografisi ile hidrofobik etkileşimler ile ayrıştırılmıştır.
2. Toplam 500 ng peptit, 150 mm Nano LC kolonuna yüklenmiştir.
3. Mobil Faz A ve Mobil Faz B sırası ile 0.1%FA, 98:2% H₂O:ACN ve 0.1%FA 98:2% ACN:H₂O olarak hazırlanmıştır.

4. Toplam gradyan süresi x olarak belirtilirse, B fazı 0,09x dakika içinde %3'ten %8'e, 0,76x sürede %8'den %24'e ardından 0.15x dakika içinde %24'den %36'ya çıkarılmıştır.
5. Tüm gradyanlar için bunu, 0,5 dakika içerisinde % 64 B'ye çıkarılma ve 6,5 dakika süreyle muhafaza edilen % 64 B'de bir yıkama izlemiştir. Akış hızı 300 nL/dk'da tutulmuştur.
6. Yeniden dengeleme %3 B çözeltisi ile 10 dk yıkama ile gerçekleştirilmiştir. Q Exactive HF-X cihazı (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) Tune (Versiyon 2.9) cihaz kontrol yazılımı ile kalibre edilmiştir.
7. Püskürtme voltajı 2 kV, funnel RF seviyesi 50, ve kapiller sıcaklığı 270 °C olarak ayarlanmıştır. Cihaz DDA analizi yapmak üzere “Full MS/DD–MS/MS” konfigürasyonuna ayarlanmıştır.
8. Full MS çözünürlüğü m/z 200 için 120000 olarak ayarlanmıştır. Full MS AGC hedefi IT 100 ms iken 3E6 olarak ayarlanmıştır. Kütle aralığı 350–1400 olarak tanımlanmıştır.
9. MS/MS AGC hedef değeri 5E4, “intensity threshold” 4E4 ve izolasyon genişliği 1,2 m/z olarak ayarlanmıştır.
10. Normalizasyon çarpışma enerjisi 28% olarak ayarlanmıştır. Tüm datalar pozitif iyon modunda elde edilmiştir.

2.3.5 Kalite Kontrol

Analize başlamadan önce Kalite Kontrol Materyali olarak 2 µg Pierce HeLa Protein Digest Standard (88329) yüklemesi yapılmıştır. Tüm veriler pozitif iyon modunda elde edilmiştir. Kütle verilerinin çıkarılması ve analizi TraceFinder Yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri analizi Sequest HT arama algoritması ile Proteome Discoverer 2.4 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dosyalar 0,01'lik Sıkı FDR ile Sequest HT arama motoru kullanılarak NCBI Viridiplantae (Taksonomi No: 33,090) veritabanında aranmıştır. Sequest HT parametreleri olarak 10 ppm'lik ön kütle toleransı ve 0,02 Da'lık parça kütle toleransı kullanılmıştır. Proteinlerin kantifikasyonu Proteome Discoverer 2.4

içindeki etiketsiz kantifikasyon (LFQ) algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein bolluğundaki anlamlı farklılıklar, 2 kattan daha büyük bir değişimle ($\log_2$ FC: 1 ve -1), Proteome Discoverer yanlış keşif oranına göre ayarlanmış P değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir ($P < 0,05$).

2.3.6 Karşılaştırmalı Grup Analizi

Proteinlerdeki ekspresyon farklılıklarının analizi için Proteome Discoverer 2.4 işleme ve konsensüs iş akışları için LFQ modülü kullanılmıştır. Her bir bitki ekstrakt örneği üç defa analiz edilerek üç analizden en az iki tanesinde tanımlanan peptitler hesaplamalara dahil edilmiştir.

Yöntemde farklı örnekler grup olarak karşılaştırılarak grupları birbirinden ayıran proteinler tanımlanmıştır. Bu yazılım ile her bir örnek grubundaki protein farklılıkları hesaplanıp tablo halinde listelenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitlerinde, kuraklık stresi ve sonrasında sulama yapılan iyileşme (recovery) gruplarında gelişen moleküler düzeydeki yanıtlar, transkriptomik ve proteomik analizler kullanılarak bütüncül bir yaklaşımla değerlendirilmiştir. Bulgular, kuraklık stresine karşı gelişen moleküler yanıtların gen ekspresyonu ve protein düzeyinde çeşitlere özgü farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur.

3.1. TRANSKRİPTOM ANALİZ SONUÇLARI

Bitkilerde kuraklık gibi abiyotik stres koşullarında ortaya çıkan gen ekspresyon değişiklikleri, bitki türlerindeki bu stres faktörlerine karşı geliştirdiği adaptif moleküler mekanizmaların anlaşılması açısından kritik öneme sahiptir. Kuraklık stresine verilen tepkiler, çoğunlukla strese duyarlı genlerin farklı kombinasyonlar hâlinde ifade edilmesiyle şekillenmektedir. Kuraklık koşullarında bazı genlerin farklı bitki türlerinde benzer biçimde yukarı veya aşağı düzenlendiği bilinmekle birlikte, geniş ölçekli gen ekspresyon profillemeye çalışmaları, gen ekspresyon desenlerinin türler arasında belirgin düzeyde farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Bu doğrultuda yürüttüğümüz transkriptomik çalışmada, zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stresinin oluşturduğu transkriptomik farklılıklar RNA dizileme (RNA-Seq) yöntemiyle RNA düzeyinde analiz edilmiştir. Elde edilen RNA sekans verileri biyoinformatik araçlarla değerlendirilmiş ve kuraklık uygulanan örneklerde kontrol gruplarına kıyasla en anlamlı farklılık gösteren transkript ve genler belirlenmiştir. Tanımlanan bu genlerin kuraklık stresi altındaki ekspresyon profilleri, gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) tekniği ile doğrulanmıştır. Böylece, zeytin çeşitlerinin kuraklık stresine karşı geliştirdiği yanıt mekanizmaları, gen ekspresyon düzeyindeki farklılıklar temelinde karşılaştırmalı olarak ortaya konmuştur.

3.1.1 Toplam RNA'ların Kalite Parametre Ölçüm Sonuçları

Transkriptom kütüphanesi oluşturulmadan önce RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak ekstrakte edilen ve genomik DNA'dan uzaklaştırılmış olan toplam

RNA'ların Nanodrop 8000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile saflık ve konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 *O. europaea* L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam RNA örneklerinin NanoDrop cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng μl^{-1})	260/280	260/230	Örnek Adı	Konsantrasyon (ng μl^{-1})	260/280	260/230
26K	30, 80	1, 72	2, 06	26KR	60, 97	1, 73	2, 09
26D	60, 44	1, 73	2, 01	26DR	43, 57	1, 88	2, 11
94K	82, 06	1, 74	2, 09	94KR	59, 11	1, 70	2, 08
94D	68, 04	1, 74	2, 10	94DR	28, 78	1, 86	2, 23

26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu

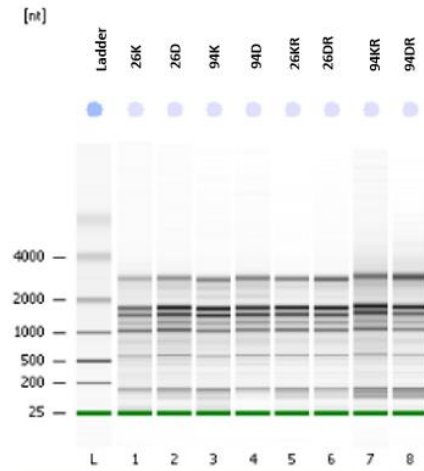
NanoDrop ile kalite parametrelerine bakılan örnek setleri içerisinde yüksek kalite (260nm/280nm ve 260nm/230nm 1.8-2.1) ve konsantrasyona sahip örnekler seçilerek Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, USA) cihazındaki RIN (RNA Integrity Number) değerleri açısından değerlendirilmiştir (Tablo 3.2, Şekil 3.1).

Tablo 3.2 *O. europaea* L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam RNA örneklerinin Bioanalyzer cihazı ile elde edilen RIN (RNA Integrity Number) ölçüm sonuçları.

Örnek Adı	RIN	Örnek Adı	RIN
26K	5,60	26KR	5,9
26D	5,70	26DR	6,10
94K	6	94KR	5,40
94D	6	94DR	6,60

26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name: DE13806879 Firmware: C.01.069
Serial#: DE13806879 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Plant RNA Pico.xsy

Assay Class: Plant RNA Pico

Version: 1.3

Assay Comments: Total RNA Analysis pg sensitivity (Plant)

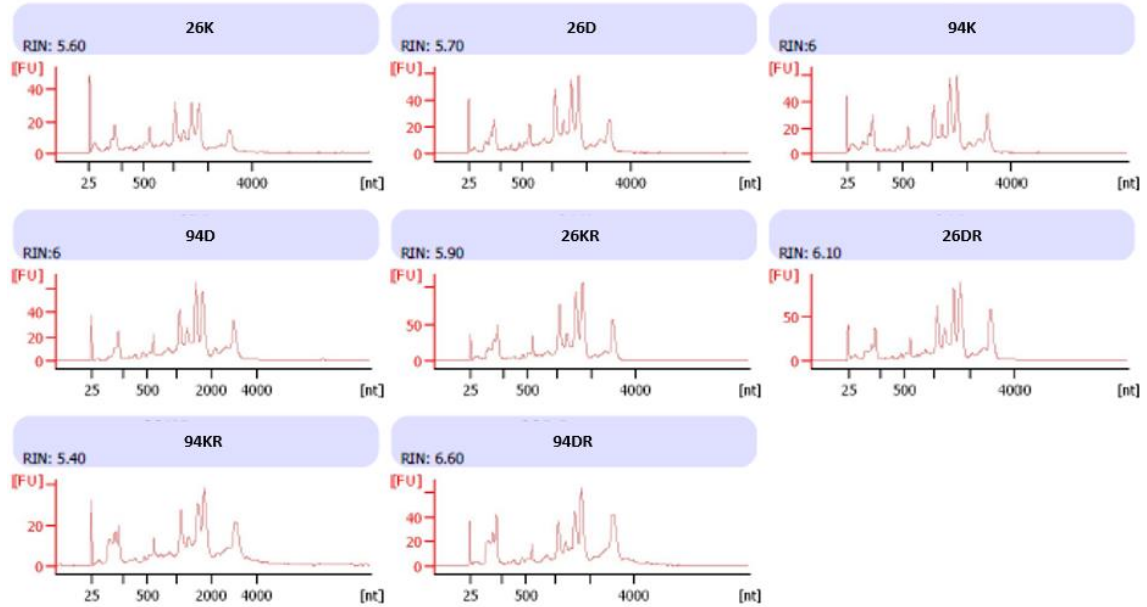
© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #:

Reagent Kit Lot #:

Chip Comments:



Şekil 3.1 *O. europaea* L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam RNA örneklerinin Bioanalyzer cihazı ile elde edilen RNA kalite parametre ölçüm sonuçları. 26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, USA) cihazındaki RIN (RNA Integrity Number) değerleri açısından değerlendirilerek orta- yüksek RIN değerine sahip olan RNA örnekleri seçilmiş ve seçilen örneklerin Qubit® 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazı ile konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır (Tablo 3.3).

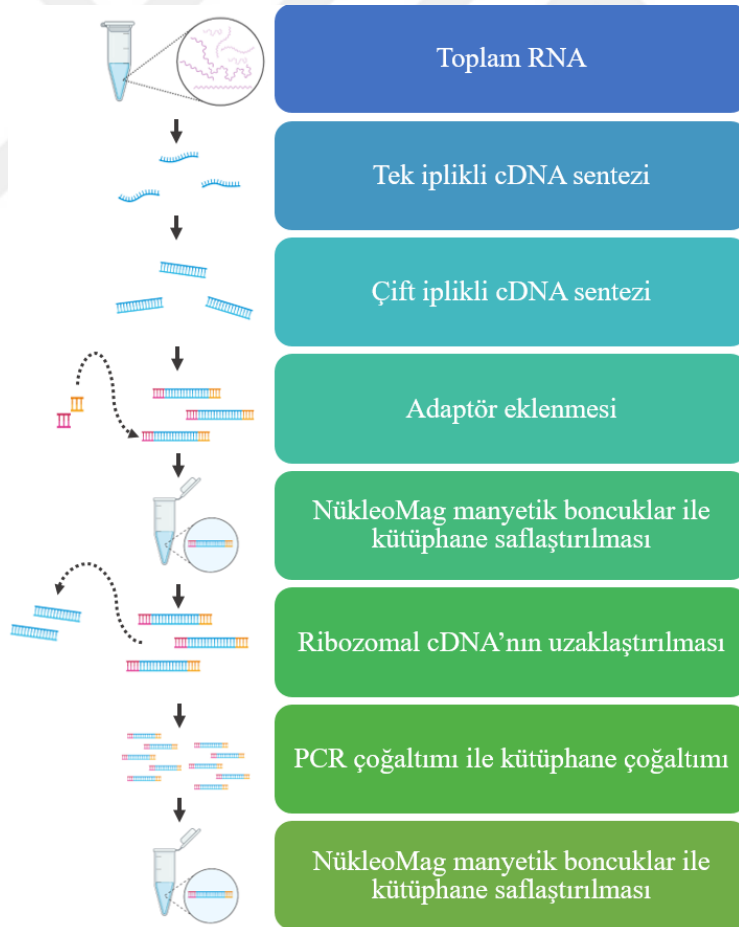
Tablo 3.3 *O. europaea* L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam RNA örneklerinin Qubit cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Örnek Adı	ng μ l ⁻¹	Örnek Adı	ng μ l ⁻¹
26K	10, 2	26KR	13, 2
26D	15, 1	26DR	17, 7
94K	23, 0	94KR	18, 1
94D	17, 3	94DR	16, 2

26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu

3.1.2 RNA-Seq Kütüphane Hazırlık Sonuçları

Saf ve yeterli konsantrasyona sahip olduğu tespit edilen toplam RNA örnekleri ile RNA-Seq (cDNA) kütüphaneleri SMART-Seq® Stranded Kit (Takara Bio USA, Inc.) protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 SMART-Seq Stranded Kit transkriptom kütüphane oluşturma iş akışı.

Kütüphane hazırlığı öncesi toplam RNA örnekleri SMART-Seq® Stranded Kit (Takara Bio USA, Inc.) protokolünde bulunan ‘‘Tek İplikli cDNA Sentezi’’ basamağında belirtilen şekilde son konsantrasyon 2,5 ng ve son hacim 7µl olacak şekilde ‘‘RNase Inhibitor (RRI) Water’’ ile Tablo 3.4’de gösterildiği oranlarda seyreltilmiştir.

Tablo 3.4 cDNA kütüphanesi oluşturmak için kullanılan toplam RNA’ların konsantrasyon ölçümleri ve kütüphane giriş seyreltme oranları.

Örnek Adı	Qubit (ng µl ⁻¹)	1:10 Seyreltme	Kütüphane giriş RNA konsantrasyonu (2,5 ng için)	
			RNA Miktarı	RRI Water Miktarı
26K	10,2	1,02	2,45	4,55
26D	15,1	1,51	1,65	5,35
94K	23,0	2,30	1,08	5,92
94D	17,3	1,73	1,44	5,56
26KR	13,2	1,32	1,89	5,11
26DR	17,7	1,77	1,41	5,59
94KR	18,1	1,81	1,38	5,62
94DR	16,2	1,62	1,54	5,46

26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu

Kütüphane hazırlığı sırasında ‘‘PCR1- İllumina Adaptör ve Indexlerinin Eklenmesi’’ basamağında her bir kütüphane örneği için seçilen ilgili adaptör listesi Tablo 3.5’te gösterildiği gibidir.

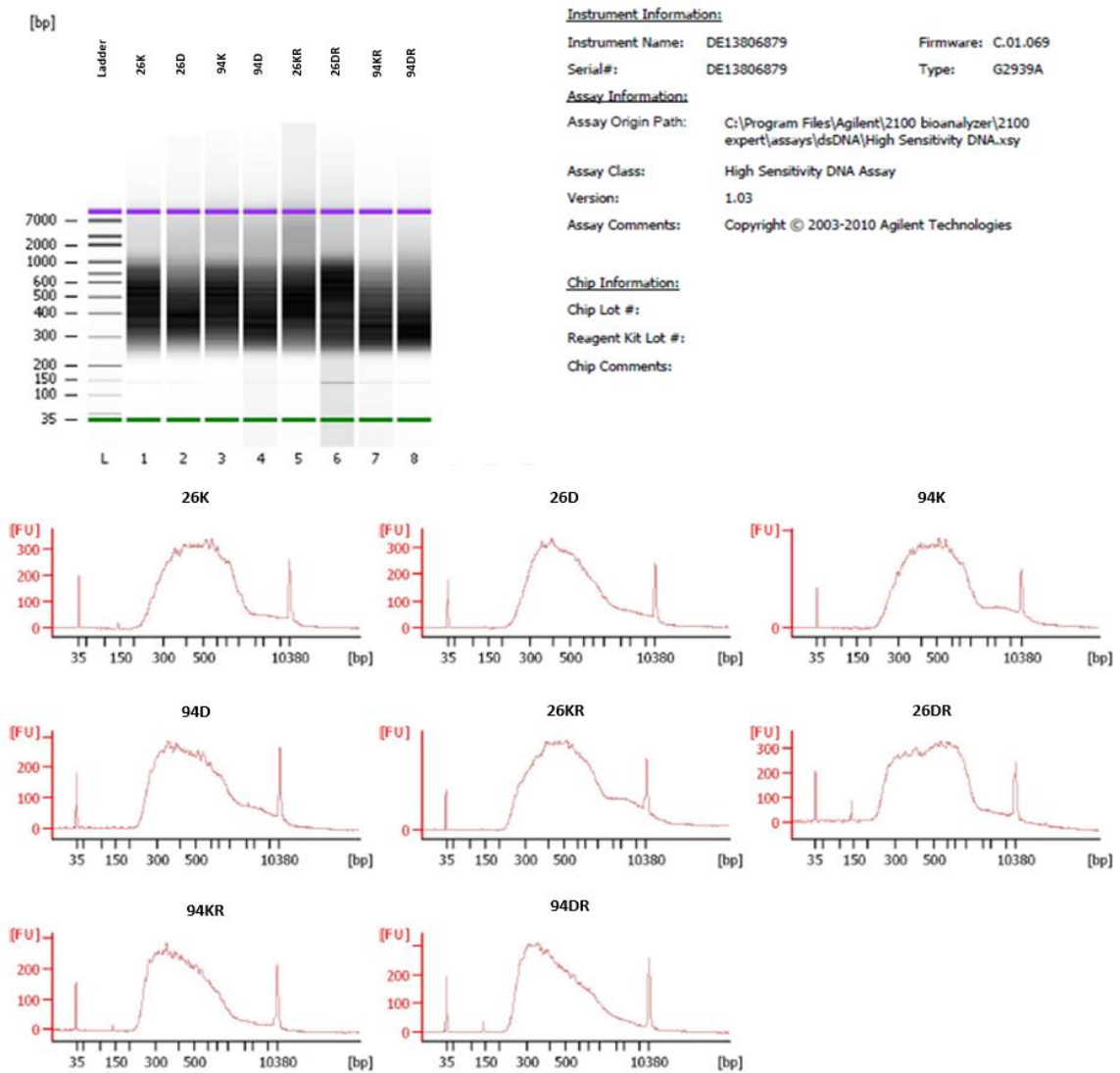
Tablo 3.5 cDNA kütüphaneleri için seçilen ilgili adaptör listesi.

Örnek Adı	Adaptör	Index 2 (i7)	Index 2 (i5)	Index 1 (i7)	Index 2 (i5)
26K	F3	D703	D506	CGCTCATT	TAATCTTA
26D	F4	D704	D506	GAGATTCC	TAATCTTA
94K	G3	D703	D507	CGCTCATT	CAGGACGT
94D	G4	D704	D507	GAGATTCC	CAGGACGT
26KR	H7	D707	D508	CTGAAGCT	GTACTGAC
26DR	H8	D708	D508	TAATGCGC	GTACTGAC
94KR	H11	D711	D508	TCTCGCGC	GTACTGAC
94DR	H12	D712	D508	AGCGATAG	GTACTGAC

26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu

3.1.3 cDNA Kütüphanelerinin Kalite Parametre Ölçüm Sonuçları

SMART-Seq® Stranded Kit (Takara Bio USA, Inc.) ile hazırlanan cDNA kütüphane örneklerinin kalite parametrelerinin kontrolü için Bioanalyzer (High Sensitivity Assay) cihazı kullanılmıştır. Kütüphane örnek konsantrasyonları yaklaşık 1,5 ng/μl olacak şekilde seyreltilerek çipe yüklenmiştir. Elde edilen Bioanalyzer görüntüleri Şekil 3.3’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.3 cDNA kütüphanelerinin uzunluklarının tespiti için dsDNA HS çipleri kullanılarak elde edilen Bioanalyzer sonuçları. 26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu.

RNA-Seq kütüphanesi oluşturulduktan sonra tüm örnekler için Qubit (dsDNA BR) cihazı ile florometrik konsantrasyon ölçümü yapılmıştır. Qubit cihazı ile elde edilen kütüphane

örneklerine ait ng konsantrasyon değerleri, nM cinsine aşağıdaki denklem kullanılarak dönüştürülmüştür (Denklem 1). Denklemde bulunan ‘‘ortalama kütüphane boyutu (bp)’’ için her bir kütüphane örneğinin Bioanalyzer sonuçlarında en yüksek pik olduğu tespit edilen 500 bp sabit değer olarak kullanılmıştır.

Denklem 3.1 Qubit cihazı ile ng cinsinden elde edilen konsantrasyon değerlerini nM cinsine dönüştürmek için kullanılan denklem.

$$Konsantrasyon (nM) = \frac{Konsantrasyon (ng/\mu l)}{660 \text{ g/mol} \times \text{ortalama kütüphane boyutu (bp)}} \times 10^6$$

Son durumda her örneğin konsantrasyonlarının ng ve nM cinsinden ölçümleri aşağıdaki tablodaki gibidir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6 cDNA kütüphanelerinin Qubit cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Örnek Adı	Kütüphane Konsantrasyonu	Kütüphane Konsantrasyonu
	(ng μ l ⁻¹)	(nM)
26K	117	360,55
26D	126	388,29
94K	116	357,47
94D	125	385,21
26KR	163	502,31
26DR	158	486,9
94KR	113	348,23
94DR	57	175,65

26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu

cDNA kütüphane hazırlık aşaması sonrası NovaSeq 6000 cihazına yüklenen örneklere ait okuma sonuçları 30-40 M arasındadır. Yaklaşık 32 saatlik bir işleme (run) süresi sonrası ‘‘Quality Scores (Q 30)’’ %95,73 ve ‘‘Clusters Passing Filter’’ %80,2 olarak tespit edilmiştir. NovaSeq 6000 cihazında gerçekleşen işleme sonrası datalar alınarak biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.1.4 Transkriptom Datasının Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Fastp ve FastQC programları ile kalite kontrol filtrelemesine tabi tutulan bütün örneklere ait 24 FastQ dosyası içerisindeki toplam dizi sayıları, dizi uzunlukları, GC yüzde

parametreleri, düşük kalite olarak belirtilen dizi sayıları, toplam baz miktarları ve ortalama baz kalite değerleri hesaplanmıştır. Dizilerin baz başına kalite istatistikleri son derece yüksek hassasiyette gözlenmiş ve baz başına ortalama Phred kalite değeri 35'in üzerinde olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.7).

Tablo 3.7 cDNA kütüphane örneklerine ait kalite kontrol parametreleri.

Dosya Adı	Toplam Okunan Dizi	Dizi Uzunluğu	GC (%)	Düşük Kaliteli Diziler	Toplam Baz (Gbp)	Ana Baz Kalitesi
26K1	42613756	101	54	0	4,3	36,25
26K2	42613756	101	55	0	4,3	35,67
26D1	44116328	101	54	0	4,4	36,20
26D2	44116328	101	55	0	4,4	35,81
26KR1	34346178	101	55	0	3,4	36,22
26KR2	34346178	101	56	0	3,4	35,52
26DR1	30522980	101	55	0	3	36,22
26DR2	30522980	101	56	0	3	35,55
94K1	43555843	101	54	0	4,3	36,25
94K2	43555843	101	55	0	4,3	35,77
94D1	39522085	101	54	0	3,9	36,20
94D2	39522085	101	55	0	3,9	35,87
94KR1	44702773	101	54	0	4,5	36,24
94KR2	44702773	101	55	0	4,5	35,80
94DR1	36900730	101	55	0	3,7	36,26
94DR2	36900730	101	56	0	3,7	35,79

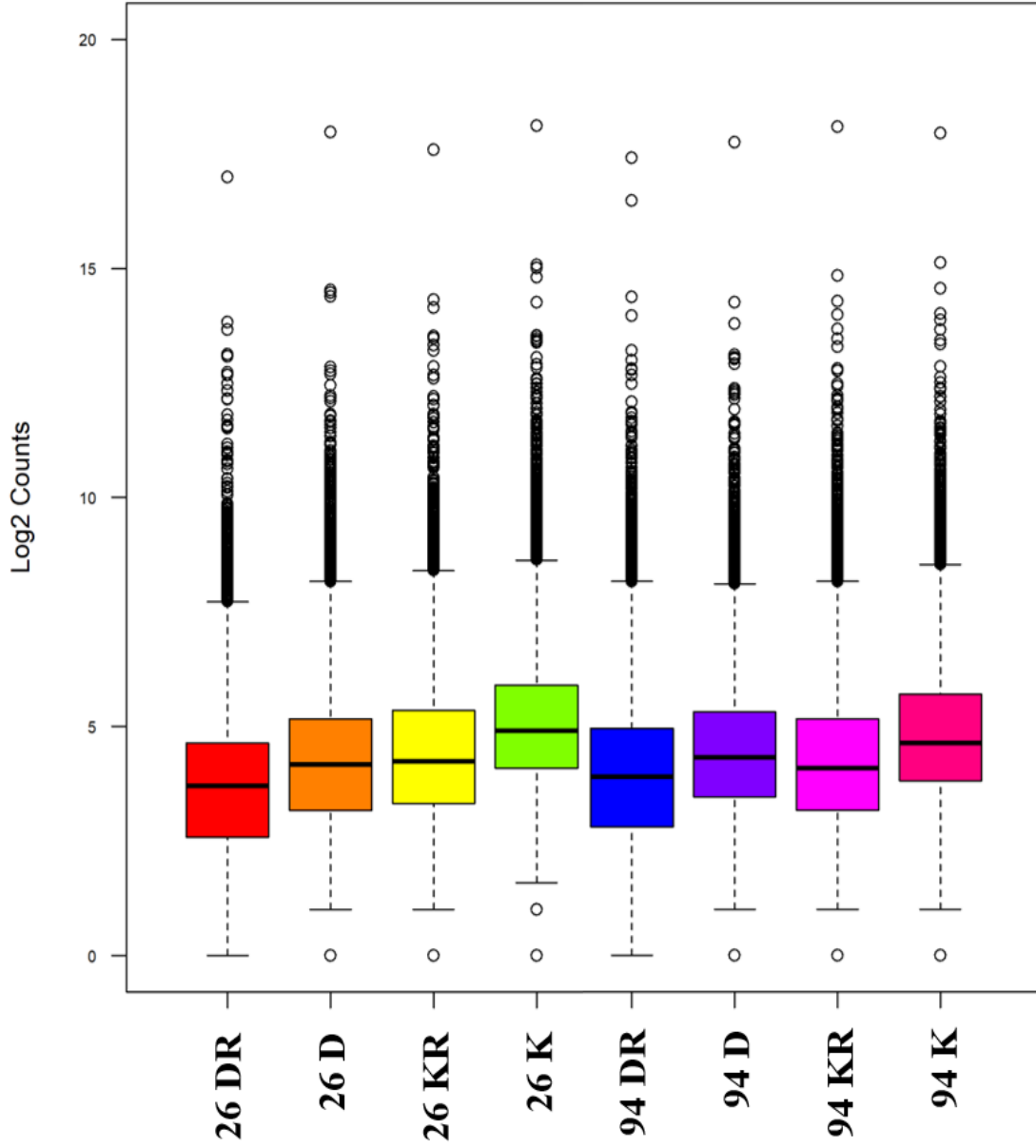
26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu

3.1.5 Karşılaştırmalı Ekspresyon Analiz Sonuçları

Transkriptom düzeyinde kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitlerinde kuraklık stresinin tetiklediği adaptif moleküler mekanizmalardaki farklılıkları ortaya koymak amacıyla, öncelikle biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, gen ekspresyon verilerine yönelik yoğunluk dağılımı, ana bileşen analizi (Principal Component Analysis; PCA), volkan grafikleri ve ısı haritaları oluşturulmuştur. Ardından, kuraklık stresinin etkisiyle gen ifade düzeylerinde meydana gelen değişiklikler analiz edilerek, stres koşullarında anlamlı düzeyde yukarı veya aşağı regülasyona uğrayan gen ve transkriptler belirlenmiştir.

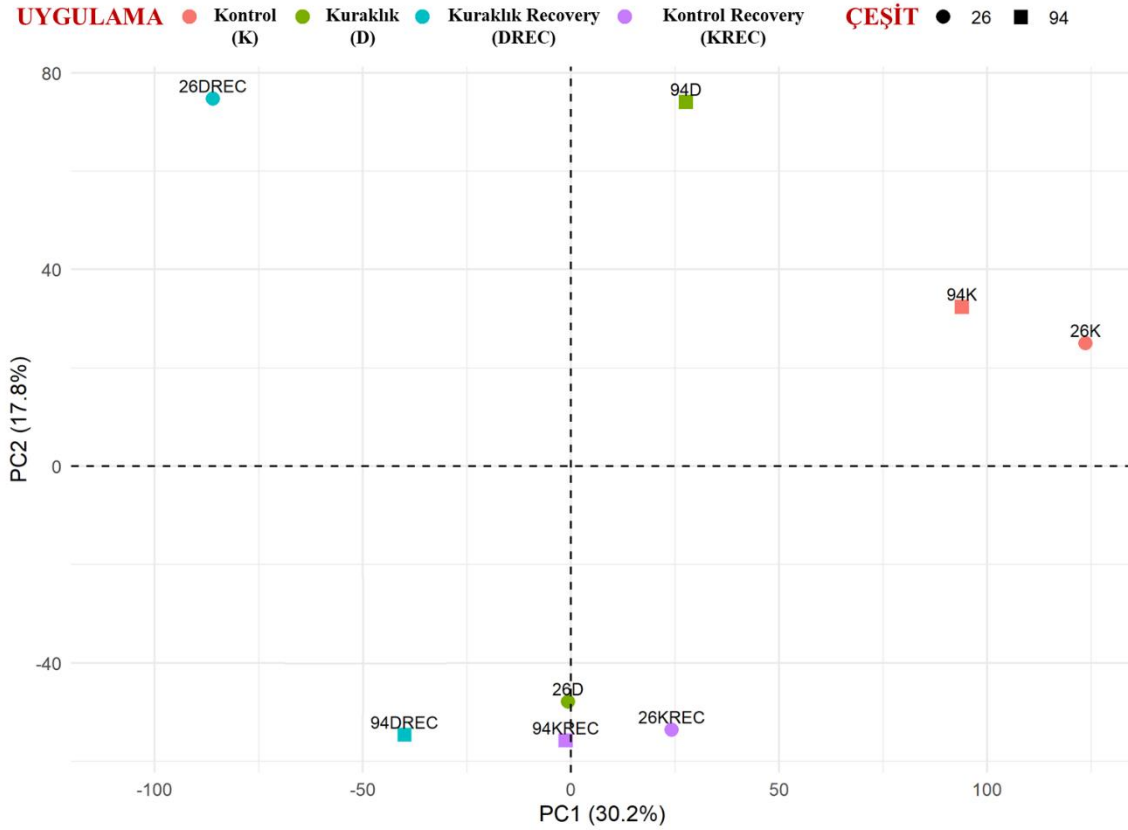
Farklı ifade düzeyine sahip genlerin biyolojik işlevsel sınıflandırılması, Gen Ontolojisi (Gene Ontology; GO) veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sınıflandırma, kuraklık stresine yanıt olarak ortaya çıkan transkriptomik farklılıkların daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesini sağlamıştır. GO analizleri, üç ana bağımsız alt ontoloji düzeyinde yapılmıştır: biyolojik süreçler (Biological Process; BP), moleküler fonksiyonlar (Molecular Function; MF) ve hücresel bileşenler (Cellular Component; CC). Bu kapsamlı analizler aracılığıyla, kuraklığa hassas ve toleranslı zeytin çeşitleri arasında stres yanıtına yönelik moleküler yollardaki farklılıklar detaylı biçimde ortaya konmuştur.

EdgeR paketi ve Trimmed Mean (TMM) istatistiği kullanılarak normalize edilmiş analiz sonuçlarına göre tüm örneklerle ait yoğunluk dağılım grafiği Şekil 3.4’de görüldüğü gibidir.



Şekil 3.4 Normalize edilmiş (EdgeR) verilere ait yoğunluk dağılım grafiği. 26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu.

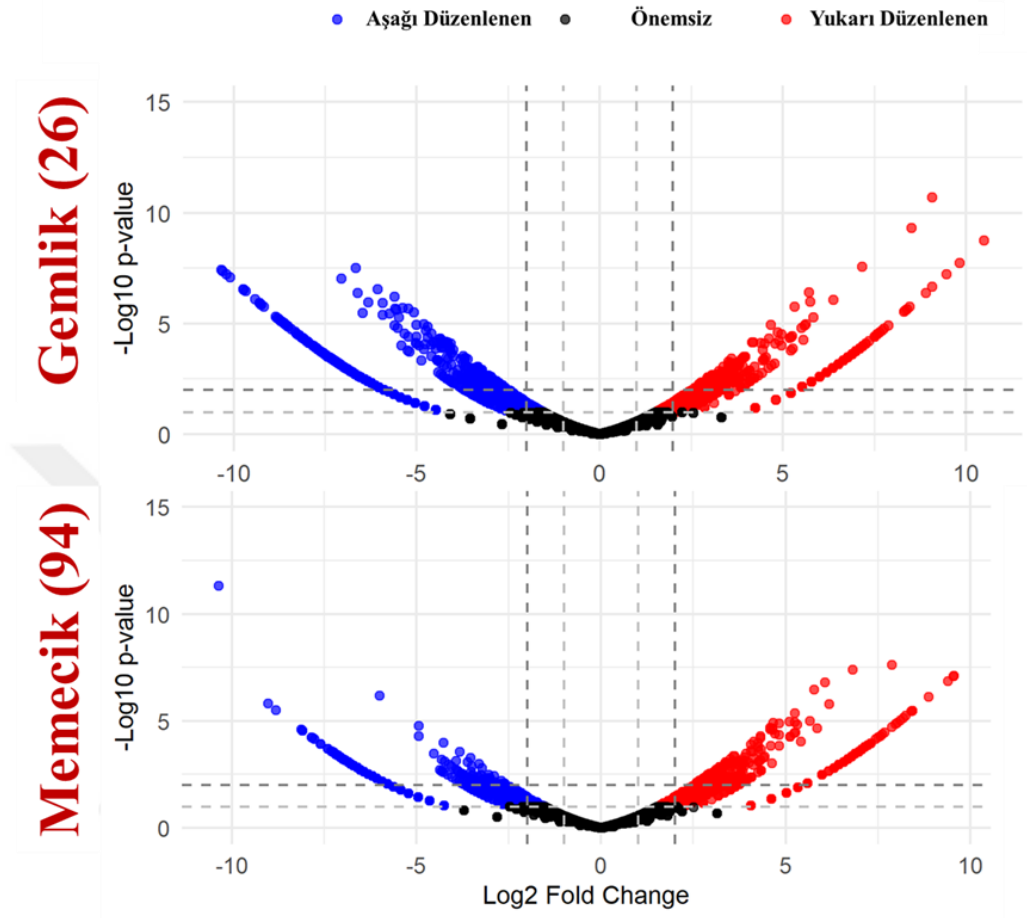
Tüm örnekler için ilk 2 temel bileşen baz alınarak oluşturulan PCA grafiği Şekil 3.5’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.5 Tüm kuraklık ve kontrol örneklerini içeren PCA grafiği (Grafik ilk 2 temel bileşen baz alınarak oluşturulmuştur). 26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu.

Kontrol ve kuraklık stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı gen ekspresyon analizine ilişkin çeşit bazlı volkan grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafiklerde X eksen (log₂ Fold Change; logFC), genlerin kuraklık stresine bağlı olarak ne derece yukarı (pozitif değerler) ya da aşağı (negatif değerler) regüle edildiğini göstermektedir. Y eksen ise (-log₁₀ P-değeri), bu gen ekspresyon değişimlerinin istatistiksel anlamlılık düzeyini yansıtmaktadır. Volkan grafiklerinde, yukarı regüle edilen genler; logFC > 1 ve -log₁₀(P-değeri) > 1 kriterlerini sağlayanlar olarak tanımlanmış ve kırmızı renkle işaretlenmiştir. Benzer şekilde, aşağı regüle edilen genler; logFC < -1 ve -log₁₀(P-değeri) > 1 koşullarını sağlayanlar olup, mavi renkle gösterilmiştir. Grafiklerdeki dikey kesikli çizgiler, logFC'in -1 ve 1 eşik değerlerini belirtmek amacıyla açık gri renkte çizilmiştir. Daha yüksek ifade değişikliklerini vurgulamak için logFC = -2 ve logFC = 2 değerleri koyu gri renkle temsil edilmiştir. Yatay eksende ise -log₁₀(P-değeri) = 1 değeri açık gri çizgiyle, -log₁₀(P-değeri) = 2 değeri ise koyu gri çizgiyle gösterilerek istatistiksel anlamlılık

düzeyleri vurgulanmıştır. Bu gösterimler sayesinde genlerin hem biyolojik anlamlılıkları hem de istatistiksel güvenilirlikleri net bir şekilde görselleştirilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı ekspresyon analizini özetleyen volkan grafiği.

Kuraklık stresi, bitkinin hayatta kalmasını ve üretkenliğini kritik şekilde etkileyen karmaşık transkriptomik ayarlamaları tetiklemektedir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitlerinin karşılaştırmalı ekspresyon analizini özetleyen volkan grafikleri, kuraklık stresiyle başa çıkmak için kullandıkları farklı moleküler stratejileri göstermektedir.

Kuraklık stresi altında, kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde hem yukarı hem aşağı düzenlenen genlerin mevcut olduğu görülmektedir. Özellikle $-\log_2 FC$ değerlerinin geniş bir aralıkta yayıldığı (özellikle -5'in altında) ve aşağı düzenlenen (mavi) gen sayısının oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir. Genel dağılım incelendiğinde zaman, kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinin kuraklık stresine karşı ağırlıklı olarak gen baskılama stratejisi geliştirdiği gözlemlenmektedir. Aşağı düzenlenmiş genlerin

baskınlığı, kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinin kurak stresine yanıt olarak büyümeyi kısıtlayan ve enerji tasarrufu sağlayan bir strateji benimsediğini göstermektedir. Bu genelleştirilmiş baskılama muhtemelen fotosentez, protein sentezi ve birincil metabolizma gibi temel metabolik yolları içermekte ve hassas bitkilerde gözlemlenen hayatta kalma mekanizmalarıyla uyumludur (Chaves ve ark., 2009). Ancak, bu strateji kısa vadeli hayatta kalmaya yardımcı olsa da bitkinin uzun süreli stres altında iyileşme ve sürdürülebilir üretkenlik kapasitesini tehlikeye atabilir (Mittler, 2002).

Buna karşılık, kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde kuraklık stresi altında çok sayıda genin önemli ölçüde yukarı düzenlenmesiyle karakterize edilen daha dinamik bir transkriptomik profil gözlemlenmektedir. Pozitif olarak düzenlenen genlerin daha geniş dağılımı, toleranslı çeşidin kuraklık stresine karşı stres yanıtında savunma ve adaptasyon mekanizmalarını aktif hale getirerek stres ortamında metabolik esnekliğini koruyabilen bir profil sergilemekte olduğunu göstermektedir (Golldack ve ark., 2014). Böyle aktif bir tepki, kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinin daha fazla transkriptomik plastisiteye sahip olduğunu ve bu sayede kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinden daha etkin olarak kuraklık stresini tolere edebildiğini göstermektedir (Tablo 3.8). Bu moleküler mekanizma, bitkilerin stres sırasında koruyucu ve enerji üretim süreçlerini koruduğu gelişmiş kuraklık toleransı ile ilişkili mekanizmalarla tutarlıdır (Golldack ve ark., 2014).

Tablo 3.8 Volkan grafiği baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.

Özellik	Gemlik (26)	Memecik (94)
Aşağı düzenlenen genler	Fazla	Orta düzeyde
Yukarı düzenlenen genler	Orta düzeyde	Fazla
Baskın yanıt tipi	Gen ekspresyon baskılanması	Adaptif gen aktivasyonu
İstatistiksel anlamlılık	Yüksek	Yüksek
Genetik esneklik	Düşük	Yüksek

Volkan grafikleriyle görselleştirilen kuraklık stresi ile ilişkili anlamlı artış ve azalış gösteren genler, çeşitler bazında daha detaylı incelenerek en yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 gen tespit edilmiştir. Gemlik (26) çeşidinde kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı ekspresyon analizi sonucu en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen 50 gen Tablo 3.9’da gösterildiği gibidir.

Tablo 3.9 Gemlik (26) çeşidi için kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı ekspresyon analiz sonucu en yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 gen.

No	Protein Sembolü	logFC	FDR	Gen Sembolü	No	Protein Sembolü	logFC	FDR	Gen Sembolü
1	Q06086	9,82210991	0,0000808	AAS	26	P05477	-6,06040403	0,00033308	HSP17.9-D
2	Q9LVD9	9,08620643	0,00030915	DTX40	27	Q09FY3	-6,32885818	0,00078127	rpl2-A
3	Q0G9Q4	9,07068396	3,66E-07	TIC214	28	Q8LGG8	-6,48325243	0,00142369	At3g01520
4	P36859	8,90758682	0,000387	NIA	29	Q38931	-6,66871919	0,0000958	FKBP62
5	Q09FZ0	8,52237253	0,00000447	ndhH	30	Q7NFE9	-7,04927777	0,00014504	clpB
6	Q33BV3	8,4661466	0,00097613	ycf2-A	31	Q94K41	-8,27994847	0,00660848	SDR3b
7	Q9T072	8,39041825	0,0011155	BHLH25	32	O23039	-8,32870335	0,00603569	ZIP5
8	Q11KE0	8,3510093	0,00120488	dxs	33	P0C7Q8	-8,42153227	0,00477121	DA1
9	Q9ZVI9	7,88322243	0,0035536	PECT1	34	Q8GUQ5	-8,52975179	0,00376808	CURL3
10	Q84JA6	7,64332493	0,00616747	CESA4	35	Q8R1G2	-8,57086449	0,00355029	Cmb1
11	Q1G3I2	7,57655432	0,00702367	MIP1A	36	Q9FS16	-8,63041692	0,00329418	EXT3
12	Q8M998	7,15910472	0,0000958	matK	37	P24724	-8,68760825	0,00281618	TP02_0244
13	Q40374	6,37321033	0,00067962	PR-1	38	Q84NC8	-8,77816035	0,0022583	0e23
14	Q9ZR25	5,75381037	0,00077953	HGT8	39	Q9CR50	-8,81284752	0,00206956	Rchy1
15	Q49L18	5,71113365	0,000387	psbA	40	O23787	-8,84672024	0,00198617	THI1
16	Q0ZPV7	5,58702041	0,0035536	CXE1	41	Q4UKR8	-9,23988552	0,00085676	hspC2
17	Q9NPJ3	5,51559777	0,0042265	ACOT13	42	P83877	-9,26515511	0,00081714	Txn14a
18	Q6R0H1	5,32415429	0,00097613	LHY	43	Q9FGT8	-9,28998969	0,00078127	TIL
19	Q8GWK5	4,96221064	0,00690833	GASA9	44	O64759	-9,30224849	0,00078127	CAT5
20	Q9LUH2	4,85947794	0,00616747	DTX19	45	Q9XIM0	-9,67647044	0,0003652	MEE14
21	P21240	-5,48295154	0,00206956	CPN60B1	46	Q6GPQ6	-9,73189902	0,00033308	edf1
22	P04793	-5,55471495	0,00117306	HSP17.5-M	47	P09886	-10,0981154	0,00013903	HSP21
23	O80982	-5,59278398	0,00108915	HSFA2	48	P30222	-10,1999053	0,00011077	HSP22
24	P02828	-5,60750536	0,0035536	Hsp83	49	P51819	-10,3011055	0,0000966	HSP83A
25	P11143	-5,61169694	0,00051764	HSP70	50	P29197	-10,331328	0,0000966	CPN60

Memecik (94) çeşidinde kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı ekspresyon analizi sonucu en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen 50 gen Tablo 3.10'da gösterildiği gibidir.

Tablo 3.10 Memecik (94) çeşidi için kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı ekspresyon analiz sonucu en yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 gen.

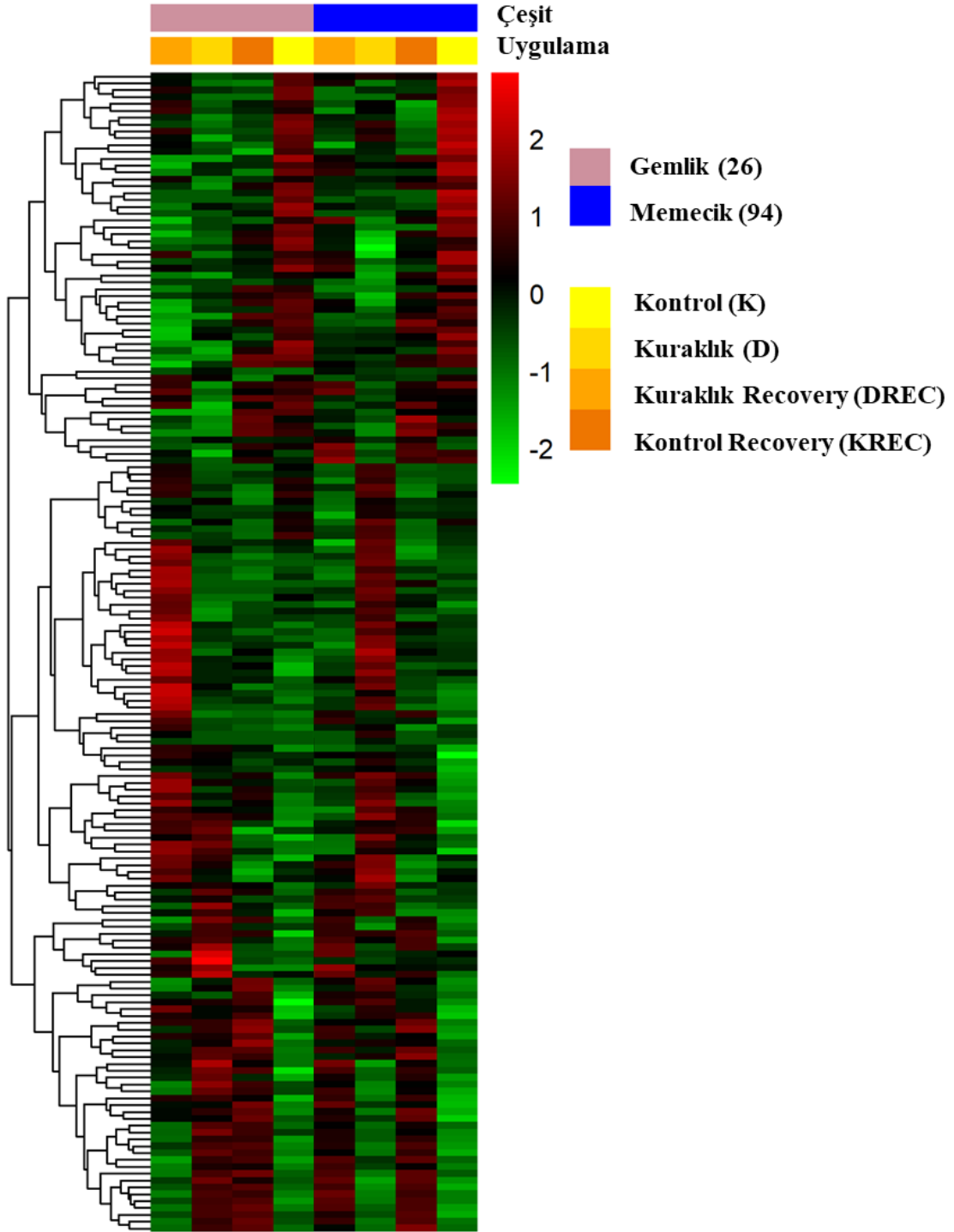
No	Protein Sembolü	logFC	FDR	Gen Sembolü	No	Protein Sembolü	logFC	FDR	Gen Sembolü
1	P46897	9,55859324	0,00029972	ATHB-7	26	P49598	5,65745456	0,00843159	PP2CA
2	P05478	9,54350648	0,00029972	HSP18.5-C	27	Q9LQ98	5,26582012	0,01603676	AFP1
3	Q4R7Y5	8,43532159	0,00397578	DNAJB6	28	Q1PDW5	5,24314556	0,01665204	FTSH6
4	Q8S9H7	8,43532159	0,00397578	DIVARICAT	29	P04793	4,82188094	0,00909506	HSP17.5-
5	Q9M276	8,40225164	0,00414737	ATHB-12	30	Q5VQG4	4,8214459	0,03739344	RFS
6	C7G304	8,2618264	0,00578656	GOLS2	31	P09886	4,7091657	0,01754784	HSP21
7	Q04980	8,18613159	0,0069772	LTI65	32	P26413	4,66361773	0,00902435	HSP70
8	Q96303	7,97745199	0,00933672	PHT1-4	33	O81822	4,64886877	0,01227508	HSP17.7
9	O65416	7,87859795	0,00022263	SKIP27	34	P46254	4,57967945	0,01311759	HSP22
10	P49597	7,67921209	0,01603676	ABI1	35	P25699	4,34439525	0,04548642	PFE
11	Q93VY3	7,62291009	0,01769063	NAC072	36	Q7NFE9	4,31937587	0,02162301	clpB
12	A6P6V9	7,56432133	0,01980141	CBDAS	37	P05477	4,31384184	0,02034254	HSP17.9-D
13	P27898	7,30281058	0,03117995	P	38	Q8LPN7	4,26330121	0,04105336	At3g19950
14	P43286	7,30281058	0,03117995	PIP2-1	39	Q9SPB3	4,26215166	0,03117995	RPL10
15	Q9T0D3	7,30281058	0,03117995	HSFB2B	40	C0LGQ5	-4,27735273	0,03117995	GSO1
16	Q9ZV88	7,30281058	0,03117995	BEH4	41	O64759	-4,93437644	0,01027122	CAT5
17	P25818	7,22929082	0,03573003	TIP1-1	42	P06512	-6,00604181	0,0013512	psaB
18	C0LGW6	7,15182237	0,0409823	ERL1	43	O74503	-7,40984516	0,04548642	spp27
19	Q9SAD9	7,15182237	0,0409823	At1g13040	44	Q0ZPV7	-7,60142938	0,03216474	CXE1
20	Q10MN2	7,06995686	0,04548642	PEX11-3	45	Q9LRT1	-7,80987851	0,02176627	At3g28040
21	Q54V77	7,06995686	0,04548642	ctps	46	Q9LFS4	-7,84818345	0,02064815	NIK1
22	P19244	6,8165565	0,00024309	HSP22.7	47	P52408	-8,09113479	0,01327966	GNS1
23	Q6GPQ6	6,18333176	0,00255152	edf1	48	Q9ZPE7	-8,12272863	0,01311759	EXO
24	P12951	6,07612982	0,00040154	DHN1	49	Q8GVD0	-8,80666025	0,00397578	GLU
25	P22240	5,77669351	0,000758	TAS14	50	Q8GUQ5	-9,02302201	0,00251514	CURL3

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitleri arasında gözlemlenen farklı transkriptomik tepkiler, kuraklık stresine karşı savunma mekanizmalarının metabolik işlevlerin sürdürülebilirliği ile dengelenmesinin önemini

vurgulamaktadır. Kuraklığa hassas olan Gemlik çeşidi, enerji ve kaynak tasarrufu amacıyla gen aktivitesini genel olarak baskılama eğilimindeyken; kuraklığa toleranslı Memecik çeşidi ise yalnızca stres koşullarına karşı koruma sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda fizyolojik işlevlerin devamlılığı ve iyileşme süreçlerini destekleyen metabolik yolları da stratejik bir şekilde aktive etmektedir. Bu karşılaştırmalı analiz, başarılı kuraklık toleransının gen ekspresyonunun seçici ve kontrollü bir şekilde yeniden programlanmasıyla yakından ilişkili olduğunu ve bu sayede bitkilerin hayatta kalırken rejeneratif ve üreme yeteneklerinden ödün vermediğini göstermektedir (Osakabe ve ark., 2014).

Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde yukarı regüle edilen spesifik biyolojik yolların ve temel düzenleyici genlerin anlaşılması, zeytin çeşitlerinde kuraklık dayanıklılığını artırmaya yönelik ıslah programları için potansiyel hedefler sunmaktadır. Bu genlerin fonksiyonel rollerinin, proteomik analizlerle desteklenerek doğrulanması, kuraklık adaptasyonunun moleküler temellerine ilişkin bilgilerimizi daha da derinleştirecektir.

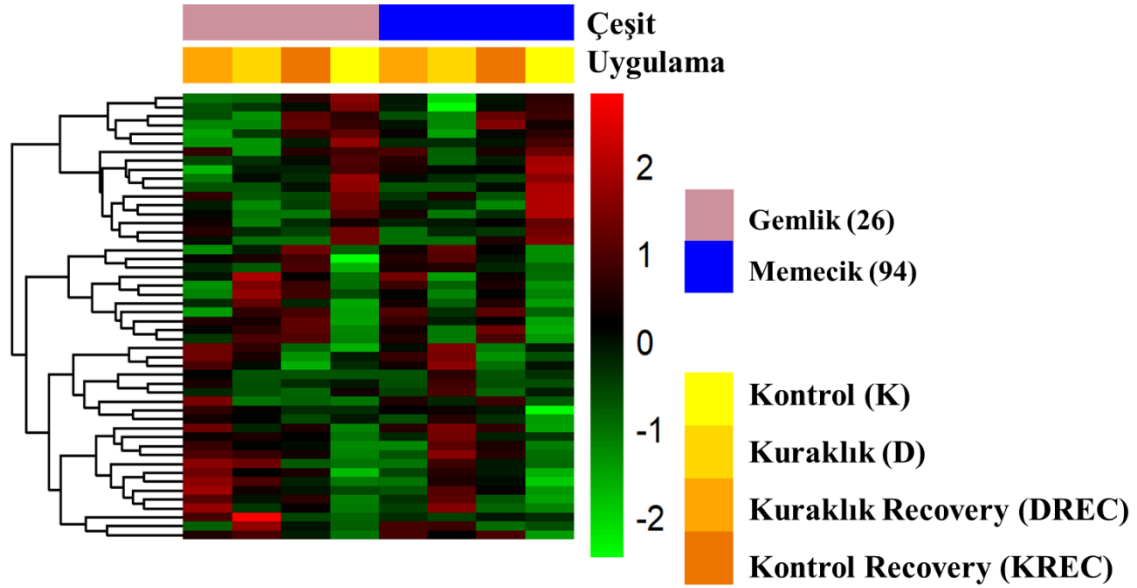
Kuraklık stresine yanıt olarak en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin analizinde, Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait ekspresyon verileri önce EdgeR paketi ile log dönüşümü uygulanarak normalize edilmiş, ardından Z-skor normalizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gen yoğunluk verilerine dayalı olarak oluşturulan ısı haritası Şekil 3.7’de sunulmuştur. Bu grafik, çeşitler arasında kuraklık stresine verilen transkriptomik yanıtların farklılığını görsel olarak ortaya koymaktadır.



Şekil 3.7 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait kuraklık stresi altında anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen tüm genlerin (log) Z-skor ile normalize edilmiş (EdgeR) yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği.

Tüm genler için oluşturulan ısı haritası sonrası en yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 gen (log) normalize edilmiş (EdgeR) ve ek olarak Z-skor normalizasyonu uygulanarak

tespit edilen genlere ait yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği Şekil 3.8’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.8 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait kuraklık stresi altında en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen 50 gen (log) için Z-skor ile normalize edilmiş (EdgeR) yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği.

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitlerinin karşılaştırmalı ekspresyon analizini özetleyen ısı haritası kuraklık ve iyileşme dönemlerinde stres yanıtı olarak farklı transkriptomik yeniden programlamalara sahip olduklarını göstermektedir.

Kontrol koşullarına (K) kıyasla kuraklık stresinin (D), her iki zeytin çeşidinin gen ekspresyon profillerinde anlamlı değişikliklere yol açtığı gözlemlenmiştir. Özellikle kuraklığa hassas olan (Gemlik-26) zeytin çeşidinde, hücrel aktiviterin baskılandığını gösteren yaygın bir aşağı regülasyon (yeşil renk) dikkat çekmektedir. Buna karşılık kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde ise sınırlı düzeyde aşağı regülasyonun yanı sıra, stresle ilişkili adaptif genlerin yukarı regülasyonu ile daha dengeli ve koordineli bir transkripsiyonel yanıt sergilendiği tespit edilmiştir. Bu durum toleranslı çeşidin strese karşı daha bütüncül bir düzenleyici strateji kullandığını göstermektedir.

Kuraklık sonrası iyileşme (recovery) aşamasında da çeşitler arası belirgin farklar gözlemlenmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde iyileşme grubunun transkriptomik profili kontrol grubundan belirgin şekilde sapmış olup, bu durum stres sonrasında eksik veya gecikmiş bir moleküler iyileşmeye işaret etmektedir. Diğer yandan

toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde iyileşme ve kontrol gruplarının gen ekspresyon profilleri birbirine daha yakın seyretmiştir. Bu durum stres sonrası normal gen ifade modellerinin daha etkin ve hızlı bir şekilde yeniden düzenlendiğini ve bu çeşidin daha esnek ve dayanıklı bir moleküler adaptasyon stratejisi geliştirdiğini göstermektedir.

Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinin bu etkili toparlanma kapasitesi, yalnızca kuraklık stresine yanıt sürecinde değil, aynı zamanda stres sonrası fizyolojik dengenin yeniden sağlanmasında da avantaj sağladığını düşündürmektedir (Pinheiro ve Chaves, 2011). Buna karşılık kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık sırasında genetik aktivitenin büyük ölçüde baskılandığı, iyileşme döneminde ise normal metabolik süreçlerin yeniden tesis edilmesinde güçlükle yaşandığı gözlenmiştir. Bu durum, bu çeşitte stres hafızası (stress memory) gibi mekanizmaların yeterince devreye girmediğini ve stres sonrası homeostazın yeniden kurulmasında yetersiz kaldığını düşündürmektedir (Bruce ve ark., 2007).

Bu karşılaştırmalı analiz, kuraklığa toleransın yalnızca anlık stres yanıtı ile sınırlı olmadığını, aynı zamanda stres sonrasında transkriptomik dengeyi (homeostazı) yeniden sağlama kapasitesini de içerdiğini açıkça ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz bulgular zeytin çeşitleri arasında kuraklık stresine karşı moleküler tolerans mekanizmalarının transkriptom seviyesinde farklılaştığını ve Memecik çeşidinin daha yüksek düzeyde moleküler dayanıklılık ve iyileşme dinamiklerine sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 3.11).

Tablo 3.11 Isı haritası baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.

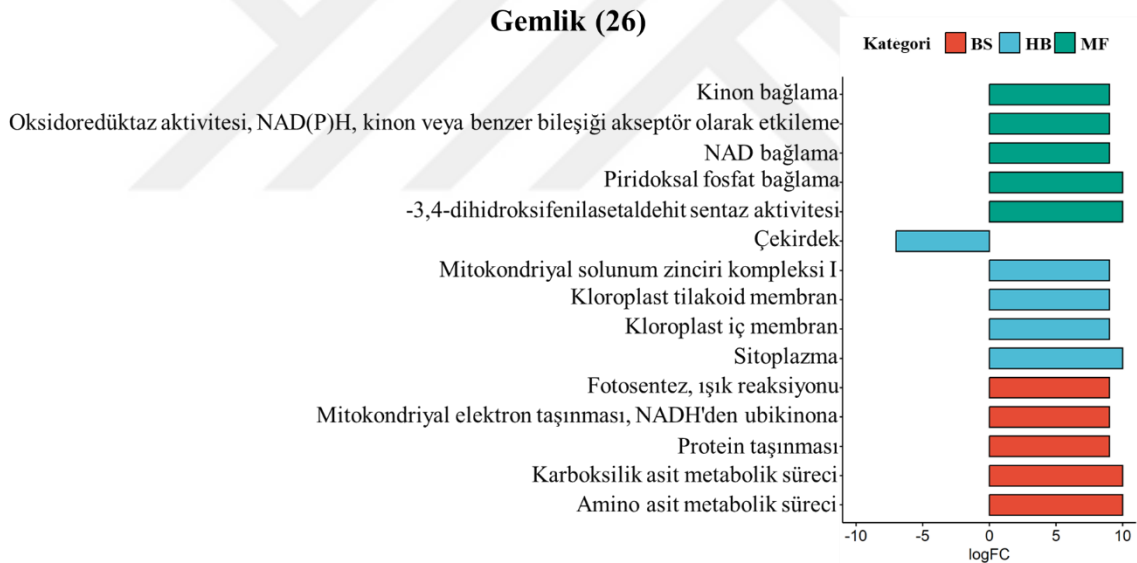
Özellik	Gemlik (26)	Memecik (94)
Kuraklık sırasında gen baskılanması	Şiddetli	Orta dereceli
İyileşme sonrası toparlanma	Zayıf	Güçlü
Stres hafızası	Belirsiz	Mevcut
Genetik esneklik ve homeostaz	Düşük	Yüksek

3.1.6 Transkriptomik Gen Ontoloji Analizleri

Bu kısımda kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler için fonksiyonel zenginleştirme analizi

yapılarak farklı anlatım yapan genlerin kategorizasyonu Gen ontolojisi (GO) veri tabanı kullanılarak oluşturulmuştur. Bu amaçla hiyerarşik olarak biyolojik süreç (Biological Process; BS), moleküler fonksiyon (Molecular Function; MF) ve hücresel bileşen (Cellular compartment; HB) olmak üzere üç ana bağımsız alt ontolojiden yararlanılmıştır. Hata payı oranı (False Discovery Rate; FDR) 0.001'den küçük ve eşit olacak şekilde filtrelenip, sonrasında en yüksek gen sayısına sahip her bir kategoriden 5 terim listelenmiştir. Alt ontolojilere ait kuraklık stresi ile ilişkili tespit edilen genler ve etki ettiği yollar için oluşturulan ısı grafikleri her iki çeşit için de ayrı ve kontrol grupları ile karşılaştırılarak oluşturulmuştur.

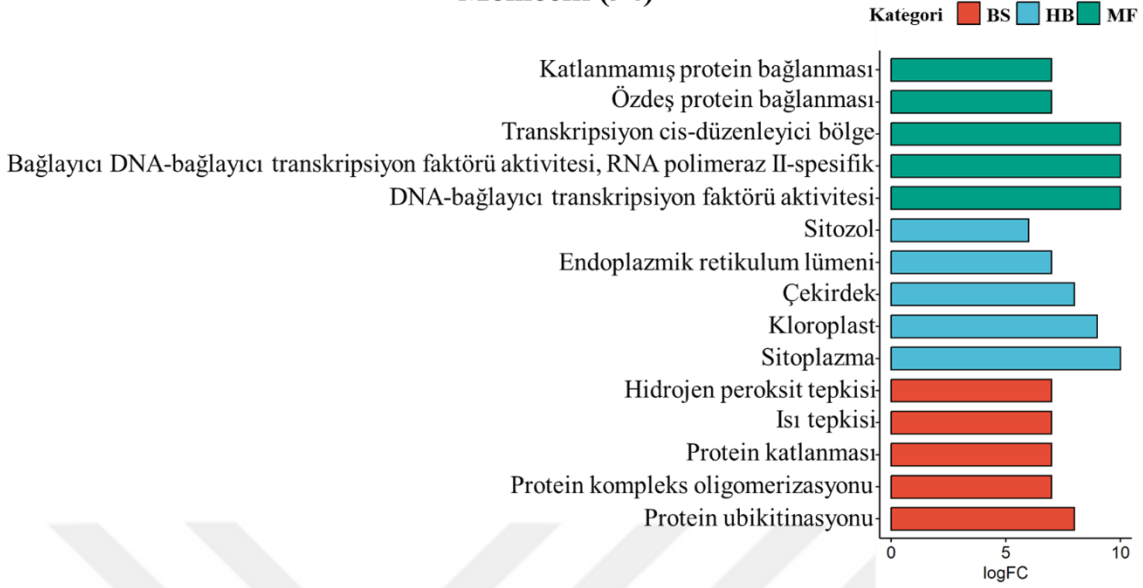
Gen ontolojisi (GO) analiz sonuçlarına göre Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stresi altında en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genlerin karşılık geldiği terminolojiler ve logFC değerleri Şekil 3.9'da gösterildiği gibidir.



Şekil 3.9 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) çeşidinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin gen ontoloji analiz sonuçlarına göre karşılık geldiği terminolojiler ve logFC değerleri.

Gen ontolojisi (GO) analiz sonuçlarına göre Memecik (94) çeşidinde kuraklık stresi altında en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genlerin karşılık geldiği terminolojiler ve logFC değerleri Şekil 3.10'da gösterildiği gibidir.

Memecik (94)



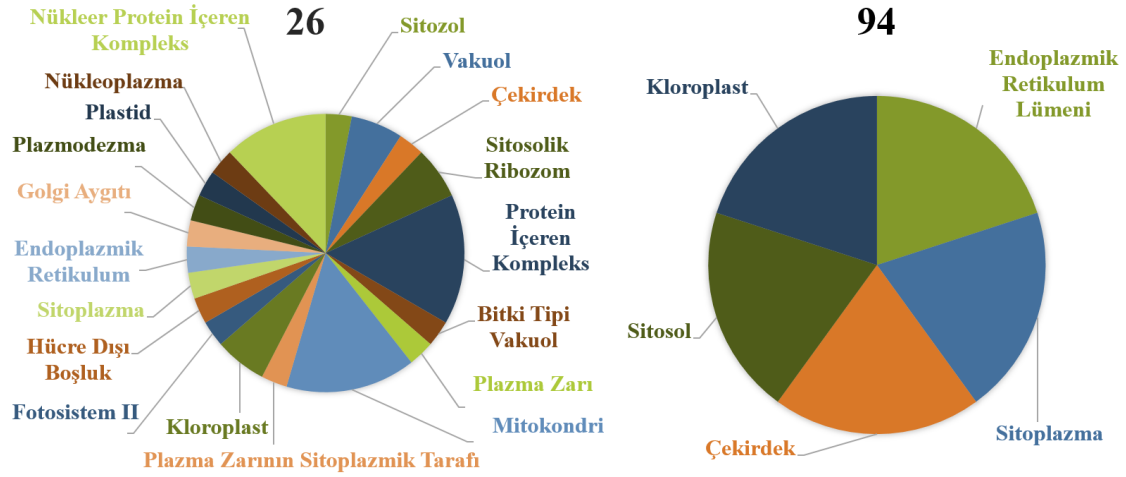
Şekil 3.10 Kuraklık stresi altında Memecik (94) çeşidinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin gen ontoloji analiz sonuçlarına göre karşılık geldiği terminolojiler ve logFC değerleri.

Kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde üç ana alt ontolojiye ait en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin karşılık geldiği terminolojiler çeşitler bazında fonksiyonel zenginleştirme sonrasında daha detaylı olarak analiz edilmiştir. Transkriptom verilerinden elde edilen gen ontolojisi (GO) analiz sonuçlarına göre çeşitler (26 ve 94) bazında kuraklık stresi altında en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin biyolojik süreçler (Biological Process, BP), moleküler fonksiyon (Molecular Function; MF) ve hücresel bileşen (Cellular compartment, HB) alt ontolojilerindeki spesifik görev dağılımları tespit edilmiştir. Ayrıca çeşitler bazında deney grupları arası farklılıkların daha detaylı anlaşılması açısından, tespit edilen bu gen yollarını temsil eden ısı haritaları oluşturulmuştur. Hata payı oranı (False Discovery Rate; FDR) 0.001'den küçük ve eşit olacak şekilde filtre uygulanmıştır.

3.1.6.1 Hücresel Bileşenler

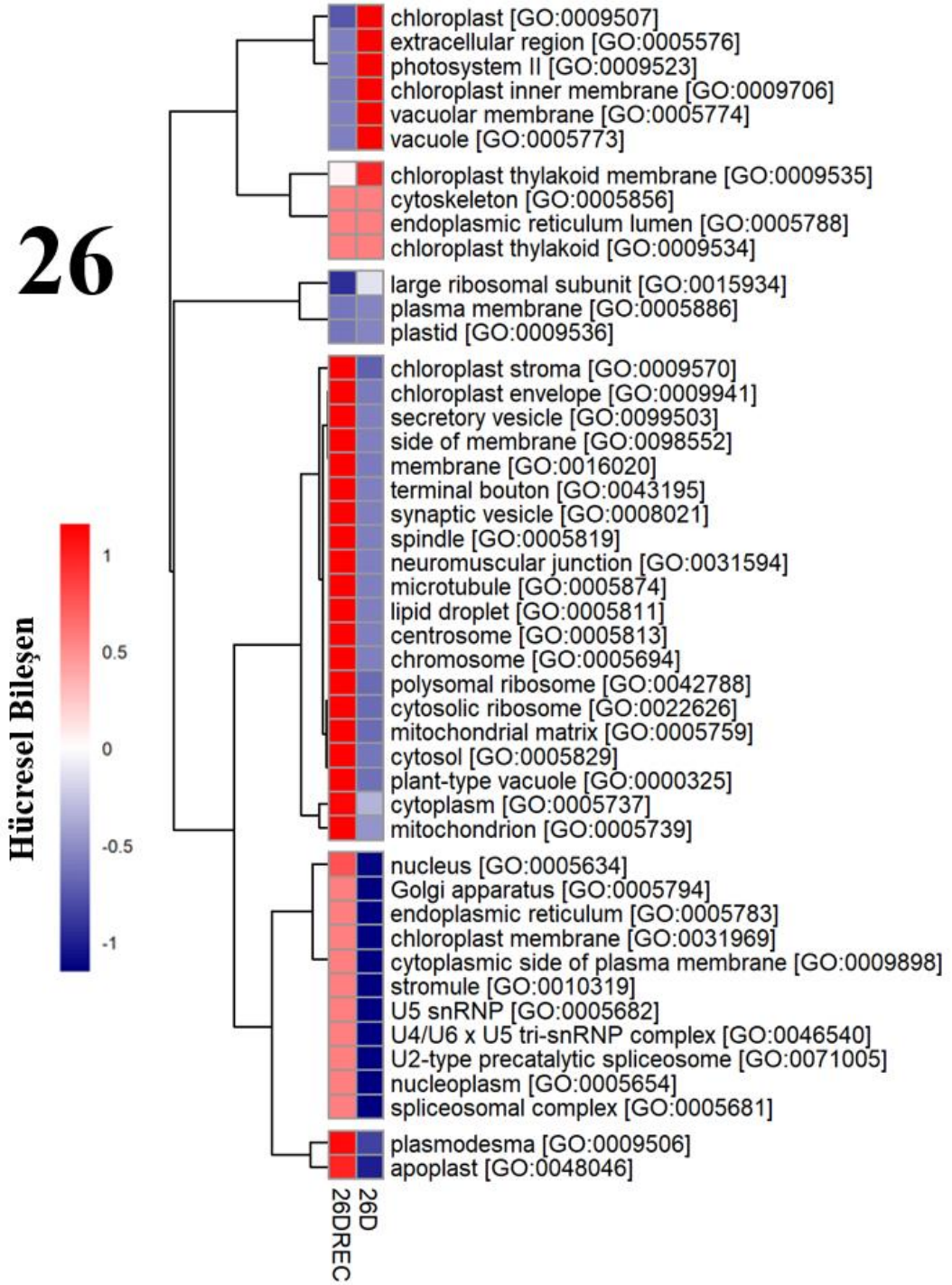
Hücresel bileşenler alt ontolojisi için, Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stres uygulamasının etki ettiği gen ve gen yolları; sitozol için %3, vakuol için %6, çekirdek için %3, sitosolik ribozom için %6, protein içeren kompleks için %15, bitki tipi vakuol için %3, plazma zarı için %3, mitokondri için %15, plazma zarının sitoplazmik tarafı için %3, kloroplast için %6, fotosistem II için %3, hücre dışı boşluk için %3, sitoplazma için %3,

endoplazmik retikulum için %3, golgi aygıtı için %3, plazmodezma için %3, plastid için %3, nükleoplazma için %3 ve nükleer protein içeren kompleks için %3 anlamlı farklılık göstermektedir. Memecik (94) çeşidinde ise endoplazmik retikulum lümeni için %20, sitoplazma için %20, çekirdek için %20, sitosol için %20 ve kloroplast için %20 anlamlı farklılık tespit edilmiştir (Şekil 3.11).



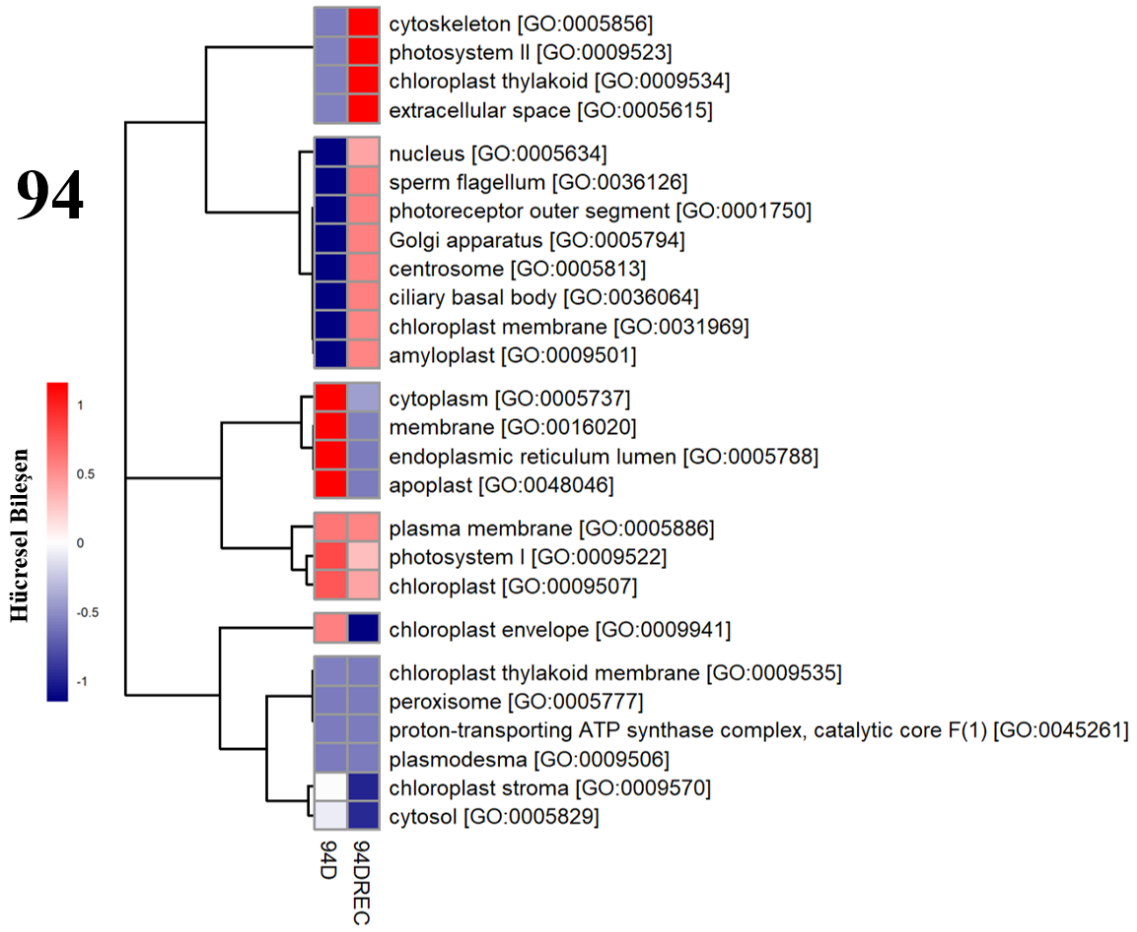
Şekil 3.11 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin hüresel bileşen (Cellular compartment, HB) alt ontolojisindeki spesifik görev dağılım sonuçları.

Hüresel bileşen alt ontolojisi için Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösteren genler ve etki ettiği yolların yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği Şekil 3.12’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.12 Gemlik (26) çeşidinde hücresel bileşen alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.

Hücresel bileşen alt ontolojisi için Memecik (94) çeşidinde kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösteren genler ve etki ettiği yolların yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği Şekil 3.13’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.13 Memecik (94) çeşidinde hücresel bileşen alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.

Kuraklık stresi altında hem kuraklığa hassas (Gemlik-26) hem de toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde transkriptom seviyesinde hücresel bileşenler ile ilişkili gen ifade değişimlerinin karşılaştırmalı analiz sonuçlarına göre çeşitler arası belirgin farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Kuraklık stresi kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde özellikle fotosentez ve kloroplast yapıları (chloroplast, photosystem II) üzerine daha belirgin etkiler gösterirken toleranslı çeşitte ise daha geniş bir hücresel ağda (plazma membranı, sitoplazma, endoplazmik retikulum vb.) dengesel düzenleme sergilendiği görülmektedir.

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık stresinin kloroplast, fotosistem II ve tilakoid membranlar gibi fotosentetik bileşenleri önemli ölçüde aşağı düzenlenleyerek, öncelikli olarak fotosentetik yapıları ve kloroplast fonksiyonlarını hedef aldığı görülmektedir. Bu durum fotosentezin hızla baskılanmasına ve enerji verimliliğinin

azalmasına yol açarak bitkiyi daha savunmasız hale getiriyor olabilir (Flexas ve Medrano, 2002). Ayrıca, nükleus ve ribozomal bileşenlerde de değişimler gözlemlenmekte ve bu durumun genel protein sentezi ile genetik yanıtları etkilendiği görülmektedir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde ise kuraklık stresi altında hücresel membran bütünlüğü, taşıma ve enerji dönüşüm sistemlerini korumaya yönelik aktif bir yanıt verdiği belirlenmiştir. Fotosentezle ilişkili genlerin hafifçe yukarı düzenlenerek stres altında kloroplast bütünlüğü ve fotosentetik işlevi koruduğu tespit edilmiştir. Dahası, toleranslı çeşitte plazma membranı ve sitoplazmik yapıların güçlü bir yukarı düzenleme gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum toleranslı çeşidin hücre içi homeostazı sürdürme yeteneğinin daha güçlü olduğunu desteklemektedir (Chaves ve ark., 2009).

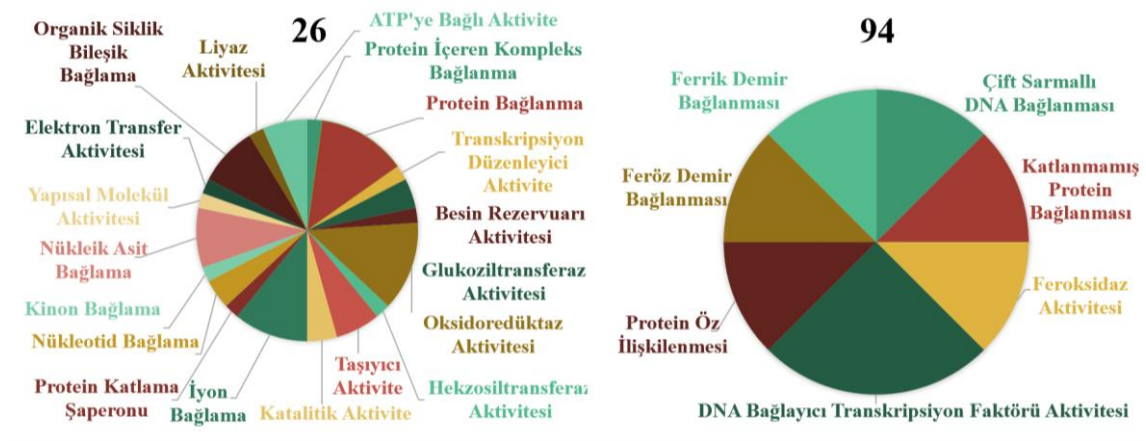
Hassas çeşitte kuraklık stresinin fotosentetik kapasite ve enerji üretimini doğrudan hedef aldığı, toleranslı çeşitte ise hücre zarı, sekresyon yolları ve sitoplazmik işlevlerin korunmasının ön planda tutulduğu gözlemlenmiştir. Bu farklar, toleranslı çeşidin proaktif membran ve taşıma stabilizasyonu sayesinde su kaybı ve metabolik bozulmaya karşı daha dayanıklı olduğunu ortaya koymaktadır (Tablo 3.12).

Tablo 3.12 Hücresel bileşen alt ontolojisi baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.

Kategori	26		94	
	D	DR	D	DR
Kloroplast	↑↑ Güçlü artış	↓ Hafif azalma	↑ Artış	↓ Azalma
Fotosistem II	↑↑ Güçlü artış	↓ Hafif azalma	↑ Artış	↓ Azalma
Sitoplazma	↑↑ Güçlü artış	↓ Azalma	↑ Artış	→ Hafif azalma
Plazma Membranı	↑↑ Güçlü artış	↓ Azalma	↑ Artış	↓ Azalma
Endoplazmik Retikulum	↑↑ Güçlü artış	↓ Azalma	↑ Artış	→ Hafif azalma
Golgi	↑ Artış	↓ Azalma	↑ Artış	↓↓ Belirgin azalma
Ribozom	↑↑ Güçlü artış	↓ Azalma	→ Sabit veya hafif artış	↓ Azalma
Çekirdek	↑ Artış	↓ Azalma	↑ Artış	↓ Azalma
Apoplast	↑↑ Güçlü artış	↓↓ Belirgin azalma	↑ Artış	↓ Azalma

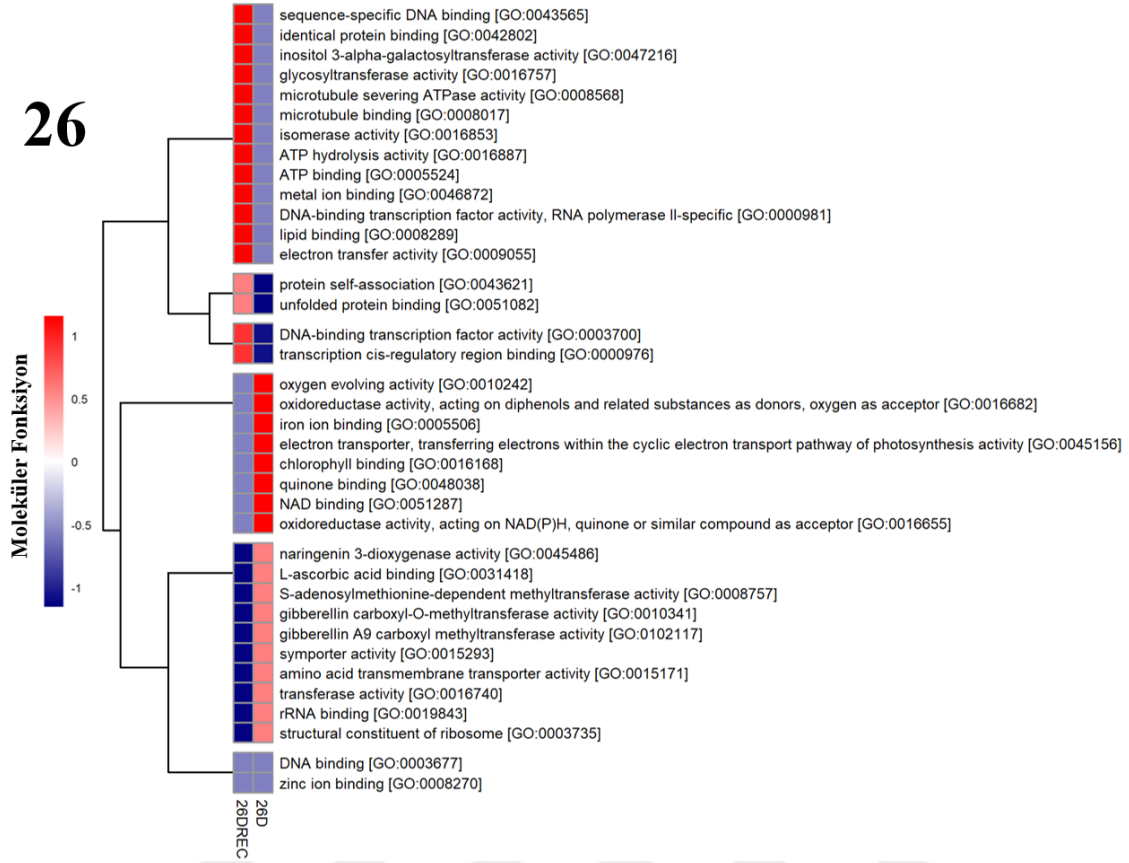
3.1.6.2 Moleküler Fonksiyonlar

Moleküler fonksiyon alt ontolojisi için, Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stres uygulamasının etki ettiği gen ve gen yolları; protein içeren kompleks bağlanmada %2, protein bağlanmada %13, transkripsiyon düzenleyici aktivitede %2, glukoziltransferaz aktivitesinde %4, besin rezervuarı aktivitesinde %2, oksidoredüktaz aktivitesinde %13, hekzoziltransferaz aktivitesinde %2, taşıyıcı aktivitede %7, katalitik aktivitede %4, iyon bağlamada %11, protein katlama şaperonu ile ilgili %2, nükleotid bağlamada %4, kinon bağlamada %2, nükleik asit bağlamada %9, yapısal molekül aktivitesinde %2, elektron transfer aktivitesinde %2, organik siklik bileşik bağlamada %9, liyaz aktivitesinde %2 ve ATP'ye bağlı aktivitede %7 anlamlı farklılık göstermektedir. Memecik (94) çeşidinde ise çift sarmallı DNA bağlanmasında %12, katlanmamış protein bağlanmasında %12, feroksidaz aktivitesinde %12, DNA bağlayıcı transkripsiyon faktör aktivitesinde %25, protein öz-ilişkilenmesinde %13, feröz demir bağlanmasında %13, ferrik demir bağlanmasında %13 anlamlı farklılık tespit edilmiştir (Şekil 3.14).



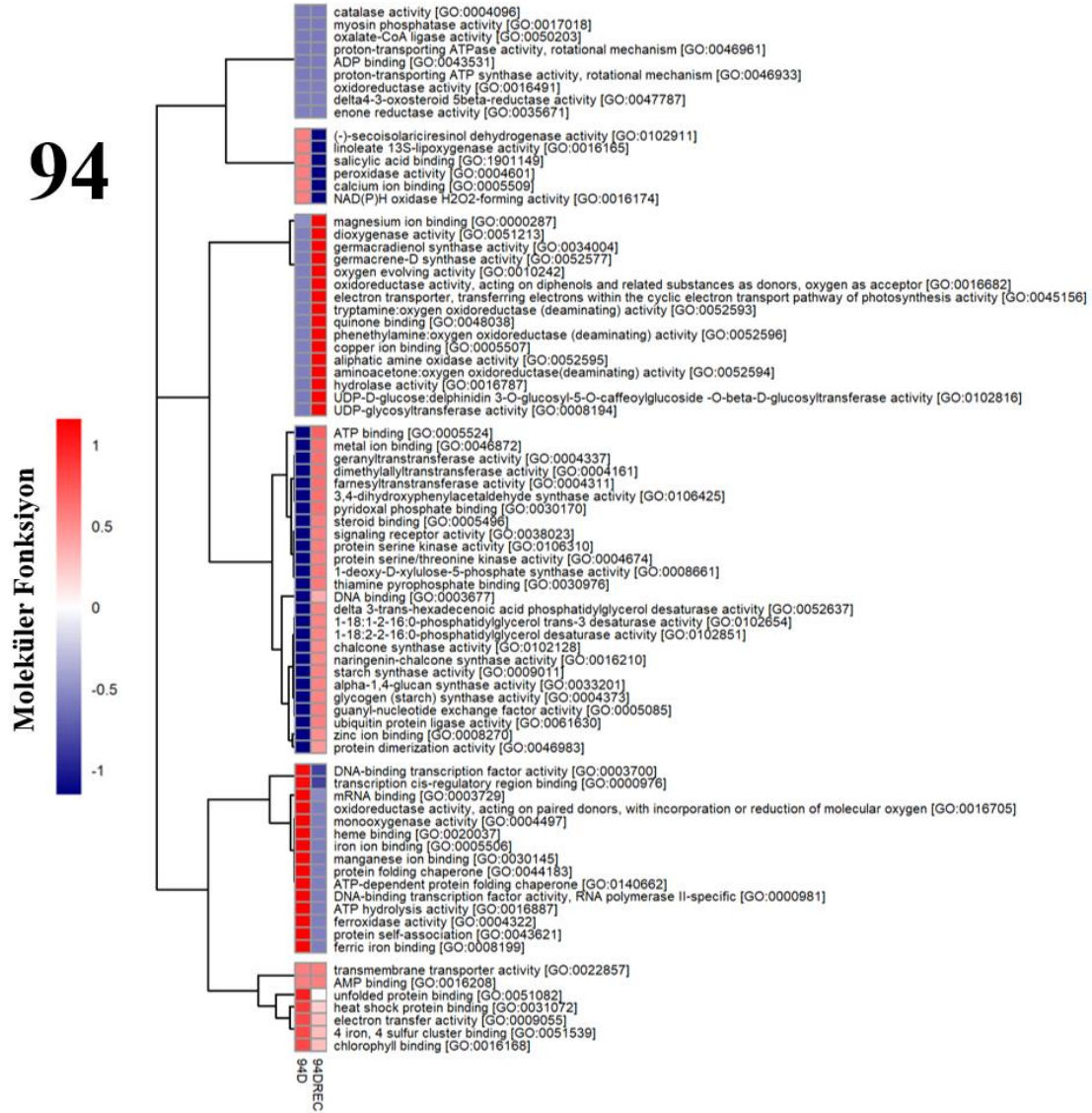
Şekil 3.14 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin moleküler fonksiyon (Molecular Function; MF) alt ontolojisindeki spesifik görev dağılım sonuçları.

Moleküler fonksiyon alt ontolojisi için Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösteren genler ve etki ettiği yolların yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği Şekil 3.15’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.15 Gemlik (26) çeşidinde moleküler fonksiyon alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.

Moleküler fonksiyon alt ontolojisi için Memecik (94) çeşidinde kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösteren genler ve etki ettiği yolların yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği Şekil 3.16’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.16 Memecik (94) çeşidinde moleküler fonksiyon alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.

Kuraklık stresi altında hem kuraklığa hassas (Gemlik-26) hem de toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde transkriptom seviyesinde moleküler fonksiyonlar ile ilişkili gen ifade değişimlerinin karşılaştırmalı analiz sonuçlarına göre; kuraklık stresi altında hem kuraklığa hassas (Gemlik-26) hem de toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde, benzer gen ifade artışları ve farklı gen baskılanma örüntülerinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Hassas çeşitte kuraklık stresine karşılık hızlı bir transkripsiyonel yeniden programlama ve elektron transfer mekanizmalarının aktive edilmesi dikkat çekmektedir. Ancak protein sentezinin baskılanması, hücresel büyümenin ve gelişimin sekteye uğradığını

düşündürmektedir (Flexas ve Medrano, 2002). Özellikle artan elektron transfer aktiviteleri, kuraklık koşullarında oluşan reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı koruma amaçlı alternatif solunum yollarının aktive olduğunu gösterebilir (Mittler, 2002).

Toleranslı çeşitte ise kuraklık stresine karşılık hem oksidatif dengeyi yönetmek hem de enerji üretimini ve fotosentezi sürdürmek için çok yönlü bir moleküler yanıt geliştirildiği görülmektedir. Bu durum stres toleransının çok katmanlı bir genetik ağ üzerinden koordine edildiğini göstermektedir (Golldack ve ark., 2014; Osakabe ve ark., 2014).

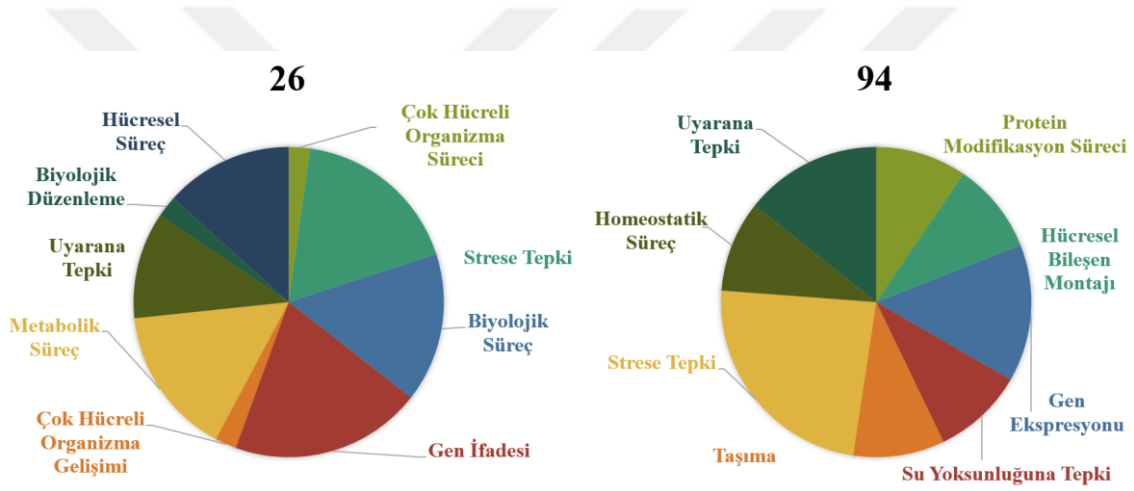
Hassas çeşit, kuraklık stresine daha reaktif ve sınırlı bir metabolik adaptasyon ile yanıt vermekte olduğu görülmektedir. Bu hızlı transkripsiyonel değişimin enerji üretimi ve protein sentezinde zayıflamaya sebep olabileceği öngörülebilir. Toleranslı çeşitte ise, daha organize, koruyucu ve üretken bir moleküler yanıt gelişmekle birlikte hem oksidatif koruma hem de fotosentezin sürdürülebilmesi için fonksiyonel aktivasyonların mevcut olduğu gözlemlenmektedir. Bu durum, drought resilience (kuraklık dayanımı) mekanizmalarının hassas ve toleranslı çeşitlerde farklı moleküler stratejilerle gerçekleştiğini açıkça ortaya koymaktadır (Tablo 3.13).

Tablo 3.13 Moleküler fonksiyon alt ontolojisi baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.

Kategori	26		94	
	D	DR	D	DR
DNA Bağlanma ve Transkripsiyon	↑↑ Güçlü artış	↓ Azalma	↑ Sınırlı artış	↓ Azalma
Elektron Taşıma Aktivitesi	↑ Artış	→ Stabil / ↓	↑ Geniş yanıt	→ Devam eden aktivite
ATP Hidrolizi ve Enerji Metabolizması	↑ ATP aktivitesi	↓ Hafif azalma	↑ Çok çeşitli ATP aktivitesi	→ Kısmi devam
Oksidoredüktaz Aktiviteleri	↑ Oksidoredüktaz	↓ Azalma	↑ Oksidoredüktaz aktivitesi	→ Kısmi devam
Ribozomal ve Translasyon Aktiviteleri	↑ rRNA ve ribozom aktivitesi	↓ Azalma	→ Düşük düzeyde aktivite	↓ Azalma
Klorofil Bağlanması ve Fotosentez	↑ Klorofil bağlanması	↓ Azalma	↑ Fotosentez gen aktivitesi	→ Aktif

3.1.6.3 Biyolojik Süreçler

Biyolojik süreçler alt ontolojisi için, Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stres uygulamasının etki ettiği gen ve gen yolları; çok hücreli organizma sürecinde %2, strese tepkide %18, biyolojik süreçte %16, gen ifadesinde %20, çok hücreli organizma gelişiminde %2, metabolik süreçlerde %16, uyarana tepkide %11, biyolojik düzenlemede %2 ve hücresel süreçlerde %13 anlamlı farklılık göstermektedir. Memecik (94) çeşidinde ise protein modifikasyon sürecinde %9, hücresel bileşen montajında %9, gen ekspresyonunda %14, su yoksunluğuna tepkide %10, taşımada %10, strese tepkide %24, homeostatik süreçte %10 ve uyarana tepkide %14 anlamlı farklılık tespit edilmiştir (Şekil 3.17).

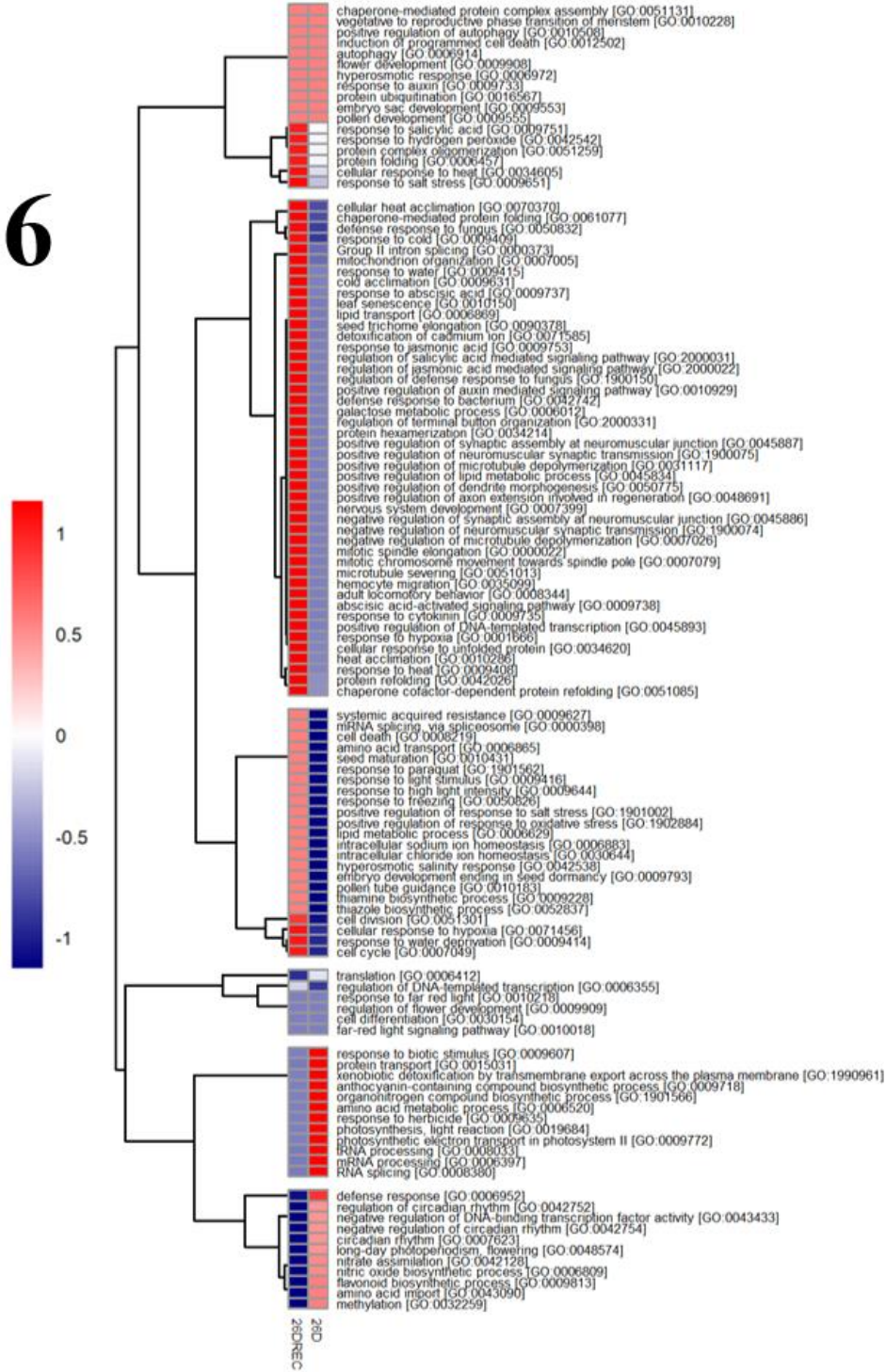


Şekil 3.17 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde en yüksek anlamlı farklılık gösteren genlerin biyolojik süreçler (Biological Process, BP) alt ontolojisindeki spesifik görev dağılım sonuçları.

Biyolojik süreç alt ontolojisi için Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösteren genler ve etki ettiği yolların yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği Şekil 3.18’de gösterildiği gibidir.

26

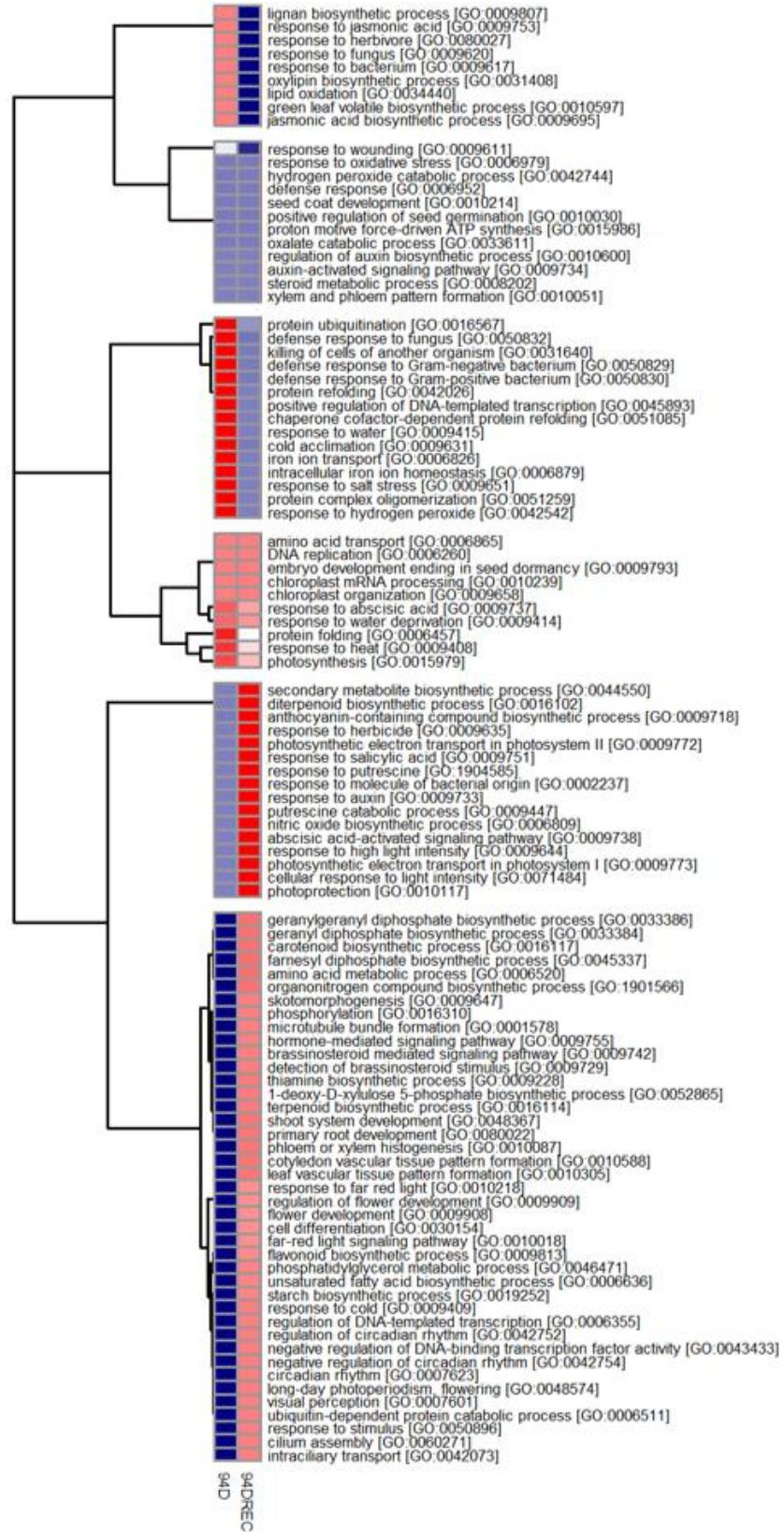
Biyolojik Süreç



Şekil 3.18 Gemlik (26) çeşidinde biyolojik süreç alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollarlar. Biyolojik süreç alt ontolojisi için Memecik (94) çeşidinde kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösteren genler ve etki ettiği yolların yoğunluk değerlerini içeren ısı grafiği Şekil 3.19’de gösterildiği gibidir.

94

Biyolojik Süreç



Şekil 3.19 Memecik (94) çeşidinde biyolojik süreç alt ontolojisi için kuraklık stresi ile ilişkili en yüksek anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen genler ve etki ettiği yollar.

Kuraklık stresi altında hem kuraklığa hassas (Gemlik-26) hem de toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde transkriptom seviyesinde biyolojik süreçler ile ilişkili gen ifade değişimlerinin karşılaştırmalı analiz sonuçlarına göre; çeşitler arası ayırt edici farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında gerçekleşen oksidatif stres tepkileriyle birlikte protein katlanması ve şaperon aracılı tepkilerin belirgin şekilde aktive edildiği, buna karşın fotosentez, ribozomal biyogenez ve translasyon süreçlerinde yer alan genlerin ise baskılandığı tespit edilmiştir. Hassas çeşit, kuraklık stresinde öncelikle hayatta kalmaya yönelik hızlı stres yanıtı süreçlerini aktive ederken, büyüme ve gelişme ile ilgili temel biyolojik süreçleri büyük ölçüde baskılamış durumdadır. Bu strateji kısa vadede koruyucu olsa da uzun vadede bitkinin verim kaybına ve canlılığının azalmasına neden olabilir (Chaves ve ark., 2009).

Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidi ise kuraklık stres yanıtını ikincil metabolit biyosentezi (lignin ve flavonoid yolları dahil) ve hücre duvarı güçlendirme süreçlerinde rol oynayan genleri yukarı düzenleyerek göstermiştir. Ayrıca toleranslı çeşidinde fotosentetik elektron taşınımı ve ATP biyosentez yolları ile ilişkili genlerin aktivasyonlarının arttığı gözlemlenerek böylece kuraklık koşullarında sürekli enerji üretimi sağlayarak büyümesini desteklediği düşünülmektedir (Chaves ve ark., 2009; Osakabe ve ark., 2014). Toleranslı çeşidin kuraklık stresi sırasında hem aktif savunma yanıtı geliştirirken hem de enerji üretimi, büyüme ve sekonder metabolizma gibi kritik süreçleri dengeli bir şekilde sürdürdüğü görülmektedir. Bu durum uzun vadeli hayatta kalım ve verim açısından çok daha avantajlı bir stratejidir (Golldack ve ark., 2014; Osakabe ve ark., 2014).

Hassas çeşidin kuraklık stresinde hayatta kalma odaklı kısa vadeli yanıtlar geliştirdiği, büyüme ve fotosentez mekanizmalarını baskıladığı görülmektedir. Buna karşın toleranslı çeşitte ise stres yanıtının savunma sistemlerini güçlendirilmesi ve fotosentez, enerji üretimi ve yapısal dayanıklılığı korumakla geliştiği tespit edilmiştir. Bu durum, kuraklığa toleranslı zeytin çeşidinin çok daha kompleks ve entegre biyolojik stratejilerle su kaybına ve stresin etkilerine tolerans sağladığını ortaya koymaktadır (Tablo 3.14).

Tablo 3.14 Biyolojik süreçler alt ontolojisi baz alınarak oluşturulan kuraklık stresi altında Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde transkriptom seviyesinde meydana gelen stres tepkilerinin özellikleri.

Kategori	26		94	
	D	DR	D	DR
Protein Katlanması ve Stres Proteinleri	↑ Belirgin artış (şaperon & ısı şoku proteinleri aktif)	↓ Aktivite azalmış	↑ Protein katlanma genleri	→ Devam eden aktivite
ROS Yanıtı ve Oksidatif Stres	↑ Güçlü ROS yanıtı	→ Kısmi devam	↑ Oksidatif stres savunması	→ Stabil yanıt
Fotosentez ve Elektron Transport	→ Aktivite gözlenmedi	→ Yok	↑ Fotosentez ve elektron transportu	↑ Hâlen yüksek
Ribozomal Biyogenez ve Translasyon	↑ Translasyonel aktivite	↓ Azalma	↓ Translasyonel aktivite	↓ Hâlen düşük
Sekonder Metabolit Üretimi	↑ Flavonoid ve sekonder metabolit yanıtı	→ Devam etmekte	↑ Sekonder metabolit üretimi (terpenoid, flavonoid)	→ Kısmen devam ediyor
Su Kaybı Yanıtı ve İyon Taşınımı	↑ Su kaybı tepkisi	↓ Azalma	↑ İyon taşınımı ve su kaybı tepkisi	↓ Hafif azalma

GO analizi, zeytin bitkisinde kuraklık toleransının yalnızca stres tepkilerini aktive ederek değil, büyümeyi, enerji metabolizmasını ve koruyucu yolları stratejik olarak dengeleyerek elde edildiğini göstermektedir. Bu bağlamda kuraklık koşulları altında özellikle kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde yaşamsal işlevselliğin devam etmesini sağlayan moleküler, hücresel ve fizyolojik mekanizmaların karmaşık bir düzenlenmesinin sergilendiği görülmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar, bitki kuraklık toleransı ile ilişkili araştırmalarda sadece stres altındaki performansa değil, stres sonrası toparlanma kapasitesine de odaklanılması gerektiğini vurgulamaktadır.

Özetle, toleranslı çeşitte, ısı şok proteinleri (HSP), su taşıma proteinleri (aquaporinler) ve transkripsiyon faktörleri (WRKY, DREB) ekspresyonlarında artış görülmüştür. Ayrıca sekonder metabolizma (özellikle lignin ve flavonoid biyosentezi) ile ilişkili genlerin yukarı regülasyonu gözlemlenmiştir. Programlanmış hücre ölümü (PCD) ile ilgili genlerde baskılanma mevcuttur. Bu yanıt profili, toleranslı çeşidin su kaybını minimize etmek, oksidatif hasarı azaltmak ve aktif hücresel koruma stratejileri geliştirmek üzere erken ve sistematik bir adaptasyon mekanizması geliştirdiğini göstermektedir (Pinheiro ve Chaves, 2011; Golldack ve ark., 2014). Hassas çeşitte ise, fotosenteze katılan genlerin ekspresyonunda belirgin baskılanmalar gözlenmiştir (örneğin Rubisco küçük alt birim genleri). ROS temizleyici enzimlerin transkript seviyelerinde artış daha sınırlı kalmıştır

(Tablo 3.15). Su taşıyıcı aquaporin transkriptlerinde genel bir azalma eğilimi gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, hassas çeşitlerin stres algılama ve yanıt mekanizmalarının geciktiğini ve daha reaktif bir savunma geliştirdiğini, bu nedenle de metabolik tahribata daha açık olduğunu göstermektedir (Chaves ve ark., 2009; Osakabe ve ark., 2014).

Tablo 3.15 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitlerinin, transkriptom seviyesinde hiyerarşik olarak yapılandırılmış üç ana bağımsız alt ontolojiden (biyolojik süreçler, hücresel bileşenler ve moleküler fonksiyonlar) yararlanılarak elde edilen kuraklık stres yanıtlarındaki farklı stratejilerine ilişkin sonuçların özeti

Özellik	Toleranslı Çeşit	Hassas Çeşit
Antioksidan Yanıt	Güçlü ve erken	Sınırlı ve gecikmeli
Su Taşınımı (Aquaporinler)	Artış veya korunmuş ekspresyon	Azalma
Fotosentez Genleri	Hafif baskılama	Ciddi baskılama
Transkripsiyon Faktörleri	WRKY, DREB artışı	Düşük aktivasyon

Bu farklılıklar, kuraklık stresine karşı başarılı bir tolerans yanıtı için, erken stres algılama, transkripsiyonel yeniden programlama ve hücre içi homeostazın aktif korunması süreçlerinin kritik olduğunu göstermektedir (Verslues ve ark., 2006). Bu bulgular, zeytin bitkisinde kuraklık stresine tolerans geliştirmenin yalnızca belirli genlerin ekspresyonuyla değil, genetik ağların bütüncül düzenlenmesiyle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle HSP'ler, WRKY transkripsiyon faktörleri, aquaporin genleri ve ferritinler, gelecekte kuraklığa dayanıklı zeytin çeşitlerinin geliştirilmesinde hedef genler olarak değerlendirilebilir.

3.1.7 Transkriptom Analizi Validasyonu

Son yıllarda, RNA-Seq gibi yüksek verimli transkriptomik teknolojilerin kullanımı, bitkilerin çevresel stres faktörlerine, özellikle de kuraklık stresine verdikleri yanıtların anlaşılmasında önemli ilerlemeler sağlamıştır. Bu teknolojiler, gen ekspresyon profillerinin tüm genom ölçeğinde kapsamlı bir şekilde analiz edilmesine olanak tanımaktadır. Ancak, RNA-Seq analizleri teknik varyasyonlar, biyolojik karmaşıklık ve hesaplamalı sınırlamalar gibi faktörlerden etkilenebildiği için, transkriptom verilerinin bağımsız ve yüksek duyarlılığa sahip bir yöntemle doğrulanması gerekmektedir (Conesa ve ark., 2016). Bu bağlamda, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR), transkriptom çalışmalarıyla belirlenen gen ekspresyon değişimlerinin doğrulanmasında yüksek

hassasiyeti, özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği sayesinde, yüksek verimli analizlerle elde edilen bulguların gerçekten biyolojik anlam taşıyıp taşımadığını güvenilir şekilde test edilmesinde altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (Bustin ve Nolan, 2020). Bu doğrulama adımı, yalnızca transkriptomik verilerin güvenilirliğini artırmakla kalmayıp aynı zamanda çalışmanın biyolojik yorumunun güçlendirilerek bilimsel geçerliliği desteklemektedir. Ayrıca, qRT-PCR ile yapılan doğrulamalar, kuraklık toleransı gibi özelliklerin geliştirilmesine yönelik ileri düzey fonksiyonel çalışmalar ve ıslah programları için kilit aday genlerin belirlenmesini de kolaylaştırmaktadır (Kumar ve ark., 2013). Bu yaklaşım, araştırmanın uluslararası düzeyde kabul görmesi için gereken bilimsel standartlara, özellikle de MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) yönergelerine (Bustin ve ark., 2009) uyum sağlanmasına da katkı sunmaktadır.

Bu doğrultuda, bu tez çalışmasında, zeytin bitkisinin kuraklık stresi ve iyileşme (R-recovery) süreçlerindeki transkriptom verileri, seçilmiş genler üzerinden qRT-PCR yöntemiyle doğrulanmış; böylece yapılan gen ekspresyon analizlerinin bilimsel geçerliliği güçlendirilerek elde edilen sonuçların sağlam bir temele oturtulması sağlanmıştır.

Bu amaçlar önce, RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak ekstrakte edilen total RNA örneklerinin Nanodrop 8000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific) ve Qubit® 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazları ile saflık ve konsantrasyon konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır (Tablo 3.16).

Tablo 3.16 Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerine ait toplam RNA örneklerinin NanoDrop ve Qubit cihazlarından elde edilen kalite parametre ölçüm sonuçları.

Örnek Adı	NanoDrop Konsantrasyon (ng μl^{-1})	NanoDrop 260/280	NanoDrop 260/230	Qubit Konsantrasyon (ng μl^{-1})
26K	54,4	2,03	1,04	38,8
26D	70	1,95	1,28	46,2
94K	56,4	1,94	1,82	44,8
94D	76,3	1,98	1,66	50,4
26KR	52,9	1,95	1,40	30,0
26DR	57	2,01	0,91	33,6
94KR	43	1,91	1,00	31,2
94DR	54,3	1,84	0,18	33,6

26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu

3.1.7.1 cDNA Sentez Kontrolü

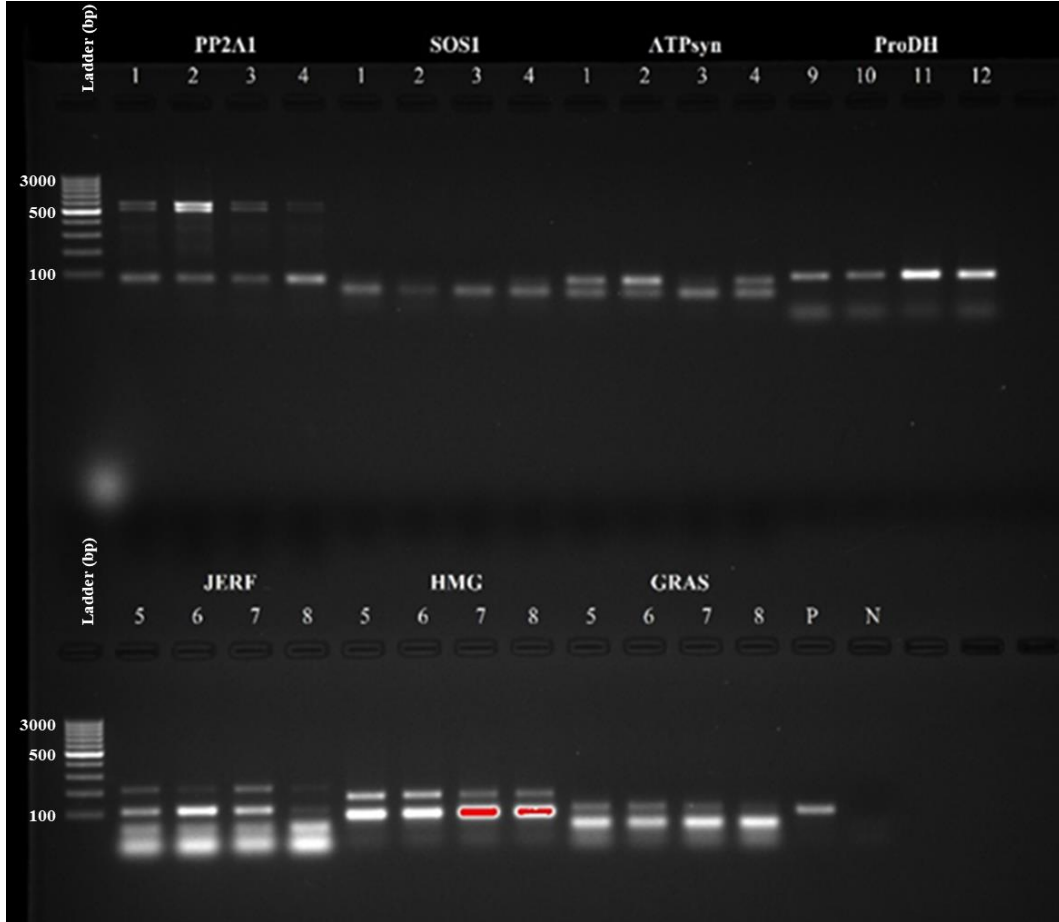
Saf ve sağlam olduğu tespit edilen RNA örneklerinin cDNA sentezleri gerçekleştirildikten sonra cDNA örneklerinin kontrolü için housekeeping gen GAPDH ile PCR uygulaması yapılmıştır. Sonrasında %2'lik agaroz jelde ayrıştırılan PCR ürünlerine ait elde edilen jel görüntüsü Şekil 3.20'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.20 GAPDH primeri ile yapılan PCR uygulaması jel görüntüsü (1-26 K, 2-26 D, 5-94 K, 6-94 D, 7-26 KR, 8-26 DR, 11-94 KR, 12-94 DR, N-negatif kontrol).

3.1.7.2 Real Time (qRT-PCR) PCR Sonuçları

Sentezi gerçekleştirilen kuraklık stresi ile ilişkili spesifik 87 primer için klasik PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Klasik PCR ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarından elde edilen PP2A1, ATPsyn, SOS1, ProDH, JERF, HMG ve GRAS primerlerine ait jel görüntüleri Şekil 3.21’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.21 PP2A1, ATPsyn, SOS1, ProDH, JERF, HMG, GRAS primerleri için yapılan klasik PCR uygulaması sonucu elde edilen jel görüntüsü.

Klasik PCR’da spesifik bant veren primerlerin Real Time PCR çalışmaları için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen primer deneme çalışmaları sonrası, düşük CT değerleri ve kararlı melt curve piki veren primerler seçilerek qRT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) ve hassas (Gemlik-26) zeytin çeşitlerinde detaylı gen anlatım profili oluşturmak için seçilen 26 gen, beş farklı ana başlıkta incelenmiştir: (1) Metabolizma ve Biyosentez, (2) Hücresel Taşınım ve Sinyal İletimi, (3) Savunma ve Stres Yanıtı, (4) DNA, RNA ve Hücresel Düzenleme, (5) Hücre Duvarı ve Büyüme.



Şekil 3.22 Validasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen genler ve ait oldukları metabolik yollar.

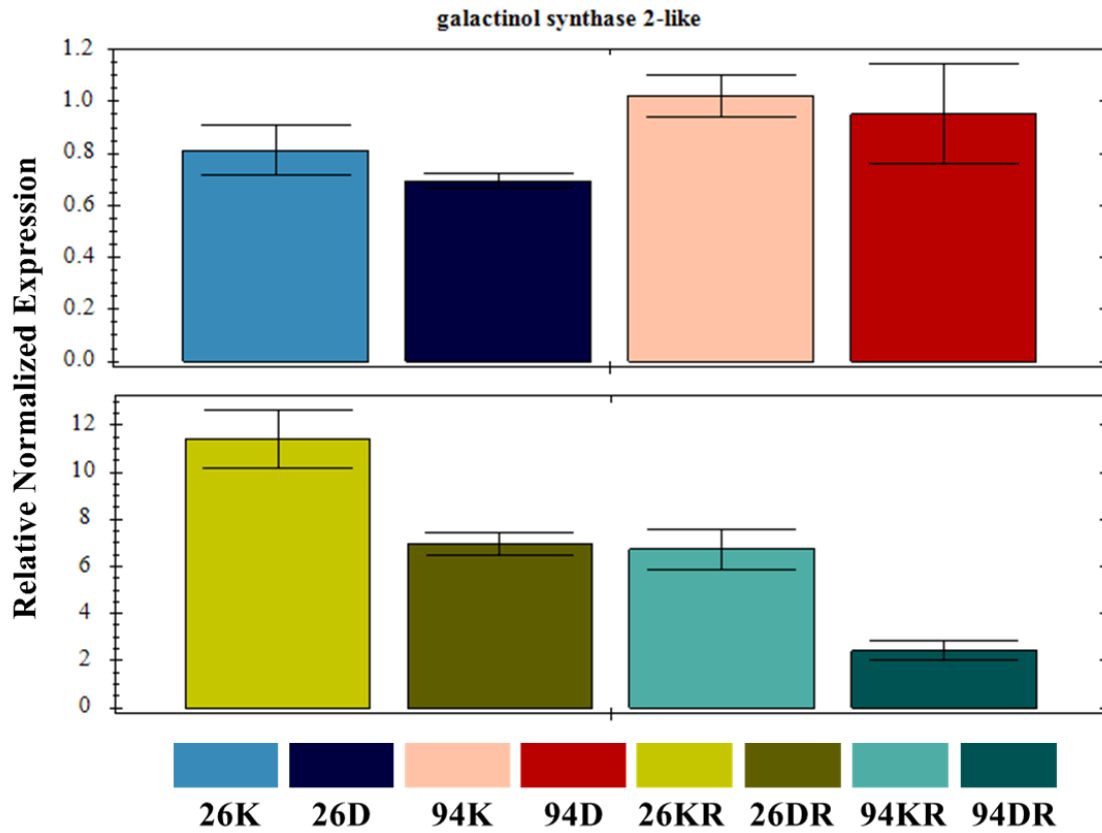
3.1.7.2.1 Metabolizma ve Biyosentez ile İlişki Genler

Elde edilen RNA-Seq datasından seçilen metabolizma ve biyosentez ile ilişki 7 farklı genin kuraklık stresi ile ilişkisi, çeşitler ve deney grupları açısından qRT-PCR ile detaylı olarak analiz edilmiştir. Bu genler; *galactinol synthase 2-like* (Karbonhidrat metabolizması); *beta-amyrin 28-oxidase-like*, *squalene monooxygenase-like* ve *(-)-germacrene D synthase-like* (Sterol ve triterpen biyosentezi); *chalcone synthase J-like* ve *caffeic acid 3-O-methyltransferase 2* (İkincil metabolit biyosentezi) ve *glutamate dehydrogenase B, transcript variant*'tır (Azot metabolizması).

3.1.7.2.1.1 Karbonhidrat metabolizması ile İlişki Genler

3.1.7.2.1.1.1 *Galactinol synthase 2-like*

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) her iki çeşit için de kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) ise kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat ve toleranslı (Memecik-94) çeşitte yaklaşık 3 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.23).



Şekil 3.23 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stresi uygulaması (D) ve kuraklık stresi uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların galactinol synthase 2-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Galaktinol sentaz (*GolS*), bitkilerin abiyotik stres adaptasyonunda, özellikle kuraklığa toleransta önemli rol oynayan rafinoz oligosakkaritlerin (RFO'lar) sentezi için önemli bir biyolojik katalizördür (Hoi ve ark., 2019). Qui ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada soya fasulyesi *GolS* genlerinden *GmGolS2-1* ve *GmGolS2-2*'yi tütün bitkisine aktarmışlar ve elde ettikleri transgenik tütünde kuraklık stresi altında *GmGolS2-1* ve *GmGolS2-2*

transkriptlerinde önemli bir artış tespit etmişlerdir. Ek olarak, *GmGolS2-1*'in aşırı ekspresyonunun kuraklık stresi altında yabani tip (WT) tütüne kıyasla transgenik tütünde daha düşük elektrolit sızıntısı ve malondialdehid (MDA) içeriği ve daha yüksek çözünür karbonhidrat ve prolin içeriği ile sonuçlandığını belirtmişlerdir. Bu bulgular *GmGolS2-1*'in transgenik tütünün kuraklığa toleransını geliştirdiğini göstermektedir.

Başka bir araştırmada *Coffea arabica*'daki üç *GolS* izoformunun (*CaGolS1*, *CaGolS2*, *CaGolS3*) su eksikliği, yüksek tuz ve ısı şoku koşulları altında bitkide rafinoz ve staçiyoz oluşumunu arttırdığı ve galaktinol birikiminde rol oynayarak bitkilerin çevresel tehlikelere karşı tolerans kazanmasında yardımcı olduğu belirtilmiştir (dos Santos ve ark., 2011). Benzer bir çalışmada Nishizawa ve arkadaşları (2008), *Arabidopsis* genomunda 10 *AtGolS* geni tanımlayarak *AtGolS1*, *AtGolS2* ve *AtGolS3*'ün abiyotik stresler altında yukarı regüle olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmadan elde edilen bulgular, galaktinol sentaz geninin yukarı regülasyonu sonucu galaktinol ve rafinoz sentezindeki artışın abiyotik stres altında bitki hücrelerinde meydana gelen oksidatif hasardan koruma rolleri olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Bir başka çalışmada ise salatalık *CsGolS1* genini aşırı eksprese eden transgenik tütün bitkilerinin biyotik strese, kuraklığa ve yüksek tuzluluğa karşı artan toleransla sonuçlanan galaktinol birikiminde artış gösterdiği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2008). Taji ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2002), 7 *Arabidopsis* *GolS* geni arasında strese duyarlı 3 *GolS* geni (*AtGolS1*, 2 ve 3) belirlenmiş ve *AtGolS1* ve 2 genlerinin kuraklık ve yüksek tuzluluk stresi tarafından tetiklendiği ancak soğuk stresi tarafından uyarılmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca *AtGolS3* geni de soğuk stresi tarafından tetiklenirken kuraklık veya tuz stresi tarafından uyarılmamıştır.

Bu sonuçlar stresle indüklenen çoğu *GolS* geninin ozmoprotektanlar olarak işlev gören galaktinol ve rafinoz sentezindeki rolü nedeniyle abiyotik stres koşulları altında bitkilerin stres toleransında anahtar rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca *GolS* genlerinin bitkilerde stres toleransında oynadığı rolün her bitki ve abiyotik streste aynı olmadığını, bazı *GolS* genlerinin kuraklık stresi altında uyarılırken bazılarının tuz ve soğuk stresi altında uyarıldığını göstermektedir.

Gerçekleştirdiğimiz validasyon analiz sonuçları, kuraklık stres koşullarında benzer şekilde her iki zeytin çeşidinde de ilgili genin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir azalma olmadığını göstermiştir. Bu durum, literatürde yapılan diğer çalışmalarda elde edilen

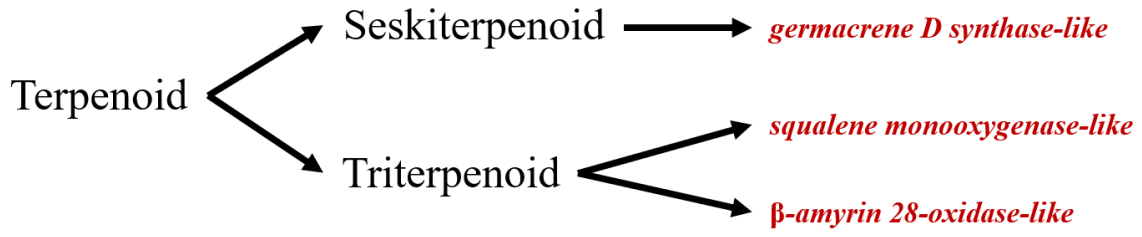
sonuçlarla paralel olarak, transkript datasından belirlediğimiz zeytin *GoS2* geninin kuraklık stresiyle doğrudan ilişkili olmayıp, diğer abiyotik stres yanıtlarında daha etkin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Tajı ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlara benzer şekilde bu durum, zeytin bitkisinde kuraklık stres mekanizmalarının daha anlamlı olarak anlaşılabilmesi için farklı bir *GoS2* geninin incelenmesinin daha doğru bir yaklaşım olacağını düşündürmektedir.

3.1.7.2.1.2 Sterol ve Triterpen Biyosentezi ile İlişki Genler

Bitki sekonder metabolitleri (PSM'ler), hücresel işlevleri düzenlemedeki kritik rolleri ile tanınan biyoaktif bir bileşik grubudur (Anchimowicz ve ark., 2025). Flavonoidler, alkaloidler ve terpenoidlerden oluşan PSM'ler, biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki savunmasında önemli roller oynamaktadır (Al-Khayri ve ark., 2023). PMS'ler içerisinde en fazla yeri terpenoidler (%31) alırken ardından sırasıyla alkaloidler (%28) ile flavonoidler (%13) gelmektedir (Rahimi ve ark., 2025).

Terpenoidler, hemi-, mono-, homo-, seski- ve bazı diterpenoidleri içeren bitki ikincil metabolizmasının bir parçası olarak sentezlenen, düşük molekül ağırlıklı (300 Da) çeşitli bir organik bileşik sınıfıdır (Boncan ve ark., 2020). Bitkiler, terpenoid metabolitlerini kullanarak bir dizi temel büyüme ve üretim işlevi gerçekleştirmektedir. Bununla birlikte çoğu terpenoid, abiyotik ve biyotik sistemlerde karmaşık kimyasal etkileşimler ve savunma için de kullanılır (Jahangeer ve ark., 2021). Devam eden araştırmalar, ekolojik öneme sahip olan terpenoidlerin bitkide abiyotik stres koruması geliştirme konusunda tam potansiyellerinden yararlanmak için terpenoid biyosentezinde yer alan karmaşık metabolik ve moleküler düzenleyici ağların anlaşılmasına odaklanmaktadır (Tholl, 2015; Jahangeer ve ark., 2021; Câmara ve ark., 2024).

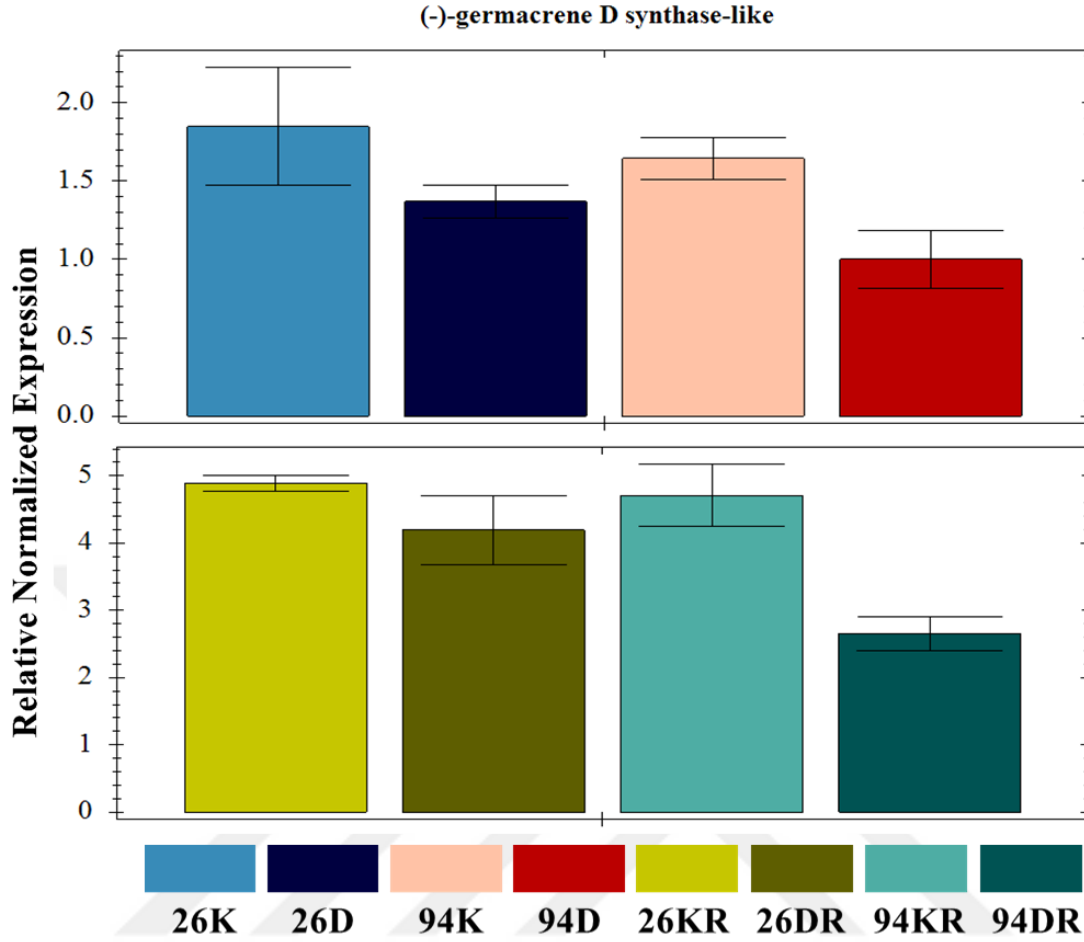
Çalışmamızda RNAseq transkriptomik analizler sonucunda validasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen (-)-*germacrene D synthase-like*, *squalene monooxygenase-like* ve *beta-amyrin 28-oxidase-like* genleri sekonder metabolit biyosentezinde görev alan terpenoidlerin iki büyük alt grubunda (seskiterpen ve triterpen) yer almaktadır (Şekil 3.24).



Şekil 3.24 Terpenoid biyosentetik yolunda yer alan ilgili genler (Ma ve ark., 2024).

3.1.7.2.1.2.1 (-)-germacrene D synthase-like

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,3 kat azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların (-)-germacrene D synthase-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Germakren D, geniş uygulama yelpazesine sahip terpenlerin büyük bir alt grubu olan seskiterpen sınıfına dahil olan uçucu bir organik hidrokarbon (Liu ve ark., 2022). Genellikle antimikrobiyal ve böcek öldürücü özellikleri nedeniyle birçok bitki türü tarafından üretilmektedir (Senji ve Mandoulakani, 2018). Germakren'in iki önemli molekülü germakren A ve germakren D olup (Adio, 2009) bitkilerde en yaygın konfigürasyonun (-)-germakren D olduğu bildirilmiştir (Bülow ve König, 2000).

Germakren D sentaz, bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere karşı geliştirdiği savunma mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Arimura ve arkadaşlarının (2004) melez kavakta (*Populus trichocarpa* × *deltoides*) yaptıkları bir çalışmada, (-)-germakren D sentaz olarak tanımlan *PtdTPS1* geninin, böcek beslenmesi sırasında meydana gelen mekanik yaralama ile gen ifadesinin arttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, çay bitkilerinde (*Camellia sinensis*) yapılan bir başka çalışmada, germakren D sentazı

kodlayan *Cstps1* geni böcek hasarına yanıt olarak 6, 12, 24, 48 ve 72 saat sonra 1,61 ila 2,64 kat yukarı düzenlendiği, ancak 96 saat sonra kontrol grubunun 0,53 katı kadar azaldığı tespit edilmiştir (Fu, 2013).

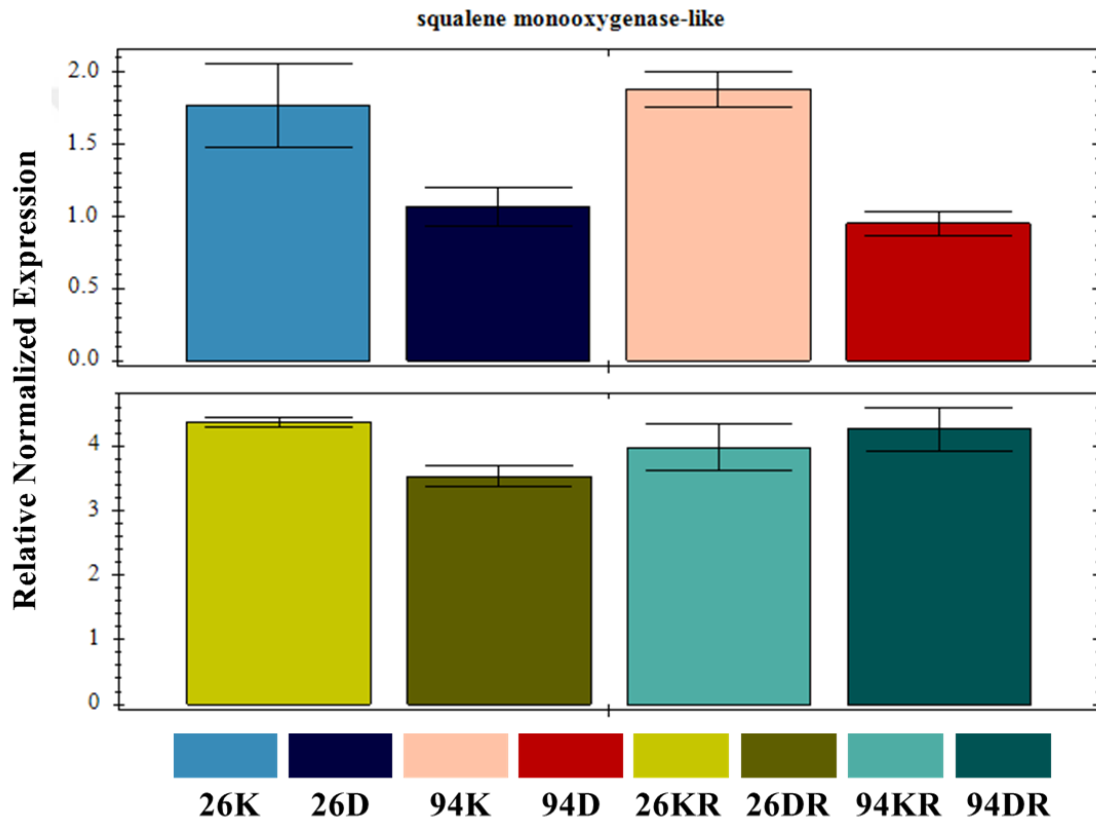
Ocimum basilicum L. bitkilerinde yapılan bir başka çalışmada, soğuk stresine maruz bırakılan bitkilerde germakren D içeriğinin, *germakren D sentaz (GDS)* geninin ifade seviyesinin yukarı düzenlenmesi yoluyla arttığı saptanmıştır (Senji ve Mandoulakani, 2018). Ramezani ve arkadaşları (2020), bitkide kuraklık stresine yanıt olarak uçucu bileşik profilinde meydana gelen değişiklikleri değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, Germacrene D'nin yalnızca kuraklıkla muamele edilen bitkilerde tespit edildiği ve strese yanıt olarak işlevsel roller üstlendiği belirtilmiştir. Benzer şekilde, Ormeño ve arkadaşlarının (2007), *Thymus vulgaris* ve *T. Serpyllum* türlerinde kuraklık stresi altında Germacrene D seviyesinin arttığını göstermişlerdir. Ma ve arkadaşlarının (2024) *Atractylodes chinensis* bitkisinde yaptıkları başka bir çalışmada, Germakren'i katalize eden *CYP450* geninin orta şiddetli kuraklık stres uygulamasında yukarı, yüksek şiddetli kuraklık stres uygulamasında ise aşağı düzenlendiği tespit edilmiştir. Nik ve arkadaşlarının (2008) *Parthenium argentatum* bitkisiyle yaptıkları bir başka çalışmada ise, kuraklığa toleranslı ve hassas çeşitler arasındaki farklar incelenmiş ve her iki çeşitte de kuraklık stresi ile germakren D'nin arttığı, ancak toleranslı çeşitte hassas çeşide göre daha yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz validasyon sonuçlarına göre hem kuraklık stresi altında hem de stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında her iki zeytin çeşidi için de ilgili genin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Özellikle bu azalma, toleranslı çeşitte hassas çeşide kıyasla daha belirgin olmuştur. Bu durum kuraklık stresi için bitkilerin geliştirdiği tolerans mekanizmasında (-)-germacrene D synthase-like geninin önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında, orta şiddette ve kısa süreli stres uygulamaları sonrası ilgili genin ekspresyonunun arttığı, ancak yüksek şiddette ve uzun süreli stres uygulamaları sonrası azaldığı görülmektedir. Ayrıca toleranslı çeşitlerin, hassas çeşide göre daha fazla gen indüksiyonu gösterdiği belirtilmektedir. Bu bulgular, elde ettiğimiz verileri destekler nitelikte olup, (-)-germakren D sentaz geninin bitkilerde kuraklık stres yanıtında potansiyel bir savunma işlevinde rol aldığını göstermektedir.

3.1.7.2.1.2.2 Squalene monooxygenase-like

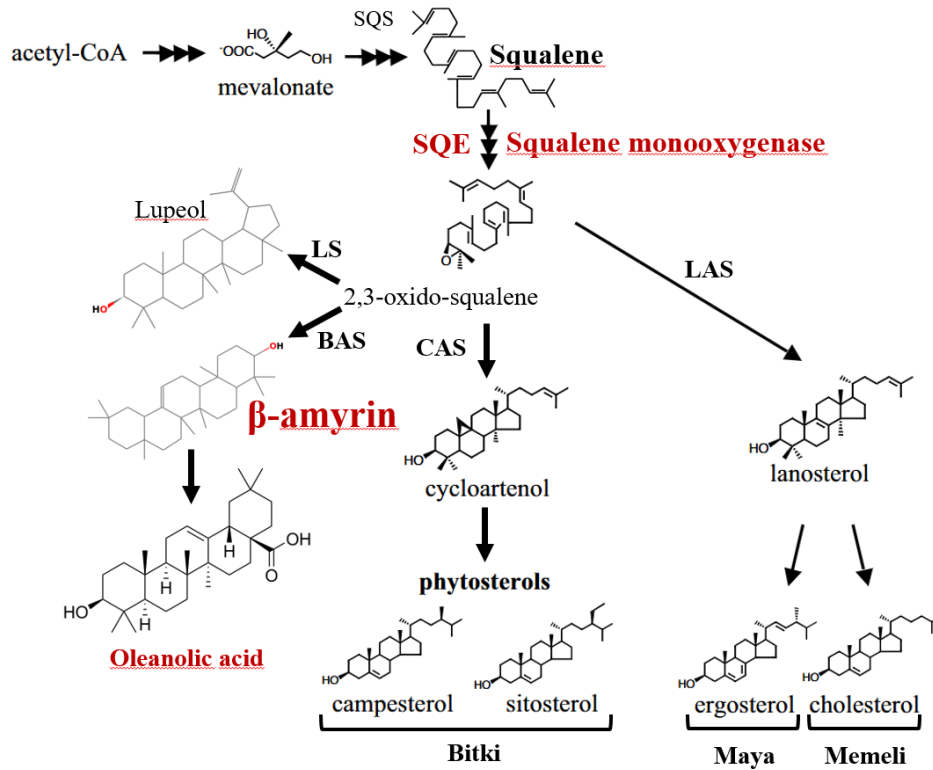
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat, toleranslı (Memecik-94) çeşit için ise yaklaşık 2 kat azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,2 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir (Şekil 3.26).



Şekil 3.26 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların squalene monooxygenase-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Bitki hücrelerinde birincil sterol ile ikincil triterpenoid metabolizmasının öncü molekülü olan 2,3-oksidoskualen, mevalonat yolundan türetilen izopentenil pirofosfattan sitozolde sentezlenmektedir (Chappell, 2002; Phillips ve ark., 2006). Bu yolağın temel enzimleri arasında 2,3-oksidoskualen biriktirmek için SQS ve SQE yer almaktadır (Pollier ve Goossens, 2012). 2,3-oksidoskualen birikiminin ardından, iki ana ikincil metabolit grubu

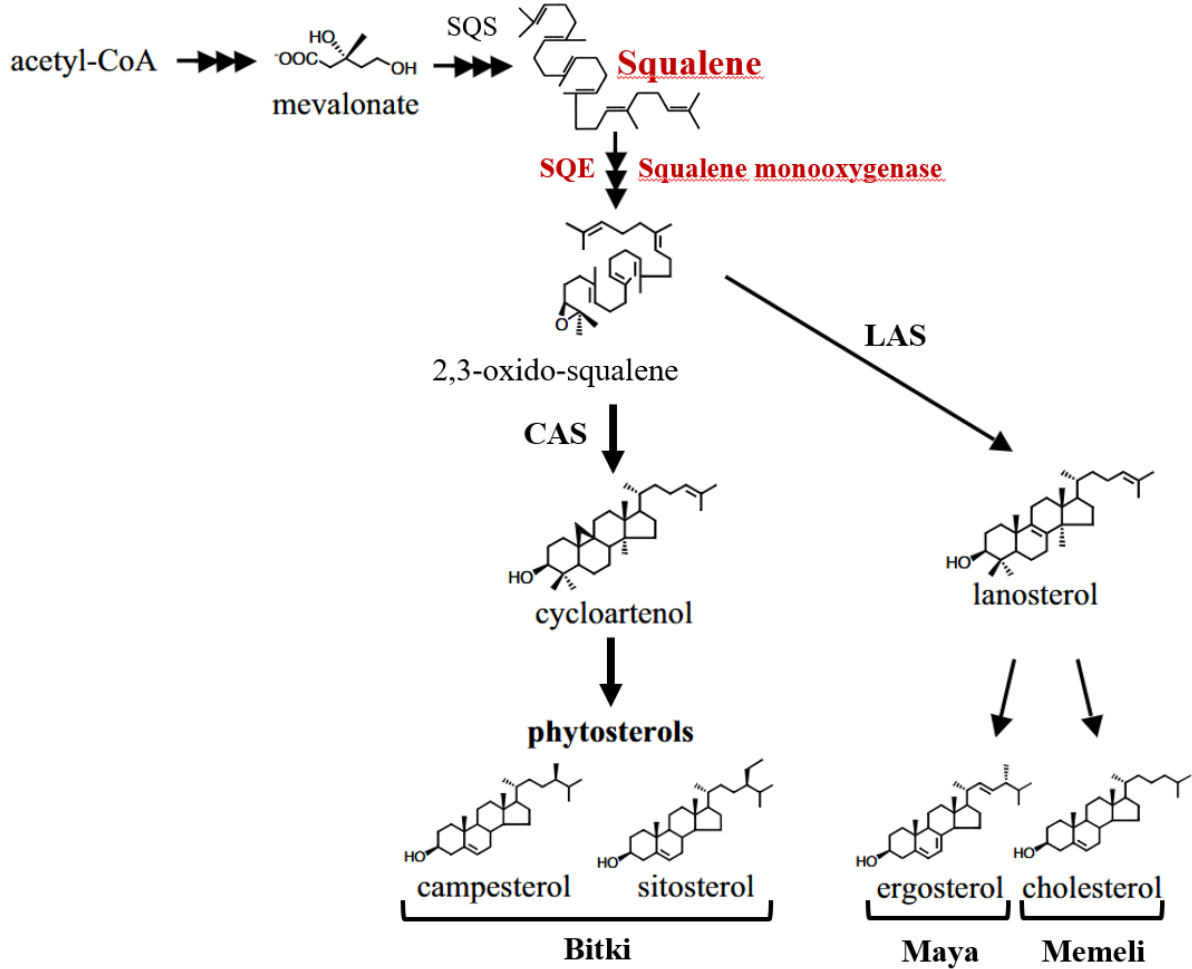
(steroller ve nonsteroller) sentezlenir ve bu süreç BAS, LS, LAS, CAS enzimlerinin aktivitesine bağlıdır (Sawai ve Saito, 2011). Yaptığımız çalışmada seçtiğimiz *squalene monooxygenase-like* geninin, triterpenoid ve fitosterol biyosentetik yollarında skualeni katalize ederek sterol biyosentezinde hız sınırlayıcı enzimlerden birini temsil ettiği belirlenmiştir. Seçilen bir diğer gen olan *beta-amyirin 28-oxidase-like* ise, adını zeytin bitkisinden alan oleanolik asidin biyosentezinde öncü bir molekül olarak önemli bir role sahiptir (Şekil 3.27).



Şekil 3.27 Sterol ve triterpenoid biyosentetik yolu.

Bu genlerden *squalene monooxygenase-like* özellikle bitki büyümesi ve gelişimi için gereklidir (Laranjeira ve ark., 2015). Skualen monooksijenaz / epoksidaz (SQE), ökaryotik yaşam boyunca hayati bir sterol sentez enzimidir (Chua ve ark.,2020). Farklı organizmalarda çeşitli isim ve kısaltmalara sahip olan bu enzim (hayvanlarda SM veya SQLE, mantarlarda ERG1, bitkilerde ve protistlerde SQE veya SE), triterpenoid ve fitosterolün biyosentetik yolundaki skualeni katalize ederek sterol biyosentezinde hız sınırlayıcı enzimlerden biri olarak görev yapmaktadır (Arya ve ark., 2016; Long ve ark., 2022, Baker ve Brown, 2019; Gao ve ark., 2016). Çalışmalar SQE aktivitesinin maya ve hayvanlar gibi organizmalarda sterol biyosentetik yolunun düzenleyici bir kontrol noktası olduğunu göstermektedir (Foresti ve ark., 2013). Bitkilerde ise triterpenoid biyosentetik

yolunun bloke edildiği mutantların şiddetli pleiotropik kusurlar göstermesi ve bitkilerde embriyo gelişiminde oynadığı tespit edilen rolleri nedeniyle önemli bir düzenleyici role sahip olduğu düşünülmektedir (Vranová ve ark., 2013)(Şekil 3.28).



Şekil 3.28 Siterol biyosentetik yolu. Skualen, skualen epoksidaz (SQE) tarafından oksitlenerek 2,3-oksido skualen üretir ve bu da membran sterolleri dahil olmak üzere steroidleri üretmek üzere metabolize edilir. BAS, b-amirin sentaz; CAS, sikloartenol sentaz; LAS, lanosterol sentaz; LS, lupeol sentaz; SQE, skualen monooksijenaz/epoksidaz; SQS, skualen sentaz (Ohyama ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2023)

Skualenin 2,3-oksidoskualene dönüşümünü katalize eden skualen monooksijenazın genlerindeki mutasyonlar aşırı kuraklık hassasiyetine, değişen sterol bileşimine ve bozulmuş reaktif oksijen türlerinin düzenlemesine neden olabilmektedir (Posé ve ark., 2009). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, *SQE* geninde ortaya çıkan bir mutasyon, bitkilerde bozulmuş kök gelişimi, hipokotil ve gövde uzama kusurları, verimsiz tohum gelişimi, köklerde değişmiş sterol bileşimi ve bozulmuş stoma tepkileri ile

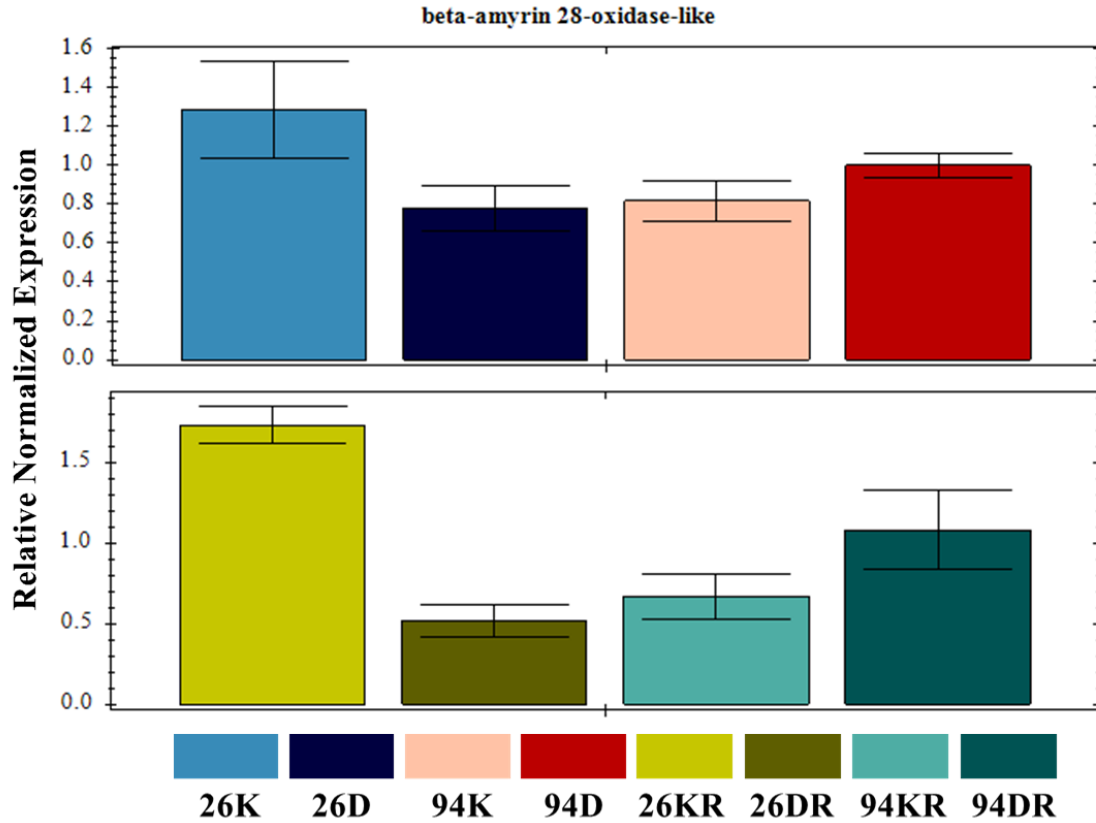
sonuçlanmaktadır (Phillips ve ark., 2006). Laranjeira ve arkadaşları (2015), *Arabidopsis thaliana* ile yaptıkları bir çalışmada, skualen türevi bileşiklerin bitki stres toleransını artırmadaki potansiyel rolünü değerlendirmek için üç farklı *GmSQE1* aşırı ekspresyon hattı üreterek *SQE* azalmasına bağlı olarak gelişen skualen birikiminin fenotipik kusurlara neden olduğunu vurgulamışlardır. Ek olarak *SQE*'nin yüksek ekspresyonunun bitkilerde iyileştirilmiş agronomik performans, çiçeklenme aşamasında artan biyokütle ve daha yüksek kalitede tohum üretimi gibi gelişmiş özellikler sergilemesinde rol oynayarak bitki stres toleransını artırmada fayda sağladığını tespit etmişlerdir. Soya fasulyesi bitkilerinde steroidlerin oksidatif strese karşı koymadaki temel rolünü araştıran bir başka güncel çalışmada ise, *GmSQE1*'in aşırı ekspresyonunun soya fasulyesi kuraklık stres toleransını önemli ölçüde artırdığı ve bu artan stres toleransının abiyotik stres kaynaklı hücre oksidatif hasarının azalmasıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir. Çalışmada ek olarak stres koşulları altında *GmSQE1* genini aşırı ifade eden soya fasulyesi, buğday, darı ve mısırdaki birden fazla sterol bileşiğinin yukarı düzenlenerek kuraklık toleransını önemli ölçüde iyileştirdiği belirtilmiştir (Yu ve ark., 2024). Ma ve arkadaşlarının (2024) *Atractylodes chinensis* fideleri üzerinde kuraklık stresi yanıtının moleküler mekanizmasını ortaya çıkarmak için yaptıkları bir başka çalışma ise orta ve yüksek düzeyde kuraklık stresi uygulanan bitkilerde *SQE* geninin aşağı düzenlendiğini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki kuraklık stresi altında *SQE* geni bitkiler arasında farklı düzenlenmektedir. Bunun bir nedeni yapılan çalışmaların sınırlı olmasıyla açıklanabilir. Ayrıca literatürde de bahsedildiği üzere bitki triterpenoid biyosentetik yolundaki hız sınırlayıcı enzimlerden biri olan *SQE*'nin bitkilerde birden fazla çeşidi bulunmakta ve dokuya göre farklı ekspresyon paternleri göstermektedir (Laranjeira ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olmasına rağmen skualen monooksijenazın bitki kuraklık stresi tepkilerinde ve ikincil metabolit üretimindeki önemli rolü ile birlikte bitki büyümesi ve gelişimindeki önemini ortaya koymaktadır. Bu durum abiyotik stres yanıtında bitkide gerçekleşen sterol sentezinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasının önemini de vurgulamaktadır.

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre, kuraklık stresi altında her iki zeytin çeşidinde de *SEQ* gen ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Ancak kuraklık stres grupları ile iyileşme grupları karşılaştırıldığında, kuraklık stresine maruz kalmış bitkilerde gen ekspresyonu düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Hassas çeşitte, stres uygulaması sonrası

sulama yapılan iyileşme gruplarında gen ekspresyonu azalırken, toleranslı çeşitte ilgili genin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler, zeytin çeşitlerinde kuraklık stres yanıtının, sterol biyosentezinde önemli bir role sahip olan *SQE* genindeki azalmış gen ekspresyon profili ile temsil edildiğini göstermektedir.

3.1.7.2.1.2.3 *Beta-amyrin 28-oxidase-like*

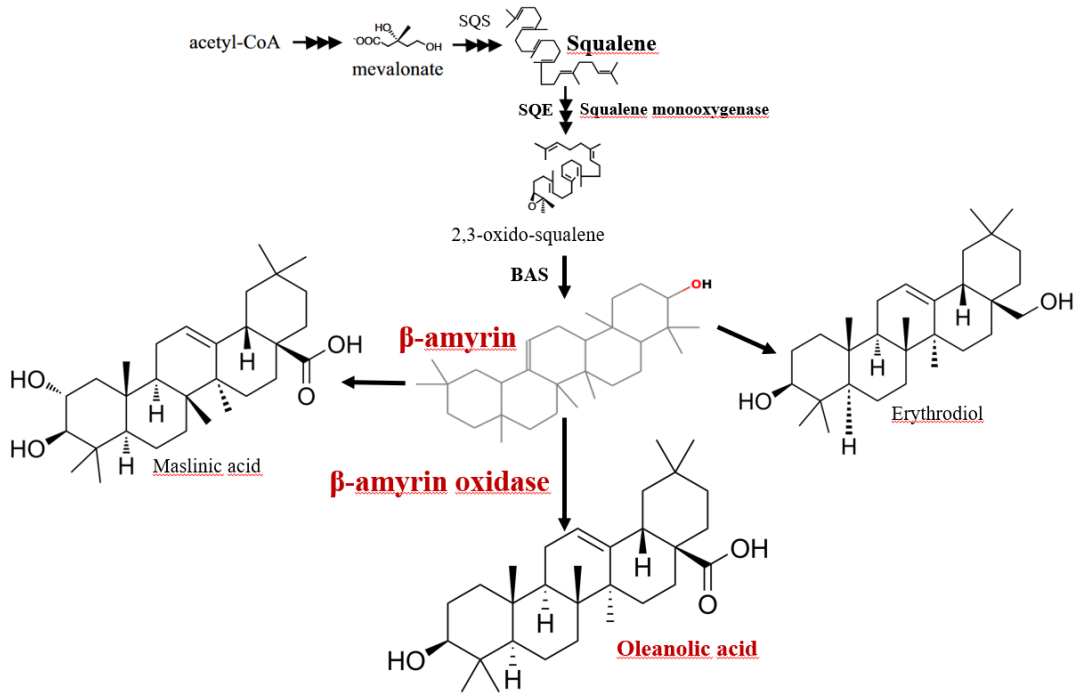
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 3,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların beta-amyrin 28-oxidase-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Oleanane iskeletine sahip tipik bir pentasiklik triterpen olan β -amirin, doğada en sık rastlanan triterpenlerden biridir ve (3S)-2,3-oksidoskualenin biyosenteziyle oluşur. β -amirin sentaz enzimi ile katalize edilen oksidoskualenin siklizasyonu sonucu meydana gelen β -amirin, oleanolik asit (3 β -hidroksiolean-12-en-28-oik asit) biyosentezinde öncü bir molekül olarak rol oynar (Kushiro ve ark., 1998).

Oleanolik asit ve türevleri, anti-inflamatuar, antioksidan ve antikanser gibi çeşitli ümit verici farmakolojik aktivitelere sahiptir (Pollier ve Goossens, 2012). Bu bileşik, özellikle Oleaceae ailesine ait bitkilerde yaygın olarak bulunmakla birlikte, bileşiğin adını aldığı zeytin (*Olea europaea*) hala ticari oleanolik asidin ana kaynağıdır (Simonsen ve Ross, 1957; Sporn ve ark., 2011). Oleanolik asit genellikle bitkilerin epikütikular mumlarında bulunarak su kaybını önlemeye yardımcı olur ve patojenlere karşı ilk savunma bariyeri olarak işlev görür (Heinzen ve ark., 1996) (Şekil 3.30).



Şekil 3.30 Oleanolik asit biyosentetik yolu. Mevalonat yolundan türetilen skualen oluşumu skualen sentaz (SQS) tarafından katalize edilir. Oleanolik asit, skualen epoksidaz (SE) katalizinde skualenden sentezlenen aynı öncül olan 2,3-oksidoskualenden türetilir. Oksidoskualen, b-amirin sentaz katalizinde b-amirin'e dönüştürülür. B-amirin, b-amyrin oksidaz (BAO) tarafından katalize edilerek oleanane tipi oleanolik aside dönüştürülür (Zhao ve ark., 2015; Martínez-Beamonte ve ark., 2020). Nasrollahi ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları çalışma, meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) bitkilerinde kontrollü kuraklık stresinin, triterpenoid saponinlerin biyosentezinde yer alan

anahtar genlerden biri olan *β-amirin sentaz* geninin ifadesini yukarı düzenlediğini ve ikincil metabolitlerin üretimini doğrudan artırdığını göstermektedir. *Glycyrrhiza uralensis* ile yapılan bir başka kuraklık stres çalışmasında ise *β-amirin sentaz* (*β-AS*) aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Fan ve ark., 2022).

Chung ve arkadaşlarının (2007) soya fasulyesinde çeşitli streslere yanıt olarak *β-amirin sentaz* (*GmAMS1*) geninde meydana gelen değişiklikleri RNA düzeyinde araştırdıkları çalışmada, *GmAMS1* ekspresyonunun düşük sıcaklık ve yara stresi ile indüklendiği, ancak dehidratasyon ve tuz stresi ile uyarılmadığı belirlenmiştir. Bir başka çalışmada Shabani ve arkadaşları (2010), metil jasmonat (MeJa) ve salisilik asit (SA) uygulamalarının farklı konsantrasyon ve sürelerde *β-AS* gen ekspresyonuna etkisini araştırmışlardır. Sonuçlara göre, *bAS* geni 24 saatlik uyarıdan sonra 0,1, 1 ve 2 mM MeJa'da artarken, SA'da sadece 0,1 ve 1 mM konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir.

Şimdiye kadar yapılan araştırmalar, kuraklık da dahil olmak üzere abiyotik stres koşullarında, bitkilerde triterpenoid biyosentetik yolunda yer alan *bAS* gen ifadesinin yukarı düzenlendiğini ortaya koymaktadır. Ancak literatürde *β-amirin oksidaz* geni ile ilgili bir doğrudan bir stres çalışması bulunmamaktadır. Zhao ve arkadaşlarının (2015) *Panax ginseng* bitkisinde ginsenosid biyosentez yollarını inceledikleri çalışmalarında, *β-amirin* seviyesinin azalmasıyla *β-amirin oksidaz* gen ekspresyonunun da aşağı düzenlendiğini bildirmiştir. Bu durum, *β-amirin oksidaz* enziminin indüklenebilir bir enzim olduğunu düşündürmektedir.

Literatürde *β-amirin oksidaz* geni ile yapılmış bir stres çalışması bulunmamakla birlikte, *β-amirin oksidaz* geninin olenolik asit biyosentezinde anahtar bir rol üstlendiği açıktır. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, kuraklık stresi altında *bAS* gen ekspresyonunun yukarı düzenlenmesiyle *β-amirin* miktarının arttığını ve bunun sonucunda ikincil metabolit üretiminin dolaylı olarak yükseldiğini göstermektedir. Bu durum *β-amirin* ve ilişkili gen yollarının bitkilerde kuraklık stresine karşı potansiyel bir savunma mekanizmasında rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca mevcut veriler olenolik asidin, bitkilede su kaybını önlemede ve patojenlere karşı savunmada önemli bir işlev üstlendiğini de desteklemektedir (Heinzen ve ark., 1996).

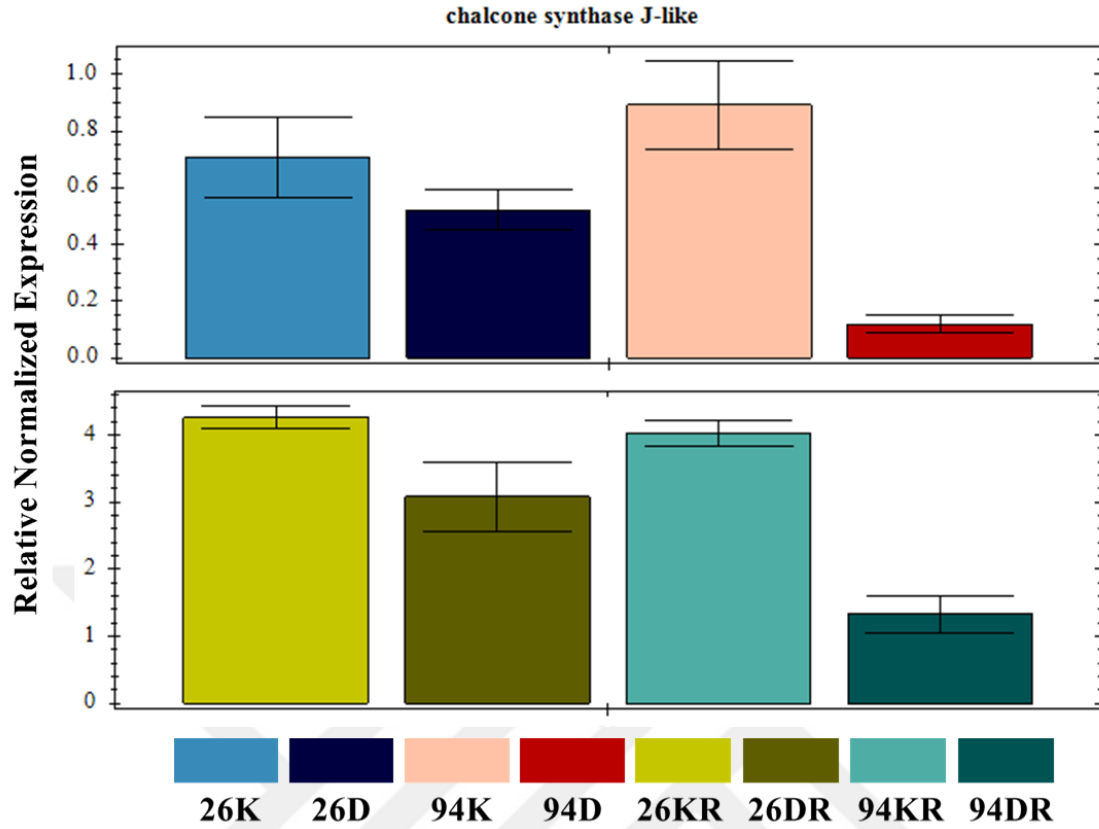
Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre, hem kuraklık stresine maruz bırakılan hem de stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında, kuraklığa hassas

çeşitte *beta-amyrin 28-oxidase-like* gen ekspresyonunda azalma, toleranslı çeşitte ise ekspresyonda artış tespit edilmiştir. Bu veriler, ilgili genin kuraklık stresine karşı gelişen bitkisel tolerans mekanizmalarına hem oleanolik asit üretimi yoluyla doğrudan hem de triterpenoid biyosentetik yolağındaki hız sınırlayıcı rolü nedeniyle dolaylı olarak etki ettiğini düşündürmektedir.

3.1.7.2.1.3 İkincil Metabolit Biyosentezi ile İlişki Genler

3.1.7.2.1.3.1 *Chalcone synthase J-like*

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 6 kat azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,3 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 3,5 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.31 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların chalcone synthase J-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Kalkon sentaz (*CHS*), bitki büyümesi, gelişimi ve abiyotik stres toleransının düzenlenmesinde rol oynayan flavonoid biyosentetik yolunun önemli bir hız sınırlayıcı enzimidir (Hou ve ark., 2022). Flavonoidler, karasal bitkilerde yaygın olarak sentezlenen ikincil metabolitler olan bir tür fenolik bileşiktir (Hernández ve ark., 2009; Shen ve ark., 2022). Flavonoidler, bitki büyümesinde, gelişiminde, çevresel adaptasyonda, biyotik veya abiyotik streslere yanıtta önemli işlevler görür (Petrussa ve ark., 2013). Flavonoidler, olumsuz ortamlarda bitkiler tarafından üretilen ROS'u temizlemek için SOD ve CAT aktiviteleri gibi antioksidan enzim aktivasyonlarını ve buna bağlı olarak bitki stres toleransını artırabilmektedir (Wang ve ark., 2021). Ek olarak, *CHS* gen ailesi üyelerinin ifadesi dokuya özgüdür ve farklı büyüme aşamalarındaki ifade düzeyleri de farklılık göstermektedir (Sepiol ve Dhaubhadel, 2017; Anguraj Vadivel ve ark., 2018).

Önceki araştırmalar, flavonoidlerin abiyotik stres altında bitkiler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerini temizleyebileceğini ve böylece bitki stres toleransını

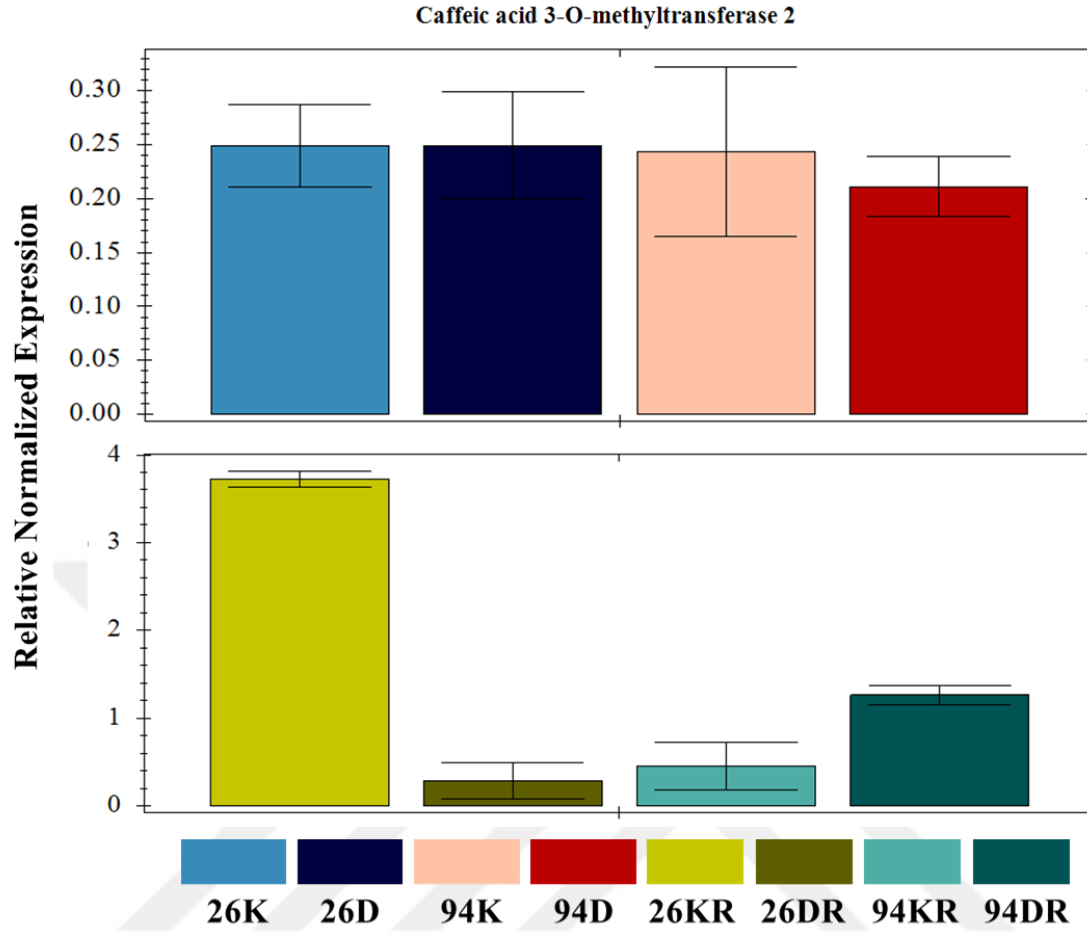
artırabileceğini göstermiştir (Ma ve ark., 2014; Naing ve Kim, 2021). Tütünde domates SLF3HL'nin aşırı ekspresyonunun düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık, tuz ve oksidatif strese karşı daha güçlü tolerans, daha yüksek flavonoid içeriği ve vahşi tiptekilerden daha düşük MDA içeriği sağladığı bildirilmiştir (Meng ve ark., 2015). Pirinç (*Oryza sativa*) genomundaki *OsCHS* genlerinin yalnızca büyüme ve gelişmede değil, aynı zamanda çeşitli çevresel streslere karşı da önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Çalışma sonuçları *OsCHS* genlerinin susuzlaştırma (DEH) ve yeniden sulandırma (REH) altındaki pirinç fide sürgünlerinde dinamik gen ifadesi kalıplarına sahip olduğunu göstermiştir. *OsCHS15*'in kontrol grubuna göre susuzlaştırma (DEH) grubunda 30 kat arttığı, buna karşın *OsCHS14* ve *OsCHS27*'nin DEH ve REH gruplarında keskin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. *OsCHS10*'nun kontrole kıyasla DEH ve REH gruplarında hafifçe yükseldiği, *OsCHS26*'nın ise DEH grubunda 2 kat azalmış bir ifade gösterdiği bildirilmiştir. *OsCHS21* gen ifadesi için de DEH grubunda az artış gözlemlenirken REH grubunda azalma olduğu bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2023). Yapılan bir başka çalışmada Çin kirazı (*Prunus avium* L.) *CpCHS1*'in aşırı ekspresyonunun kuraklık stresi altındaki transgenik tütün tohumlarında çimlenme sıklığını iyileştirdiği, *CpCHS1*'in aşırı ekspresyonunun SOD, POD, Pro ve CAT aktivitelerini artırarak fidelerin kuraklık stres toleransını artırdığı bildirilmiştir (Hou ve ark., 2022). Turunçgillerde, *CHS*'lerin metil jasmonat (MeJA) tarafından artan transkripsiyonunun flavonoid artışına yol açtığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2018). Son zamanlarda yapılan bir çalışma *CHS*'nin antrakinon biyosentezine katılımı *Senna tora*'da bildirilmiştir ve daha ileri analizler bu otta türlere özgü *CHS*'lerin ifade edildiğini göstermiştir (Kang ve ark., 2020). Kuraklığın *CHS* gen ifadesi üzerindeki etkileri nin araştırıldığı bir başka çalışmada *CHS* gen ifadesinin acı biberde (*Capsicum annuum* L.) önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Rodríguez-Calzada ve ark., 2019). Ek olarak, proteomik veriler, kuraklık stresi altında çay bitkilerinde (*Camellia sinensis* L.) biriken flavonoidlerle birlikte *CHS*'lerin aşağı düzenlendiğini göstermiştir (Gu ve ark., 2020). *Coelogyne ovalis*'te yapılan başka bir çalışmada *CoCHS* geninin farklı abiyotik stresler altında yukarı düzenlendiği ve antosiyanin birikimiyle pozitif korelasyon gösterdiğini tespit edilmiştir (Singh ve Kumaria, 2020). Tütünde domates SLF3HL'nin aşırı ekspresyonunun düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık, tuz ve oksidatif strese karşı daha güçlü tolerans, daha yüksek flavonoid içeriği ve vahşi tiptekilerden daha düşük MDA içeriği sağladığı bildirilmiştir (Meng ve ark., 2015).

Brassica rapa'da yapılan bir başka çalışmada da *BrCHS2* ve *BrCHS8* gen ifadesinin metil jasmonat, tuz veya kuraklık stresi altında arttığı tespit edilmiştir (Xie ve ark., 2025).

Elde ettiğimiz validasyon sonuçlarına göre hem kuraklık stresi altında hem de stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında her iki zeytin çeşidi için de ilgili genin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Özellikle bu azalma, toleranslı çeşitte hassas çeşide kıyasla daha belirgin olmuştur. Bu durum *CHS* gen ifadesinin dokuya özgü olarak farklı büyüme aşamalarında farklı düzenlendiği düşünüldüğünde zeytin bitki çeşitlerinin kuraklık stresine karşı geliştirdiği tolerans mekanizmasında *chalcone synthase J-like* geninin önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca iyileşme grupları kuraklık stres gruplarıyla karşılaştırıldığında her iki çeşit için de daha yüksek gen ifade profili gösterdiği görülmektedir. Bu durum literatür genelinde irdelenince ilgili gen ekspresyonunun kuraklık stres yanıtında daha yavaş etki gösterdiğini de düşündürmektedir.

3.1.7.2.1.3.2 Caffeic acid 3-O-methyltransferase 2

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık tespit edilmezken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 19 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2,5 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.32).



Şekil 3.32 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların caffeic acid 3-O-methyltransferase 2 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Kafeik asit (3,4-dihidroksisinnamik asit; CA) eşitli bitki türlerinde doğal olarak bulunan bir sinamik asittir. Bitki fizyolojisi ve stres toleransı mekanizmalarında aktif olarak yer alan CA esas olarak bitkiler tarafından lignin sentezi için kullanılmaktadır. CA hücre duvar kalınlaşması, bitkide iyon toksisitesinin azaltılması, antioksidan enzim düzenlenmesi ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin temizlenmesi, sodyum ve ağır metal stresine karşı bitki stres toleransı sağlanması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan fenoliklerin üretilmesine yardımcı olmaktadır (Zafar-ul-Hye ve ark.,2021; Mughal ve ark., 2024). Bu mekanizma O-metiltransferaz tarafından katalize edilen kafeik asidin metilasyonu yoluyla ferulik asit üretimini içermektedir (Riaz ve ark., 2019).

Kafeik asit ve türevlerinin, patojen saldırıları, düşük ve yüksek sıcaklık stresi, UV ışığı, kuraklık, ağır metal stresi ve tuzluluk stresi dahil olmak üzere bitki biyotik ve abiyotik stres toleransına dahil olduğu açıkça bilinmektedir (Douglas, 1996; Martinez, 2012). Kuraklık stresi, bitki kafeik asit genlerinde ve ilgili metabolik yollarda önemli değişikliklere neden olmaktadır. Çalışmalar, kafeik asidin fizyolojik süreçleri düzenleyerek ve antioksidan savunma mekanizmalarını geliştirerek kuraklık stresini hafifletmede önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Mughal ve ark., 2024).

Yapılan bir çalışmada kuraklık koşulları altında mısır (*Zea mays*) yapraklarında, yükselmiş enzimatik aktivite ve sinamat 4-hidroksilaz ile p-kumarat 3-hidroksilaz kodlayan genlerin ifadesiyle ilişkili olarak artan kafeik asit içeriği tespit edilmiştir (Kolo ve ark., 2022). Mercimekte (*Lens culinaris*) kafeik asidin ACC-deaminaz üreten rizobakterilerle birlikte uygulanmasının, kuraklık stresi altında bitki büyümesini, verimi ve stres toleransını önemli ölçüde iyileştirdiği belirtilmiştir (Zafar-ul-Hye ve ark., 2021). Mısır (*Zea mays*) ile yapılan bir başka çalışmada kuraklık stres uygulamasının p- kafeik ve ferulik asit içeriğinin artmasına neden olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca yazarlar fenolik asitleri içeren metabolik yolların kuraklık tepkilerinin düzenlenmesine katkıda bulunarak bu düzenlemeyi aydınlatmak için yapılacak daha fazla çalışmanın kuraklığa karşı toleransı iyileştirilmiş yeni mısır çeşitlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabileceğini önermişlerdir (Kolo ve ark., 2022).

Soya fasulyesinde (*Glycine max*) ekzojen olarak uygulanan kafeik asidin kök büyümesini engellediği, PAL aktivitesi ve H_2O_2 içeriğini azalttığı ve hücre duvarına bağlı çözünür POD aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada ek olarak kafeik aside maruz kalan köklerde hücre duvarı sertleşmesi ve kök büyümesini engelleyen lignin monomerlerinin (p-hidroksifenil (H), guaiasil (G) ve siringil (S) monomerleri ve toplam lignin (H + G + S) arttığı tespit edilmiştir (Bubna ve ark., 2011). Soya fasulyesi (*Glycine max*) kök nodülü ile yapılan bir başka çalışmada tuz stresi altında kafeik asit tedavisinin, süperoksit içeriğinde azalmaya neden olurken hücre canlılığında ve SOD aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Yazarlar CA'nın, muhtemelen tuz stresi sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini düzenleyen sinyaller yoluyla soya fasulyesinin tuz stres toleransını iyileştirdiğini öne sürmüşlerdir (Klein ve ark., 2013).

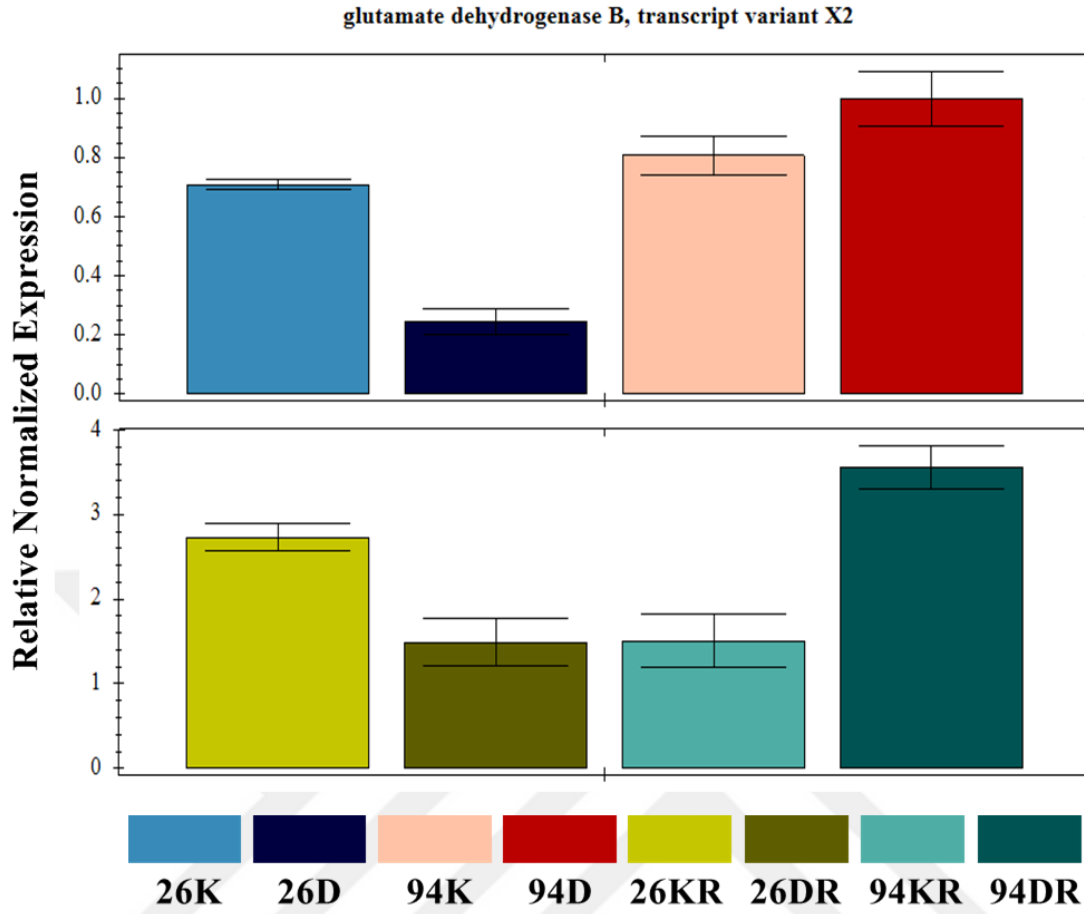
Rize mandalinası (*Citrus unshiu*) ile yapılan bir başka çalışmada kuraklık stresi altındaki bitkilerde kafeik asit düzeylerinin önemli ölçüde artarak bitkide kök ve sürgün büyümesini iyileştirdiği bildirilmiştir (Malik ve ark., 2015). İki farklı çeşit patates bitkisi (*Solanum tuberosum*) ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada da kafeik asitin kuraklık stresi altındaki bitkilerde iyi sulanan bitkilere göre daha yüksek seviyelerde tespit edildiği ve bu durumun ROS konsantrasyonunu azaltılarak daha fazla mitokondriyal aktivite ve kloroplast savunması sağlanmasında rol oynadığı vurgulanmıştır (Vasquez-Robinet ve ark., 2008).

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz validasyon sonuçlarına göre kuraklık stresine toleranslı çeşit Memecik'in iyileşme sürecinde *OeCOMT2* gen ekspresyonunu dengeli bir şekilde düzenleyebildiği gözlemlenirken kuraklık stresine hassas Gemlik çeşidinin ise ilgili genin ekspresyonunu kuraklık grubunda tamamen baskılandığı tespit edilmiştir. Bu durum, hassas bitkilerin stres sonrası adaptasyon yeteneğinin zayıf olduğunu ve dengesiz bir toparlanma süreci yaşadığını göstermektedir. Ek olarak dayanıklı bitkilerin iyileşme sürecinde daha kararlı bir metabolik yanıt verdiği, hassas bitkilerin ise stres sonrası aşırı tepki vererek dengesiz bir adaptasyon süreci yaşadığını göstermektedir. *OeCOMT2*'nin baskılanması, hücre duvarı modifikasyonları ve su iletkenliği açısından dengesiz bir yanıt anlamına gelebilmektedir.

3.1.7.2.1.4 Azot Metabolizması ile İlişki Genler

3.1.7.2.1.4.1 *Glutamate dehydrogenase B, transcript variant X2*

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2,5 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.33).



Şekil 3.33 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların glutamate dehydrogenase B, transcript variant X2 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Glutamat dehidrogenaz, stres koşulları altında bitkide yüksek hücre içi amonyanın detoksifikasyonunda ve prolin sentezi için glutamat üretiminde rol oynayan önemli bir enzim olarak görev yapmaktadır (Zhou ve ark., 2015). Abiyotik stres, proteaz aktivitesini indükleyerek oksidatif olarak hasar görmüş proteinlerin parçalanmasına neden olan ve mitokondride hiperamonyağa neden olan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna yol açmaktadır (Sweetlove ve ark., 2001; Skopelitis ve ark., 2006). Stres koşulları altında, amonyak etkili bir şekilde uzaklaştırılmazsa, artan proteolitik aktivite hücre içi hiperamonyağa ve toksisiteye neden olmaktadır (Terce'-Laforgue ve ark., 2013). Hiperamonyanın bitki hücreleri için toksik olması nedeniyle amonyumu asimile etme kapasitesi bitkilerde stresin etkisini azaltmak için önemli bir unsurdur (Britto ve Kronzucker 2002, Thu Hoai ve ark., 2003). *GDH*, glutamat oluşturmak için 2-oksoglutarat'ın aminasyonunu katalize ederek, karbon ve nitrojen asimilasyon yolları

arasında kritik bir rol oynayan prolin sentezini yönlendirir (Skopelitis ve ark., 2006; Орлова, 2022). Prolin birikimi, abiyotik strese maruz kalan bitkilerde kritik bir koruyucu rol oynayarak, stres yanıtında ozmotik potansiyelleri ayarlayarak hücre altı yapıları hasardan koruma rolüne sahiptir (Tercé-laforge ve ark., 2015).

Bitkilerde *GDH* genlerinin aşırı ekspresyonunun kuraklık toleransını arttırdığı bilinmektedir. Pirinç bitkisinde (*Oryza sativa* L.), *Aspergillus candidus*'tan bir fungal NADP(H)-bağımlı glutamat dehidrogenaz geninin (*AcGDH*) aşırı ekspresyonunun amonyum toksisitesini hafiflettiği, fotorespirasyonu baskılayarak kuraklık toleransı ile tane verimini arttırdığı bildirilmiştir (Yan ve ark, 2021). Tütün (*Nicotiana tabacum* cv. 'SR1') ve mısır bitkisinde (*Zea mays*) yapılan iki ayrı çalışmada da, *E.coli*'nin glutamat dehidrogenaz geninin (*gdhA*) aşırı ekspresyonunun kuraklık toleransını iyileştirdiği tespit edilmiştir (Mungur 2002; Mungur ve ark., 2006; Lightfoot ve ark., 2007). Benzer şekilde pirinç bitkisinde (*Oryza sativa* L.), *Magnaporthe grisea*'nin NADP(H)-GDH geninin (*MgGDH*) aşırı ekspresyonunun aminasyon aktivitesini arttırarak hücre içi toksik amonyum miktarını azalttığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada ayrıca, *MgGDH*'nin heterolog ekspresyonunun dehidratasyon stres koşulları altında transgenik bitkilerde prolin ve çözünür şeker içeriğini arttırarak dehidratasyon stresine karşı toleransı iyileştirdiği belirtilmiştir (Zhou ve ark., 2015). Yapılan bir başka çalışmada da buğday bitkilerinin kuraklığa karşı iyileşmiş toleransının, düşük ve yüksek ozmotik stres altında artan GDH aktivitelerinden kaynaklanan artan amonyum asimilasyonu ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2009).

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, kuraklığa hassas Gemlik çeşitinde hem kuraklık hem de kuraklık sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında ilgili genin ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Kuraklığa toleranslı Memecik çeşitinde ise tam tersi bir durum söz konusudur; ilgili genin hem kuraklık stres uygulaması yapılan gruplarda hem de stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında fark edilir bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu durum literatür ile de karşılaştırıldığı zaman oldukça tutarlıdır. Sonuçlar, zeytin bitkisinde gelişen kuraklık stres toleransının, GDH gen ekspresyonundaki artışa bağlı olarak gelişen aminasyon aktivitesi veya prolin birikiminden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

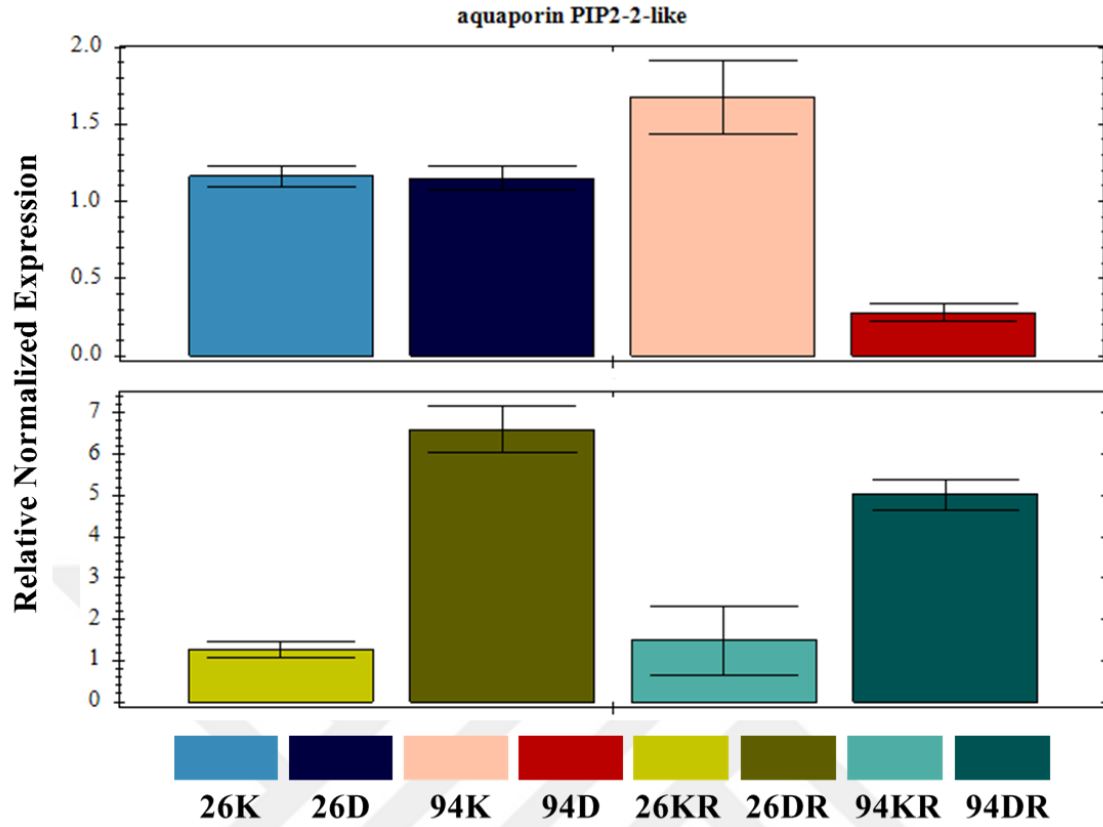
3.1.7.2.2 Hücresel Taşınım ve Sinyal İletimi ile İlişki Genler

Bu grupta su ve iyon taşınımıyla beraber hormon regülasyonu ve sinyal iletiminde rol oynayan; *aquaporin PIP2-2-like* ve *aquaporin TIP1-1-like* (Su taşınımı), *zinc transporter 5-like* ve *copper-transporting ATPase HMA4-like* (İyon taşınımı), *glutamate receptor*, *abscisic acid receptor PYL4-like* ve *ethylene-responsive transcription factor 5-like* (Sinyal iletimi ve hormon regülasyonu) genlerinin kuraklık stresi ile ilişkisi, çeşitler ve deney grupları açısından qRT-PCR ile detaylı olarak analiz edilmiştir.

3.1.7.2.2.1 Su taşınımı ile İlişki Genler

3.1.7.2.2.1.1 *Aquaporin PIP2-2-like*

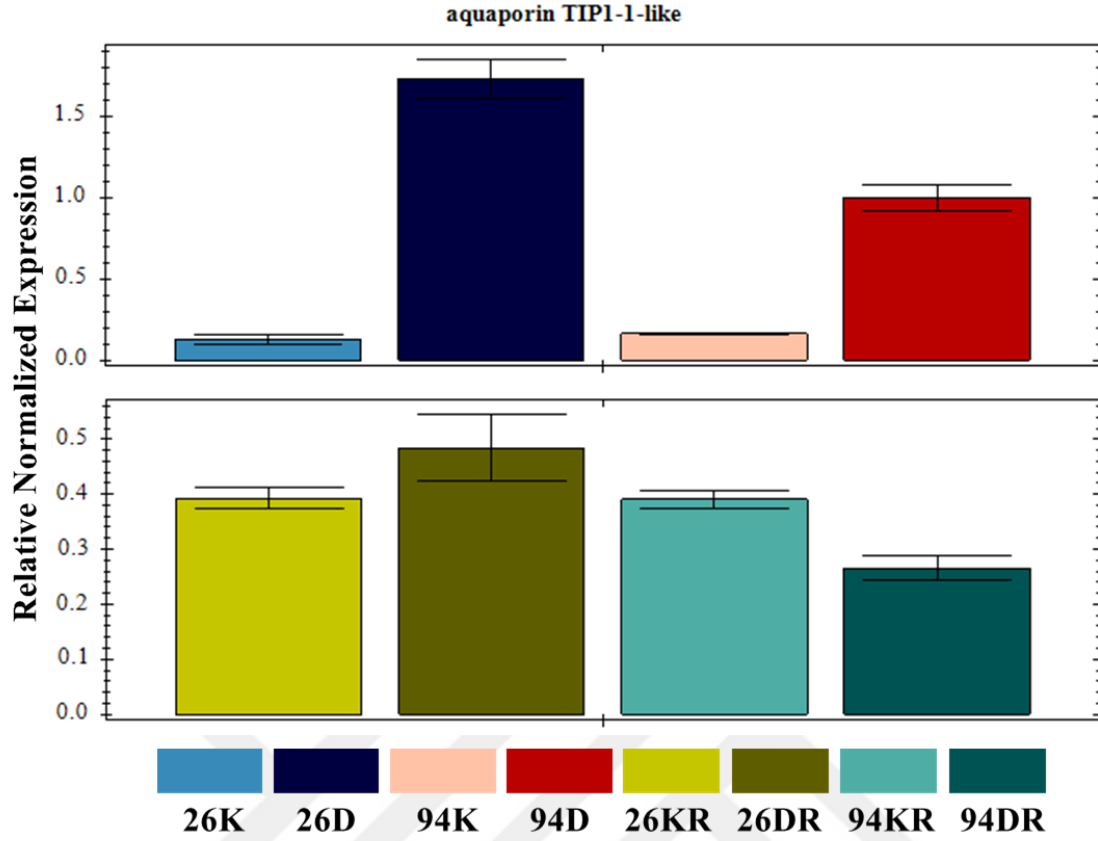
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık tespit edilmezken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 7 kat azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 6 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 3,5 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.34).



Şekil 3.34 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların aquaporin PIP2-2-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

3.1.7.2.2.1.2 Aquaporin TIP1-1-like

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 17 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 10 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.35).



Şekil 3.35 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların aquaporin TIP1-1-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Aquaporinler (AQP), kuraklık ve normal koşullar altında bitkilerin hücre sel su dengesinin ve ozmotik homeostazisinin korunmasında kritik rol oynayan membran kanallarıdır (Patel ve Mishra, 2021). AQP'ler bitkilerdeki su geçişinin %75-95'inden sorumludur (Henzler ve ark., 2004). Çoğu bitki türünde, su alımı ve köklerdeki hücre içi su akışı büyük ölçüde plazma membranı içsel proteinleri (PIP) ve tonoplast içsel proteinleri (TIP) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu proteinler sırasıyla bitki hücrelerinin plazma membranında ve tonoplastında en fazla bulunan aquaporinlerdir (Boursiac ve ark., 2008). Karşılaştırmalı transkriptom çalışmaları, kuraklık stresine yanıt olarak farklı aquaporin homologlarının diferansiyel ekspresyonunu ortaya çıkarmış ve bu genlerin stres yanıtlarında kesin roller oynadığını göstermiştir (Yamaguchi-Shinozaki ve ark., 1992). Ayrıca, kuraklık stresi altında bitkilerde farklı PIP ve TIP homologlarının hem yukarı hem de aşağı regüle edildiği, bunun da aquaporinlerin su eksikliği koşullarında su dengesinin korunmasındaki karmaşık rollerinden kaynaklandığı belirlenmiştir (Molina ve ark.,

2008). Kuraklık stresine yanıt olarak aquaporin genlerinin düzenlenmesi, bitki türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir (Alexandersson ve ark., 2010).

2005 yılında yapılan bir çalışmada Alexandersson ve arkadaşları kuraklık stresine yanıt olarak *Arabidopsis*'teki 35 aquaporin homologunun ekspresyon profillerini incelemişlerdir. Çalışmalarında, çoğu *PIP* ve bazı *TIP* genlerinin yüksek düzeyde ifade edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, fazla anlatım yapan *AtPIP1;4* ve *AtPIP2;5* dışındaki tüm *PIP* genlerinin yapraklarda kuraklık stresine tepki olarak aşağı regüle edildiğini, ancak *AtPIP2;6*'nın yapısal olarak ifade edilerek kuraklık stresinden önemli ölçüde etkilenmediğini göstermişlerdir. Bunun yanı sıra, *Arabidopsis* üzerinde yapılan bir başka çalışmada *AtPIP2;5*'in ekspresyonunun, kuraklık ve sıcaklık stresinin kombinasyonuna yanıt olarak yapraklarda önemli ölçüde yukarı regüle edildiği belirtilmiştir (Rizhsky ve ark., 2004). Bu sonuçlarla tutarlı olarak *Arabidopsis*'te yapılan diğer çalışmalar da *PIP*'lerin kuraklık stresine duyarlı olduğunu, çoğunun transkripsiyonel olarak aşağı regüle edildiğinin ve yalnızca birkaç genin yukarı regüle edildiğini göstermektedir (Alexandersson ve ark., 2010; Jang ve ark., 2004).

Pirinçte (*Oryza sativa*) yapılan bir başka çalışmada ise *PIP* genlerinin ekspresyonunun kuraklık stresi altında arttığı ve bunların yukarı regülasyonunun kuraklık toleransı ile pozitif bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Verma, 2019). Zupin ve arkadaşlarının (2017) fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) yaptığı bir çalışmada, kuraklık stresi uygulaması sonrası *PvPIP1;2* ve *PvPIP2;7* genlerinin aşağı regüle edildiği ve bu regülasyonun kuraklığa toleranslı fasulye çeşidinde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Çilek (*Fragaria vesca*) ile yapılan bir başka çalışmada ise farklı şiddetlerdeki kuraklık stresine yanıt olarak *PIP* genlerinin ifadesi incelenmiş ve çoğu *PIP* geninin köklerde aşağı regüle edildiği belirtilmiştir (Šurbanovski ve ark., 2013). Abdelhakam ve arkadaşlarının (2021) ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) ile yaptığı bir başka çalışmada ise ayçiçeği fidelerine kuraklık stresi uygulanması sonrasında *PIP2* gen ekspresyonunun düştüğü tespit edilmiştir. Araştırmacılar, bitkilerin bu mekanizmayı hidrolik iletkenliği azaltmak, terleme yoluyla aşırı su kaybını kontrol etmek ve CO₂ geçirgenliğini azaltarak bitki köklerinden toprağa olası su kaybını önlemek için geliştirdiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, zeytin köklerinde ve dallarında yapılan başka bir çalışma, *PIP2.1* geninin kuraklık stresine yanıt olarak aşağı regüle edildiğini, ancak yeniden sulama yapılan iyileşme gruplarında tekrar yukarı regüle olduğunu göstermektedir (Secchi, 2007). Bu

durumun, sürgün embolizminin modüle edilmesinde bir rol oynadığından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Secchi 2007). Aynı şekilde, zeytin ile yapılan bir başka çalışmada, yeniden sulama yapıldıktan 36 saat sonra *OePIP2.1* geninin ifadesinde artış olduğu bildirilmiş ve bu sonuçlar Perez-Martin ve arkadaşları (2011) tarafından da desteklenmiştir.

Ancak yaprak ve kök hidrolik iletkenliğinin artması nedeniyle bazı bitkilerde hızlı su kaybı gözlenmiş ve bu durum, kuraklık stres koşullarına karşı daha da savunmasız hale gelmelerine yol açmıştır (Afzal ve ark., 2016). Jang ve Ahn (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, *JcPIP1* ve *JcPIP2* aquaporin genlerinin aşırı ekspresyonunun, transgenik *Arabidopsis*'te tuz ve kuraklık toleransını arttırmadığı belirtilmiştir. Benzer şekilde transgenik *Arabidopsis* ile yapılan bir başka çalışmada, *AtPIP1;4* ve *AtPIP2;5* genlerinin aşırı ifadesinin normal koşullar altında hiçbir avantaj sağlamadığı, ancak kuraklık stres koşulları altında bitkinin hızlı su kaybetmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada, *AtPIP1;2* geninin aşırı ekspresyonunun, transgenik tütün bitkilerinin normal koşullarda kontrol bitkilerine kıyasla daha iyi büyümesini sağladığı, ancak muhtemelen stoma düzensizliği nedeniyle kuraklık stresine daha duyarlı hale geldiği bildirilmiştir (Aharon ve ark., 2003). Benzer şekilde, asma (*Vitis vinifera*) yapraklarında yapılan orta dereceli kuraklık stresinin beş *PIP* geninde önemli ölçüde aşağı regülasyonuna yol açtığı, ancak uzun süreli kuraklık stresinde bu genlerin ekspresyon seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (Galmés ve ark., 2007). Belirgin bir şekilde, birçok bitki türü ve hatta aynı türün farklı çeşitleri arasında bile aynı aquaporin homologlarının farklı tepkiler verdiği görülmektedir. Yapılan bir çalışmada asma (*Vitis vinifera*) köklerindeki *VvPIP1;1* geninin, kuraklık stresine yanıt olarak çeşitlere özgü bir şekilde eksprese edildiği ve gözlemlenen hidrolik iletkenlik farklılıklarını yansıttığı da gösterilmiştir (Vandeleur ve ark., 2009). Ayrıca tarlada yetiştirilen pamuk bitkisinin (*Gossypium hirsutum*) normal ve kuraklık stres koşulları altında yapılan transkriptom karşılaştırmasında, iki yüksek derecede homolog gen olan *PIP1;3* ve *PIP1;1*'in yaprak ve köklerde zıt ifade profillerine sahip olduğu belirlenmiştir (Park ve ark., 2012).

Yaptığımız çalışmada, kuraklığa hassas zeytin çeşidindi Gemlik'te kuraklık stres altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık tespit edilmezken, toleranslı Memecik çeşitinde ekspresyon seviyesinin yaklaşık 7 kat azaldığı tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas ve toleranslı her iki çeşitte de stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme

gruplarında ilgili genin ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular, literatürü destekler nitelikte olup, kuraklık stresi altında zeytin bitkisinin *aquaporin PIP2-2-like* gen ekspresyonunu aşağı regüle ederek su kaybını azaltmaya ve suyun kuruyan toprağa geri akışını önlemeye yardımcı olmak için düzenlediği öne sürülebilir. Ayrıca kuraklık stresi sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında hem hassas hem de toleranslı çeşitlerde gen ifadesinin normal seviyelerin üzerine çıkmasının, stres koşulları sonrası bitkinin metabolik süreçlerini normalize ederek eski gen ifadesi seviyelerine dönme çabasıyla ilişkili olduğu düşünülebilir.

Transkriptom çalışmalarında, PIP'lerin kuraklık tepkisindeki rolleri çoğu durumda iyi tanımlanmış olsa da, bazı raporlar özellikle su eksikliği koşullarında TIP'lerin rolüne işaret etmektedir. Pirinçte (*Oryza sativa*) yapılan bir çalışmada *OsTIP1;1* geninin ekspresyonunun kuraklık stresine yanıt olarak köklerde ve sürgünlerde yukarı doğru düzenlendiği tespit edilmiştir (Liu ve ark., 1994). Kuraklık stres koşulları altında narenciye (*Citrus* sp.) bitkilerinde yapılan ayrıntılı transkriptom çalışmaları, tüm *CsTIP*'lerin yapraklarda yukarı doğru düzenlenmektedir (Chaumont ve ark., 2001). Benzer şekilde domates (*Solanum lycopersicum*) ile yapılan bir başka çalışmada, kuraklık stresine duyarlı *SlTIP2;2* gen ifadesinin transgenik domates bitkilerinin hem normal hem de kuraklık stresi koşulları altında arttığı belirlenmiş ve bu durum transgenik domates bitkilerinin transpirasyon hızını düzenleme yeteneğinin kuraklık toleransını artmasına bağlanmıştır (Sade ve ark., 2009).

Yaptığımız çalışmada kuraklığa hassas zeytin çeşidi Gemlik'te kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 17 kat, toleranslı Memecik çeşidinde ise yaklaşık 10 kat artış tespit edilmiştir. Stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında kuraklığa hassas Gemlik çeşidinde ilgili gen ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış tespit edilirken, Memecik çeşidinde yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilmiştir.

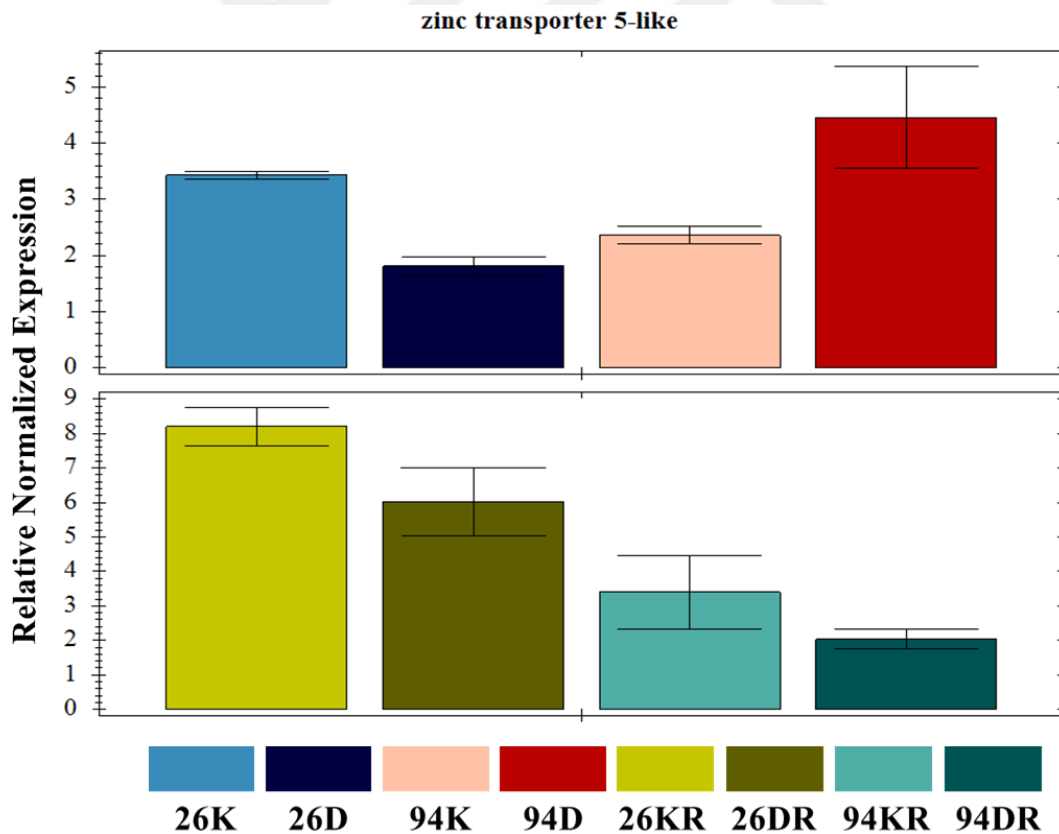
TIP'lerin, bitki hücrelerinin vakuelleri ve sitoplazmaları arasında hızlı su taşınması sağlayarak hücrel su homeostazisinin korunmasında anahtar bir rol oynadığı düşünüldüğünde, kuraklık stresi altında her iki çeşitte de ilgili genin ekspresyonundaki artış literatürü destekler niteliktedir. Bu durum bitkinin kendini strese karşı koruma mekanizması olarak *aquaporin TIP1-1-like* genini regüle ettiğini göstermektedir. Ayrıca kuraklık stresi sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında, kuraklığa hassas Gemlik

çeşidinde ilgili genin ifadesindeki artış düşük de olsa devam ederken toleranslı Memecik çeşidinde ilgili genin ifadesindeki azalma, toleranslı çeşidin stres ve stres sonrası normalleşme süreçlerine daha hızlı adaptasyonunu göstermektedir.

3.1.7.2.2.2 İyon taşınımı ile İlişki Genler

3.1.7.2.2.2.1 Zinc transporter 5-like

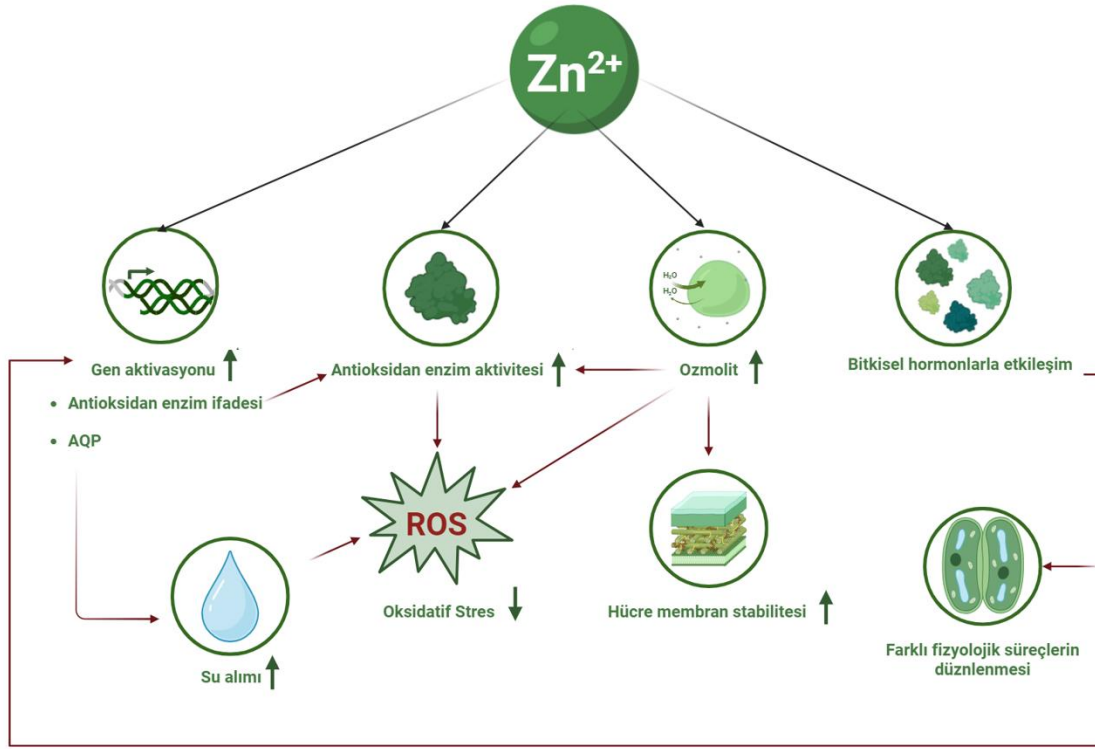
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,3 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,7 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.36).



Şekil 3.36 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların zinc transporter 5-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Bitki büyümesi ve gelişimi için gerekli mikro besinler arasında yer alan çinko (Zn), gen ifadesi ve stres toleransı da dahil olmak üzere birçok metabolik süreçte önemli bir role sahiptir (Raeesi Sadati ve ark., 2021). Zn, bitkilerde çeşitli fizyolojik ve moleküler mekanizmaları düzenleyerek kuraklık stresine karşı toleransta etkin rol oynamaktadır (Marschner, 2011). Kuraklık stresi altında, Zn tohum çimlenmesini (Hassan ve ark., 2020), bitki su ilişkilerini (Fatemi ve ark., 2020), hücre zarı stabilitesini (Ghanepour ve ark., 2015), ozmolit birikimini (Wu ve ark., 2014), stoma düzenlemesini (Karim ve ark., 2012), su kullanım verimliliğini (Sánchez-Blanco vce ark., 2002) ve fotosentezi (Ma ve ark., 2017) iyileştirerek bitkinin strese karşı toleransını arttırmaktadır (Bajji ve ark., 2002; Hera ve ark., 2018).

Kuraklık stresine karşı bitkide yeterli Zn bulunması, zar geçirgenliğini, antioksidan maddelerin aktivitesini, fotosentetik verimliliği korumaktadır (Sharif ve ark., 2018). Ayrıca Zn, bitki hormonlarıyla etkileşime girerek stres proteinlerinin ifadesini arttırmakta ve antioksidan enzimleri uyararak kuraklık stresinin bitki üzerindeki olası olumsuz etkilerini azaltmaktadır (Hassan ve ark., 2020). Lipitler, proteinler ve oksinlerin yardımcı faktörü olarak görev yapan Zn, bitki metabolizmasında birçok biyomolekülün ayrılmaz bir bileşeni olup, özellikle nükleik asit metabolizmasında önemli bir role sahiptir (Mengel ve Kirkby, 1987) (Şekil 3.37).



Şekil 3.37 Çinko (Zn) tarafından tetiklenen kuraklık toleransı mekanizmaları.

Güncel çalışmalar, Zn taşınmasında görev alan proteinleri kodlayan veya optimum Zn taşınması için ifade edilen birçok genin tanımlandığını göstermiştir (Hassan ve ark., 2020). Zn taşınımında önemli rol oynayan protein aileleri arasında ZIP ailesi (Zn, demir-permeaz ailesi/ZRT-, IRT proteinleri), ağır metal ATPaz (HMA) ailesi ve metal toleranslı proteinler (MTP) ailesidir. Bu aileler arasında, ZIP ailesinin üyeleri hücre sitozolüne Zn akışında rol oynarken, HMA ailesi apoplasta Zn çıkışını düzenlemektedir. Son olarak MTP ailesi vakuollerde ve endoplazmik retikulumda Zn depolanmasında görev almaktadır (Gupta ve ark., 2016). Özellikle ZIP (Zn-düzenlenmiş, demir-düzenlenmiş taşıyıcı benzeri protein) gen ailesi çinko (Zn) başta olmak üzere, demir (Fe), manganez (Mn) ve kadmiyum (Cd) dahil olmak üzere çeşitli metal katyonlarını taşıyabilen çok yönlü bir metal taşıyıcı gen ailesi olarak tanımlanmıştır (Zhang ve ark., 2023).

Tan ve arkadaşları (2020) *Oryza sativa* ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında ZINC TRANSPORTER5 (*OsZIP5*) ve ZINC TRANSPORTER9 (*OsZIP9*) olmak üzere iki Zn taşıyıcı genini işlevsel olarak karakterize etmişlerdir. Çalışmalarında her iki genin de taşıyıcı aktivitesine sahip, plazma membranında lokalize proteinleri kodladığını belirlemişlerdir. Ayrıca, *OsZIP5*'in ifade profilinin kökteki yerel Zn durumuna yanıt olarak değiştiğini ve *OsZIP5* ifadesinin azalmasının büyüme geriliği ile ilişkili

olabileceğini rapor etmişlerdir. Raeesi Sadati ve arkadaşları (2021), üç buğday çeşidinde (Heidari, Meihan ve Sysons) abiyotik streslere yanıt veren genlerin (*WRKY1*, *HMA2* ve *ZIP1* genleri dahil) kuraklık stresi altındaki değişimlerini analiz etmişlerdir. Çalışmalarında, kuraklık stres seviyesinin artmasıyla kuraklığa toleranslı çeşitte (Meihan) *ZIP1* geninin ifadesinin arttığını tespit etmişlerdir.

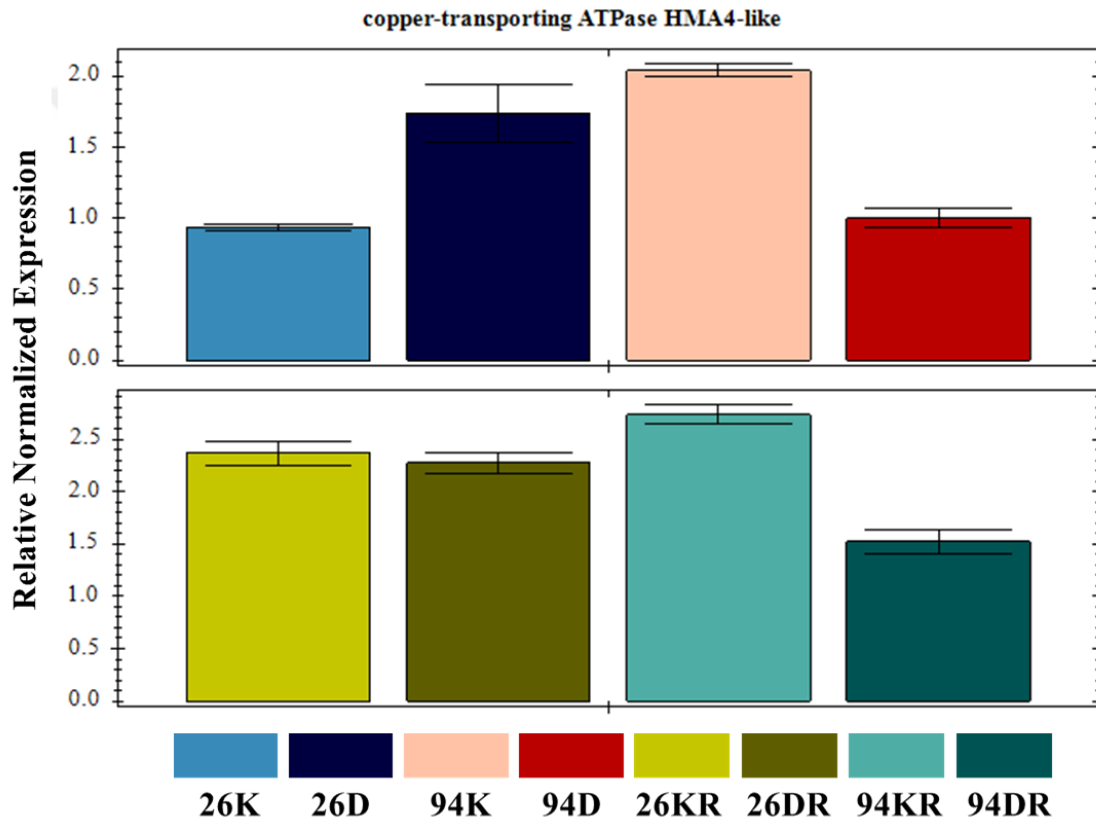
Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar göz önüne alındığında, kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonundaki yaklaşık 2 katlık azalma ve toleranslı (Memecik-94) çeşit için ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 katlık artış Raeesi Sadati ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayı destekler niteliktedir. Özellikle toleranslı zeytin çeşidinde *zinc transporter 5-like* geninin ifade seviyesinin artması, kuraklık stresine karşı bitki metabolizmasında artan çinko tüketimi ile ilişkili bir tolerans mekanizması olarak değerlendirilebilir.

Zn taşıyıcılarının düzenlenmesi, karmaşık sinyal yolları ve transkripsiyon faktörlerini içeren bitkinin kuraklığa karşı adaptif yanıtının bir parçasıdır (Bhargava ve Sawant, 2013). Zn'nin, sürgün-kök hidrolik iletişimini iyileştirdiği, yaprakların iç dokularına su taşınmasını desteklediği, yaprak su potansiyelindeki ve ksilem gerginliğindeki azalmayı önlediği ve bu süreçte AQP'lerin ifadesini arttırarak kuraklık stresi altında su taşınmasını desteklediği bildirilmiştir (Rucińska-Sobkowiak, 2016; Fatemi ve ark., 2020).

Çalışmamızda *aquaporin TIP1-1-like* ve *zinc transporter 5-like* genleri karşılaştırıldığında, özellikle toleranslı çeşitte her iki genin de kuraklık stresi altında hızlı artış, stres sonrası ise hızlı bir azalış gösterdiği tespit edilmiştir. Buna karşın, hassas çeşitte ise bu durum tam tersi şekilde gözlemlenmiş; gen ifadesi kuraklık stresi altında azalmış ve stres sonrası sabit kalmıştır. Bu sonuçlar Zn taşıyıcı genlerin ekspresyonundaki artışın kuraklık stresi sırasında metabolik Zn tüketimini arttırarak, özellikle AQP gibi H₂O taşınmasında kritik rol oynayan daha hızlı aktivasyonunu tetiklediğini göstermektedir. Özellikle toleranslı çeşitte ilgili genlerin kuraklık stres yanıtının hızla aktive olması ve stres sonrası gen ifadesinin dengelenerek azalması, bitkinin adaptif mekanizmalarının etkin çalıştığını düşündürmektedir. Buna karşın hassas çeşitte çinko tüketim mekanizmasının kullanılmaması ve kuraklık stresine yanıt olarak gen ekspresyonunun azalması, bitkinin kuraklığa karşı hassasiyet geliştirmesine neden olabileceğini göstermektedir.

3.1.7.2.2.2 copper-transporting ATPase HMA4-like

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık tespit edilmezken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.38).



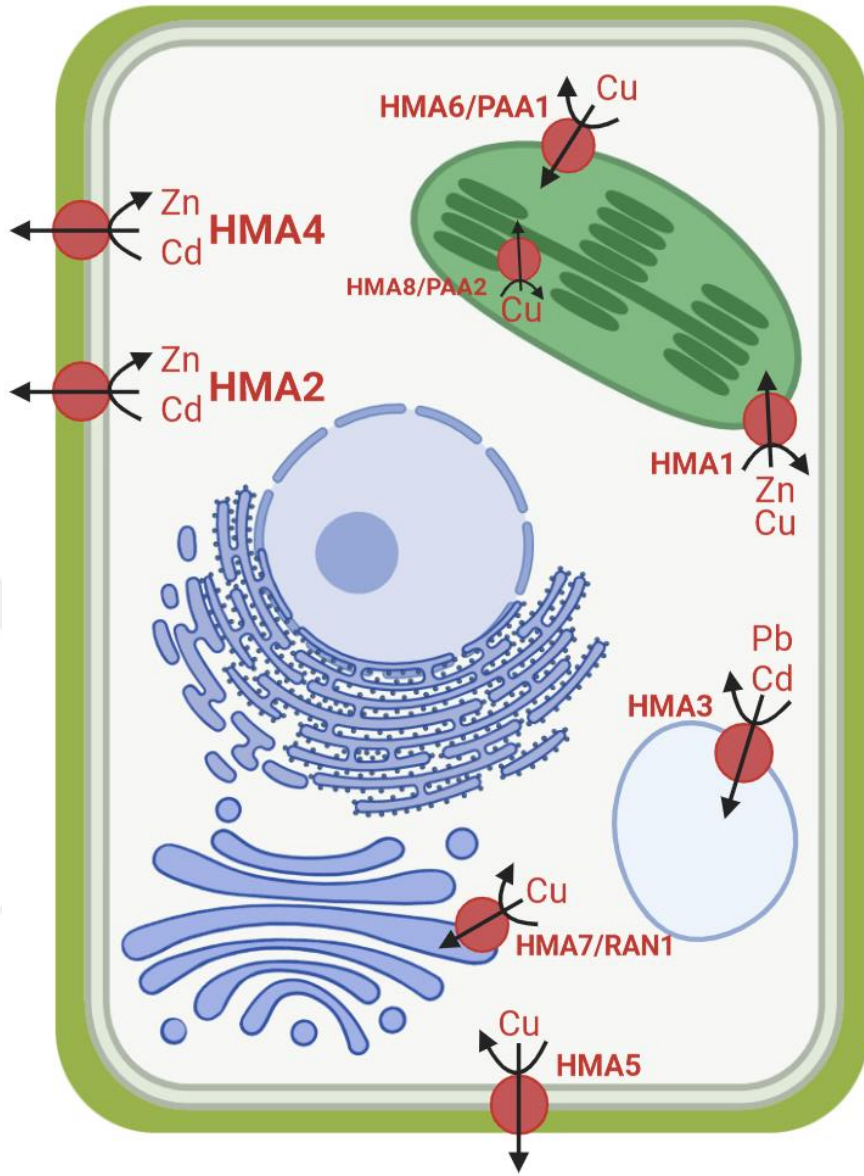
Şekil 3.38 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların copper-transporting ATPase HMA4-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Bakır (Cu), birçok enzim için kofaktör olarak görevi üstlenmesinin yanı sıra fotosentez ve solunum süreçleri, transkripsiyon ve hormon sinyalizasyonu, protein taşınması, hücre duvarında lignin oluşumu ve oksidatif stres tepkileri gibi bir dizi fizyolojik süreç ve moleküler mekanizmalarda yer alan hayati bir elementtir (Yruela, 2005; Guo ve ark., 2024). Ancak optimum fizyolojik konsantrasyonların aşılması durumunda, bakırın

biyomoleküllere oksidatif hasar vermesi, temel mineral besin maddelerinin emilimini bozması, enzim aktivitesini azaltması, membran lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı gibi toksik etkilere yol açabileceği bilinmektedir (Rastgoo ve ark., 2011; Batool ve ark., 2023).

Hücreler için hem vazgeçilmez hem de yüksek konsantrasyonlarda toksik olan Cu'nun bu ikili doğasına karşı koyabilmek için bitkiler, hücrel Cu konsantrasyonunu düzenleyen karmaşık homeostatik mekanizmalar geliştirmişlerdir (Huang ve ark., 2016). Bu süreçte, ağır metal ATPazları (HMA'lar) olarak da bilinen P_{IB} ATPazlar, metal katyon pompaları olarak metal iyonlarının zarlar arası taşınmasını sağlayan temel düzenleyici proteinlerdir (Mills ve ark., 2005; Batool ve ark., 2023; Guo ve ark., 2024). Bu proteinler metal algılama, metal iyon seçiciliği ve pompa aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan yüksek afiniteli metal bağlama bölgeleri içeren N ve C terminal sitoplazmik uzantılara sahiptir (Catty ve ark., 2011).

Şimdiye kadar bitkilerde tespit edilen çeşitli HMA proteinlerinin konumları, taşıdıkları metal içerikleri ve görevleri farklılık göstermektedir. *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada, *AtHMA1*'in kloroplastın iç zarına konumlanarak Cu-ATPaz ve Zn-ATPaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Seigneurin-Berny ve ark., 2006). *Brassica napus* 'ta yapılan bir diğer çalışmada, HMA2 ve HMA4'ün plazma zarında konumlandığı ve Zn ve Cd iyonlarının kökten sürgüne taşınarak yer üstü dokularda detoksifikasyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Wu ve ark., 2015). HMA3'ün ise Cd ve Pb iyonlarını vakuole hapsederek metal detoksifikasyonunda görev alan tonoplastta lokalize bir taşıyıcı olduğu belirlenmiştir (Song ve ark., 2014). Pirinçte (*Oryza sativa*), *OsHMA5* ve *Arabidopsis*'ten *AtHMA5*'in, ksilem aracılığı ile Cu'yu kökten sürgünlere taşıyarak detoksifikasyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (Andrés-Colás ve ark., 2006). *AtHMA7*'nin Cu'yu Golgi membranındaki etilen reseptörlerine ileterek Cu detoksifikasyonunda önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (Baloun ve ark., 2014). *AtHMA6/PAA1*, Cu'yu kloroplast zarı boyunca taşıırken, *AtHMA8/PAA2* ise Cu'yu tilakoid membrandan tilakoid lümenine aktarmaktadır (Abdel-Ghany ve ark., 2005). Bu bulgular, HMA proteinlerinin bitkilerde bakır homeostazının korunmasında merkezi bir rol oynadığını ve bu proteinlerin farklı doku ve organellerde özelleşmiş taşınım mekanizmalarına sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 3.39).



Şekil 3.39 Basitleştirilmiş bir bitki hücresinde ağır metal P1B-ATPazları (HMA) için olası hücre altı konumları.

Bitkilerde Cu detoksifikasyonu, hücresel homeostazın korunması için kritik öneme sahiptir ve bu süreçte HMA'lar büyük rol oynamaktadır. Bakır ATPazlar (Cu-ATPazlar), prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin farklı biyolojik zarları boyunca bakırı taşımak için ATP'den enerji kullanan transmembran proteinlerdir. Hücrelerde, Cu-ATPazlar çözünabilir şaperonlardan bakır iyonlarını alarak hücre dışına taşınmasını veya hücre içi bölmelere yönlendirilmesini sağlayarak bakır homeostazını korur. Ayrıca, Cu-ATPaz'lar, bakırın kloroplastlara, tilakoid lümenine veya salgı yolunun lümenine iletilmesi yoluyla bakıra bağımlı enzimlerin biyosentezinde önemli rol oynar (Migocka, 2015).

PIB ATPaz ailesine ait HMA4 (Ağır Metal ATPaz 4), *Arabidopsis thaliana*'da metal homeostazında merkezi birtaşıyıcı olarak görev yapar. Plazma membranında yer alan HMA4, kökler ve sürgünlerdeki vasküler dokularda ifade edilmektedir (Hussain ve ark., 2004; Verret ve ark., 2004; Siemianowski ve ark., 2014). *AtHMA4*'ün temel görevi, ksilem yüklemesi yoluyla Cu ve Zn iyonlarını kökten sürgüne taşımaktır (Hussain ve ark., 2004; Wong ve ark., 2009; Cun ve ark., 2014). *Arabidopsis thaliana*'da *AtHMA4*'ü aşırı ifade eden hatların sürgünlerinde Zn^{+2} ve Cd^{+2} birikiminde artış tespit edilmiştir. Bu bulgu, *AtHMA4*'ün ksilem aracılığıyla metal taşınmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Verret ve ark., 2004). Yapılan diğer çalışmalar *Arabidopsis halleri* ve *Noccaea caerulescens*'te HMA4'ün Zn ve Cd hiperakümüülasyonu ile hipertoleransında kritik bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur (Hanikenne ve ark., 2008; Craciun ve ark., 2012). *A. thaliana*'da 35S promoter::*AtHMA4* aşırı ekspresyonunun, Zn toleransını ve translokasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Verret ve ark., 2004). Zn ve Cd taşınmasında görev alan *AtHMA4*, bu metallerin toksik seviyelere ulaşmasını önlemek için köklerden uzaklaştırılmasını ve sürgünlere iletilmesini sağlayarak güçlü bir yukarı düzenleme göstermektedir (Hussain ve ark., 2004; Mills ve ark., 2005).

Oryza sativa L. ile yapılan çalışmalarda, *OsHMA4*'ün, Cu taşınmasında darol oynadığı belirlenmiştir. *OsHMA4*'ü, kök vakuollerine hapsederek pirinç danesindeki Cu birikimini sınırlandırmaktadır. Yapılan çalışma göstermektedir ki, *OsHMA4*'ün nakavt edilmesi sonucunda sürgünlerde ve ksilem özsuyundaki Cu konsantrasyonu artmış ancak köklerde ve kök hücre özsuyundaki Cu konsantrasyonu azalmıştır. Ayrıca *OsHMA4* ekspresyonunun Cu eksikliği tarafından baskılandığı belirtilmiştir (Huang ve ark., 2016). Literatürdeki çalışmalar göstermektedir ki PIB ATPaz HMA4 (Ağır Metal ATPaz 4) ile ilgili yapılan araştırmalar Zn ve Cd ağır metalleri ile bu metallerin hücrede oynadıkları rollere odaklanmaktadır. ATPaz HMA4 genel olarak bu metallerle ilişkilendirilirken kuraklık stres yanıtında Bakır (Cu) taşınmasıyla ilişkilendirildiği çalışma bulunmamaktadır.

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, kuraklık stresi altında kuraklığa hassas çeşitte *copper-transporting ATPase HMA4-like* gen ekspresyonunda artış olduğunu göstermektedir. Bu durum ilgili genin hassas çeşit için stres mekanizmasında rol aldığını düşündürmektedir. Kuraklığa hassas çeşitte kuraklık stresi altında elde ettiğimiz validasyon sonuçlarından *copper/zinc superoxide dismutase* ve *copper-transporting*

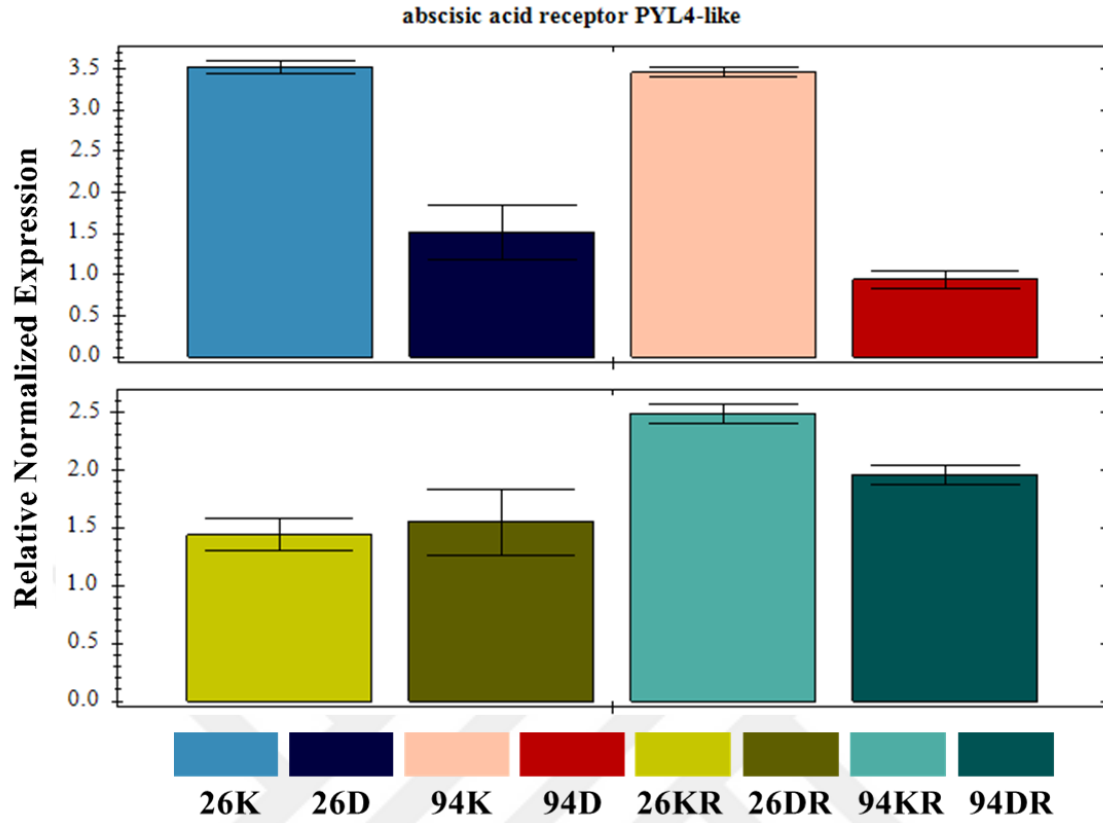
ATPase HMA4-like genlerinin benzer ekspresyon profiline sahip olması, bakırın antioksidan sistemde işlenmesi için ilgili HMA4 geninin rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Öte yandan, kuraklığa toleranslı çeşitte, kuraklık stresine yanıt olarak HMA4-like gen ekspresyonunun azalması, HMA4 proteini ile ilişkili olarak bakır yerine çinko etkileşiminin tolerans mekanizmasında daha etkili bir rol oynadığına işaret etmektedir. Kuraklığa toleranslı çeşitte kuraklık stresine yanıt olarak *copper/zinc superoxide dismutase* ve *zinc transporter 5-like, transcript variant X2* gen ifadesi arttarken *copper-transporting ATPase HMA4-like* gen ifadesinin azaldığı görülmüştür. Bu birbirleriyle ilişkili genler incelendiğinde, kuraklığa toleranslı çeşitte antioksidan etkileşimli ağır metal taşınımının çinko tarafından daha etkili olarak gerçekleştirilirken, bakırın bu mekanizma için daha düşük katkı sağladığı söylenebilir. Benzer şekilde kuraklık sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında da bu ters tepki gözlemlenmiştir. Bu bulgular, hassas ve toleranslı bitki çeşitleri arasında kuraklık toleransının ayırt edici bir karakter olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

3.1.7.2.2.3 Sinyal İletimi ve Hormon Regülasyonu ile İlişki Genler

3.1.7.2.2.3.1 Abscisic acid receptor PYL4-like

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 3,5 kat azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış gözlenirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için yaklaşık 1,4 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.40).



Şekil 3.40 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların abscisic acid receptor PYL4-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Absisik asit (ABA), bitki gelişimi, meyve olgunlaşması ve abiyotik stres tepkisi gibi çeşitli fizyolojik süreçleri düzenlemede rol oynamaktadır (Cutler ve ark., 2010; Pilati ve ark., 2017). Abiyotik stresler sırasında, ABA biyosentezini düzenleyen genlerin değişmiş transkripsiyonu nedeniyle kök dokusundaki ABA içerikleri hızla yükselir (Antoni ve ark., 2013; Ma ve ark., 2018; Yang ve ark., 2019; Vaidya ve ark., 2019; Lozano-Juste ve ark., 2023). Dokuda indüklenen ABA molekülleri, ilgili hücrel taşıyıcılar aracılığıyla çeşitli organlara taşınır, dağıtılır ve sonunda bitkinin farklı abiyotik streslere adaptasyon tepkisini ortaya çıkarır. Abiyotik stresler sırasında ABA sinyalleşmesinin algılanması esas olarak ABA'ya bağlı yol tarafından düzenlenir. ABA çekirdek sinyal yolu, ABA reseptörü PYR (Pyrabactin Resistance) / PYR like (PYR like) / RCAR (Regulatory Components of ABA Receptors) proteinleri, negatif düzenleyici PP2C'ler (protein fosfat 2C) ve pozitif düzenleyici SnRK2 (SNF1 ile ilişkili protein kinaz 2) olmak üzere üç ana bileşeni içermektedir (Cutler ve ark., 2010; Park ve ark., 2009; Rodriguez ve ark., 2019). Bunlardan abisik asit reseptörleri (ABR- ABA responsive element binding factors) kritik

çekirdek bileşenler olarak işlev görmektedir. Ozmotik stres koşulları altında ABA hızla birikmektedir. ABR'ler (PYR/PYL proteinleri) ABA moleküllerine bağlanarak indüklenir ve böylece ABA sinyallemesinin temel baskılayıcıları olan PP2C'leri inhibe eder (Rubio ve ark., 2009). Bu durum SnRK2 ailesinin kinaz proteinleri üzerindeki PP2C aktivitelerinin inhibisyonunu ortadan kaldırır (Cutler ve ark., 2010). Bu durum ABA yokluğunda PP2C'lere bağlanan SnRK2'lerin serbest kalmasına ve ardından aktive olmasına neden olur (Zhang ve ark., 2022; Lozano-Juste ve ark., 2023). SnRK2 ailesi üyelerinin aktivasyonu, bitki kuraklık toleransında önemli olan membran kanallarını düzenlemekte, transkripsiyon faktörleri (TF') ve stres savunma genlerinin transkripsiyonunu arttırmaktadır (Cutler ve ark., 2010; Antoni ve ark., 2013).

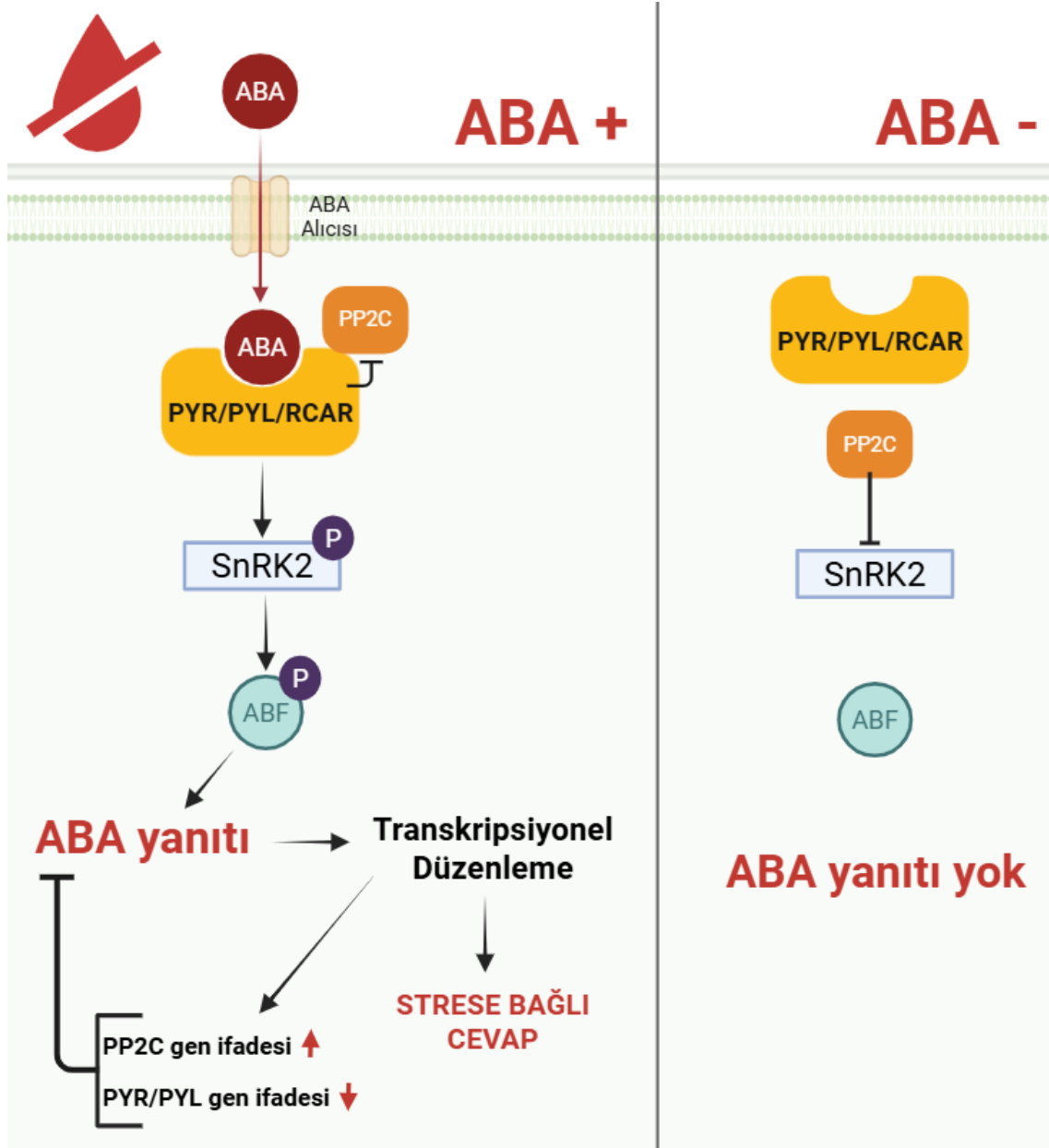
PYL ailesi üyeleri bitki büyümesini ve ozmotik stres tepkilerini kapsamlı bir şekilde düzenleyerek kuraklık stresine karşı bitki adaptasyonunu sağlamak gibi önemli rollere sahiptir. Yapılan çalışmalar *Arabidopsis* PYL'lerinin (*PYL1*, *PYL2*, *PYL3*, *PYL4*, *PYL5*, *PYL7*, *PYL8* ve *PYL9*) aşırı ekspresyonunun *Arabidopsis* bitkilerinde gelişmiş kuraklık toleransı kazandırdığını bildirmektedir. (Pizzio ve ark., 2013; Santiago ve ark., 2009; Lee ve ark., 2013; Chen ve ark., 2017). *Arabidopsis* PYL proteinleri genel olarak benzer görevler üstlenmesine rağmen bazı PYL proteinlerinin benzersiz özellikleri bulunduğu da bilinmektedir (Park ark., 2009). Örneğin *PYL8*, MYB77 proteiniyle etkileşime girerek oksin duyarlı genlerin ekspresyonunu arttırmakta ve *Arabidopsis* kök büyümesini teşvik etmektedir (Zhao ark., 2014). Bitki kuraklık toleransını artırmaya ek olarak *Arabidopsis* *PYL9*, ABA ile uyarılan yaprak yaşlanmasını teşvik etmektedir (Zhao ark., 2016). Buğday (*Triticum aestivum*) ile yapılan çalışmalar da benzer şekilde *TaPYL4* gen ifadesinin yukarı düzenlenmesinin bitkide stoma iletkenliğini düzenleyerek fotosentetik aktiviteyi arttırdığı, ozmolit birikimini teşvik ettiği ve bitkiye geliştirilmiş kuraklık toleransı kazandırdığı gösterilmektedir (Mega ark., 2019; Zhang ve ark., 2022). Benzer başka çalışmalarda pirinç (*Oryza sativa* ssp. *indica* cv. Nagina 22) *PYL3/9/10* ve pamuk (*Gossypium hirsutum*) *PYL10/12/26* genlerinin aşırı ifadesinin, tohum çimlenmesi ve erken fide aşamalarındaki ABA duyarlılığını arttırarak bitkilerde abiyotik streslere karşı gelişen toleransı geliştirdiğini göstermektedir (Chen ve ark., 2017; Verma ve ark., 2019). Benzer şekilde, pirinç (*Oryza sativa*) *OsPYL6* ve *OsPYL10* gibi ABA reseptör ailesindeki diğer birkaç üyenin, ABA'ya bağlı yollarda stres tepkisi ile ilişkili genlerin bitki kuraklık toleransını artırmada kritik roller oynadığı belirtilmiştir (Liu ve ark., 2019; Verma ve ark.,

2019; Santosh Kumar ve ark., 2021). Bir başka çalışmada mısır (*Zea mays*) *PYL3/9/10/13* ve *PYL8/9/12*'nin artan prolin birikimi yoluyla bitkide kuraklık toleransını arttırdığı bildirilmiştir (He ve ark., 2018). Patates (*Solanum tuberosum*) ile yapılan bir başka çalışma *StPYL8* benzeri geni taşıyan transgenik tütün (*Nicotiana tabacum*), kuraklık koşullarında yabani tip bitkilere kıyasla daha düşük malondialdehit (MDA) seviyesi, daha yüksek prolin birikimi ve antioksidan enzim aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Dahası, kuraklık stresi altında *StPYL8* benzeri geni taşıyan transgenik tütün bitkilerinde strese duyarlı genlerin (*NtRD29A*, *NtLEA5*, *NtP5CS*, *NtPOD*, *NtSOD* ve *NtCAT*) ifadesinin yukarı düzenlendiği de ayrıca tespit edilmiştir (Yao ve ark., 2024).

Literatürdeki çalışmalar, özellikle de *Arabidopsis AtPYL* genlerinin aşırı ekspresyonunun, ABA yanıtını ve transgenik bitkilerde kuraklık stres toleransını arttırdığını göstermiştir. Ancak, *Arabidopsis*'te ekzojen ABA ile tedavisinden sonra bazı *AtPYL*'lerin (*PYL1*, *PYL4*, *PYL5*, *PYL6* ve *PYL8*) aşağı ekspresyon gösterdiği de tespit edilmiştir (Santiago ve ark., 2009; Merlot ve ark., 2001). Bir başka çalışmada pamuk (*Gossypium hirsutum*) *GhPYL* genlerini taşıyan transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde *GhPYL1/6/8/10/12/26* gen ekspresyonlarının kuraklık stresi altında azaldığı bildirilmiştir. Dahası *GhPYL10*, *GhPYL12* ve *GhPYL26*'yı aşırı ifade eden transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin tohum çimlenmesi ve erken fide büyümesi sırasında da ABA-aşırı duyarlılığı gösterdiği belirtilmiştir (Chen ve ark., 2017). Benzer başka çalışmada da domates (*Solanum lycopersicum*) monomerik *SlPYL*'lerinin *Arabidopsis*'te aşırı ekspresyonunun, ABA kaynaklı fide büyümesinin inhibisyonunu arttırdığı belirtilmiştir (González-Guzmán ve ark., 2014). Bu çelişkili ekspresyon kalıpları, negatif geri beslemeli düzenleyici mekanizmanın tanıtılmasıyla açıklanmaktadır (Santiago ve ark., 2009; Merlot ve ark., 2001). Normal koşullar altında, ABA sinyal yolu PP2C'lerin koordineli eylemiyle baskılanmaktadır. Kuraklık stresi altında ABA seviyesi, aşağı akış transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu da dahil olmak üzere ABA yanıtını aktive etmek için artmaktadır. ABA seviyelerindeki artış, PYR/PYL proteinlerinin ABA moleküllerine bağlanarak ABA sinyallemesinin temel baskılayıcıları olan PP2C'lerin inhibe edilmesine sebep olmaktadır (Rubio ve ark., 2009). PP2C'ler ABA sinyallemesinin negatif düzenleyicileri olsa da, ABA tarafından negatif geri beslemeli düzenleyici bir mekanizma ile güçlü bir şekilde indüklenmektedirler (Merlot ve ark., 2001). PYR/PYL proteinlerinin PP2C aktivitesinin inhibitörleri olarak hareket ettiği göz önüne alındığında, PYR/PYL

genlerinin gözlemlenen ABA aracılı aşağı regülasyonu, PP2C'ler için açıklanan negatif geri beslemeli düzenleyici mekanizmaya uymaktadır. Böylece, ABA'ya bağlı PYR/PYL aracılı PP2C'lerin inaktivasyonu ile elde edilen ilk ABA yanıtı (Şekil 3.41), daha sonra hem ABA aracılı PP2C genlerinin yukarı regülasyonunu hem de PYR/PYL genleri tarafından kodlanan PP2C inhibitörlerinin aşağı regülasyonunu koordineli olarak zayıflatmaktadır. ABA sinyalleme mekanizmasının bu şekilde yeniden ayarlanması, ABA yanıtını düzenlemek için dinamik bir mekanizma sağlamaktadır (Santiago ve ark., 2009).





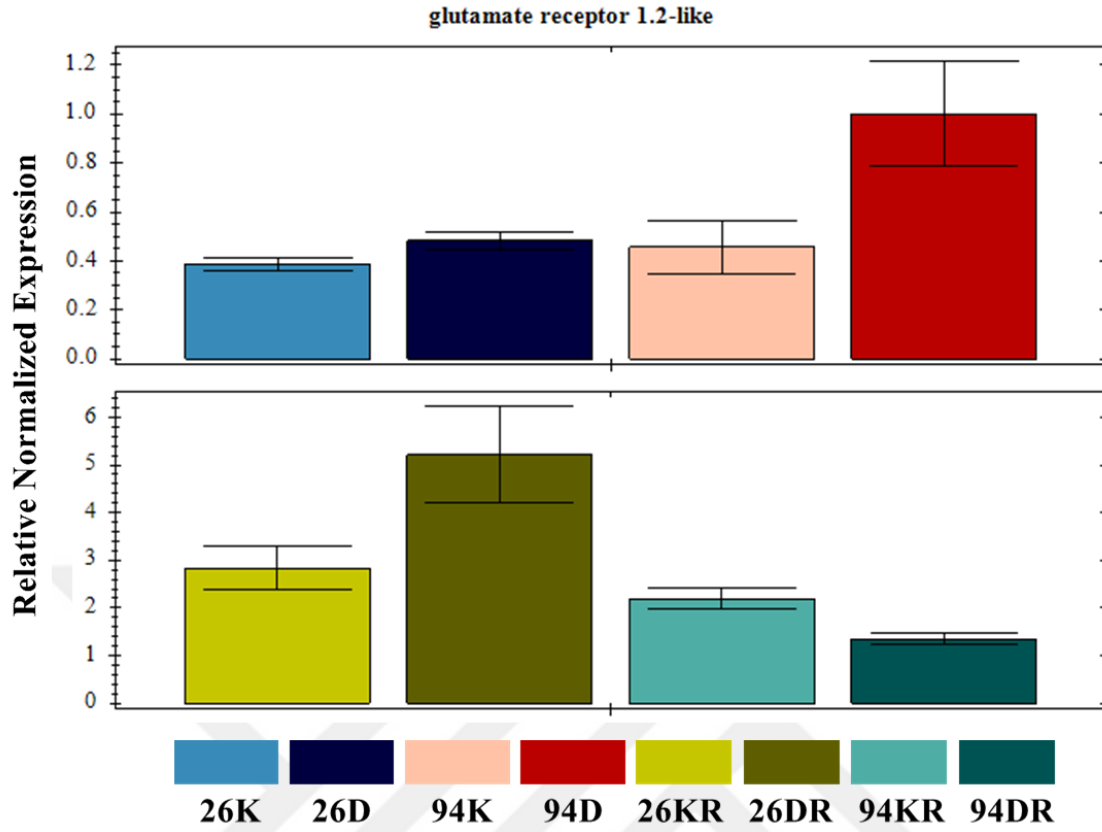
Şekil 3.41 Bitkilerde ABA-bağımlı PYR/PYL aracılı PP2C aktivitesi ve ABA sinyalleme sisteminin inhibisyonunun şematik gösterimi. ABF, ABA'ya duyarlı element bağlayıcı faktör; PP2C, Protein fosfatase 2C; PYR, pirabaktin direnci; PYL, PYR ile ilgili; SnRK2, sakarozu fermente etmeyen-1 ile ilişkili protein kinaz 2. (Santiago ve ark., 2009; Ng ve ark., 2014; Fernando ve Schroeder, 2016).

Validasyon çalışmalarından elde edilen verilere göre, kuraklık stresi altında kuraklığa hassas ve toleranslı her iki zeytin çeşidinde de *abscisic acid receptor PYL4-like* gen ekspresyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir. PYL proteinlerinin PP2C aktivitesinin inhibitörleri olarak hareket ettiği göz önüne alındığında, *OePYL4* geninde gözlemlenen aşağı regülasyon, bu genin ABA aracılı yolda işlev gösterdiğini ve PP2C'ler için

açıklanan negatif geri beslemeli düzenleyici mekanizmada yer aldığını göstermektedir. Kuraklık stres grupları ile iyileşme grupları karşılaştırıldığında, kuraklık stresi gruplarının kuraklık iyileşme gruplarıyla benzer profil gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum ilgili genin gelecekte olası bir stres durumu için bitkide gelişen adaptasyon mekanizmasında yer alan aday bir hafıza geni olabileceğini gösteriyor olabilir. Elde ettiğimiz veriler, zeytin çeşitlerinde kuraklık stres yanıtında yer alan *OePYL4* geninin ABA bağımlı yolda yer alarak aday bir hafıza geni olarak bitki stres adaptasyon mekanizmasında önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

3.1.7.2.3.2 *Glutamate receptor*

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış görülürken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için yaklaşık 2 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.42).



Şekil 3.42 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların glutamate reseptör genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

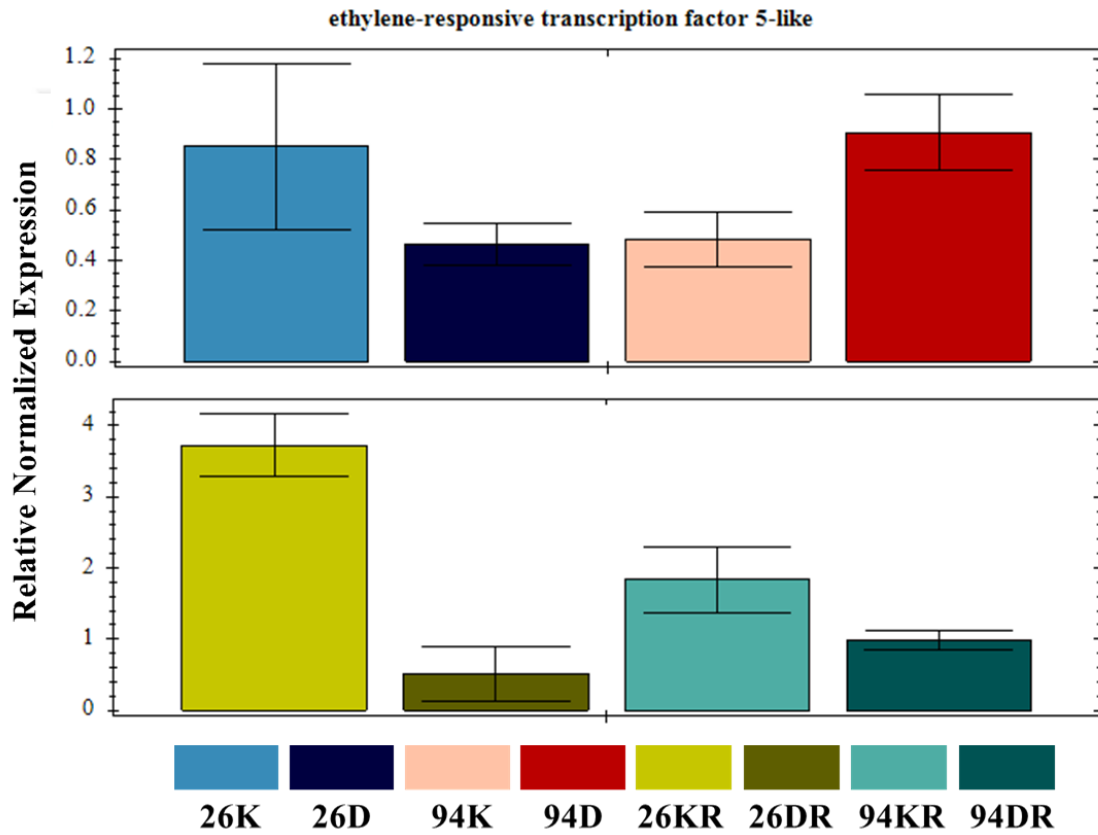
Glutamat reseptörleri (*GLR*), hem hayvanlarda hem de bitkilerde yaygın olarak bulunmakla ve bitki büyümesi, gelişimi ve stres tepkilerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Shi ve ark., 2022). *Glutamat reseptör (GLR)* geninin bitkilerde kuraklık stresine tepkisi karmaşık olmakla birlikte, çeşitli fizyolojik ve moleküler mekanizmalar rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalar *GLR* geninin, prolin metabolizmasını ve redoks düzenlenmesini modüle ederek stresle ilişkili genlerin ve proteinlerin ekspresyonunu arttırdığını, böylece de bitkilerin kuraklık stresine yanıt vermesinde rol oynadığını göstermektedir. Stres uyaranlarına yanıt olarak biriken reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve prolinin, metabolik düzenleyici yollarda sinyal molekülleri olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Rejeb ve ark., 2014). Bu stres tepkisinin, stres altındaki bitkilerde koruyucu bir mekanizma olarak işlev gördüğü düşünülmektedir (Manzoor ve ark., 2013).

Manzoor ve arkadaşlarının (2013) yaptığı farmakolojik araştırmalar, GLR'lerin kısmen serbest sitozolik $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) varyasyonlarında, oligogalakturonidler (OG) tarafından savunmayla ilgili genlerin ekspresyonunda, nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde rol oynadığını göstermiştir. Elde ettikleri veriler, *Arabidopsis*'de bitki savunma sinyal yollarında GLR'lerin rol oynadığına dair kanıt sunmaktadır. La ve arkadaşlarının (2020) kanola (*Brassica napus*) ile yaptıkları çalışmada, *GLR* geninden etkilenen glutamat aracılı prolin metabolizmasının bitkide kuraklık stres cevabında önemli bir rol oynayarak *GLR1.3* gen ifadesinin kuraklık stresi altında dikkate değer ölçüde yukarı regüle edildiğini bildirmişlerdir. Lu ve arkadaşlarının (2014) bir başka çalışmasında, kuraklık toleransı olan pirinç genotipinin stres toleransının *GLR* (*OsGLR1* ve *OsGLR2*) genlerinin aktivasyonundan kaynaklandığı ve bu genlerin aşırı ekspresyonunun hem pirinçte hem de *Arabidopsis*'te kuraklık toleransını önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir. Benzer şekilde Shi ve arkadaşlarının (2022) yaptığı bir çalışmada pirinçte (*Oryza sativa* L.) 26 *OsGLR* geni tespit edilerek, çoğu *OsGLR* geninin kuraklık stresi altında yukarı regüle olduğu bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde, kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) olmak üzere her iki çeşitte de kuraklık uygulaması sonrası ilgili genin ekspresyon seviyesinde artış tespit edilmiştir. Özellikle toleranslı (Memecik-94) çeşitte bu oran hassas çeşitten daha yüksek olmakla birlikte yaklaşık 2 kattır. *Glutamate receptor 1.2-like* geninin her iki çeşitte de artış göstermesi, ilgili genin bitkinin çevresel strese genel bir yanıtı olarak eksprese edilmesi ile oluşabilecek stres hasarından en az etkilenmek için geliştirdiği koruma mekanizması olarak açıklanabilir. Ayrıca 94 çeşidinin toleranslı olmasının, bu genin hassas çeşide kıyasla daha yüksek ifadesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında ise, kuraklığa hassas çeşitte (Gemlik-26) ilgili genin ekspresyon seviyesinde yaklaşık 1,5 kat artış gözlemlenirken kuraklığa toleranslı çeşitte (Memecik-94) ilgili genin ekspresyon seviyesinde yaklaşık 2 kat azalma tespit edilmiştir. Bu durum toleranslı çeşidin stres sonrası normal koşullara daha hızlı adapte olabilme yeteneği ile açıklanabilir.

3.1.7.2.2.3.3 Ethylene-responsive transcription factor 5-like

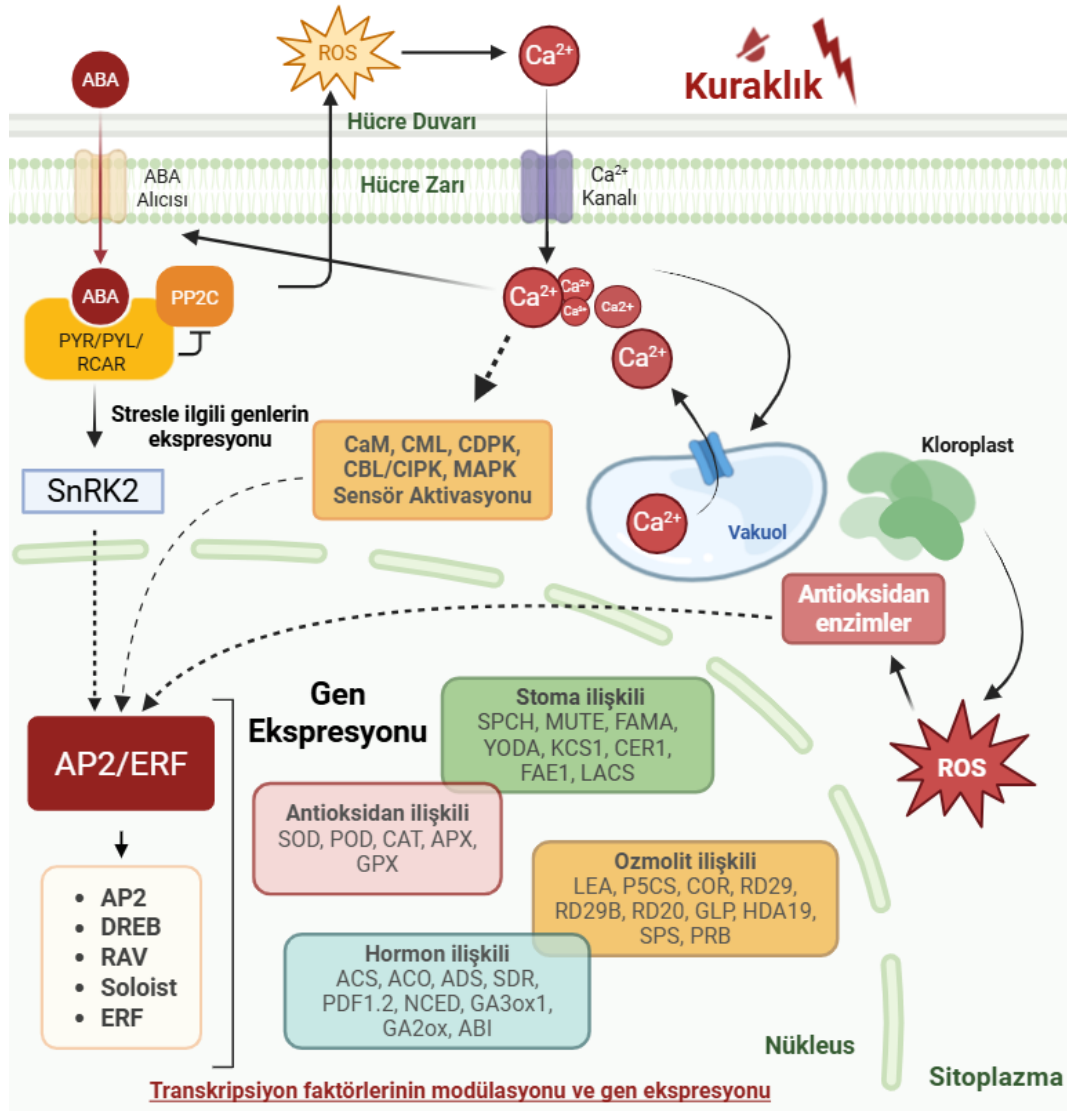
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 7,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,8 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.43).



Şekil 3.43 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların ethylene-responsive transcription factor 5-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Transkripsiyon faktörleri (TF'ler), bitkilerde biyotik ve abiyotik streslere karşı geliştirdiği moleküler mekanizmalarda önemli roller oynamaktadır (Zhao ve ark., 2025). Bitkilerdeki en büyük transkripsiyon faktörü ailelerinden biri olan AP2/ERF (APETALA2/Etilen Tepki Faktörü), yapısal özelliklerine göre beş ana gruba ayrılabilirler (Şekil 3.44), bunlar AP2 (APETALA2), DREB (dehidratasyona duyarlı element bağlayıcı protein), ERF

(etilene duyarlı faktör), RAV (ABI3/VP1 ile ilişkili) ve Soloist'tir (Ma ve ark., 2024). Bu alt gruplar bitki büyümesi ve gelişimi, morfogenez, patojen direnci, stres tepkileri, metabolik biyosentez düzenlemesi ve bitki hormonu aracılı düzenlemede hayati roller oynamaktadır (Ye ve ark., 2020; Yu ve ark., 2022; Feng ve ark., 2020; Hong ve ark., 2020).



Şekil 3.44 ERF alt familyası transkripsiyon faktörlerinin bitkide kuraklık stresine verdiği tepkileri düzenleme mekanizmaları (Wu ve ark., 2022; Nie ve Wang, 2023; Ma ve ark., 2024).

Etilen duyarlı faktör (ERF) alt ailesi, bitki AP2/ERF süper ailesindeki en fazla sayıda proteini içermekte ve bu alt ailenin üyelerinin kuraklık, tuzluluk ve soğuk gibi çeşitli abiyotik streslere karşı bitki direncini düzenlediği kanıtlanmıştır (Wu ve ark., 2022). Artan çalışmalar, kuraklık, tuzluluk, soğuk, yüksek sıcaklık, ağır metal toksisitesi ve

stres-tepki genlerinin aktivasyonunu kontrol ederek tepki veren beslenme stresleri dahil olmak üzere abiyotik strese ERF'lerin katılımını desteklemektedir (Klay ve ark., 2018; Debbarma ve ark., 2019)

Son çalışmalar bitki flavonoid sentezinin düzenlenmesinde yer alan ERF'lerin abiyotik stresler altında ozmolit sentez genlerinin ifadesini düzenlediği bildirilmiştir (An ve ark., 2020; Wang ve ark., 2018). Zhang ve arkadaşları (2010), bir domates ERF proteini olan JERF1'in prolin biyosentezini artırarak transgenik pirinçte kuraklık toleransını önemli ölçüde artırdığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada An ve arkadaşları (2020), bir elma ERF proteini olan MdERF38'in kuraklık stresine yanıt olarak antosiyanin biyosentezini desteklediğini tespit etmiştir. Pirinç ile yapılan benzer bir başka çalışmada, *OsERF115/AP2EREBP110* gen ifadelerindeki artışın prolin biyosentezinde yer alan *P5CS1* geninin ifade seviyesini yükselterek kuraklık toleransını arttırdığı tespit edilmiştir (Park ve ark., 2021). Rong ve arkadaşları (2014), buğdayda *TaERF3*'ün prolin ve klorofil birikimini artırarak kuraklık toleransını güçlendiren stresle ilişkili genleri pozitif olarak düzenlediğini göstermiştir. Chen ve arkadaşları (2022), Soya fasulyesinde *GmDREB1* gen ifadesindeki artışın fotosentetik verimliliği, ozmoregülasyon maddelerinin birikimini ve melatonin sentezini artırarak kuraklık toleransını sağladığını bildirmişlerdir.

Ayrıca yapılan başka çalışmalar göstermektedir ki ERF'ler, kuraklık koşulları altında bitkilerin ROS temizleme yeteneğini de arttırmaktadır (An ve ark., 2020; Zhao ve ark., 2021). Kuraklık kaynaklı *NtERF172*'nin tütünde katalaz (CAT) aracılı hidrojen peroksit temizlemeyi pozitif olarak desteklediği kanıtlanmıştır (Zhao ve ark., 2020). SIERF84 aşırı ekspresyonlu domates bitkisinin kuraklık stresi altında hem süperoksit dismutaz (SOD) hem de peroksidaz (PO) aktivitelerini yükseltmiştir (Li ve ark., 2018). Son çalışmalar, ERF'lerin bitki kuraklığa dayanıklı tepkilerini esas olarak absisik asit (ABA) sinyal yolları aracılığıyla düzenlediğini göstermektedir.

ABA, stoma kapanmasını artırma ve kuraklık stresine duyarlı genlerin ekspresyonunu düzenleme kapasitesi yoluyla kuraklık stresi toleransından sorumludur (Takahashi ve ark., 2020). Pirinçte ERF tipi transkripsiyon faktörü *OsERF83*'ün ekspresyonu ABA tarafından indüklenmiş ve *OsERF83*'ü aşırı eksprese eden bitkilerde daha güçlü bir kuraklık toleransı tespit edilmiştir (Jung ve ark., 2021). Li ve arkadaşları (2018), *OsERF71*'in ABA sinyalleme ve prolin biyosentezi ile ilişkili genlerin (*OsABI5*,

OsPP2C68, *OsRAB16C* ve *OsRAB16D* gibi) ekspresyonunu artırarak pirincin kuraklık toleransını pozitif yönde etkilediğini göstermiştir. Fang ve arkadaşları (2022) yakın zamanda *GmERF113*'ün, SOD ve POD aktivitelerinin yukarı düzenlenmesiyle ilişkili olan absisik asit 8'-hidroksilaz 3'ü (*GmABA8'-OH 3*) aşağı düzenleyerek soya fasulyesinde kuraklık toleransının iyileştirildiğini tespit etmiştir. Bir başka çalışmada ERF5 ailesinin bir üyesi olan *AhDREB1*, ABA'ya bağımlı sinyal yoluyla *Arabidopsis*'te kuraklık toleransını arttırmıştır. *AhDREB1*'in *Arabidopsis*'te aşırı ifadesi ABA duyarlılığını arttırarak ABA sinyal yollarını değiştirmiş ve *RD29A*, *P5CS1*, *P5CS2* ve *NCED1* gibi kuraklık stresıyla ilişkili genlerin ifadesini yükseltmiştir (Zhang ve ark., 2018). Benzer başka bir çalışma *Arabidopsis*'te *HcERF5*'in aşırı ekspresyonu, kuraklık veya ABA stresi altında tohum çimlenme oranlarını ve antioksidan enzim aktivitelerini artırarak fidelerde kuraklık toleransını iyileştirdiğini göstermiştir. Ek olarak, *HcERF5*'i aşırı ifade eden *Arabidopsis*, önemli ölçüde artmış kuraklık toleransı ve ABA'ya karşı azalmış hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir (Luo ve ark., 2024).

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre, hem kuraklık stresine maruz bırakılan hem de stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarda, kuraklığa hassas çeşitte *OeERF5-like* gen ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Kuraklık koşullarında bazı bitkiler, stomaların uzun süre açık kalmasını engellemek için *OeERF5* gibi etilenle ilişkili genleri baskılayarak su kaybını önlemeye çalışabilir. Kuraklık stresinde ABA (absisik asit) seviyeleri genellikle yükselerek stomaların kapanmasını teşvik eder. ABA ile etilen genellikle zıt etkilere sahip olmasından dolayı; ABA yanıtları baskın hale geldiğinde *OeERF5* gibi etilenle ilişkili genlerin ekspresyonu azalabilir. Hassas çeşitte ilgili gende gözlemlenen bu ekspresyon azalışı, kuraklık stresi altında bitkide baskın ABA yanıtının gelişmesiyle ilişki bir durumdan kaynaklandığını düşündürmektedir. Kuraklığa toleranslı çeşitte ise kuraklık stres uygulaması ile gözlemlenen ilgili gen ekspresyonundaki artış, bu genin toleranslı çeşitte kuraklık stres yanıtında stomaların kapanması ve su kaybının düzenlenmesi gibi süreçlerde oynadığı rolden kaynaklandığını gösteriyor olabilir.

Kuraklığa hassas çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme grubunda ilgili genin ekspresyonunda gözlemlenen azalış, hassas çeşidin bu geni baskılayarak metabolik süreçlerini eski haline döndürmeye çalıştığını gösteriyor olabilir. Kuraklığa toleranslı çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme grubunda ilgili genin ise

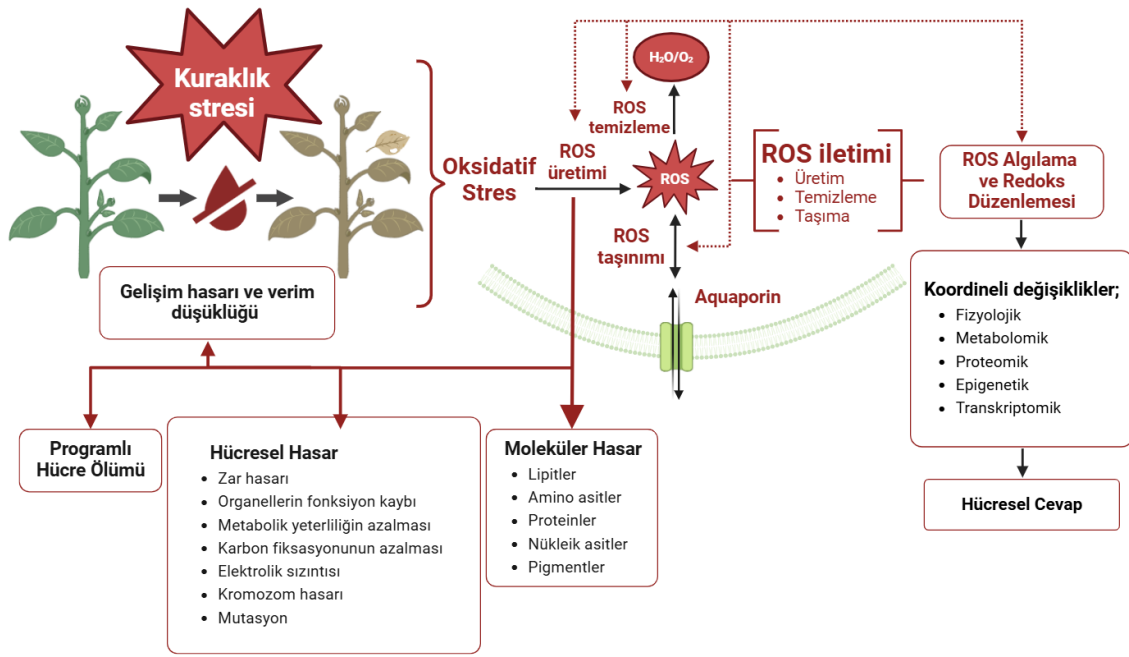
tamamen baskılanmamış olması, stres sonrası bitkinin daha kararlı bir gen regülasyon mekanizmasına sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu durum, dayanıklı bitkilerin strese karşı daha istikrarlı bir adaptasyon geliştirdiğini, hassas bitkilerin ise ani gen ekspresyon değişiklikleri ile dengesiz bir yanıt verdiğini göstermektedir.

3.1.7.2.3 Savunma ve Oksidatif Stres Yanıtı ile İlişki Genler

En önemli grubu oluşturan oksidatif stres yanıtıyla ilişkili genlerle beraber patojen savunması ve metal homeostazında rol alan *peroxidase 12-like, probable glutathione peroxidase 8, ascorbate peroxidase, catalase, copper/zinc superoxide dismutase* ve *4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase* (Oksidatif stres yanıtı) genlerinin kuraklık stresi ile ilişkisi, çeşitler ve deney grupları açısından qRT-PCR ile detaylı olarak analiz edilmiştir.

3.1.7.2.3.1 Antioksidan Gen Grubu

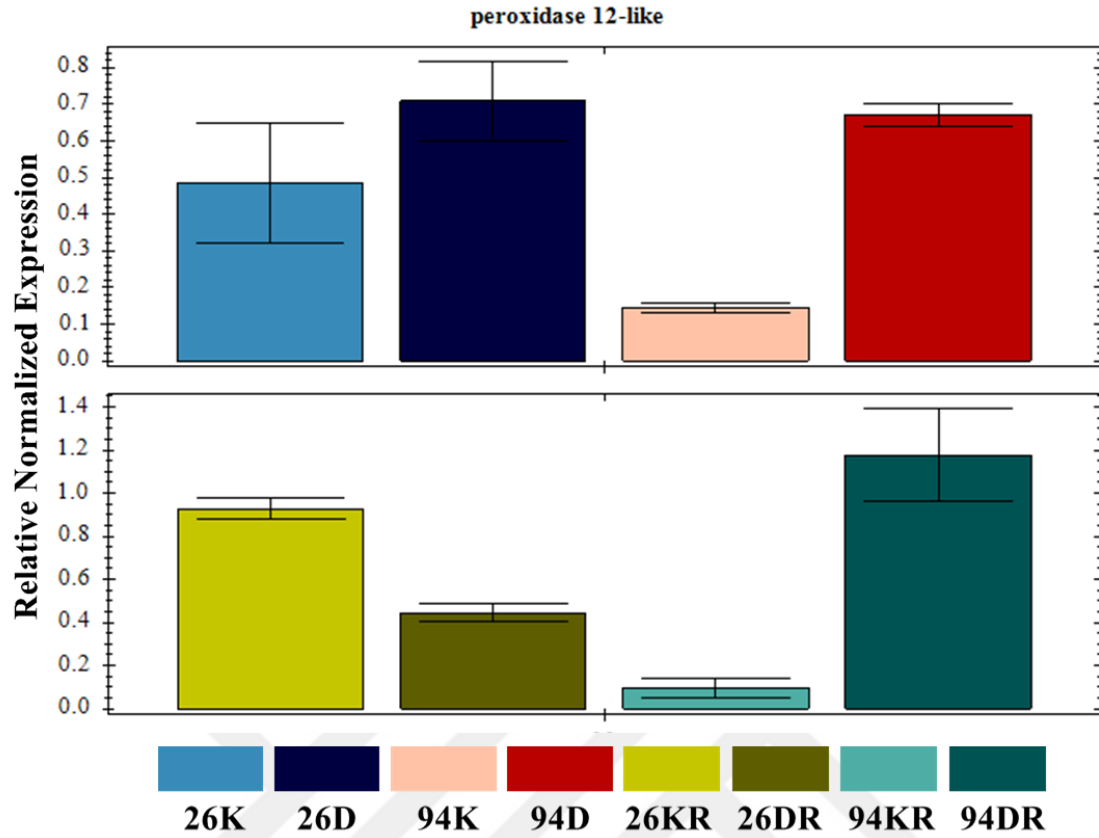
Abiyotik stresler altında bitkiler, süperoksit radikali, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lipid peroksitler dahil olmak üzere çok sayıda reaktif oksijen türü (ROS) üretmektedir (Şekil 3.45). Aşırı ROS birikimi, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu yoluyla bitki hücrelerine zarar vermektedir (Suzuki ve ark., 2016; Corpas ve Barroso, 2015). Birçok enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan, hücrel redoks dengesini korumak için ROS seviyelerini azaltmaktadır (Suzuki ve ark., 2014). Bitkiler, süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (PO), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi çeşitli enzimatik antioksidanların yanı sıra askorbat (AsA), glutatyon, flavonoidler, karotenoidler ve enzimatik olmayan antioksidanlar içermektedir (Sanz ve ark., 2015; Mhamdi ve Van Breusegem, 2018).



Şekil 3.45 Stres koşulları altında bitkilerde ROS metabolizmasının ve sinyalleşmesinin yönetimi. Hücresel ROS birikimi üç ana yöntemle kontrol edilir: (1) ROS üretimi, (2) ROS temizleme ve (3) ROS taşınması. Bu yöntemler ROS konsantrasyonlarını korur ve çeşitli abiyotik faktör-tepki sinyal iletim yollarında sinyal görevi gören çeşitli ROS düzenlemeleri gerçekleştirir (Raza ve ark., 2022).

3.1.7.2.3.1.1 Peroxidase 12-like

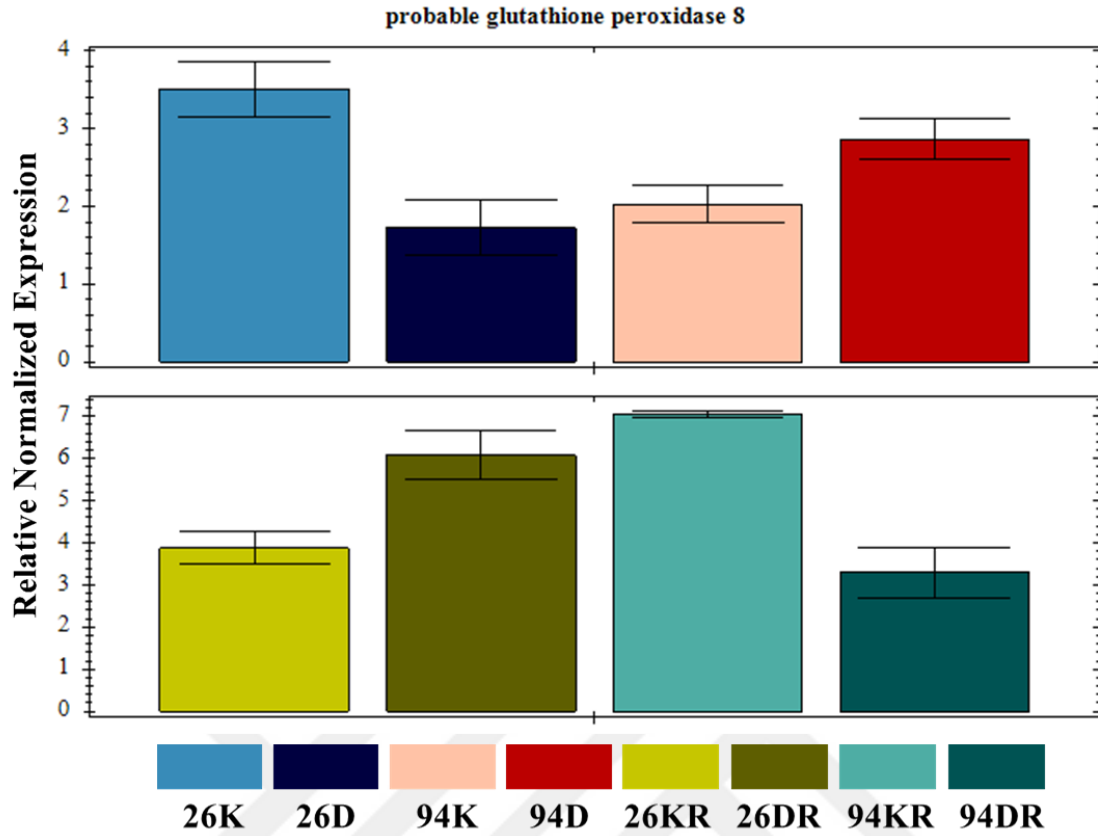
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,4 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 4,3 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 12 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.46).



Şekil 3.46 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların peroxidase 12-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

3.1.7.2.3.1.2 Probable glutathione peroxidase 8

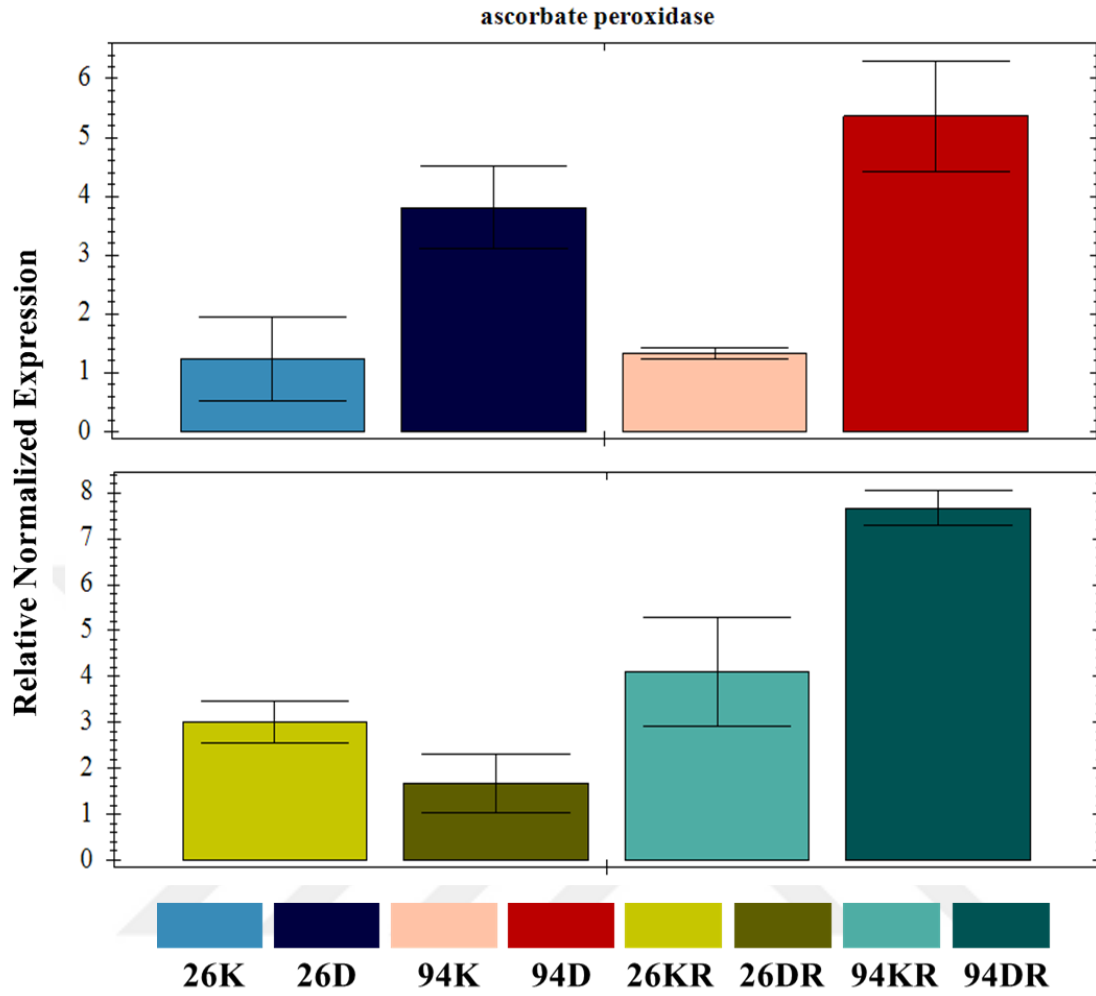
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2,3 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.47).



Şekil 3.47 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların probable glutathione peroxidase 8 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

3.1.7.2.3.1.3 Ascorbate peroxidase

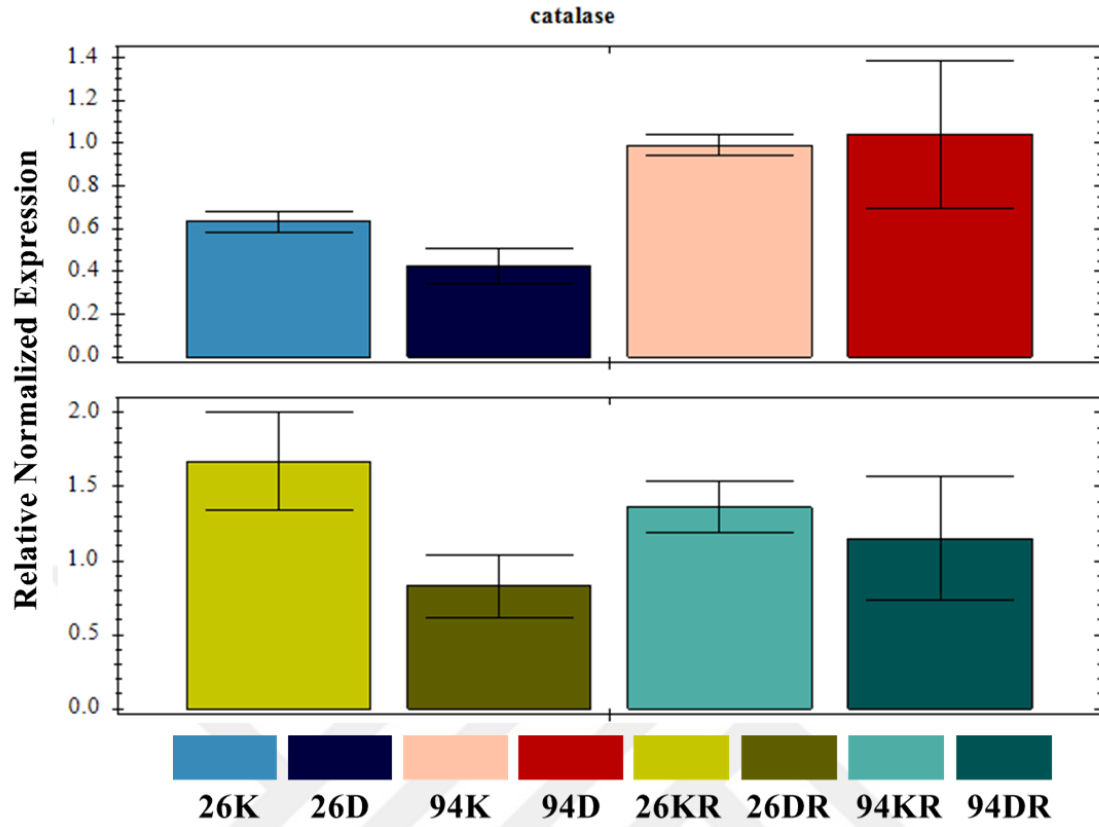
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 3,5 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 4 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.48).



Şekil 3.48 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların ascorbate peroxidase genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

3.1.7.2.3.1.4 Catalase

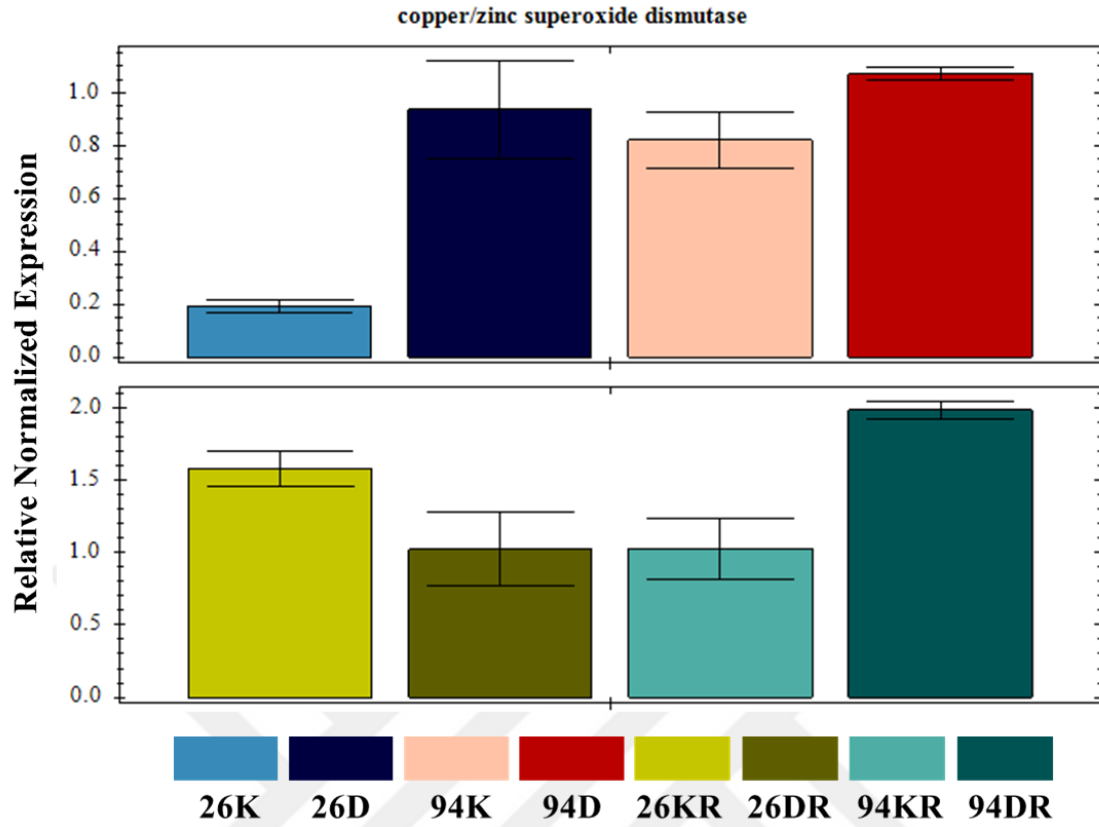
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.49).



Şekil 3.49 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların catalase genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

3.1.7.2.3.1.5 Copper/zinc superoxide dismutase

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 4,5 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,2 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,6 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.50).



Şekil 3.50 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların copper/zinc superoxide dismutase genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Kuraklık stresi sırasında, antioksidan sistemlerin yukarı regülasyonu hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası seviyede gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalar kuraklık stresi altında başta *Arabidopsis*, mısır, pirinç, tütün, patates, buğday, pamuk olmak üzere birçok bitki türünde APX, CAT, Cu/Zn SOD, GPX ve PO antioksidan gen ekspresyon seviyelerinin yaygın olarak arttığını göstermektedir (Laxa ve ark., 2019).

Zeytin ile yapılan bir çalışmada Sofo ve arkadaşları (2005), SOD, APX, CAT ve PO aktivitelerinin hem yapraklarda hem de köklerde kuraklık stresinin şiddetine bağlı olarak arttığını, özellikle şiddetli kuraklık stresindeki bitkilerin yapraklarında APX aktivitesinde belirgin bir artış olduğunu vurgulamışlardır. Benzer bir başka çalışmada ise Gholmohammadi ve arkadaşları (2019) CAT, APX ve PO aktivitelerinin kuraklık stresi altında farklı zeytin genotiplerinde artan bir eğilim gösterdiğini rapor etmiştir.

Ahmed ve arkadaşları (2009) ise üç farklı zeytin çeşidi ile yaptıkları çalışmada, APX aktivitesinin, kuraklık stresi altındaki tüm zeytin çeşitlerinde SOD ve CAT kıyasla daha

fazla arttığını tespit etmişlerdir. Ek olarak, CAT aktivitesinin yukarı regülasyonunun zeytin ağaçlarında kuraklık toleransı ile doğrudan ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Xu ve arkadaşları (2023), kuraklık stresi altında *Arabidopsis*'in *PtCAT2*'yi aşırı eksprese etmesiyle bitki hayatta kalma oranının %30 arttığını ve bu durumun da kuraklık toleransını arttırdığını göstermiştir. Ayrıca, *PtCAT2*-transgenik bitkilerde SOD ve PO aktivitesinin artmasıyla H_2O_2 düzeyinin azaldığını ($P<0.05$) tespit etmişlerdir.

Guerfel ve arkadaşları (2009), iki farklı toleranslı zeytin çeşidi (Chétoui ve Chemlali) ile yaptıkları çalışmada, kuraklık stresine maruz bırakılan her iki çeşitte de CAT aktivitesinin kontrol bitkilerine kıyasla arttığını göstermiştir. Chétoui çeşidinde gözlemlenen %50'lik CAT aktivite artışı, Chemlali çeşidine (%27) kıyasla daha yüksek olmuştur. Bununla birlikte, Chemlali çeşidinde APX aktivitesi kontrol bitkilerine kıyasla %44 oranında artarken, Chétoui çeşidinde su stresinden önemli ölçüde etkilenmediği belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada, bezelyede kuraklık stresi altında sitozolik APX'in aktivitesinin arttığı tespit edilirken, transgenik tütünde peroksizomal veya sitozolik APX'in aşırı ekspresyonunun bitkinin kuraklık stres toleransını arttırdığı gösterilmiştir (Mittler ve Zilinskas, 1994; Liu ve ark., 2014; Cao ve ark., 2017). Kuraklığa hassas ve toleranslı türlerde antioksidan sistemlerin aktivasyonunun yalnızca aktivasyon düzeyi ile değil, hangi enzimlerin hangi çeşitlerde daha yüksek eksprese edildiği de belirlendiği dikkat çekmektedir. Örneğin, APX ve CAT'ın aktivasyonunun, hassas türlere kıyasla toleranslı türlerde daha fazla eksprese edildiği tespit edilmiştir (Laxa ve ark., 2019).

Yaptığımız çalışmada, kuraklık stresi altında CAT gen ekspresyonunun, kuraklığa toleranslı Memecik çeşitinde arttığı, hassas Gemlik çeşitinde ise azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, CAT geninin bitkinin membran bütünlüğünü koruyarak H_2O_2 seviyesini düzenleme yeteneğini arttırdığını ve böylece kuraklık stres toleransını arttırdığını göstermektedir. Kuraklık stresi sonrası yeniden sulama yapılan iyileşme gruplarında ise her iki çeşitte de gen ekspresyonunda azalma gözlenmiş olup, bu durum bitkilerin normalleşme sürecinde kuraklık stresine kıyasla daha düşük CAT aktivitesi gösterdiğini destekler niteliktedir.

APX gen ekspresyonu sonuçlarına göre kuraklık stresi altında hem toleranslı (Memecik) hem de hassas (Gemlik) çeşitte artış gözlenmiştir. APX gen ekspresyonu, toleranslı çeşitte kontrole göre 4 kat, hassas çeşitte ise yaklaşık 3,5 kat arttığı tespit edilmiştir. Hassas

çeşitte, kuraklık stresi sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında *APX* gen ekspresyonunun yaklaşık 2 kat azalarak stres öncesi seviyeye hızla döndüğü görülmüştür. Toleranslı çeşitte iyileşme grubunda ekspresyon seviyesinin yaklaşık 2 kat arttığı tespit edilmiştir.

Bu durum kuraklığa toleranslı çeşitte *APX* geninin olası bir “hafıza geni” olarak işlev görebileceğini ve gelecekte olası bir kuraklık stresine karşı koruma mekanizması olarak ekspresyon seviyesini hassas çeşide kıyasla daha yavaş azalttığını göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, *APX* ve *CAT* genleri için literatürde belirtilen hassas türlere kıyasla toleranslı türlerde daha yüksek ekspresyon gösterdiği bilgisini doğrulamaktadır.

Buna karşılık yapılan çalışmalar, kuraklık stresi altında hassas türlerin *GPX* genini, toleranslı türlerden daha fazla aktive ettiğini göstermektedir. Kuraklığa hassas bitkiler, ağırlıklı olarak “glutatyon bağımlı temizleme sistemi”ni aktive ederken, askorbat bağımlı sistemin sadece orta derecede indüklendiği veya hatta aşağı regüle edildiği belirtilmiştir (Laxa ve ark., 2019).

Yaptığımız çalışmada ise *GPX* geni için kuraklığa toleranslı ve hassas çeşitler arasında farklı ekspresyon paternleri tespit edilmiştir. Şöyle ki; kuraklık stresi altında hassas çeşitte (Gemlik) *GPX* ekspresyonu baskılanırken toleranslı çeşitte (Memecik) ekspresyonun arttığı gözlemlenmiştir. Kuraklık stres sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında ise, her iki çeşitin de tam tersi gen ekspresyon paternleri sergilediği belirlenmiştir.

Öte yandan kuraklık stresi altında toleranslı türlerin glutatyon bağımlı sisteme kıyasla askorbat bağımlı süpürme sistemini daha fazla aktive ettikleri tespit edilmiştir (Laxa ve ark., 2019). Validasyon çalışmaları sonucunda, *APX* geninin kuraklık stresi altında toleranslı çeşitte yaklaşık 4 kat, *GPX* geninin ise 1,5 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, kuraklığa toleranslı çeşidin (Memecik) literatürde de belirtildiği gibi, askorbat bağımlı süpürme sistemini daha güçlü bir şekilde aktive ettiğini desteklemektedir.

Ayrıca yapılan diğer çalışmalar, kuraklık stresi altında hücre kompartmanlarında O_2 birikimine karşı bir önlem olarak SOD izoformlarının (*Mn-SOD*, *Fe-SOD*, *Cu*, *Zn-SOD*) ekspresyon seviyelerinin arttığını göstermektedir. Bu artış, *Arabidopsis thaliana* (Jung, 2004), *Festuca arundinacea* Schreb. (Fu ve Huang., 2001), narenciye (Zandalinas ve ark., 2017), *Coffea canephora* (Lima ve ark., 2002), *Phoenix dactylifera* (Safronov ve ark., 2017), *Pisum sativum* (Mittler ve Zilinskas, 1994), *Populus przewalskii* (Lei ve ark.,

2006), *Phaseolus vulgaris* (Türkan ve ark., 2005), *Triticum aestivum* (Cheng ve ark., 2016), *Oryza sativa* (Yang ve ark., 2020) gibi birçok türde rapor edilmiştir.

Raja ve arkadaşlarının (2020), domates bitkisinde yaptığı bir çalışmada, kuraklık stres koşulları altında *SOD* transkript seviyelerinde 6-8 kat artış tespit edilmiştir. Benzer şekilde, *APX*, *GR*, *DHAR* ve *MDHAR* transkriptlerinin de stres koşulları altında anlatımlarının arttığı bildirilmiştir. Li ve arkadaşlarının (2022) çalışması, *SOD* geninin fazla anlatımının *Arabidopsis* bitkilerinde kuraklık toleransını arttırdığını göstermektedir.

Wu ve arkadaşlarının (2016) yaptığı başka bir çalışma ise, özellikle *Cu/Zn-SOD*'u aşırı ekspresyonunun transgenik bitkilerde kuraklık stresine karşı toleransı arttırdığını ortaya koymuştur. Bu durumu destekleyen benzer çalışma da *Cu/Zn-SOD* ve *Mn-SOD* genlerine sahip transgenik *Arabidopsis*'in *SOD* aktivitesinde 2-3 kat artış göstererek kuraklık stresine karşı yabancı tipe oranla daha fazla stres toleransı sağladığını göstermiştir (Shafi ve ark., 2017). Özellikle transgenik bitkilerle yapılan bu çalışmalar *SOD* geninin ilgili tarla bitkilerinde çevresel açıdan stresli koşullar altında optimum büyümeye ve artırılmış verime katkı sağlayacağını göstermektedir.

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde, kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) her iki çeşitte de kuraklık uygulaması sonucu *OeCu/ZnSOD* geninin ekspresyon seviyesinde artış tespit edilmiştir. Bu durum literatürü destekler niteliktedir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında, hassas çeşitte *OeCu/ZnSOD* ekspresyon seviyesinde azalma, toleranslı çeşitte ise ilgili genin ekspresyon seviyesindeki artışın tespit devam ettiği gözlemlenmiştir. Kuraklığa toleranslı çeşitte ilgili genin kuraklık stresiyle beraber artan ekspresyon paterni göstermesi ve iyileşme gruplarında bu paterni koruması, bu genin olası bir hafıza geni olarak bitkide korunmasıyla birlikte tekrarlanabilecek olası kuraklık streslerine hızlı ve etkili cevap verebilmek için geliştirdiği bir tolerans mekanizması olabileceğini düşündürmektedir.

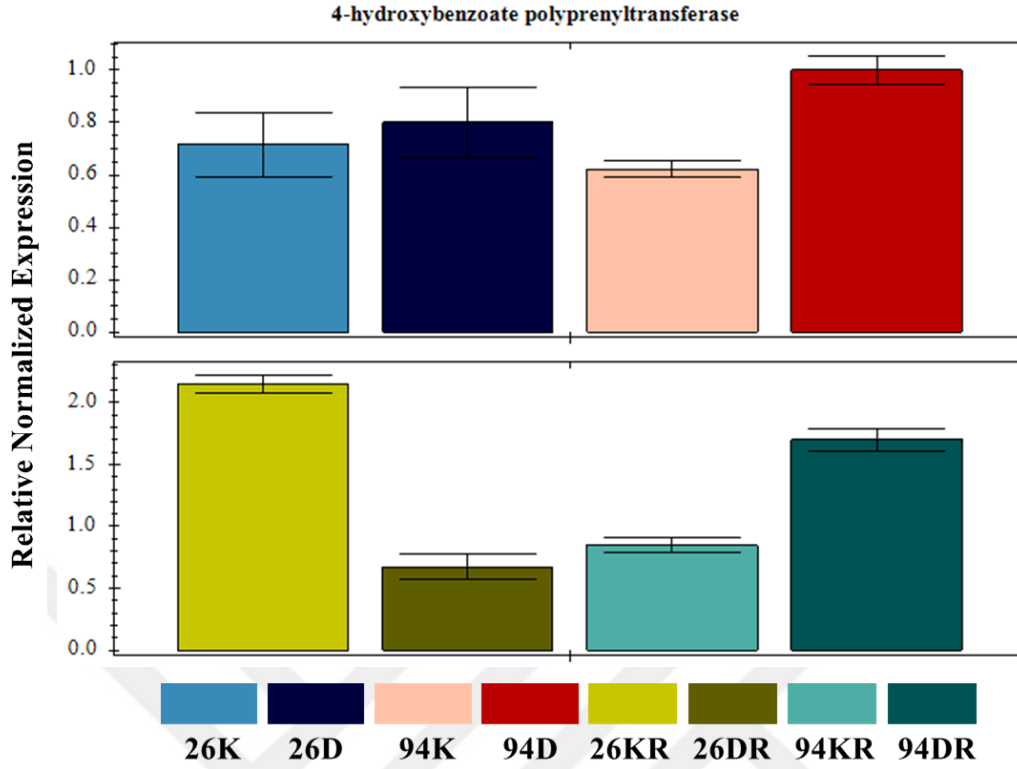
Sofo ve arkadaşlarının (2004), zeytin üzerinde yaptığı çalışmada, diğer antioksidan enzimlerle birlikte peroksidaz aktivitesinin de kuraklığa yanıt olarak arttığı ve peroksidaz birikiminin, bitkinin kuraklığı tolere etme yeteneği ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalar da kuraklık stresi altında *Gossypium hirsutum* (Zhang ve

ark., 2016), *Phoenix dactylifera* (Safronov ve ark., 2017) ve *Triticum aestivum*'da (Hu ve ark., 2011) *PO* gen ekspresyon seviyelerinin arttığını göstermektedir.

Validasyon çalışmalarımızda da kuraklık stresi altında her iki zeytin çeşidinde de *PO* gen ekspresyonunun artması literatürü destekler niteliktedir. Özellikle kuraklığa toleranslı çeşitte gen ekspresyon artışı, hassas çeşide göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, *PO* geninin bitkilerde kuraklık stresine karşı savunmada önemli bir rol oynadığını ve kuraklığa tolerans geliştirmesinde yardımcı olabileceğini göstermektedir. Kuraklık sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında ise hassas çeşitte *PO* gen ekspresyonunda azalma gözlemlenirken, toleranslı çeşitte ekspresyon seviyesindeki artışın devam ettiği tespit edilmiştir. İyileşme grubunda diğer antioksidan genlerde olduğu gibi toleranslı çeşitte gözlemlenen bu durum, *PO* geninin de bitkilerde kuraklık stres yanıtında önemli bir rol oynadığını ve bitkinin olası başka stres koşullarına maruz kalma ihtimaline karşı hızlı yanıt verebilmesi için geliştirdiği bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir.

3.1.7.2.3.1.6 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 3 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.51).



Şekil 3.51 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase, mitochondrial-like, transcript variant X1 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Ökaryotlarda mitokondrinin iç zarına konumlanmış olan *p*-hydroxybenzoate polyprenyltransferase (PPT) enzimi tarafından katalize edilen *p*-hydroxybenzoate'ın (PHB) prenilasyonu, ubikinon (UQ) biyosentezinde kritik bir reaksiyondur (Ohara ve ark., 2006). Ohara ve arkadaşları (2004), *Nicotiana tabacum*'da PPT'yi kodlayan *COQ2* geninin oksidatif stres uygulaması sonrası aşırı ekspresyonunun, UQ birikimini yabani tiptekinden altı kat daha fazla arttırdığını göstermiştir.

Soubeyrand ve arkadaşları (2018), 4-hidroksibenzoat biyosentezinin farklı aşamalarında etkilenen çeşitli *Arabidopsis* mutantları ile yaptıkları çalışmada, bitki peroksidazlarının kaempferolden (Arbutin) 4-hidroksibenzoat salgılayarak ubikinon biyosentezinde rol aldıklarını bulmuşlardır. Okada ve arkadaşları (2004) yaptıkları bir başka çalışmada 4-hidroksibenzoat poliprenil difosfat transferazın (4HPT) ubikinon (UQ) biyosentezinde anahtar bir enzim olarak rol aldığı belirtilmiştir. 4HPT'yi kodlayan *Arabidopsis AtPPT1* geni ile yapılan araştırmalar sonucunda, mitokondriyal UQ biyosentezinde yer alan

AtPPT1 geninin *Arabidopsis*'te embriyo gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Ubikinon, iç mitokondriyal membranda elektron taşınmasında işlev gören bir benzoik asit bileşiğidir (Wildham ve Dudareva, 2015). Solunumdaki işlevine ek olarak, ubikinon, membran lipidlerini, genellikle solunum sırasında üretilen serbest radikallerin vereceği zarardan koruyan bir antioksidan görevi görür. Yağda çözünen bir antioksidan olan ubikinon, bitkilerin abiyotik stres koşulları altında üretilen reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan zararları önlemesine yardımcı olmaktadır (Mach, 2018).

Elde ettiğimiz validasyon sonuçlarına göre, kuraklık stresi altında her iki zeytin çeşidi için de ilgili genin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Özellikle bu artış, toleranslı çeşit için hassas çeşide kıyasla daha fazladır. Bu durum literatürü destekler nitelikte olup, toleranslı çeşitte daha yüksek ekspresyon artışının görülmesi, kuraklık stresi için bitkinin geliştirdiği tolerans mekanizmasında UQ biyosentezinin önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Kuraklığa hassas çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında ilgili genin ekspresyonunun yaklaşık 3 kat azalarak stres öncesi ekspresyon paternine hızlı bir şekilde döndüğü tespit edilirken, toleranslı çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış gözlemlenmiştir. Bu durum kuraklığa toleranslı olan çeşitte bu genin olası bir hafıza geni olabileceğini ve yakın zamanda yaşanabilecek bir kuraklık stresine karşı bir koruma mekanizması olarak hızlı yanıt vermek için hassas çeşide kıyasla ekspresyon seviyesini daha yavaş azalttığını göstermektedir.

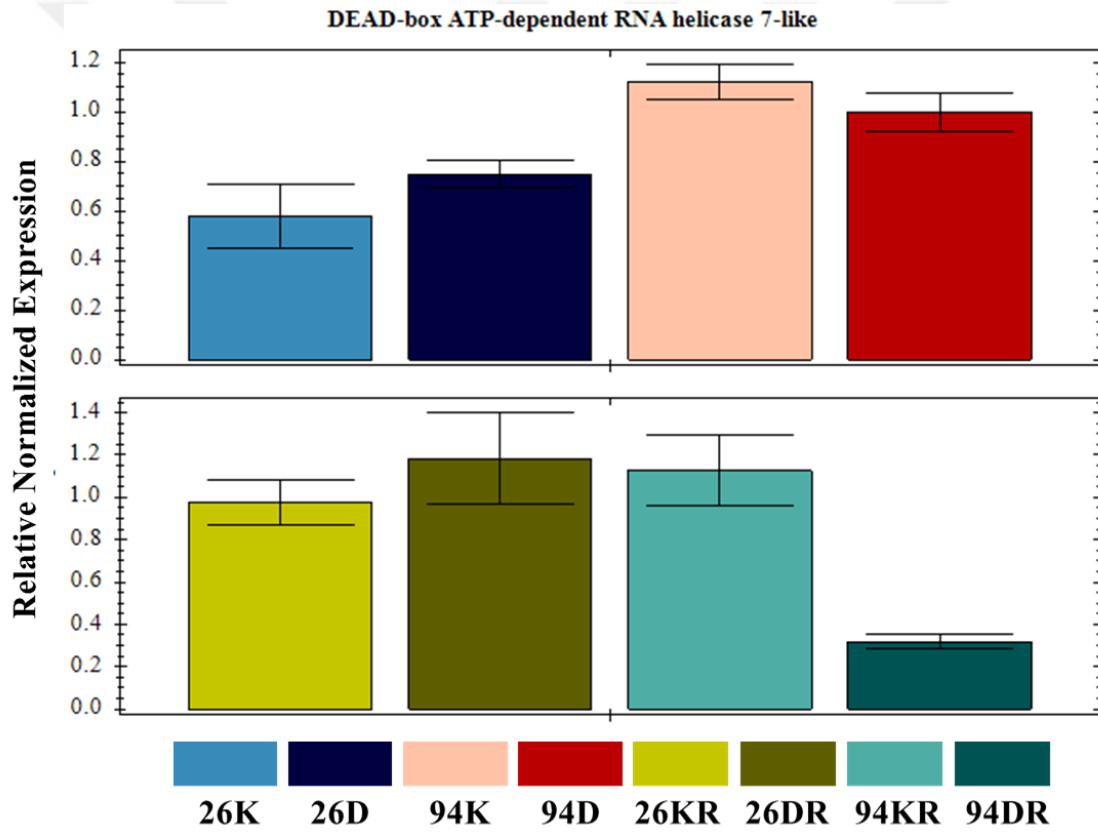
3.1.7.2.4 DNA, RNA ve Hücresel Düzenleme ile İlişki Genler

Bu grupta genetik düzenlenmede rol oynayan; *DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like*, *histone H1-like* (Genetik materyal düzenleme), *DNA (cytosine-5)-methyltransferase CMT2-like* (Epigenetik düzenleme), *pinin-like* (Hücre adezyonu ve yapısal düzenleme) genlerinin kuraklık stresi ile ilişkisi, çeşitler ve deney grupları açısından qRT-PCR ile detaylı olarak analiz edilmiştir.

3.1.7.2.4.1 Genetik Materyal Düzenlemesi ile İlişki Genler

3.1.7.2.4.1.1 DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like

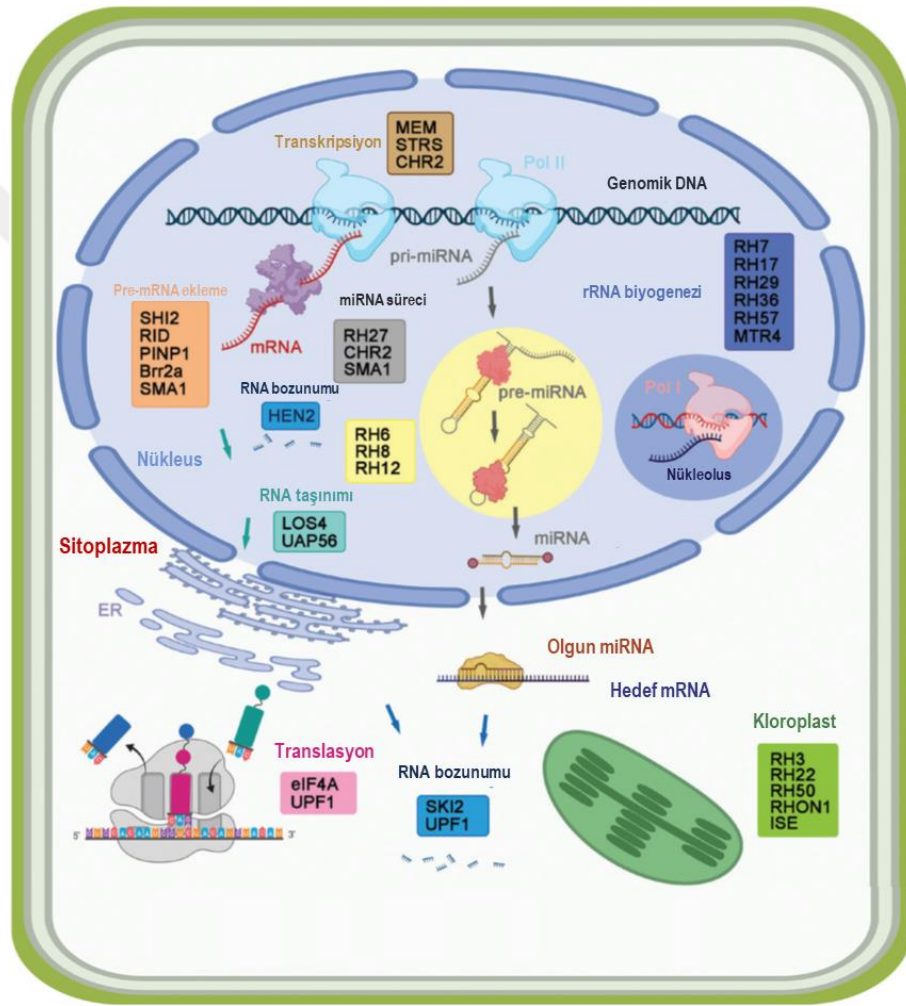
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,2 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 4 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.52).



Şekil 3.52 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

RNA helikazlar, prokaryotlardan ökaryotlara kadar tüm organizmalarda bulunarak altı süper aileye (SF1–SF6) ayrılmaktadırlar (Ru ve ark., 2021). En büyük helikaz ailesi olan Süper Aile II (SF2), esas olarak DEAD-box RNA helikazlardan oluşmaktadır (Nawaz ve

Kang, 2017). DEAD-box RNA helikazları, yanlış katlanmış RNA yapılarını bozarak doğru katlanmayı desteklemek için ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanmakta ve bitki büyümesi ve gelişimi de dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevlerde rol oynamaktadır (Zhu ve ark., 2015). DEAD-box RNA helikazları, ribozom biyogenezisi, mRNA eklenmesi, RNA ihracatı, mRNA translasyonu ve RNA bozunması gibi çeşitli RNA metabolizma süreçlerine katılarak biyotik ve abiyotik stres yanıtında da görev almaktadır (Huang ve ark., 2016) (Şekil 3.53).

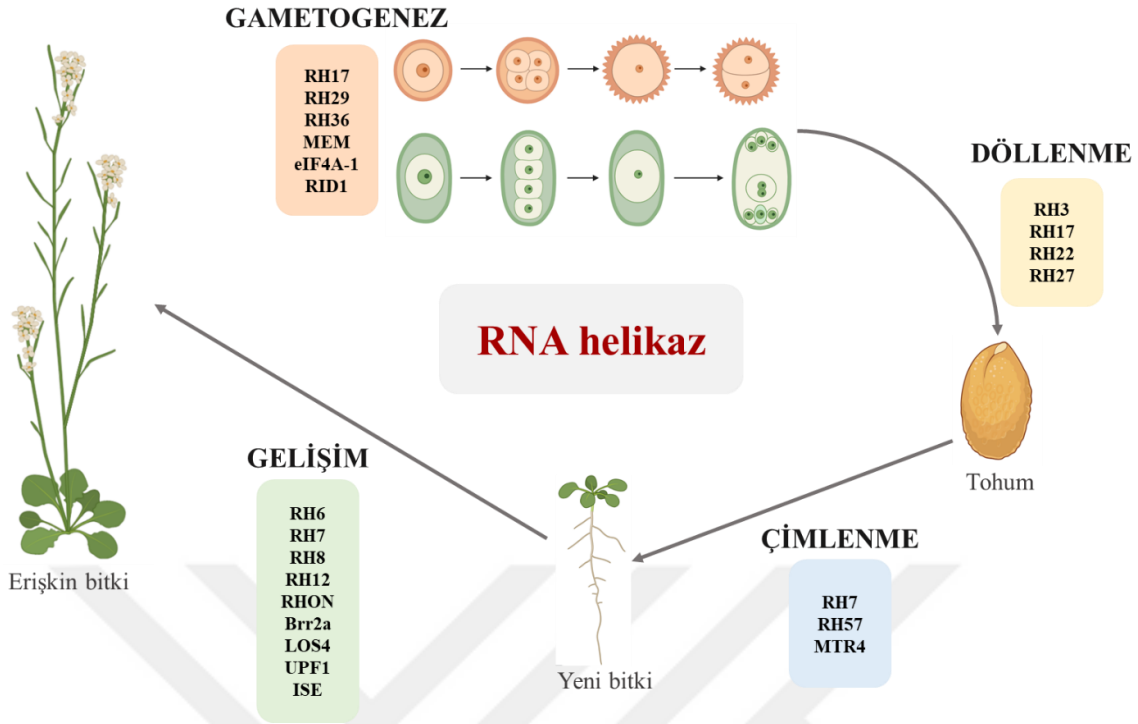


Şekil 3.53 RH'ler Arabidopsis'te yer aldığı moleküler süreçler (Li ve ark., 2023).

Bitki RH'leri farklı substratlar üzerinde etki ederek katalitik enzimler olarak RNA metabolizmasının tüm yönlerinde çeşitli roller oynamakta ve çeşitli metabolik yollarda yer almaktadır (Li ve ark., 2023). Yapılan çalışmalar *Arabidopsis* DEAD-box RH'leri (*AtRH7*, *AtRH36* ve *AtRH57*) ile mısır (*Zea mays*) *ZmDRH1*'in rRNA işlenmesinde önemli roller oynadığını göstermektedir (Huang ve ark., 2010; Hsu ve ark., 2014; Liu ve

ark., 2016). Chi ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada RH22'nin 50S ribozomal alt birimleriyle etkileşime girdiğini deneysel olarak doğrulamış ve RH22'nin bitki gelişimini düzenlemek için kloroplast ribozom birleşiminde yer aldığını öne sürmüşlerdir. Bir başka çalışmada DEAD-box RH50'nin de 23S ve 4.5S rRNA'larının olgunlaşması için gerekli olan bir kloroplast rRNA olgunlaşma faktörü olduğu bildirilmiştir (Paieri ve ark, 2018).

Bitki RH'leri gametogenez, döllenme, çimlenme ve gelişme dahil olmak üzere bitki büyümesinin ve gelişiminin her aşamasında yer almaktadır (Li ve ark., 2023). Asakura ve arkadaşları (2012), Mısır (*Zea mays*; ZmRH3) ve *Arabidopsis*'teki (*Arabidopsis thaliana*; AtRH3) kloroplast RH3'ün embriyogenez, kloroplast gelişimi ve fotosenteze katkıda bulunduğu tespit etmişlerdir. Bush ve arkadaşları (2015) yaptıkları bir başka çalışmada RH29'un gametofitik hücrelerde yüksek ve spesifik olarak ifade edilerek erkek ve dişi gametofitlerin işlevsel olgunlaşması için gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir. Bir başka çalışmada RH17'nin ovül gelişiminde işlev gördüğü bildirilmiştir. Ek transkriptom analizleri, RH17'nin ribozom biyosentezi, stres tepkisi, hormonlar ve tohum kabuğu gelişiminin genetik yollarını kontrol ederek bu süreçleri düzenlediğini göstermektedir (Stein ve ark., 2021). Lange ve arkadaşları yaptıkları bir başka çalışmada (2011) MTR4, RH7 ve RH57'nin rRNA biyogenezine katılarak bitki büyümesini ve gelişimini düzenleyerek vejetatif büyümeyi kontrol ettiğini bildirmişlerdir. Huang ve arkadaşlarının (2016), pirinçte (*Oryza sativa*) nükleer DEAD-box RH'leri ile yaptıkları çalışmada, OsRH2 ve OsRH34'ün programlanmış hücre ölümünü düzenlemede yer alarak polen ve tohum gelişimi için gerekli olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 3.54).



Şekil 3.54 *Arabidopsis* RH'lerinin bitki yaşam döngüsünde rol aldığı aşamalar (Li ve ark., 2023).

Artan kanıtlar, DEAD-box RNA helikazlarının kuraklık, tuz, sıcaklık ve oksidatif stres dahil olmak üzere bitki abiyotik stres tepkilerinde önemli roller oynadığını ortaya koymuştur. Pirinçteki (*Oryza sativa*) *PDH45*'in NaCl dahil olmak üzere çeşitli abiyotik stresler tarafından indüklendiği ve aşırı ekspresyonunun bitkiye tuzluluk toleransı ve gelişmiş fizyolojik özellikler kazandırdığı bildirilmiştir (Amin ve ark., 2012). Yapılan bir başka çalışmada da *OsPDH45*'in antioksidan sistemi kontrol ederek tuzluluk stres toleransını düzenlediği tespit edilmiştir (Gill ve ark., 2013). Pirinçteki (*Oryza sativa*) *OsRH58* ifadesinin ise tuz, kuraklık veya ısı stresi ile yukarı düzenlenirken soğuk ve UV uygulamalarıyla aşağı düzenlendiği belirtilmiştir (Nawaz ve Kang, 2019). Benzer şekilde *Arabidopsis* bitkilerinde *AtRH9* ve *AtRH25*'in transkript seviyelerinin oğuk stresine yanıt olarak belirgin şekilde yukarı düzenlenirken tuz veya kuraklık stresi tarafından aşağı düzenlendiği tespit edilmiş ve *AtRH25*'in bitki donma toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2008). Farklı bir çalışmada *Arabidopsis*'te kloroplastta lokalize olan RH3'ün, çevresel stresler altında karbon fiksasyonu ve ABA düzeyinin korunması için gerekli olduğu ve bitkide donma toleransı sağladığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2013; Gu ve ark., 2014). Ek olarak *RH3* geninin kloroplast gelişiminde kritik bir rol oynadığı ve *rh3* mutantı bitkilerde NaCl stresine hassasiyet olduğu tespit edilmiştir (Lee ve ark.,

2013). Bir başka çalışmada *Arabidopsis* LOS4 RNA helikazının, soğuğa yanıt olarak CBF transkripsiyon faktörü ekspresyonunun erken bir düzenleyicisi olduğu ve soğuk stresiyle düzenlenen bir gen olduğu gösterilmiştir (Gong ve ark., 2002; Gong ve ark., 2005). Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada da (2022), kasımpatı (*Chrysanthemum*) DEAD-box *CmRH56*'nın su eksikliğinde rizom büyümesini negatif olarak düzenlediği ve *CmRH56*'yı aşırı ifade eden bitkilerde su eksikliğinde indüklenen rizomlar yoluyla artan hayatta kalma gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca *CmRH56*'nın gibberellin biyosentezini inhibe ederek kuraklık stresinde rizom büyümesine katkıda bulunabileceği de belirtilmiştir.

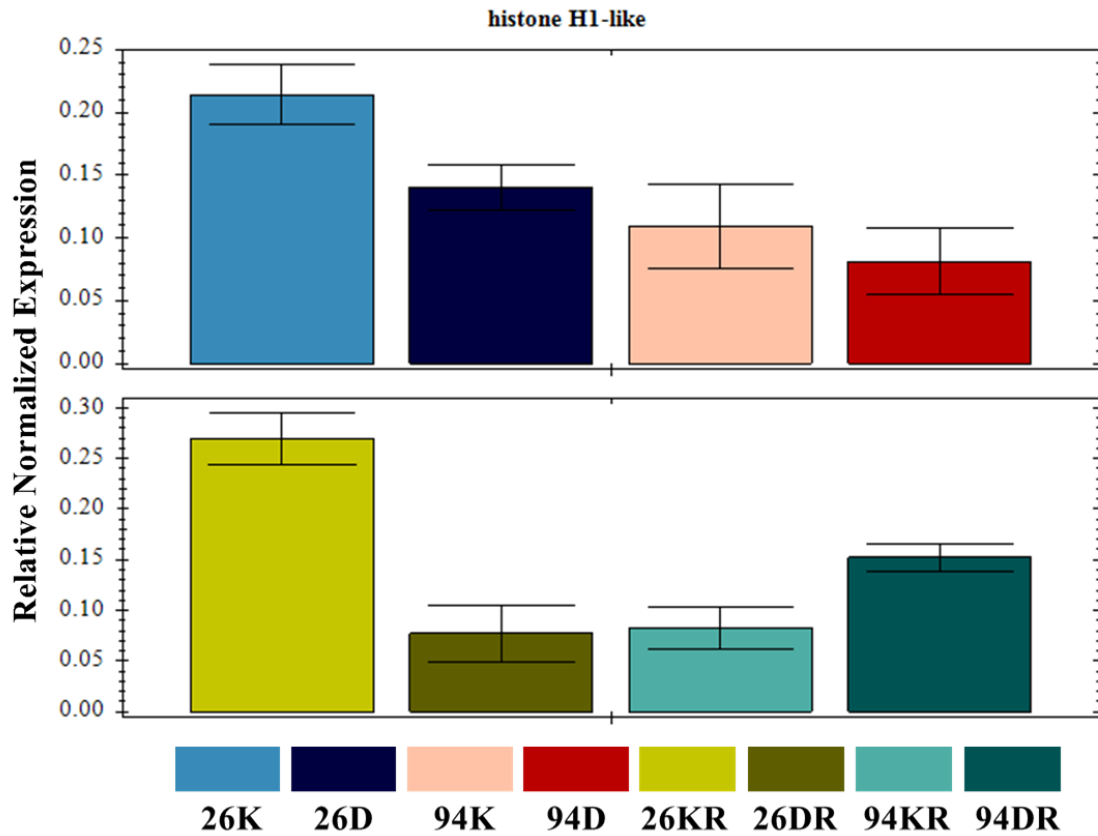
Liu ve arkadaşları (2016), *Arabidopsis AtRH7* mutantlarının (kayıp fonksiyonlu bitkiler) düşük sıcaklıkta (12°C) 35S ve 18S rRNA birikimine sebep olarak pre-rRNA işlenmesinin kısmen bozulduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar *AtRH7*'nin rRNA biyogenezini etkilediğini ve soğuk altında bitki büyümesinde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. Huang ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışma da (2016), *AtRH7* DEAD-box RNA helikazının, pre-rRNA'nın olgun rRNA'ya dönüşümüne yardımcı olduğu ve bu rolünün bitkinin büyümesi ve gelişimi için gerekli olan ribozom üretimi ve protein sentezi için kritik öneme sahip olduğu vurgulanmıştır. Ek olarak *AtRH7* mutantlarının (kayıp fonksiyonlu bitkiler), gelişimsel bozukluklar ve zayıf büyüme sergileyerek soğuk stresine karşı hassasiyetinin arttığını gözlemlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar *AtRH7*'nin temel hücresel süreçlerde ve çevresel stres yanıtlarında önemli bir düzenleyici olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, DEAD-box RNA helikazlarının bitki gelişiminde ve stres yanıtlarında merkezi roller oynadığını göstermektedir.

Elde ettiğimiz validasyon sonuçlarına göre, *DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like geninin* kuraklığa toleranslı çeşitte (Memecik-94) kuraklığa hassas çeşide (Gemlik-26) göre 2 kat yüksek bir anlatım yaptığı tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman normal koşullar altında ilgili genin kuraklığa toleranslı çeşitte tespit edilen yüksek ifadesi, kuraklık stresine karşı gösterdiği tolerans mekanizması ile ilişkilendirilebilir. Kuraklık stres uygulaması sonrası kuraklığa hassas çeşitte (Gemlik-26) ilgili genin ifadesinde tespit edilen yaklaşık 1,5 katlık artış, bitkide bir savunma mekanizması olarak ilgili gen ve bu genin etki ettiği yolakların kuraklık stres yanıtında rol oynadığını düşündürmektedir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması

sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) tespit edilen ilgili geninin ekspresyonundaki yaklaşık 1,2 katlık artış ise hassas çeşitte bitki normalizasyonunun daha yavaş gerçekleştiğini göstermektedir.

3.1.7.2.4.1.2 Histone H1-like

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir oranda azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 4 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.55).



Şekil 3.55 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stresi uygulaması (D) ve kuraklık stresi uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların histone H1-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

H1 histonları, yüksek ökaryotlarda nükleozomlar arasındaki DNA'ya bağlanarak kromatinin yoğunlaşmasında kritik roller üstlendikleri için "bağlayıcı histonlar" olarak bilinmektedirler (Nunez-Vazquez ve ark., 2022). Bağlayıcı histon protein varyantları, birçok bitki türünde farklı dokularda, çeşitli gelişim aşamalarında ifade edilmekte olup, çeşitli çevresel koşullar tarafından indüklendiği bilinmektedir (Scippa ve ark., 2000). Özellikle bitkilerin kuraklık gibi çevresel streslere karşı verdikleri adaptif tepkilerin, H1 varyantları aracılığıyla kontrol edildiği bildirilmiştir (Rutowicz ve ark., 2015). Ancak, bu varyantların adaptasyonu nasıl kolaylaştırdığına dair bilgiler halen sınırlıdır. Kromatin organizasyonunun fizyolojik ve anatomik düzeydeki değişimlerine odaklanan çalışmalar, H1 histon varyantlarının gelişim sırasında ve kuraklık stresine yanıt olarak CO₂ asimilasyon değişimi, stoma fonksiyonunun düzenlenmesi, terleme, yaprak anatomisinde ve fizyolojik aktivitelerde farklılıklar gibi çok sayıda karmaşık işlev üstlendiğini ortaya koymaktadır (Scippa ve ark., 2004; Trivedi ve ark., 2012; Rutowicz ve ark., 2015). Ayrıca epigenetik düzeyde kuraklık stresinin DNA metilasyonu ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Rutowicz ve ark., 2015; Bourguet ve ark., 2021; Liu ve ark., 2022).

Liu ve arkadaşları (2021), sıcaklık stresi altındaki bitkilerde heterokromatik transpozon elemanlarının (TE) düzenlenmesinde histon H1'in rolünü incelemiş ve H1 eksikliği olan bitkilerin sıcaklık stresine karşı son derece dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Wan ve arkadaşlarının (2023) pirinçte yüksek ve düşük sıcaklık tepkisini inceledikleri bir başka çalışmada histon H1 geni *OsHis1.1*'in aşırı ifadesinin, sıcaklık stresine yanıt veren genlerin ifadesini baskıladığı ve bu durumun pirinçte soğuk ve sıcaklık stresine karşı toleransı azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca *OsHis1.1*'in aşırı ifade edildiği pirinç bitkilerinde sıcaklık stresi altında daha şiddetli oksidatif stres ve hücrel hasar gözlemlenmiştir. Bu çalışmada *OsHis1.1*'in aşırı ifadesinin pirincin agronomik özelliklerini değiştirdiği de vurgulanmıştır. Fujita ve arkadaşlarının (2005), yaptıkları kuraklık çalışmasında ise kuraklık stresi uygulanmış *Arabidopsis* bitkilerinde *HIS1-3* gen ifadesinin baskılandığı bildirilmiştir. Rutowicz ve arkadaşlarının (2015) kuraklık ve düşük ışık stresleri ve kombine stres uyguladıkları *Arabidopsis* bitkilerinde histon H1'in rolünü ve işlevini araştırdıkları çalışmada *H1.3*'ün tükenmesinin stresle ilişkili DNA hipermetilasyonunu önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca yabani tip ile karşılaştırıldığında, *h1.3* mutant bitkilerinin daha düşük bir CO₂ asimilasyon oranı gösterdiği ve stoma

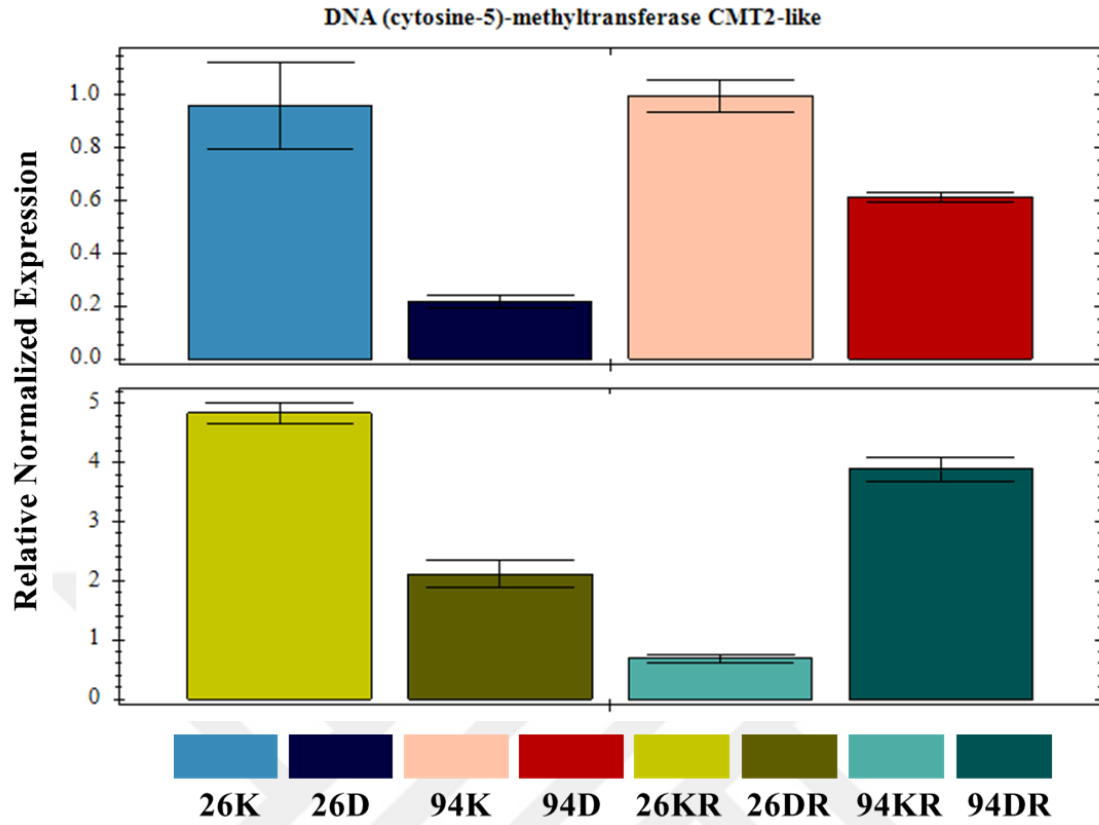
yoğunluğunu azaltarak kombine strese yanıt verme yeteneğinde düşüş gösterdiği belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, zeytin bitkisinde kuraklık stresine tepkinin histon H1 gen ekspresyonunda azalmayla ilişkili olduğunu göstermektedir. Kuraklığa hassas ve toleranslı her iki zeytin çeşidinde de histon H1 gen ekspresyonunda gözlemlenen bu azalma literatürdeki bitki stres yanıtlarıyla uyumludur. Bu durum H1 histonunun kromatin yapıda oluşturduğu değişiklikler de göz önüne alındığında, H1 gen ekspresyonundaki bu azalmanın, kuraklık stresine karşı rol oynayan genlerin ifadesini arttırmak amacıyla DNA erişilebilirliğini arttırarak gerçekleştiği yönündeki görüşü destekler niteliktedir. Kuraklık stresi sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında hassas çeşitte ilgili gendeki ekspresyon azalmasının devam ederken, toleranslı çeşitte bu ekspresyonun artması, kuraklık stresi sonrası toleranslı çeşidin bitki bütünlüğünü korumak için hızlıca yanıt geliştirdiğini düşündürmektedir. Literatürde bu alanda yapılan çalışmaların arttırılması, H1 histonlarının etki ettiği farklı mekanizmaları anlamamıza yardımcı olacaktır. Özellikle zeytin bitkisindeki stres yanıtlarında daha önce çalışılmamış bir gen olarak histon H1-like genindeki tespit ettiğimiz bu değişim, son yıllarda artan sayıda yapılan epigenetik çalışmalarına da katkıda bulunacaktır.

3.1.7.2.4.2 Epigenetik Düzenleme ile İlişki Genler

3.1.7.2.4.2.1 DNA (cytosine-5)-methyltransferase CMT2-like

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 4,5 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilmemiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2,3 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 4,5 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.56).



Şekil 3.56 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların DNA (cytosine-5)-methyltransferase CMT2-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

DNA metilasyonu, gen ifade düzenlenmesi, gen susturulması ve kromozom inaktivasyonu gibi çeşitli moleküler mekanizmalarda rol oynayarak büyüme ve gelişme, stres tepkisi ve ikincil metabolizma dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte yer alan oldukça korunmuş epigenetik bir modifikasyondur (Zhu ve ark., 2020; Liu ve ark., 2015; Xing ve ark., 2015). Bitkilerde, DNA metilasyonu özellikle CpG, CpHpG ve CpHpH (burada H, A/C/T'dir) olmak üzere üç dizi bağlamında sitozin-5 DNA metiltransferaz (C5-MTaz) tarafından düzenlenir (Zhu ve ark., 2020). Sitozin-5 DNA metiltransferazlar (C5-MTaz), DNA metilasyonu sürecindeki anahtar enzimler olarak sadece DNA metilasyon sürecini başlatmakla (de novo) kalmaz, aynı zamanda sürekliliğini de sağlamaktadır (Ahmad ve ark., 2014). Sitozin (C) metilasyonu için metiltransferaz (MET), kromometiltransferaz (CMT), yeniden düzenlenmiş metiltransferaz (DRM) ve DNA metiltransferaz 2 (DNMT2) dahil olmak üzere dört farklı enzim türü yer almaktadır (Henikoff ve Comai, 1998; Cao ve Südhof, 2001).

CMT'lerin bitkilerdeki ana işlevi CHG metilasyonu ve histon H3 lizin 9 (H3K9) metilasyonu arasındaki güçlendirici bir halka aracılığıyla CHG bağlamlarında metilasyonu sürdürmek ve CpHpH (CMT2) ve CpHpGp bölgelerini (CMT3 ve CMT2) metillemektir (Du ve ark., 2014). Bitkilerde, *C5-MTase* genleri epigenetik durumları DNA metilasyonu yoluyla düzenleyerek çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır (Zhang ve ark., 2018; Muller ve ark., 2011).

Çay bitkisinde (*Camellia sinensis*) abiyotik stres (soğuk ve kuraklık) uygulaması sonrası *CsC5-MTase* ve *CsdMTase* genlerinin transkript bolluğunun araştırıldığı bir çalışmada *CsMET1*, *CsCMT1*, *CsCMT2* ve *CsCMT3* gen ifadelerinin kuraklık stres altında önemli ölçüde aşağı düzenlendiğini tespit edilmiştir (Zhu ve ark., 2020). Benzer şekilde *Ricinus communis* ile yapılan bir başka çalışmada da kuraklık stresi altında *RcCMT1* ve *RcCMT2* gen ifadelerinin sırasıyla 3,4 ve 3,6 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Victoria ve ark., 2018). Benzer bir başka çalışmada patlıcanda (*Solanum melongena* L.) kuraklık stres uygulamasının *CMT3a* gen ifadesini arttırırken *CMT3b* gen ifadesini azalttığı tespit edilmiştir (Moglia ve ark., 2019). Başka bir çalışmada ise buğdayda (*Triticum aestivum*) kuraklık stres uygulamasının *TaCMT2-4D* ve *TaCMT3b-6B* gen ifadelerini arttırdığı tespit edilmiştir (Gahlaut ve ark., 2020). Pirinç (*Oryza sativa* L.) bitkisiyle yapılan bir başka çalışmada da kuraklık stresi altında pirinç sürgün ve kök dokularında *OsCMT1* ve *OsCMT3* gen ifadelerinin azalırken buna karşın *OsCMT2* gen ifadesinin arttığı bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2014).

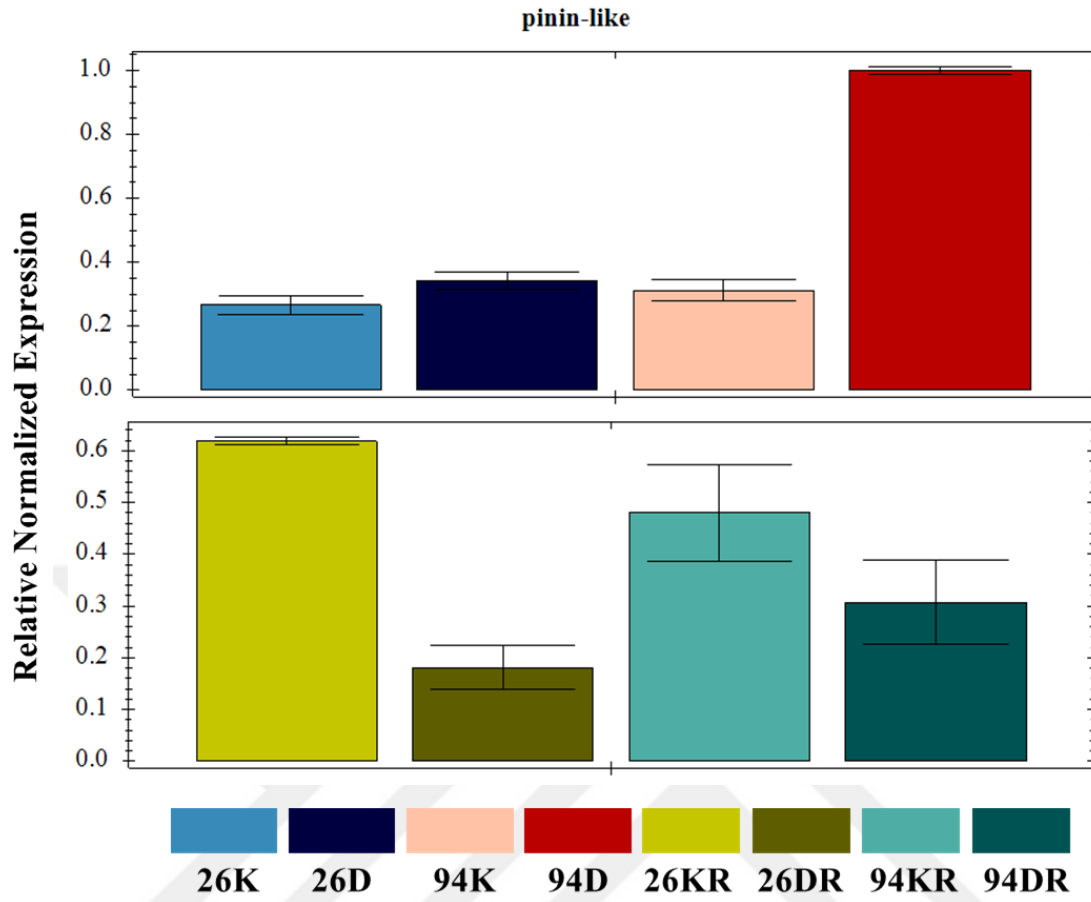
Elde ettiğimiz validasyon sonuçlarına göre hem kuraklık stresi altında hem de stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında kuraklığa hassas zeytin çeşidi (Gemlik-26) için ilgili genin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Özellikle bu azalma, hassas çeşitte toleranslı çeşide kıyasla daha belirgindir. Bu durum *OeCMT2* gen ifadesinin zeytin bitki çeşitlerinin kuraklık stresine karşı geliştirdiği tolerans mekanizmasında bir rol oynayarak, literatürdeki diğer CMT gen ailelerinin çoğunluğuyla benzer ifade paterni geliştirdiğini göstermektedir. Kuraklığa hassas çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında ilgili genin ekspresyonunun yaklaşık 4 kat azalarak stres öncesi ekspresyon paternine hızlı bir şekilde döndüğü tespit edilmiştir. Kuraklığa toleranslı çeşitte (Memecik-94) stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında ise ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 4 katlık artış gözlemlenmiş ve bu durum kuraklık stres uygulaması öncesi kontrol gruplarında

gözlemlenen gen ifadesinden de yaklaşık olarak 4 kat yüksek olduğu gözlemlenmektedir. Bu durum kuraklığa toleranslı olan çeşitte bu genin kuraklık stres uygulaması sonrası bitkide metabolik süreçlerini hızlı bir şekilde normale döndüğünü ve daha hızlı adaptasyon geliştirdiğini düşündürmektedir. Literatürde bu alanda yapılan epigenetik çalışmaların azlığı, zeytin bitkisinde kuraklık stresi altında tespit ettiğimiz bu gendeki sonuçların özellikle değerli olduğunu göstermektedir.

3.1.7.2.4.3 Hücre Adezyonu ve Yapısal Düzenleme ile İlişki Genler

3.1.7.2.4.3.1 *Pinin-like*

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 3 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 3 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.57).



Şekil 3.57 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların pinin-like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Pinin (PNN), epitel hücre farklılaşmasını düzenleyen ve hücre bağlantılarının oluşumunu artırabilen bir ekzon bağlantı bileşenidir (EJC) (Wang ve ark., 2022). Epitel hücrelerinde ve desmozomla ilişkili diğer hücrelerde PNN, desmozom-ara filament kompleksinin stabilizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Joo ve ark., 2014). PNN proteinini kodlayan pinin geni, fare embriyonik gelişimi sırasında tüm dokularda, özellikle merkezi sinir sisteminde yüksek seviyelerde ifade edildiği bildirilmiştir (Hsu ve ark., 2011).

Hsu ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada, PNN'nin aşırı ekspresyonunun epitel hücrelerinde göç aktivitesini azalttığı ve hücrelerin ayrışmasına yol açtığı belirtilmiştir. PNN'nin hücre-hücre adezyonu ve hücre göçü üzerindeki bu gibi etkilerinin, desmozomlardaki protein etkileşimleri ve çekirdek içi gen ekspresyonu farklılaşmasıyla açıklandığı ifade edilmiştir.

Ayrıca yapılan güncel çalışmalar göstermektedir ki kolorektal kanser, üçlü negatif meme kanseri, pankreas kanseri ve nazofarenks karsinomu gibi hastalıklarda, PNN gen ekspresyondaki artışın metastazı arttırdığını göstermektedir (Wei ve ark., 2016; Kang ve ark., 2020; Tang ve ark., 2020). Bir onkojenik faktör olarak PNN'in hepatosellüler karsinom hücrelerini apoptozdan koruyarak, böbrek hücreli karsinomda hücre adezyonunu destekleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalmalarına yardımcı olduğu da belirtilmiştir (Yang ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016; Jin ve ark., 2021; Wang ve ark., 2022).

Bitkilerde ise Pinin proteini ve genleriyle ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu eksiklik, PNN'nin bitki hücrelerindeki işlevi hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz validasyon sonuçlarına göre kuraklık stresi altında her iki zeytin çeşidi için de ilgili genin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Özellikle bu artış toleranslı çeşit için hassas çeşide kıyasla daha fazladır. Bu durum kuraklık stresi altında bitkinin geliştirdiği tolerans mekanizmasında pinin geninin önemli rol oynadığını göstermektedir.

Kuraklığa hassas çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında ilgili genin ekspresyonunun yaklaşık 3 kat azalarak stres öncesi ekspresyon paternine hızlı bir şekilde döndüğü tespit edilirken, toleranslı çeşitte iyileşme grubunda ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat azalma gözlemlenmiştir. Kuraklık stresi altında hassas ve toleranslı her iki çeşitte de ilgili genin ekspresyonunun stresle doğru orantılı olarak değişmesi, bu genin kuraklık stresi ile ilişkisini ortaya koymaktadır. Ayrıca yapılacak fonksiyonel çalışmalarla benzer sonuçlar elde edildiği takdirde ilgili genin ileride kuraklık stresi ile ilişkili bir biyobelirteç olarak kullanıma olasılığı bulunmaktadır.

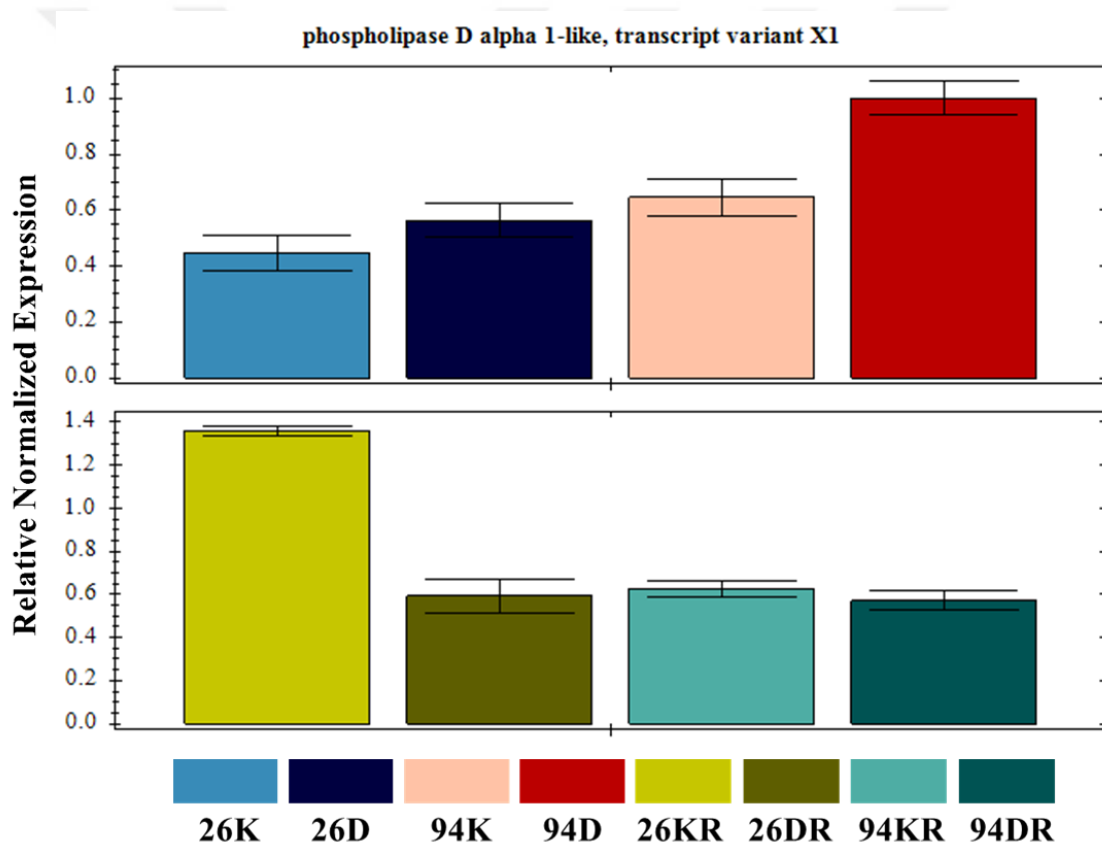
3.1.7.2.5 Hücre Duvarı ve Büyüme ile İlişki Genler

Bu grupta hücre yeniden düzenlenmesi ve büyümede rol oynayan; *expansin* (Hücre genişlemesi) ve *phospholipase D alpha 1-like* (Hücre zarı düzenleme) genlerinin kuraklık stresi ile ilişkisi, çeşitler ve deney grupları açısından qRT-PCR ile detaylı olarak analiz edilmiştir.

3.1.7.2.5.1 Hücre Zarı Düzenlemesi ile İlişki Genler

3.1.7.2.5.1.1 *Phospholipase D alpha 1-like, transcript variant X1*

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artma görülürken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 1,5 kat artış tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 3.58).



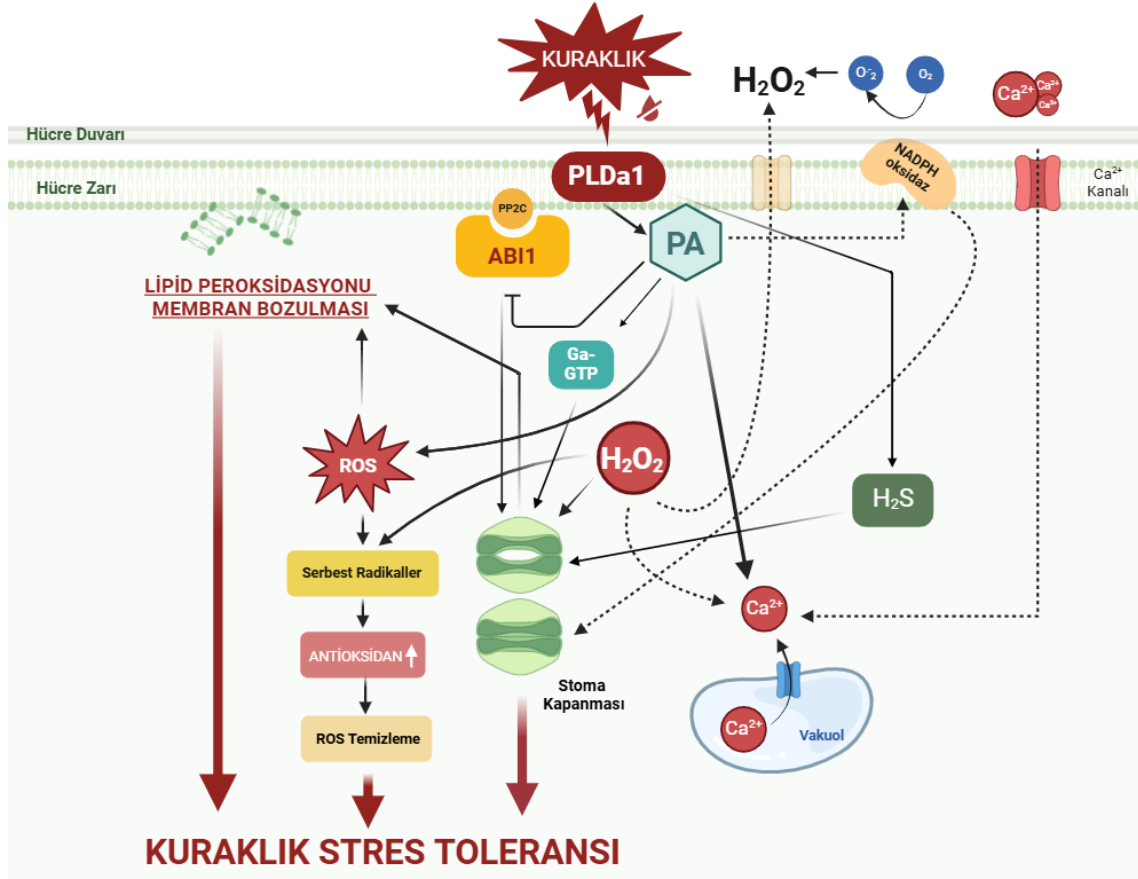
Şekil 3.58 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların phospholipase D alpha 1-like, transcript variant X1 genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Abiyotik ve biyotik strese verilen tepkilerden bitki gelişimine kadar çeşitli bitki süreçlerinde rol oynayan fosfolipaz D (PLD), membran fosfolipidlerini hidrolize ederek

ikincil bir sinyal molekölü olan fosfatidik asit (PA) üretiminde görev almaktadır (Distéfano ve ark., 2015). Yüksek bitkilerde PLD aktivitesinin dehidratasyon, kuraklık ve tuzluluk gibi farklı hiperozmotik stresler altında arttığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2024). Ek olarak PLD'nin prolin, çözünür şeker, çözünür protein ve ozmolit içeriklerini arttırarak iyon sızıntısını azalttığı da tespit edilmiştir (Ji ve ark., 2018).

PLD'ler, bitkinin çevresel streslere yanıtında önemli bir lipid aracı sınıfı olan PA üretimini düzenleyerek ozmotik stres sırasında meydana gelen başlıca membran yeniden düzenlenmesi ve yeniden modelleme olaylarında önemli role sahiptir (Distéfano ve ark., 2015). Ürettiği PA, stres hasarını muhtemelen hafifletmek için sinyali yükselten ikincil bir haberci olarak işlev görerek bazı durumlarda esas olarak membran bozulmasından ziyade stres hasarında rol oynadığı düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2005; Bargmann ve Munnik, 2006). Çevresel stresler sırasında bitki gelişiminin birçok yönünü düzenleyerek bitkinin kuraklık gibi olumsuz koşullarla başa çıkmasını ve hayatta kalmasını sağlayan PLD enzim ailesinin ayırt edilebilir, biyokimyasal, yapısal ve moleküler özelliklere sahip bilinen 12 sınıfı bulunmaktadır (Wang, 2005; Dippe ve Ulbrich-Hofmann, 2009). Bunlardan biri olan PLD α 1'in ABA aracılı stoma kapanmasını teşvik ettiği ve terleme yoluyla su kaybını azalttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2004; Mishra ve ark., 2006). PLD α 1 tarafından üretilen PA, stoma kapanmasında ABA sinyallemede negatif düzenleyici olarak görev yapan bir PP2C olan ABI1'e bağlanmaktadır (Ma ve ark., 2009; Park ve ark., 2009). PLD α 1 ayrıca heterotrimerik G proteininin G α alt birimiyle etkileşime girerek kapalı stomaların açılmasını da önlemektedir (Pandey ve Assmann 2009; Ji ve ark., 2018). Tütün hatlarında *CsPLD α* geninin aşırı ekspresyonunun ABA sentezi ve metabolizması ile ilişkili olarak kuraklık stresinde hızlı stoma kapanmasını düzenlediği ve su kaybını azalttığı tespit edilmiştir (Ji ve ark., 2018). Bir başka çalışmada *PLD α 1*'e sahip *Arabidopsis*'in ABA aracılı stoma kapanmalarına duyarsız olduğu ve yabani tipten (WT) daha fazla su kaybı yaşarken *PLD α 1*'i aşırı ifade eden *Arabidopsis*'in WT ile karşılaştırıldığı zaman bitkinin su kaybının azaldığı tespit edilmiştir (Sang ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2004). *PLD α 1*'in baskılanması, ilerleyici kuraklık stresi altında transkripsiyon, sinyal iletimi, lipid sinyalleme, hormon tepkisi ve metabolizmada yer alan birçok genin ifadesinde değişikliklere neden olmaktadır (Mane ve ark., 2007). *Arabidopsis*'te kuraklık stresine dayanıklılıkta *PLD α 1* ve H₂S arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada kuraklık stresinin *PLD α 1* gen ekspresyonunu indükleyerek

PLD α 1 ve H₂S üretimini desteklediği gösterilmiştir. *PLD α 1* membran lipid peroksidasyonunu, prolin birikimini, H₂O₂ içeriğini ve stoma kapanmasını düzenleyerek bitkinin kuraklığa karşı toleransını arttırdığı belirtilmiştir (Wang ve ark., 2024). *PLD α 1* ve PA, ABA aracılı stoma kapanmasında NADPH oksidaz aktivitesini ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini düzenlemektedir (Zhang ve ark., 2009). PLD α 1'in antisens baskılama veya gen nakavtı (KO) ile susturulması ROS üretimini baskılarken, PA'nın yabancı tip ve PLD α 1 eksikliği olan bitkilerde NADPH oksidaz aktivitesini ve ROS üretimini uyardığı tespit edilmiştir (Sang ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2009). Bu sonuçlar PA-NADPH oksidaz etkileşiminin ABA aracılı ROS üretimi ve stoma kapanması için gerekli olduğunu göstermektedir. Ayrıca PA-ABI1 etkileşiminin ABA kaynaklı ROS üretimi için gerekli olmamasına rağmen stoma kapanması üzerindeki ROS etkisini aracılık etmede önemli olduğunu ileri sürülmektedir. Bu bulgular ayrıca PLD ve PA'nın ABA sinyal ağındaki hücrel düzenleyicileri birbirine bağlayan merkezi lipid habercileri olduğunu açıkça göstermektedir (Hong ve ark., 2010). Şekil 3.59'da PLD'nin bitkideki kuraklık stres yanıtındaki rolleri gösterilmektedir.



Şekil 3.59 Kuraklık stresi altında PLD'nın rolüne ilişkin önerilen model. Bu model yalnızca ABA aracılı stoma kapanmasında bilinen PLD/PA hedeflerini tasvir etmektedir. Diğer ABA düzenleyicileri bu modele dahil değildir.

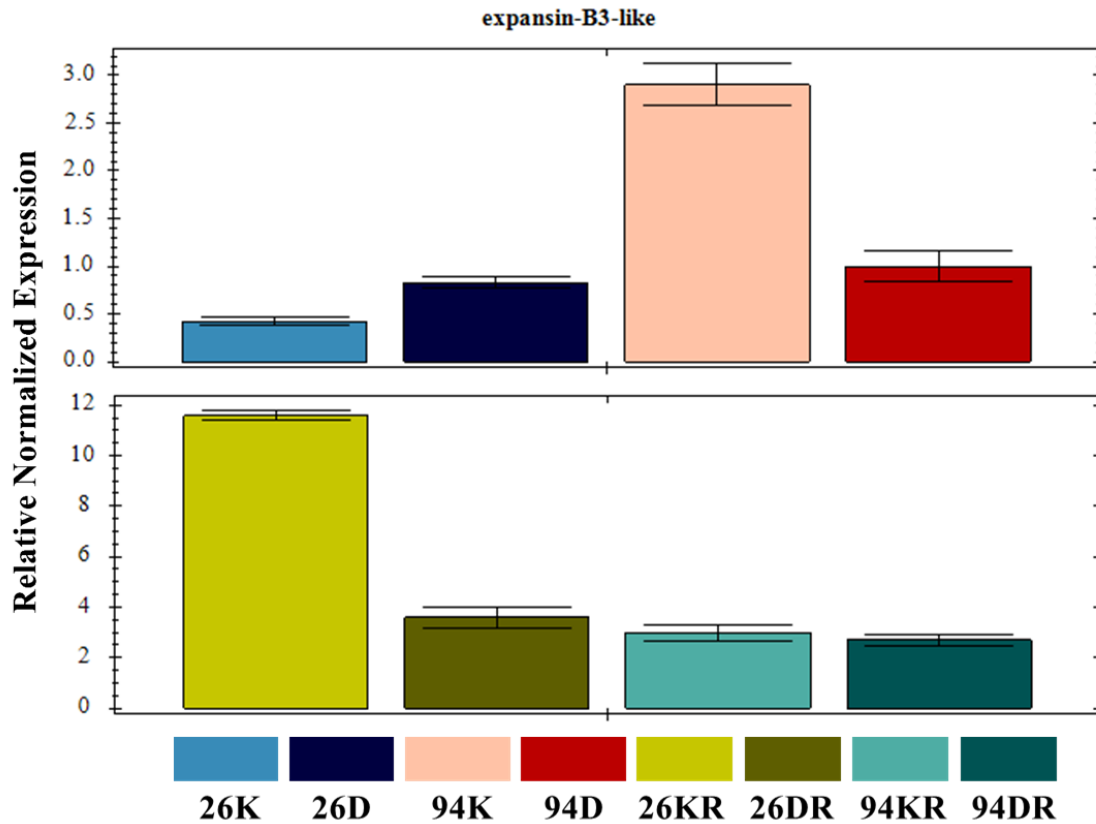
Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde, kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) olmak üzere her iki çeşitte de kuraklık uygulaması sonrası ilgili genin ekspresyon seviyesinde artış tespit edilmiştir. Özellikle toleranslı (Memecik-94) çeşitte bu oran hassas çeşite kıyasla yaklaşık 1,5 kat daha yüksektir. *Phospholipase D alpha 1-like transcript variant X1* geninin kuraklık stresi altında her iki çeşitte de artış göstermesi, ilgili genin bitkinin çevresel strese karşı genel bir yanıtı olarak görev aldığını göstermektedir. Bu durum, bitkinin oluşabilecek stres hasarından en az etkilenmek için geliştirdiği koruma mekanizması olarak açıklanabilir. Elde ettiğimiz veriler literatürle tutarlı olmakla beraber, özellikle toleranslı çeşitte tespit edilen anlamlı ekspresyon artışı, 94 çeşidinin kuraklığa toleranslı olmasını sağlayan stres yanıtında rol oynadığının güçlü bir kanıtı olarak düşünülmektedir. Kuraklığa hassas çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında ilgili genin ekspresyonunun yaklaşık 2 kat azalarak stres öncesi ekspresyon paternine dönmesi, toleranslı çeşidin iyileşme grubunda ise

kuraklık ve kontrol örnekleri için ilgili genin ekspresyonunda hassas çeşide kıyasla daha hızlı bir yanıt geliştirdiği görülmektedir. Bu durum ilgili genin, toleranslı çeşidin savunma mekanizmasında aldığı rolün, bitkide kuraklık stresiyle başa çıkmada daha hızlı stres cevabı vererek kuraklık toleransını etkin kıldığını düşündürmektedir.

3.1.7.2.5.2 Hücre genişlemesi ile İlişki Genler

3.1.7.2.5.2.1 *Expansin B3 like*

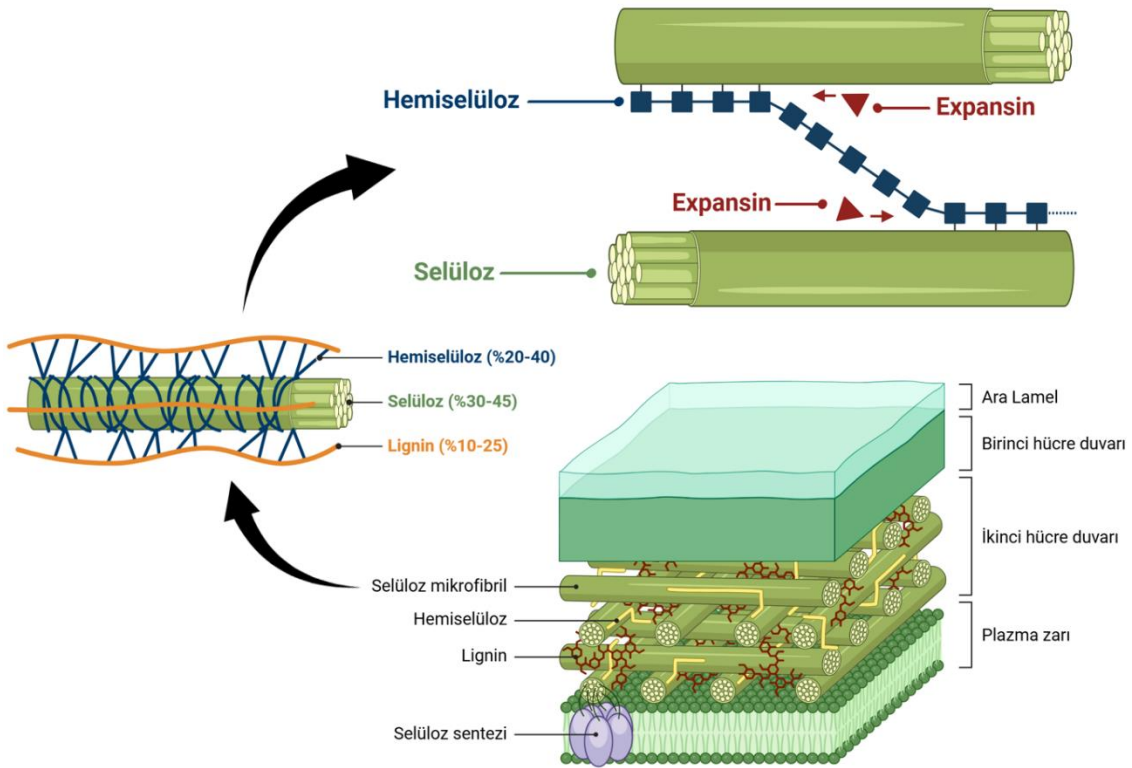
Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 2 kat artış tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşit için kuraklık stresi altında ilgili genin ekspresyonunda yaklaşık 3 kat azalma tespit edilmiştir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) kuraklık stresi altında ilgili geninin ekspresyonunda yaklaşık 4 kat azalma tespit edilirken, toleranslı (Memecik-94) çeşitte iyileşme grubu için ilgili geninin ekspresyonunda anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.60).



Şekil 3.60 Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında kuraklık stres uygulaması (D) ve kuraklık stres

uygulaması sonrası sulama yapılan (R) grupların expansin B3 like genine ait normalize edilmiş gen anlatım grafiği (K:Kontrol).

Ekspansinler, esas olarak selüloz mikrofibrilleri ve matris polimeri arasındaki hidrojen bağlarını gevşeterek bitki hücre duvarının esnekliğini artırmak için kullanılan bir hücre duvarı proteini sınıfıdır (Zhou ve ark., 2015; Abbasi ve ark., 2021). Genom çapında yapılan araştırmalarla bitkilerde dört alt familyayı kapsayan büyük bir ekspansin süperfamilyası keşfedilmiştir. Bunlar ekspansin A (EXPA), ekspansin B (EXPB), ekspansin benzeri A (EXLA) ve ekspansin benzeri B (EXLB) olarak tanımlanmıştır (Lo ve ark., 2015). Bu proteinler, ekstraselüler matristeki selüloz mikrofibrillerinin H-bağlarını enzimatik olmayan pH bağımlı bir şekilde gevşeterek/bozarak hücre şeklini düzenler ve korur (Bordoloi ve ark., 2021). Bu, hücre duvarının ve hücre uzantısının yeniden şekillenmesine ve gevşemesine yol açar (McQueen-Mason ve Cosgrove, 1994; Choi ve ark., 2006). Ekspansin, hücre duvarı üzerindeki doğrudan etkisinin yanı sıra, dolaylı olarak da selüloz enziminin substratla temas etmesi için alan yaratarak, hücre boyutunun artışı için etkili bir şekilde hızlandırmaktadır (Sampedro ve Cosgrove, 2005) (Şekil 3.61).



Şekil 3.61 Bitki hücre duvarının ve ekspansinler tarafından gevşetilmesinin basitleştirilmiş bir modeli.

Ekspansinler, hücre duvarının modifikasyonu, kök kılı büyümesi ve kök gelişimi (Cho ve ark., 2002; Che ve ark., 2016), mikorizal etkileşim ve kök nodülü oluşumu (Balestrini ve ark., 2005; Flemetakis ve ark., 2004), yaprak büyüme ve gelişimi (Goh ve ark., 2012; Kuluev ve ark., 2017), çiçek gelişimi (Saito ve ark., 2015), gövde ve polen tüpü uzaması (Cho ve Kende, 1997; Tabuchi ve ark., 2011), lif gelişimi (Harmer ve ark., 2002), meyve olgunlaşması, gelişimi ve açılması (Palapol ve ark., 2015; Brummell ve ark., 1999), tohum verimi ve çimlenmesi (Chen ve ark., 2016) ve çeşitli biyotik ve abiyotik stres tepkileriyle ilişkili çeşitli biyolojik süreçlerde çeşitli roller oynamaktadırlar (Yang ve ark., 2020).

Günümüzde ekspansin geninin, esas olarak hücre büyümesi ve genişlemesinin düzenlenmesi yoluyla bitkinin abiyotik streslere karşı tolerans geliştirmesinde rol oynadıkları iyi bilinmektedir (Sampedro ve Cosgrove, 2005; Abbasi ve ark., 2021).

Abbasi ve arkadaşları (2021) *Arabidopsis* ekspansin geni *AtEXPA18*'i ifade eden transgenik tütünde (*Nicotiana tabacum* L.) yaptıkları kuraklık stres çalışmasında ilgili genin yüksek ifadesinin bitkide morfolojik özellikleri iyileştirerek, sitokinin içeriğini artırdığı ve hücre genişlemesini teşvik ederek kuraklık toleransını artırdığı tespit edilmiştir. Transgenik tütün (*Nicotiana tabacum* L.) ile yapılan bir başka çalışmada, buğday (*Triticum aestivum* L.) ekspansin geni *TaEXPB23*'ün aşırı ekspresyonunun bitkide daha yavaş su kaybı, daha sağlam hücre yapısı ve su stresi altında daha iyi fizyolojik parametreler sergilemesiyle gelişmiş kuraklık toleransı ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2011). Başka bir çalışmada tütünde (*Nicotiana tabacum*) *GmEXP1* ve buğdayda *TaEXPA2* (*Triticum aestivum* L.) genlerinin aşırı ifadesinin, artan kök büyümesi ve antioksidan kapasite artışı yoluyla kuraklık toleransını iyileştirdiği gösterilmiştir (Lo ve ark., 2015; Yang ve ark., 2020). Barcia ve arkadaşları (2014), buğday (*Triticum aestivum* L.) gelişiminin ilk 4 günündeki su eksikliğinin kök büyümesine etkilerini araştırdıkları çalışmada, su eksikliği altında köklerde iki ekspansin geninin (*TaEXPB8* ve *TaEXPA5*) yukarı düzenlendiğini bulmuşlardır. Benzer şekilde Gao ve arkadaşları (2008), buğday (*Triticum aestivum* L.) ekspansin gen ekspresyon artışının kuraklık stres yanıtında rol oynadığını bildirmişlerdir. Yang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2020), *TaEXPA2*'yi aşırı ifade eden buğday bitkilerinin kuraklığa toleranslı fenotipler sergilerken *TaEXPA2*'nin RNA interferansı (RNAi) tarafından aşağı düzenlenmesinin, kuraklık stresi altında hayatta kalma oranı, fotosentez oranı ve su tutma yeteneği ile ölçülen yüksek

kuraklık hassasiyeti ile sonuçlandığını göstermişlerdir. Ek olarak *TaEXPA2*'nin aşırı ifadesinin antioksidan enzim aktivitesinin yükselmesi ve bazı ROS süpürücü enzimlerle ilişkili gen transkriptlerinin artması yoluyla buğday bitkilerinin antioksidan kapasitesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Daha ileri araştırmalar, *TaEXPA2*'nin kuraklık koşulları altında yanıl kök oluşumunu olumlu etkilediğini ortaya koymuştur.

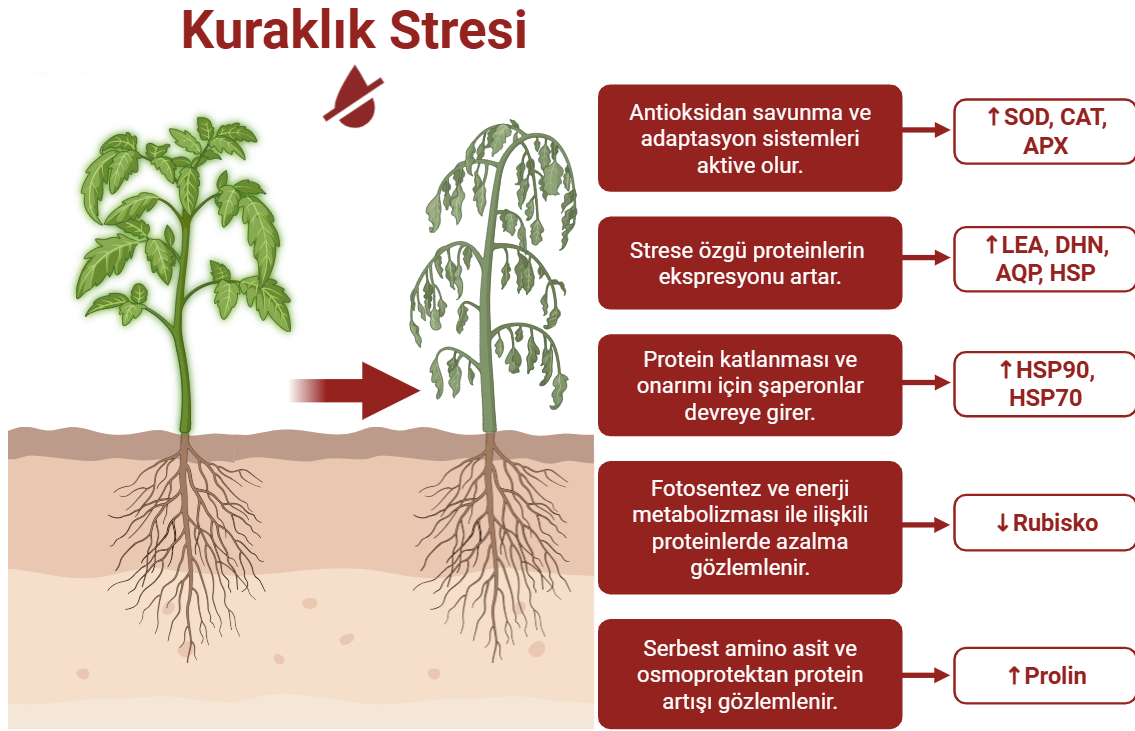
Zhao ve arkadaşları (2011), *AtEXP2*'nin *Arabidopsis*'te tohum çimlenmesi ve abiyotik stres tepkisinde rol oynadığını bildirmiştir. Ek olarak aynı çalışmada kuraklığa toleranslı buğday çeşidinde hassas çeşide kıyasla daha yüksek ekspansin aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Zhou ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada (2015), kuraklığa toleranslı buğday (*Triticum aestivum* L.) ekspansin gen ifadesinin hassas çeşide göre daha yüksek olduğunu ve ilgili genin su stresine karşı yaprak büyümesinde ve stres tepkisinde bir rolü olduğuna dair kanıt sağlamışlardır. Benzer şekilde, sürünen eğrelti otunda (*Agrostis stolonifera*) *AsEXP1* gen ifadesi ile kuraklık toleransı arasında önemli bir korelasyon bulunmuş, ilgili genin ifadesinin kuraklığa dayanıklı bitkilerde gözlemlenirken, kuraklığa hasas bitkilerde gözlemlenmediği tespit edilmiştir (Xiao ve ark., 2010). Dai ve arkadaşlarının gül bitkisi (*Rosa hybrida*) ile yaptıkları başka bir çalışma (2012), *RhEXPA4*'ün aşırı ekspresyonunun su stresi koşulları altında güçlü kuraklık toleransı kazandırdığı ve çiçek açılmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Başka bir çalışmada soya fasulyesinde (*Glycine max*) kuraklık koşullarına yanıt olarak β -ekspansin grubundan *GmEXPB2* geninin, kök uzaması, artan fosfor emilimi ve ozmotik basınç değişiklikleriyle aktive olduğu gösterilmiştir (Guo ve ark., 2011, Zhou ve ark., 2014). Çay bitkilerinde (*Camellia sinensis* L.), tanımlanan 40 ekspansin geninden en az 15'inin kuraklık stresi altında farklı şekilde ifade edildiği bildirilmiştir (Bordoloi ve ark., 2021). Mısırdaki *ZmEXPB2* geninin kuraklık stresi altında DNA metilasyonu ile ilişkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, promotör bölgesinde meydana gelen CG ve CHG bölgelerindeki hipometilasyon ve CHH bölgelerindeki hipermetilasyonun ilgili genin ekspresyonunu ve birincil kök uzunluğunu arttırdığı tespit edilmiştir (Rehman ve ark., 2021).

Elde ettiğimiz validasyon sonuçlarına göre, *expansin B3 like geninin* kuraklığa toleranslı çeşitte (Memecik-94) kuraklığa hassas çeşide (Gemlik-26) göre 6 kat yüksek bir anlatım yaptığı tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman normal koşullar altında ilgili genin kuraklığa toleranslı çeşitte tespit edilen yüksek ifadesi,

kuraklık stresine karşı gösterdiği tolerans mekanizması ile ilişkilendirilebilir. Kuraklık stres uygulaması sonrası kuraklığa hassas çeşitte (Gemlik-26) ilgili genin ifadesinde tespit edilen yaklaşık 2 katlık artış, bitkide bir savunma mekanizması olarak ilgili gen ve bu genin etki ettiği yolların kuraklık stres yanıtında rol oynadığını düşündürmektedir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) tespit edilen ilgili geninin ekspresyonundaki yaklaşık 4 katlık azalma ise hassas çeşitte bitki normalizasyonunun hızlı gerçekleştiğini göstermektedir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) çeşitte stres uygulaması sonrası sulama yapılan iyileşme gruplarında (R) gözlemlenen kuraklık stres uygulaması öncesine benzer gen ekspresyon paterni, kuraklık stresi süresince azalan gen ifade eğiliminin stresin ortadan kalkması durumunda hızlı normalize olduğunu göstermektedir.

3.2. PROTEOMİK ANALİZ SONUÇLARI

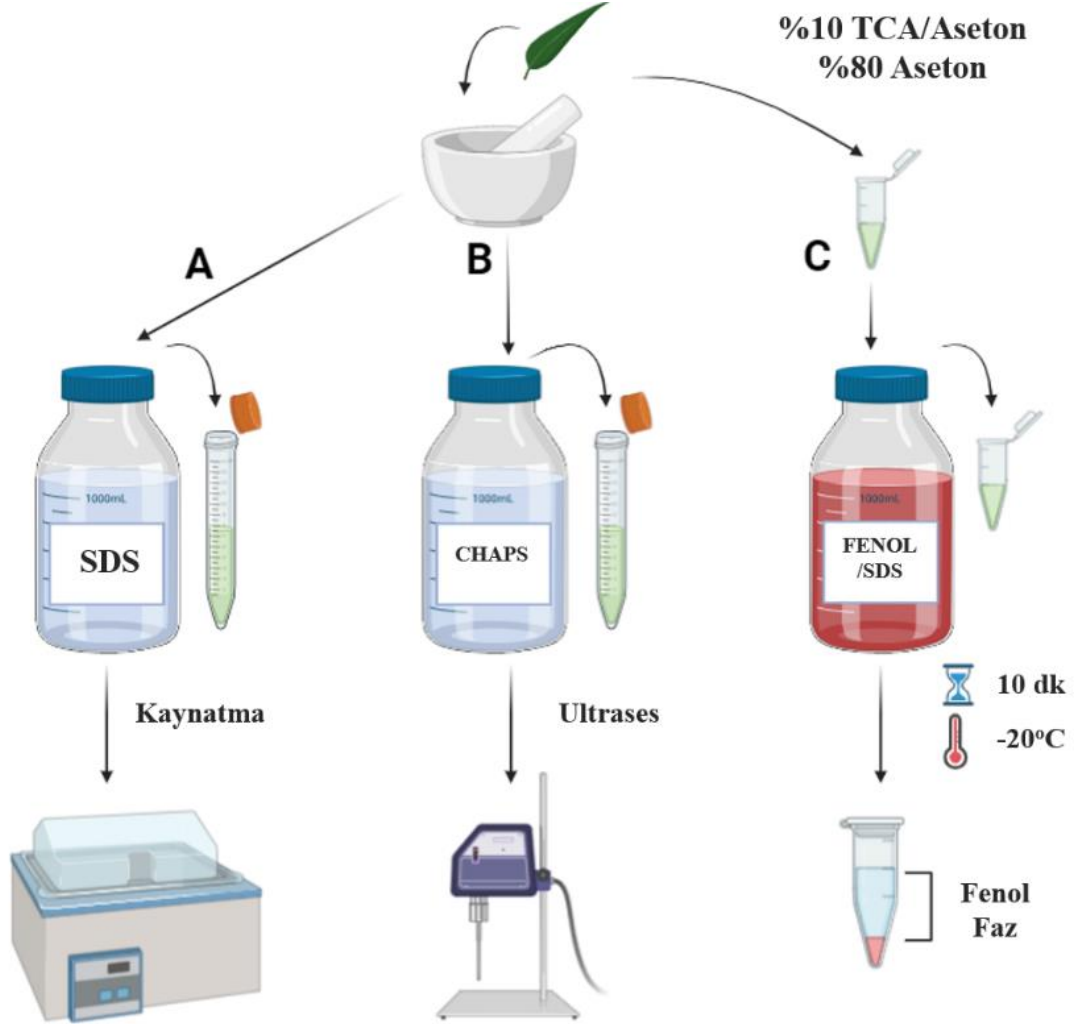
Kuraklık stresi, bitkilerin su dengesini sağlama ve hayatta kalma yeteneklerini zorlayan çevresel bir faktördür. Bu stres koşullarında, bitkiler çeşitli proteinler kullanarak su kaybını minimize eder ve içsel su dengesini korur. Kuraklık stresi bitkilerde, kuraklığa duyarlı genler tarafından kodlanan proteinler tarafından çeşitli fizyolojik ve moleküler tepkileri tetiklemektedir (Şekil 3.62). Kuraklığa duyarlı genler arasında asidik ve hidrofilik proteinlerin baskınlığı, kuraklık stresi sırasında bitkinin protein işlevini sürdürmek için geliştirdiği evrimsel bir adaptasyon olduğunu göstermektedir (Hinch ve Thalhammer, 2012).



Şekil 3.62 Kuraklık stresi altında bitkilerde proteom seviyesinde gelişen başlıca stres cevapları

Zeytin (*Olea europaea*), kuraklık stres koşullarına karşı gelişmiş bir proteomik yapıya sahiptir. Özellikle oleosinler ve depolama proteinleri de dahil olmak üzere çeşitli proteinler içermektedir (Montealegre ve ark., 2014). Bu proteinler zeytin bitkisinin hayatta kalma, büyüme ve gelişme süreçlerinde önemli işlevler üstlenerek çevresel streslere karşı adaptasyonunu sağlamak için kritik öneme sahiptir. (Papadakis ve ark., 2014). Zeytin yaprakları çoğunlukla oleuropein formunda olmakla beraber yüksek (yaklaşık 15-70 mg g⁻¹ arasında) miktarda fenolik bileşik içermektedir (Niaounakis ve Halvadakis, 2006; Briante ve ark., 2002). Bu fenolik bileşikler proteinlerle geri dönüşümsüz kompleksler oluşturarak protein ekstraksiyon ve ayrımını olumsuz yönde etkilemektedir (Vălcu ve Schlink, 2006). Zeytin ile yapılan proteomik çalışmalar, protein ekstraksiyonunun doku homojenizasyonu aşamasında oleuropeinin farklı organellerde bulunan enzimleri (örneğin; glukozidaz) aktive ederek güçlü bir protein denatürasyonuna sebep olduğunu göstermektedir (Konno ve ark., 1999; Wang ve ark., 2003). Bu bilgiler ışığında proteomik çalışmalara başlamadan önce yüksek verimde proteom eldesi için üç farklı ekstraksiyon metodunu kuraklık stresi ile ilişkili olarak detaylıca karşılaştırdık (Şekil 3.63). Bu karşılaştırmada özellikle değerlendirdiğimiz proteinler arasında kuraklık stresi ile ilişkili olduğu bildirilen dehidrin (DHN), geç embriyonez proteinleri (LEA),

akuaporin (AQP), ısı şoku proteinleri (HSP) ve antioksidan proteinler (SOD, CAT, APX, PO) yer almaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar, ekstraksiyon yönteminin protein profili üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır (Mohanta ve ark., 2019).



Şekil 3.63 Protein ekstraksiyon metod optimizasyonunda karşılaştırılan farklı protein ekstraksiyon metotları (A: Kaynatma metodu, B: CHAPS metodu, C: TCA metodu).

3.2.1 Protein Extraksiyonu Optimizasyon Sonuçları

Proteomik çalışmalara başlamadan önce zeytin bitkisinden en verimli şekilde toplam protein elde etmek için üç farklı protein ekstraksiyon metodu (A: SDS metodu, B: CHAPS metodu, C: Fenol/SDS metodu) karşılaştırılmıştır. Elde edilen toplam proteinlerin Qubit® 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazındaki florometrik okumaları sonucu elde edilen konsantrasyon ölçümleri Tablo 3.17’de verilmiştir.

Tablo 3.17 Karşılaştırması yapılan üç protein ekstraksiyon yönteminden elde edilen proteinlerin Qubit florometrik okumaları (A: Kaynatma Metodu, B: CHAPS Metodu, C: TCA Metodu).

Örnek Adı	$\mu\text{g ml}^{-1}$	$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$
A1	20.2	2020
A2	> 26	Çok yüksek
A3	24.9	2490
A4	20.7	2070
A5	23.1	2310
A6	> 26	Çok yüksek
B1	8.02	802
B2	4.71	471
B3	4.79	479
B4	8.63	863
C1	3.37	337
C2	2.86	286
C3	< 1	Çok düşük
C4	1.84	184
C5	1.97	197

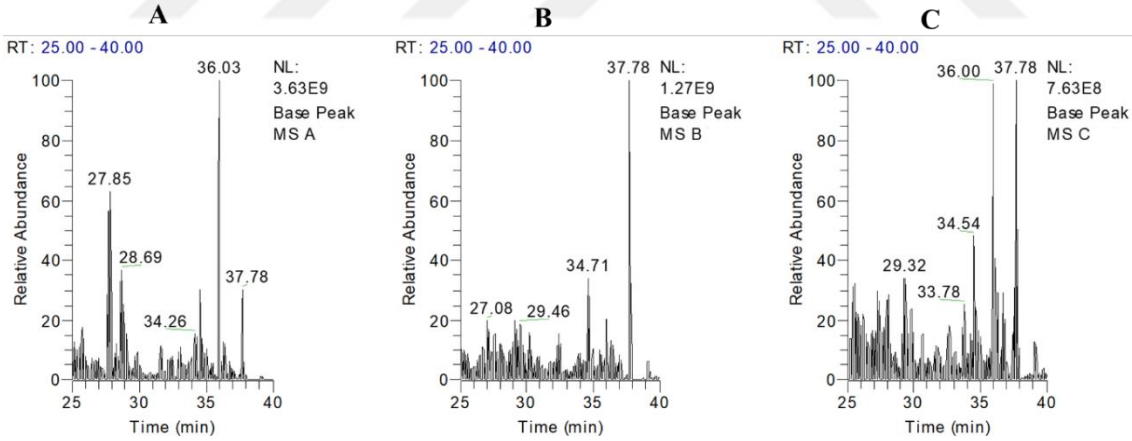
Toplam proteinler filtre destekli örnek hazırlama (FASP) yöntemi kullanılarak çıkarılmış ve ardından tripsin sindirimi sonucunda elde edilen peptitler, üç ekstraksiyon metodu için aynı gradyan kullanılarak LC-MS/MS analizine tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon metodlarına ait protein sayısı, peptit grubu ve peptit sekans tespit edilerek veriler arası karşılaştırma yapılmıştır. Sequest HT taraması sonucunda 2259 protein grubu, 5751 peptid grubu, 74797 PSM (Tespit edilen toplam peptit sayısı; peptide spectrum matches) ve 2566/6315 anotasyon protein grubu tespit edilmiştir.

LCMS/MS sonuçlarına göre 3 farklı protein ekstraksiyon metodundan elde edilen protein, peptit grubu, peptit sekansı ve ham protein verimi karşılaştırılarak ekstraksiyon yöntemlerinin verim ve etkinliği değerlendirilmiştir. Üç ekstraksiyon metodunun kantitatif karşılaştırmaları sonucunda Protokol A'dan en yüksek verim elde edildiği tespit edilmiştir (Tablo 3.18).

Tablo 3.18 Zeytin yaprağının üç ekstraksiyon yöntemi için protein, peptit grupları, peptit sekansları ve ham protein verim karşılaştırılması (FW = taze ağırlık). A) Protokol A-SDS, B) Protokol B-CHAPS ve C) Protokol C-Fenol/SDS.

Liziz Tamponu	Protein	Peptit Grupları	Peptit Sekansları	Ham protein verimi (mg protein/g FW)
A - SDS	2196	5600	4928	222,25
B - CHAPS	2028	5020	4466	77,15
C - Fenol/SDS	2061	5108	4555	16,715

Çalışmanın devamında protein ekstraksiyon metod optimizasyonu için seçilen üç metod ile elde edilen peptitlerin LC-MS baz tepe kromatogramları oluşturulmuştur. Her yöntemden elde edilen baz tepe kromatogramları (BPC'ler) genel olarak benzer profiller göstermiştir. Ancak daha yakından incelendiğinde, özellikle Protokol A'da 40 dakikalık gradyanın son 15 dakikasında belirgin bir yoğunluk artışı gözlemlenmiştir (Şekil 3.64). Protokol A'daki bu artan yoğunluk, gradyanın son segmentinde daha fazla hidrofobik peptidin elüe edildiğini göstermektedir. Üç protokol için de aynı gradyanın kullanıldığı göz önüne alındığında, gözlemlenen farklılıklar her protokol tarafından çıkarılan protein içeriğindeki farklılıklara dikkat çekmektedir.



Şekil 3.64 Protein ekstraksiyon metod optimizasyonu için seçilen üç metod ile elde edilen peptitlerin LC-MS baz tepe kromatogramları; A) Protokol A-SDS, B) Protokol B-CHAPS ve C) Protokol C-Fenol/SDS. Tutma süresi 25-40 dakika olup hidrofobik peptitleri vurgulamaktadır.

Zeytin bitkisi (*Olea europaea* L.), hem hidrofilik (suda çözünebilir) hem de hidrofobik (suda çözünmeyen) proteinleri içeren karmaşık bir protein yapısına sahiptir. Bu

proteinler, bitkinin fizyolojik süreçlerinde ve çevresel streslere karşı savunmasında önemli roller oynamaktadır (Tablo 3.19).

Tablo 3.19 Kuraklık stresi ile ilişkili bitki hidrofilik ve hidrofobik proteinlerinin işlevleri.

Protein Özelliği	Protein Grubu	Protein Sembölü	Kuraklık Stresindeki Rolü	Kaynak
Hidrofilik Proteinler	LEA Proteinleri	LEA1, LEA2, LEA3	Kuraklık stress koşullarında zar ve proteinleri stabilize ederek hücre içi su tutulumunu sağlar.	Sezer, 2024
	Dehydrins (DHNs)	DHN1, DHN2	Dehidrasyon sırasında proteinleri korur. İyon bağlama ve su tutma özellikleri vardır.	Riyazuddin ve ark., 2022
	Antioksidan Enzimler	SOD, CAT, APX	ROS (reaktif oksijen türleri) birikimini engelleyerek hücre yapısını korur.	Apel ve Hirt, 2004
	Akuaporinler	PIP1, PIP2, TIP	Suyun hücre zarından geçişini düzenler ve su dengesini sağlar. Bazıları çeşitleri stres koşullarında inhibe edilir.	Maurel ve ark., 2015
	Isı Şok Proteinleri (HSPs)	HSP70, HSP90, sHSP	Protein katlanmasını düzenler ve stres koşullarında hücrel dayanıklılığı artırır.	Hu ve ark., 2022
	Transkripsiyon Faktörleri (TFs)	DREB, bZIP, NAC, MYB	Stresle ilgili genlerin ifadesini düzenler.	Man ve ark., 2021
Hidrofobik Proteinler	PR Proteinleri (Pathogenesis-Related)	PR-1, PR-2, vb.	Kuraklık ve diğer çevresel streslere karşı savunma mekanizmalarını güçlendirir.	Islam ve ark., 2023
	Oleosin	Oleosin	Yağ damlacıklarının stabilitesini sağlayarak su kaybını engeller.	Nishiyama ve ark., 2021
	Lipid Transfer Protein (LTP)	LTP1, LTP2	Lipidlerin hücre zarları arasında taşınmasını sağlayarak hücre zarının stabilitesini artırır.	Neuman ve ark., 2022
	Keratin	-	Bitkinin yapısal dayanıklılığını artırır ve su kaybını engeller.	Tantamacharik ve ark., 2022
	Glutenin ve Gliadin	-	Depo proteinleri olarak enerji sağlar ve kuraklık stresine karşı hayatta kalmayı kolaylaştırır.	Iwaki ve ark., 2021
	Plastoglobulin	-	Lipid metabolizmasında rol oynar ve bitkinin enerji depolama kapasitesini artırır.	Jan ve ark., 2023
	GPCR (G-protein-coupled receptors)	GPCR	Hücre zarındaki geçirgenliği düzenler ve kuraklık sırasında su kaybını engeller.	Baccouch ve ark., 2022

Hidrofilik proteinler, su ile etkileşime giren ve genellikle polar veya iyonik gruplar içeren amino asitler barındırarak özellikle kuraklık gibi stres koşullarında, suyun hücre içi taşınmasını ve düzenlenmesini sağlayarak bitkinin su dengesini düzenlemektedir (Kumar ve ark., 2013; Alberts ve ark., 2002). Çoğunlukla zeytin meyvesinin sulu fazında yer alan bu proteinlerin önemli bir kısmı enzimatik özellik göstermektedir. Örneğin, peroksidaz (POD) ve polifenol oksidaz (PPO) gibi enzimler fenolik bileşiklerin oksidasyonunda rol

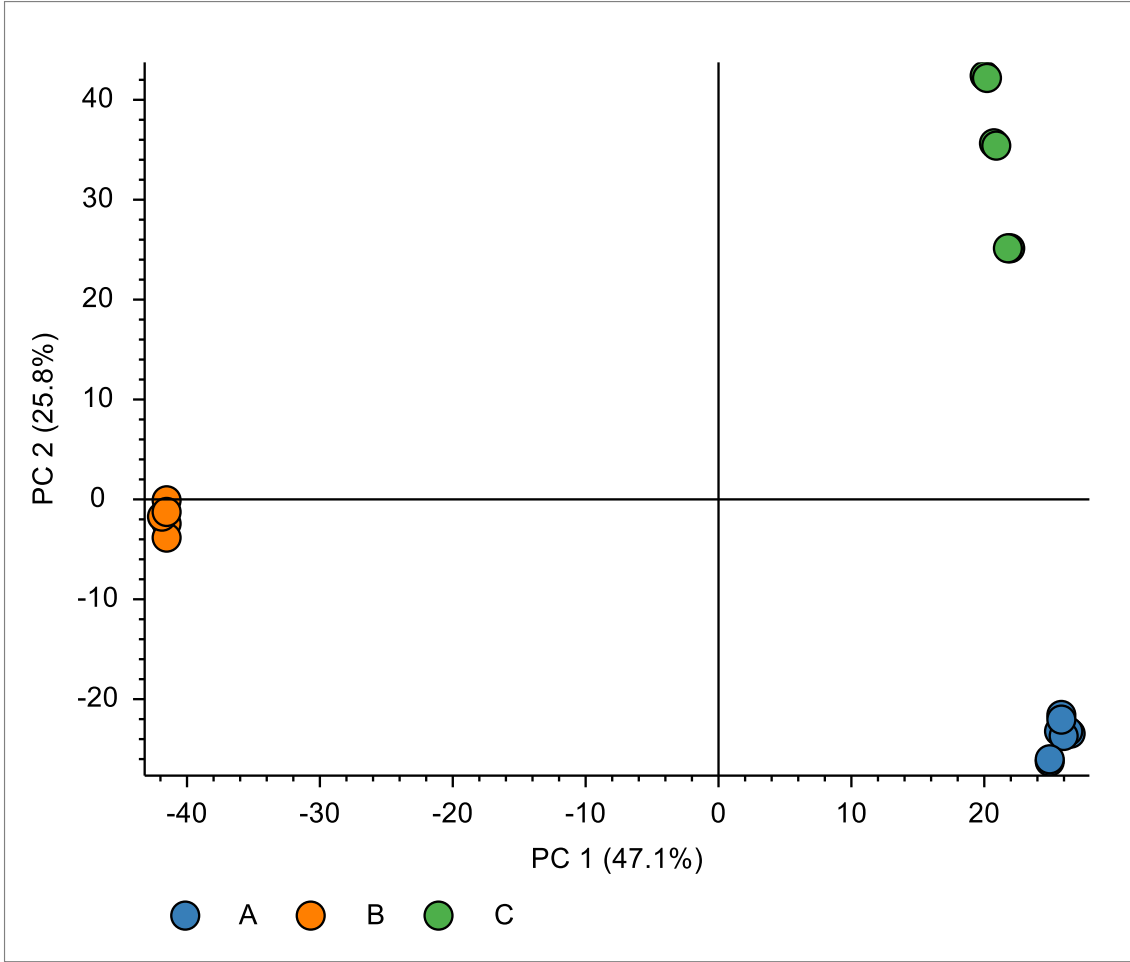
olarak zeytinin rengini, dokusunu ve antioksidan kapasitesini etkilemektedir (Kalogeropoulos ve ark., 2010; Cecchi ve ark., 2019). Bu proteinler arasında bitkilerin kuraklık stres koşullarına karşı tepkisinde önemli rol oynayan dehidrinler (DHN), akuaporinler (AQP), ve ısı şoku proteinleri (HSP) öne çıkmaktadır. Gemlik zeytin çeşidinde yapılan bir çalışmada, düşük sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde çözünebilir protein seviyelerinde artış gözlemlenmiş ve bu artışın dehidrin proteinlerinin senteziyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Cansev, 2008). Bir başka çalışma zeytin bitkisinden izole edilen bir dehidrin geninin (*OesDHN*), model bitki *Arabidopsis thaliana*'da kuraklık toleransını artırdığı gösterilmiştir (Chiappetta ve ark., 2015). Yapılan bir başka çalışmada zeytin bitkisinde, plazma membranı ve tonoplastta lokalize olan üç akuaporin geni (*OePIP1.1*, *OePIP2.1* ve *OeTIP1.1*) izole edilmiş ve fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir. Bu proteinlerin, bitkinin su dengesinin düzenlenmesinde kritik rol oynadığı belirlenmiştir (Secchi ve ark., 2007). Zeytin ile yapılan bir başka çalışmada ise HSP70 gibi ısı şoku proteinlerinin yüksek sıcaklık ve kuraklık gibi stres koşullarında proteinlerin doğru katlanmasını sağlayarak hücresel dayanıklılığı artırdığı belirtilmiştir (Hernández ve ark., 2011).

Hidrofobik proteinler ise apolar (suya karşı itici) yan zincirlere sahip olan proteinlerdir ve genellikle lipid ortamlarında çözünerek kuraklık koşullarında bitkilerin su kaybını minimize etmelerine yardımcı olmaktadır (Alberts ve ark., 2002). Bu proteinler genellikle zeytinin lipid fazına bağlı olduklarından ekstraksiyonları zor olmakla beraber zeytin meyvesinin hücre zarı bütünlüğü, su itici özellikleri ve mekanik dayanıklılığı açısından kritik öneme sahiptir (Marrero ve ark., 2024; Psomiadou ve Tsimidou, 2002). Bu proteinler içerisinde zeytin tohumlarında bulunan oleosinler, yağ damlacıklarının stabilizasyonunda ve yağların depolanmasında önemli rol oynamaktadır. Bu proteinler, yağ-su arayüzeyinde bulunarak yağ damlacıklarının bir araya gelmesini engelleyerek yağların depolanmasını düzenlemektedir. Bu özellikleri kuraklık stresi altında zeytin bitkisinin su kaybını önleyerek enerji depolama süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır (Munné-Bosch, 2005). Zeytin proteomundaki lipid transfer proteinleri (LTP) de, hücre zarları arasında lipidlerin taşınmasını sağlayarak zar stabilitesini arttırmakta ve çevresel streslere karşı bitkinin dayanıklılığını güçlendirmektedir (Sharma ve ark., 2023). Zeytin PR (Pathogenesis-Related) proteinlerinin de hastalıklara karşı savunma sağlarken,

kuraklık gibi abiyotik stres koşullarına karşı da önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Van Loon ve ark., 2006; Zhou ve ark., 2020).

Hidrofobik etkileşimlere dayalı peptitleri ayırmadaki etkinliğiyle bilinen Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC), Protokol A'nın hidrofobik, protokol B ve C'nin hidrofilik proteinleri çıkarma ve tutmada daha verimli olabileceğini göstermiştir. Literatürde bildirilen kuraklık ile ilişkili proteinler açısından değerlendirildiği zaman özellikle de geç embriyogenez (LEA) proteinleri, dehidrinler (DHN), ısı şoku proteinleri (HSP), akuaporinler (AQP), osmotin ve osmoproteinler, antioksidan enzimler ve transkripsiyon faktörlerinin (TF) hidrofilik özellik taşıdığı görülmektedir. Bu durum B ve C protokollerinin kuraklık stresi ile ilişkili proteinleri saptama konusunda daha etkili olabileceğini göstermektedir.

Kromatografik analizlerden elde edilen sonuçlara göre üç farklı protein ekstraksiyon metodu ve biyolojik tekrarlarına ilişkin Temel Bileşen Analizi - PCA (Principal component analysis) puan grafikleri protein ve peptit grupları seviyelerinde Thermo Proteome Discoverer 2.4. yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur. Temel Bileşen Analizi (PCA) puan grafiğinden elde edilen sonuçlara göre her bir ekstraksiyon metoduna ait protein ve peptit gruplarının ayrı gruplanarak tekrarları arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.65).

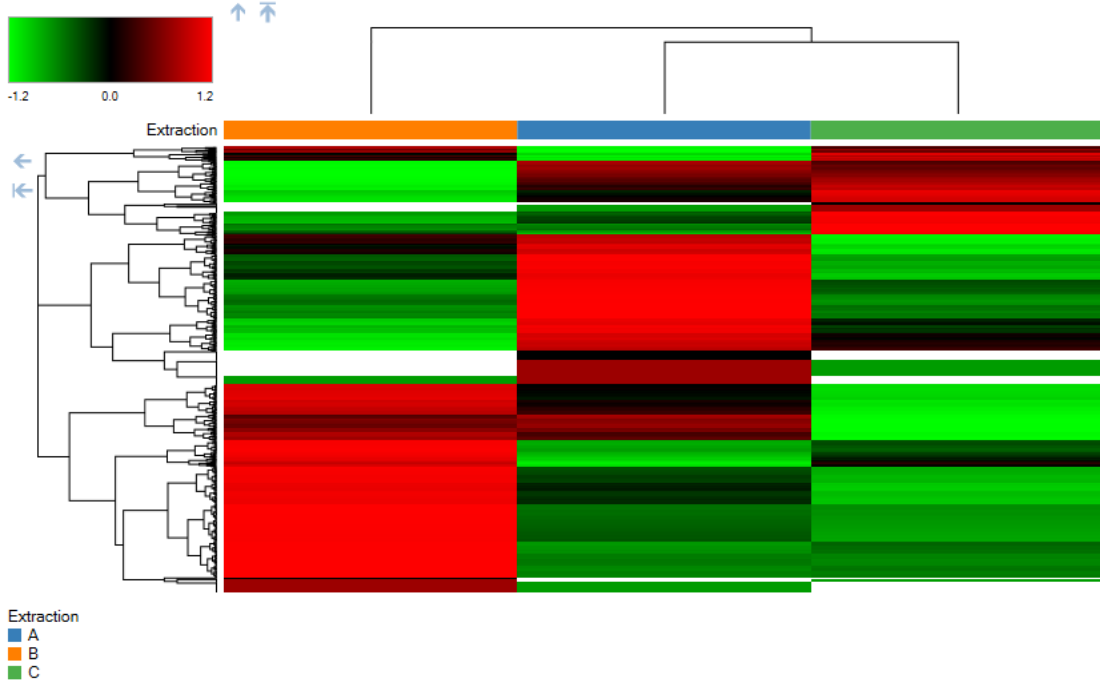


Şekil 3.65 Üç ekstraksiyon metodu için protein (X) ve peptit grupları (Y) seviyesinde oluşturulan Temel Bileşen Analizi (PCA) puan grafiği (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).

Üç farklı protein ekstraksiyon metodu ve biyolojik tekrarları için farklı anlatım yapan proteinlerin ve peptit gruplarının sayısını göstermek üzere Thermo Proteome Discoverer 2.4. yazılımı kullanılarak ısı haritası oluşturulmuştur (Şekil 3.66). Oluşturulan ısı haritasında, yeşil satırlar azalış gösteren proteinleri temsil etmekteyken kırmızı satırlar artış gösteren proteinleri göstermektedir. Gri gölgeleme ise proteinin tespit edilmediğini belirtmektedir. Isı haritasındaki veriler, her ekstraksiyon koşulu için üç tekrarı temsil etmektedir. Satırlar LC/MS-MS tarafından tanımlanan spesifik bir proteini temsil etmekteyken sütunlar ise tüm örnekler için bağımsız bir analizi görüntülemektedir.

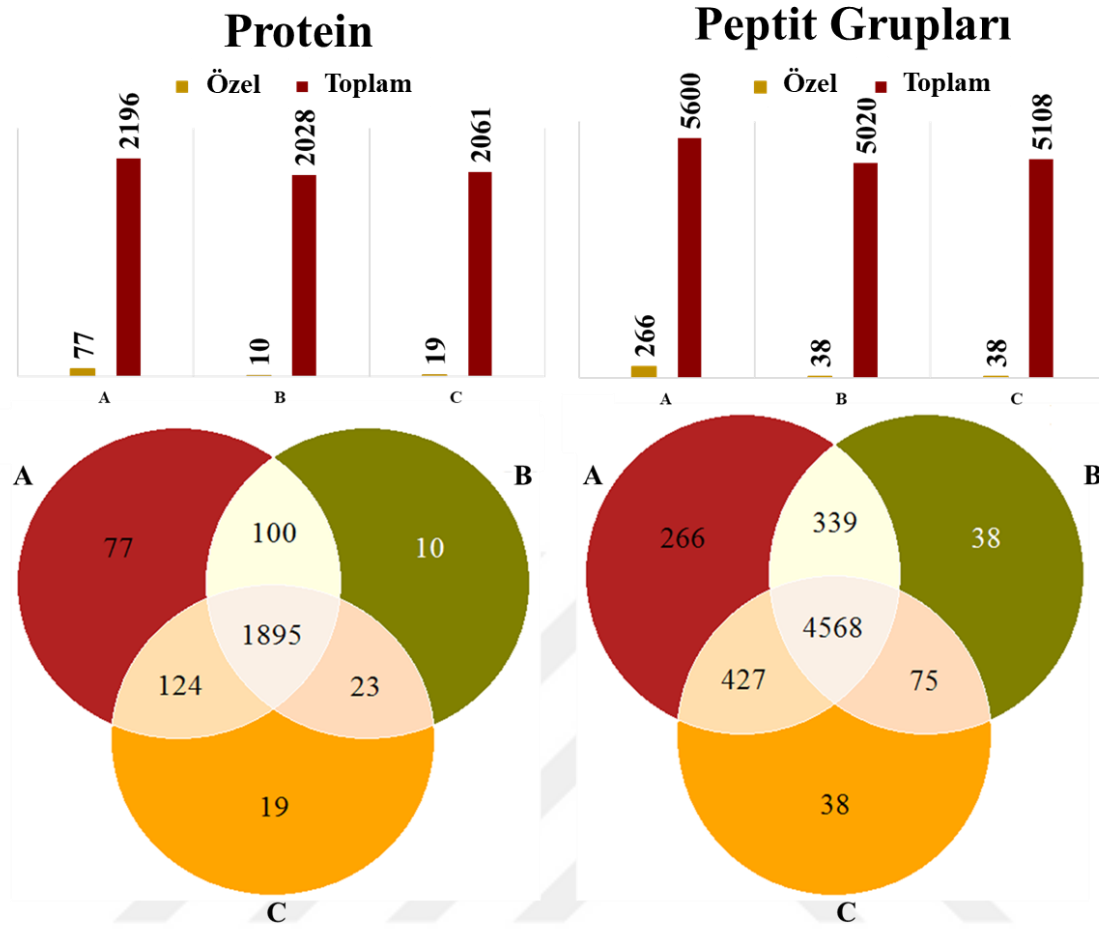
Protokoller karşılaştırıldığı zaman Protokol A ve B'nin yüksek oranda artış ve azalış gösteren proteinleri karakterize etmedeki rollerinin yüksek olduğu görülmektedir. Protokol A ve B farklı kapsama alanlarına sahip olmakla birlikte Protokol B, yüksek oranda artış gösteren proteinleri daha fazla tespit edebilmektedir. Bunun aksine, Protokol

C ağırlıklı olarak yeşil bölgeler göstermekte ve bu da Protokol A ve B'ye göre yüksek oranda azalış gösteren proteinleri daha fazla tespit edebilmekte olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 3.66 Üç ekstraksiyon protokolü için farklı şekilde ifade edilen proteinleri gösteren ısı haritası (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).

Farklı ekstraksiyon metotları kullanılarak elde edilen benzersiz protein ve peptit profillerini daha detaylı anlamlandırmak için Venn diyagramları oluşturulmuştur (Şekil 3.67). Venn diyagramları, her protokolde tanımlanan protein ve peptit gruplarını göstermektedir. Protokol A 77 proteini benzersiz bir şekilde tanımlarken Protokol B 10 ve Protokol C 19 benzersiz proteini tanımlamıştır. Bu durum, Protokol A'nın Protokol B ve C'ye kıyasla çeşitli protein türlerini çıkarmada daha geniş bir erişime sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, peptit grupları analizi sonuçları Protokol A'nın 266, Protokol B ve C'nin 38 peptit grubunu benzersiz bir şekilde tanımladığını göstermiştir. Saptanan benzersiz peptit sayısındaki bu önemli fark, Protokol A'nın derinlemesine proteomik analiz için kritik olan kapsamlı peptit grubu setini çıkarma ve korumada daha verimli olduğu fikrini daha da desteklemektedir.

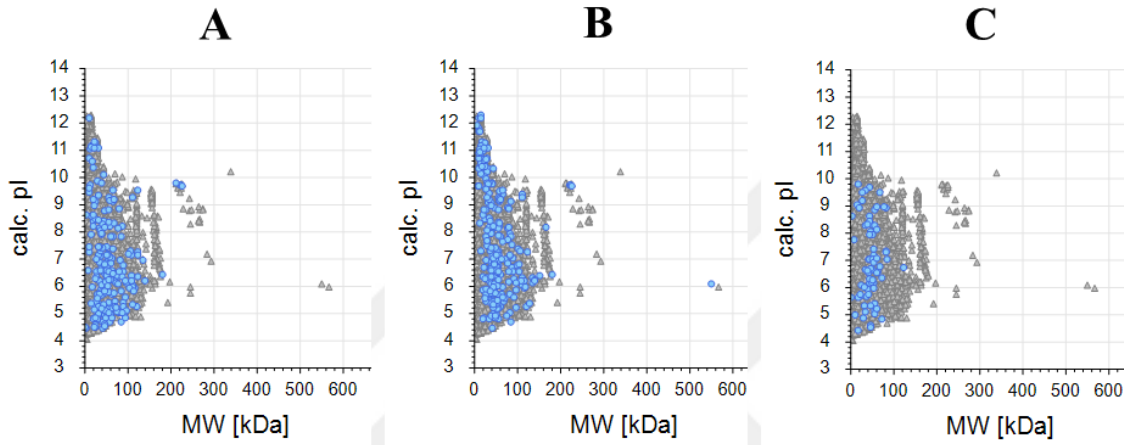


Şekil 3.67 Üç ekstraksiyon protokolü kullanılarak elde edilen protein profillerini temsil eden Venn diyagramları (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).

Ayrıca proteinlerin moleküler ağırlık (MW) ve izoelektrik nokta (pI) dağılımlarına ilişkin ek bilgi sağlamak için dağılım grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.68). Özellikle, Protokol A'da Protokol B'ye kıyasla 2 kattan fazla bolluğa sahip 245 protein ($\log_2$ FC: 1, $P < 0,05$, $FDR < \%1,0$) Şekil 3.68 A grafiğinde gösterilmiştir. Benzer şekilde, Şekil 3.68 B grafiği, Protokol A'da Protokol C'ye kıyasla 2 kattan fazla bolluğa sahip 216 proteini gösterirken Şekil 3.68 C grafiği, Protokol B'de Protokol C'ye kıyasla 2 kattan fazla bolluğa sahip 75 proteini vurgulamaktadır.

Bu dağılım grafiklerinde, mavi noktalar farklı şekilde ifade edilen proteinleri temsil ederken, gri noktalar tüm proteinlerin dağılımını göstermektedir. Dağılım grafikleri, Protokol A'da B ve C'ye kıyasla protein sayısının daha fazla olmasına rağmen, moleküler ağırlığa veya izoelektrik noktaya dayalı önemli bir kümelenme olmadığını ortaya

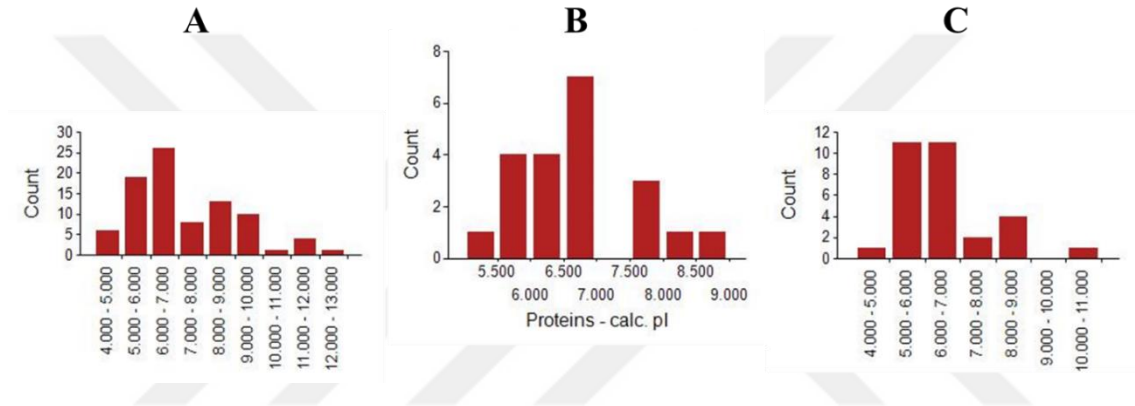
koymuştur. Bu durum, Protokol A ile tespit edilen farklı bolluktaki proteinlerin, belirli bir aralıkta belirli bir konsantrasyon olmaksızın, geniş bir MW ve pI değeri aralığına dağıldığını göstermiştir. Benzer şekilde, Protokol C ile karşılaştırıldığında Protokol B'deki farklı bolluktaki proteinler de MW ve pI değerlerinde geniş bir dağılım göstermekte ve bu da ekstraksiyon metodlarının belirli MW veya pI özelliklerine sahip proteinleri tercih etmediğini göstermektedir. Dağılım grafikleri tüm metodların geniş ve çeşitli bir proteomik profili yansıttığını vurgulamaktadır.



Şekil 3.68 Protein bolluğuna dayalı farklı ekspresyonlu proteinlerin moleküler ağırlığını (MW) ve izoelektrik noktasını (PI) temsil eden dağılım grafikleri (log2 FC: 1, P < 0,05, FDR < %1,0). A) Protokol A'da Protokol B'ye kıyasla 2 kattan fazla bolluğa sahip 245 protein B) Protokol A'da Protokol C'ye kıyasla 2 kattan fazla bolluğa sahip 216 protein, C) Protokol B'de Protokol C'ye kıyasla 2 kattan fazla bolluğa sahip 75 protein.

Ek olarak, analiz sonuçlarına göre farklı şekilde ifade edilen proteinlerin izoelektrik noktalarının (pI) dağılımını temsil eden histogram grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.69). Yöntem A ile elde edilen proteinlerin pI dağılımı oldukça geniş bir aralığa yayılmış olup, 4.0 ile 13.0 arasında değişmektedir. En yoğun dağılım 6.0–7.0 aralığında gözlemlenmiştir. Bu durum, bu yöntemin hem asidik hem de bazik karakterde proteinleri etkili bir şekilde çözebildiğini ve yüksek çeşitlilikte protein elde edilebildiğini göstermektedir. pI değeri 7'ye yakın olan proteinlerin çoğunlukta olması, bu ekstraksiyon yönteminin hücrede yaygın bulunan nötr karakterli proteinleri tercihi olarak izole ettiğini düşündürmektedir. Yöntem B ile izole edilen proteinlerin pI değerleri 5.5 ile 9.0 arasında sınırlı kalmıştır. En yüksek yoğunluk 6.5–7.0 aralığında gözlenmiş olup, daha dar bir pI spektrumuna sahiptir. Bu da yöntemin özellikle orta pH aralığında çözünür olan proteinlere yönelik daha seçici olduğunu göstermektedir. Yöntemin sınırlı protein

çeşitliliği sunduğu, ancak spesifik bazı protein gruplarının (örneğin hücre iskeleti proteinleri veya bazı enzimler) zenginleştirilmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Yöntem C ile elde edilen proteinlerin pI dağılımı 4.0–11.0 arasında değişmekte olup, iki belirgin pik noktası bulunmaktadır: 5.0–6.0 ve 6.0–7.0 aralıklarında. Bu durum, bu yöntemin özellikle hafif asidik karakterdeki proteinleri daha etkili çözdüğünü göstermektedir. Diğer yöntemlere kıyasla, Yöntem C ile bazik (pI > 9.0) proteinlerin ekstraksiyonunun sınırlı olduğu görülmektedir. Bu, yöntemin tampon pH'ı veya ekstraksiyon koşullarına (tuz konsantrasyonu, deterjan tipi vb.) bağlı olarak protein çözünürlüğünü etkilediğini düşündürülebilir.



Şekil 3.69 Farklı ekspresyon metodları ile elde edilen proteinlerin izoelektrik noktalarının (pI) dağılımını temsil eden histogramlar (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).

Proteinlerin izoelektrik noktası (pI), proteinin net elektrik yükü taşımadığı pH olarak tanımlanmaktadır. Kuraklık stresi bağlamında, pI'nin işlevsel önemi, hücre içi su potansiyeli, iyon konsantrasyonu ve pH dinamiklerindeki önemli değişimler nedeniyle özellikle belirgin hale gelmektedir (Wang ve ark., 2003; Ingram ve Bartels, 1996). Proteomik çalışmalar, bitkilerdeki kuraklığa duyarlı proteinlerin genellikle 4,0 ila 10,0 arasında değişen geniş bir izoelektrik noktaya (pI) sahip olduklarını göstermektedir. Bu izoelektrik noktalar proteinlerin çeşitli işlevsel sınıflarını ve hücre altı lokalizasyonlarını yansıtmaktadır (Hossain ve ark., 2013; Sengupta Ghatak ve Ghatak, 2016). Asidik proteinler (pI <7) genellikle sitozol ve vakuolde lokalize olup ozmoprotektan ve ROS temizleyicileri olarak hareket ederken, bazik proteinler (pI >7) sıklıkla çekirdek veya membran bölmeleriyle ilişkili olarak sinyal iletimi ve gen düzenlemesine katılmaktadır.

Glutamik asit ve aspartik asit gibi negatif yükle zenginleştirilmiş asidik pI'lere sahip proteinlerin, pozitif yüklü membran fosfolipitleri ve metal iyonlarıyla etkileşimlerinin daha kolay olduğu bilinmektedir (Close, 1996). Bu etkileşimler, kuraklık kaynaklı ozmotik dengesizlik altında membranları stabilize etmek için önem taşımaktadır. Özellikle zeytindeki geç embriyogenez (LEA) proteinleri, dehidrinler (DHN), ısı şoku proteinleri (HSP) ve antioksidan proteinler (SOD, CAT, APX, PO) gibi kuraklığa duyarlı birçok proteinin stres sırasında çözünürlüğünü koruyarak işlevsel kalmalarını sağlayan asidik izoelektrik noktalar (pI 5.0–6.0) sergilemekte olduğu bilinmektedir (Costa ve ark., 2021; Goyal ve ark., 2005; Battaglia ve ark., 2008). Bu protein özellikleri *Arabidopsis*'te ve kuraklığa toleranslı diğer türlerde de gözlemlenmiş ve korunmuş bir adaptif mekanizmayı vurguladığı bildirilmiştir (Hundertmark ve Hinch, 2008). Dahası, asidik proteinlerin Ca^{2+} ve Zn^{2+} gibi iki değerlikli katyonları şelatlama yeteneği, stres altında iyon homeostazını ve sinyal yollarını düzenleyerek ikincil bir koruma katmanı oluşturduğu da bildirilmiştir (Battaglia ve ark., 2008).

Ek olarak LEA proteinlerinin dehidratasyon sırasında şekerler ve metabolitlerle kolaylaştırılan hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimlerinin, düşük pI değerleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hoekstra ve ark., 2001; Goyal ve ark., 2005). Zeytin bitkilerinde, DHN ve LEA proteinlerinin membran yüzeylerine bağlanıp, lipid çift katmanlarını füzyondan ve sızıntıdan koruyarak kuraklık koşullarında moleküler kalkan olarak rol oynadıkları bildirilmiştir (El Zerey-Belaskri ve ark., 2022; Sun ve ark., 2002; Wang ve ark., 2004). Genellikle stres tepkileri sırasında sitozolik ortamlarla uyumlu olan 5.0–7.5 civarında pI değerlerine sahip ısı şoku proteinleri (HSP) de kuraklık stres koşullarında moleküler şaperonlar olarak işlev görmektedir (Huang ve Xu, 2008).

İzoelektrik nokta ayrıca hücre altı hedeflemeyi ve nükleik asitlerle etkileşimleri de etkilemektedir. DREB, bZIP ve MYB aileleri gibi kuraklık tepkilerinde yer alan birçok transkripsiyon faktörü, hafif bazik pI değerleri (6,5–8,5) göstererek, DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgasıyla elektrostatik etkileşimini kolaylaştırmaktadır (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2007; El Zerey-Belaskri ve ark., 2022). Bu etkileşim kuraklığa duyarlı genlerin promotör bölgelerine etkili bir şekilde bağlanmaları için kritik öneme sahiptir. DNA bağlayıcı rolleriyle tutarlı olarak nükleer lokalize ve orta derecede bazik olma eğiliminde olan DREB ve MYB gibi transkripsiyon faktörleri değişen pI değerleri göstermektedir. Örneğin, zeytindeki DREB1A homologunun tahmini pI değeri ~6.8 iken

Arabidopsis'teki DREB2A'nın pI'si yaklaşık 8,1 (pI 6,5 ile 9,0 arasındadır) olarak bildirilmiştir (El Zerey-Belaskri ve ark., 2022; Lata ve Prasad, 2011).

Suyun hücre zarından geçişini düzenleyerek su dengesini sağlayan aquaporinler (PIP1, PIP2, TIP1, vb.) ise nötr ila hafif alkali aralığında değişken pI değerleri göstermektedir (pI ~6.5–8.0) (Mousavi ve ark., 2019; Johanson ve ve ark., 2001). *Arabidopsis*'teki PIP1;2 pI değerinin 8,5 olduğu bildirilmiş ve benzer şekilde yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz zeytin PIP1-2 pI değerinin 8,6 olduğu tespit edilmiştir (Johanson ve ve ark., 2001). Bu durum kuraklık stresi ile ilişkili olarak OeAQP'nin zarla ilişkili işlevini yansıttığını düşündürmektedir. Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz veriler de geç embriyogenez (LEA) proteinleri, dehidrinler (DHN), ısı şoku proteinleri (HSP) ve antioksidan proteinler (SOD, CAT, APX, PO) gibi kuraklığa duyarlı birçok proteinin stres sırasında çözünürlüğünü koruyarak işlevsel kalmalarını sağlayan asidik izoelektrik noktalar (pI 5.0–6.0) sergilemekte olduğunu göstermektedir. Zeytin aquaporin (AQP) proteini PIP1-2'nin ise hafif bazik pI 8.63 değerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.20).

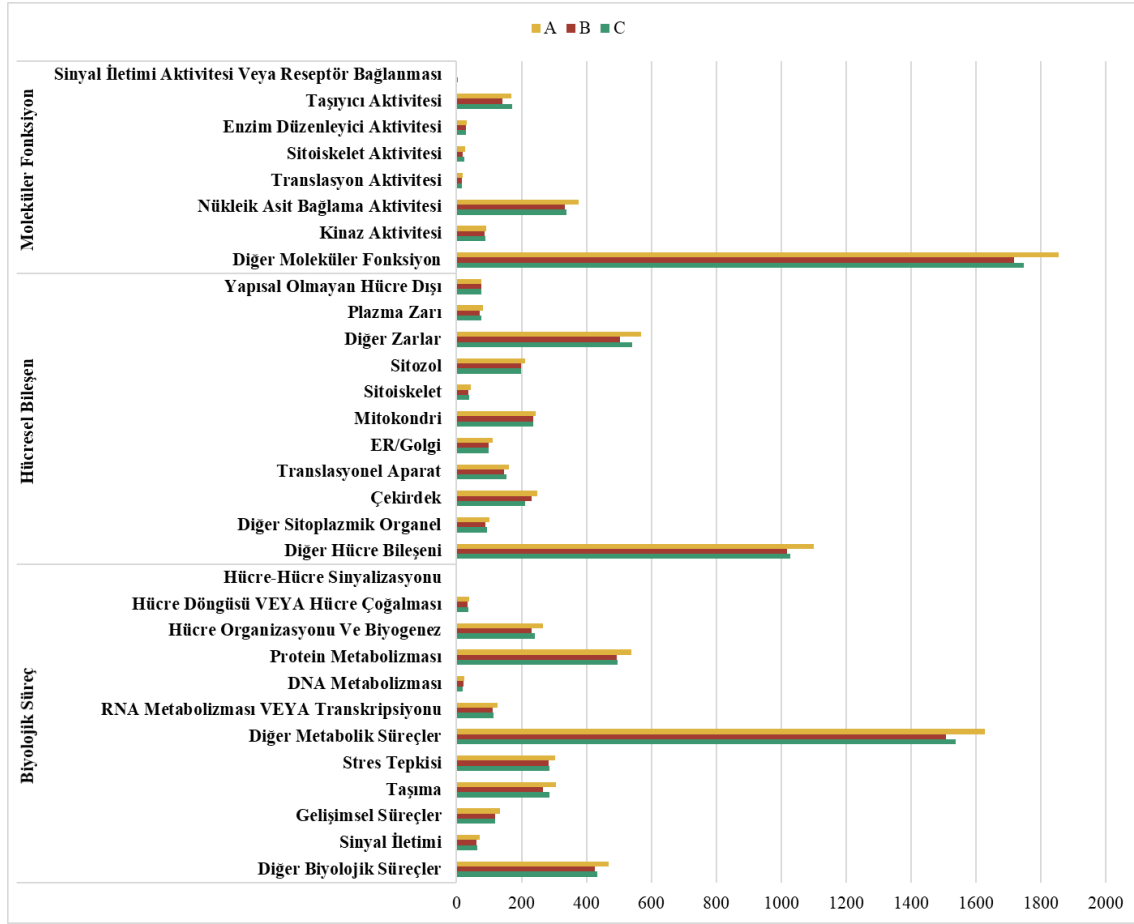
Tablo 3.20 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin bitkisinde tespit edilen kuraklık stresi ile ilişkili proteinlerin moleküler ağırlık ve izoelektrik noktaları.

Protein Sembolü	Erişim Numarası	Tanım	MW [kDa]	calc. pI
DHN	A8CVF3	Dehydrin DHN1 [OS= <i>Avicennia marina</i>]	19.8	6.14
AQP	Q7XSQ9	Probable aquaporin PIP1-2 [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	30.7	8.63
HSP	Q9S7C0	Heat shock 70 kDa protein 14 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	91.7	5.25
	Q9S9N1	Heat shock 70 kDa protein 5 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	70.9	5.41
	Q9STW6	Heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	76.5	5.2
	Q01899	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial [OS= <i>Phaseolus vulgaris</i>]	72.5	6.2
	P09189	Heat shock cognate 70 kDa protein [OS= <i>Petunia x hybrida</i>]	71.2	5.21
	P31170	Heat shock protein 21, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	25.3	8.38
	A2YWQ1	Heat shock protein 81-1 [OS= <i>Oryza sativa</i> Indica Group]	80.1	5.07
	P51819	Heat shock protein 83 [OS= <i>Ipomoea nil</i>]	80.8	5.05
	Q9SIF2	Heat shock protein 90-5, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	88.6	5.01
	P27879	18.1 kDa class I heat shock protein [OS= <i>Medicago sativa</i>]	16.5	5.3
	Q08275	17.0 kDa class II heat shock protein [OS= <i>Zea mays</i>]	17	8.12
	Q0DY72-1	17.8 kDa heat shock protein [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	17.8	7.47
SOD	O49073	Superoxide dismutase [Cu-Zn] [OS= <i>Paulownia kawakamii</i>]	15.2	6.05
	P93258	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 1 [OS= <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	15.2	5.86
	Q8L5E0	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 [OS= <i>Olea europaea</i>]	15.3	6.24
	P93407	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	21.3	6.25
	P35017	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial [OS= <i>Hevea brasiliensis</i>]	25.8	7.65
CAT	P49315	Catalase isozyme 1 [OS= <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>]	55.8	7.18
	P55308	Catalase isozyme 2 [OS= <i>Hordeum vulgare</i>]	56.9	7.08
	P29756	Catalase-1/2 [OS= <i>Glycine max</i>]	56.8	7.27
	O48561	Catalase-4 [OS= <i>Glycine max</i>]	56.7	7.28
APX	Q05431-1	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	27.5	6.13
	Q9FE01	L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	27.1	5.36
	Q42592	L-ascorbate peroxidase S, chloroplastic/mitochondrial [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	40.4	8.28
PO	P84714	Peroxidase [OS= <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>]	4.6	4.61
	P85346	Peroxidase 1 [OS= <i>Cycas revoluta</i>]	1	4.5
	Q96520	Peroxidase 12 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	39.5	8.28
	Q9SD46	Peroxidase 36 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	38.2	5.05
	Q9FLC0	Peroxidase 52 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	34.2	8.31
	Q42578	Peroxidase 53 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	35	4.96

Elde ettiğimiz veriler değerlendirildiği zaman yöntem A'nın geniş bir pI spektrumu ile genel protein ekstraksiyonu için uygun olduğu görülmektedir. Yöntem B, dar bir aralıkta daha homojen proteinler sunarken daha asidik proteinlere karşı seçici bir profil göstermektedir. Yöntem C'nin ise bazik ($pI > 9.0$) proteinlerin ekstraksiyonu için sınırlı olduğu görülmektedir. Bu bulgular, araştırmanın hedeflediği protein sınıfına göre uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi açısından önemlidir. Metod A ve B'nin kuraklık stresi ile ilişkili proteinleri sınıflandırma açısından uygun yöntemler olduğunu göstermektedir.

Üç ekstraksiyon protokolünde farklı anlatım yapan proteinlerin kategorizasyonu için Gen ontolojisi (GO) veri tabanı kullanılmıştır (Şekil 3.70). Bu amaçla hiyerarşik olarak yapılandırılmış üç ana bağımsız alt ontolojiden (biyolojik süreç, hücresel bileşenler ve moleküler işlevler) yararlanılmıştır.

GO analiz sonuçlarına göre biyolojik süreçler alt ontolojisinde A metoduyla tanımlanan proteinlerin tüm yolaklarda en yüksek, B metoduyla tanımlanan proteinlerin ise çekirdek, mitokondri ve yapısal olmayan hücre dışı olayları içeren yolaklarında C'den yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sitozol yolağı için B ve C metodlarından elde edilen proteinlerin eşit sayıda olduğu belirlenmiştir. Hücresel bileşen alt ontolojisinde A metoduyla tanımlanan proteinlerin hücre-hücre sinyal yolağı dışındaki tüm yolaklarda en yüksek, B metoduyla tanımlanan proteinlerin ise DNA metabolizması yolaklarında C'den yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hücre-hücre sinyal yolaklarında ise C metodundan elde edilen proteinlerin A ve B metodlarından yüksek olduğu belirlenmiştir. Moleküler fonksiyon alt ontolojisinde A metoduyla tanımlanan proteinlerin sinyal iletim aktivitesi veya reseptör bağlanması dışındaki tüm yolaklarda en yüksek, B metoduyla tanımlanan proteinlerin ise enzim düzenleyici aktivite ile ilgili yolaklarında C'den yüksek olduğu tespit edilmiştir. Translasyon etkinliği yolağı için B ve C metodlarından elde edilen proteinlerin eşit sayıda olduğu ve sinyal iletim aktivitesi veya reseptör bağlanması yolaklarında C metodundan elde edilen proteinlerin A ve B metodlarından yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.70 Biyolojik süreç, hücrel bileşen ve moleküler fonksiyon için GO verilerini gösteren çubuk grafik (A: Protokol A-SDS, B: Protokol B-CHAPS ve C: Protokol C-Fenol/SDS).

Bu çalışmada, *Olea europaea* L. türüne ait zeytin bitkisinde kuraklık stresine yanıt olarak farklı protein ekstraksiyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bitkinin hem hidrofilik hem de hidrofobik proteinleri içeren karmaşık proteom yapısı, kuraklık gibi çevresel stres faktörlerine karşı çok yönlü bir adaptasyon stratejisi sergilediğini ortaya koymuştur. Hidrofilik proteinlerin (ör. dehidrinler, akuaporinler, HSP'ler) su dengesinin düzenlenmesi ve antioksidatif savunma mekanizmalarında önemli roller üstlendiği belirlenirken; hidrofobik proteinlerin (ör. oleosinler, lipid transfer proteinleri) hücre zarı stabilitesi ve enerji depolanmasında kritik işlevler üstlendiği saptanmıştır. Farklı ekstraksiyon protokollerinin karşılaştırılması sonucunda, özellikle Protokol B'nin hidrofilik ve kuraklıkla ilişkili proteinlerin tanımlanmasında daha etkin olduğu gözlemlenmiştir. PCA, ısı haritası ve dağılım analizleri, her bir protokolün farklı protein alt gruplarını ortaya çıkardığını, ancak Protokol B'nin özellikle asidik pI değerlerine sahip ve hidrofilik özellik gösteren proteinleri daha etkin şekilde ortaya koyduğunu

göstermektedir. Bu bağlamda, kuraklık stresine karşı protein bazlı yanıtların daha iyi anlaşılabilmesi adına B protokolünün kullanımı proteom analizlerinde uygun ve etkin bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2 Karşılaştırmalı Proteomik Analiz Sonuçları

Günümüzde moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarındaki gelişmeler, bitkilerin hücrel ve moleküler düzeyde daha kapsamlı analiz edilmesini sağlamıştır. Bitkiler, çevresel stres faktörlerine karşı gelişmiş savunma ve adaptasyon mekanizmalarına sahip olmakta ve bu süreçlerin anlaşılması tarımda sürdürülebilirlik ve verimlilik açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, proteomik bilim dalı, belirli bir bitki türünün veya dokusunun belirli bir gelişimsel evrede ya da çevresel koşul altında ifade ettiği tüm proteinleri tanımlamayı, bu proteinlerin işlevlerini, miktarlarını ve etkileşimlerini analiz etmeyi hedeflemektedir (Jorrín-Novo ve ark., 2009). Bitki proteomiği, klasik genetik yaklaşımların ötesine geçerek, hücrel düzeyde gerçekleşen protein dinamiklerini ve stres yanıtlarını ortaya koymaktadır. Özellikle kuraklık, tuzluluk, aşırı sıcaklık, ağır metal stresi gibi abiyotik stres koşullarında farklı bitki türlerinde yapılan karşılaştırmalı proteomik çalışmalar, stres toleransı ile ilişkili aday proteinlerin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Kosová ve ark., 2007).

Karşılaştırmalı proteomik, farklı biyolojik durumlar, koşullar veya organizmalar arasında protein düzeylerindeki farklılıkların incelendiği bir proteomik alt dalıdır. Bu yaklaşım, belirli bir fizyolojik veya patolojik durumda hücrel yanıtların anlaşılması amacıyla iki veya daha fazla proteomun karşılaştırılmasına dayanır. Karşılaştırmalı proteomik çalışmaları bitkilerde özellikle genotipler arası farklılıkların anlaşılması ve çevresel stres faktörlerine verilen tepkilerin ortaya konulması gibi çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Kosová ve ark., 2011; Gstaiger ve Aebersold, 2009). Ayrıca, karşılaştırmalı proteomik yaklaşımlar sadece proteinlerin varlığını ortaya koymakla kalmaz; aynı zamanda post-translasyonel modifikasyonları, protein miktarındaki farklılıkları, protein-protein etkileşimlerini ve hücrel lokalizasyonları da değerlendirerek hücrel yanıtların bütüncül bir şekilde analiz edilmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, proteomik verilerin biyoinformatik araçlarla desteklenmesi, elde edilen verilerin fonksiyonel analizi ve yolak düzeyinde yorumlanması açısından kritik öneme sahiptir (Tyanova ve ark., 2016). Özellikle bitki stres yanıtlarının karşılaştırmalı

proteomik çalışmalar ile araştırılması önemli biyobelirteçlerin keşfi ve moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında güçlü bir araç olarak öne çıkmaktadır (Aebersold ve Mann, 2016).

Proteomik çalışmalarda kullanılacak ekstraksiyon metodunu belirlemek için yapılan karşılaştırmalı proteomik analiz sonuçlarına göre proje amacı, bitki türü ve karşılaştırılmak istenilen proteinler irdelenerek B protokolü (CHAPS) en verimli ekstraksiyon protokolü seçilmiştir. Proteomik çalışmalar için seçilen CHAPS protokolü ile kuraklık stresi uygulanmış kuraklığa toleranslı (Memecik-94) ve hassas (Gemlik-26) zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinde, kuraklık (D) ve kontrol (K) grupları ile yeniden sulama yapılan iyileşme gruplarına (R) ait toplam 24 yaprak dokusundan protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir protein örneği üç defa analiz edilmiş olup üç analizden en az iki tanesinde tanımlanan peptitler hesaplamalara dahil edilmiştir. Elde edilen toplam proteinlerin Qubit cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçüm sonuçları Tablo 3.21’de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.21 *O. europaea* L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait toplam protein örneklerinin Qubit cihazı ile elde edilen konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Örnek Adı	Qubit Ölçümü (ng μl^{-1})	Örnek Adı	Qubit Ölçümü (ng μl^{-1})
26K	787	26KR	1050
26D	706	26DR	858
94K	838	94KR	991
94D	1050	94DR	912

26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu

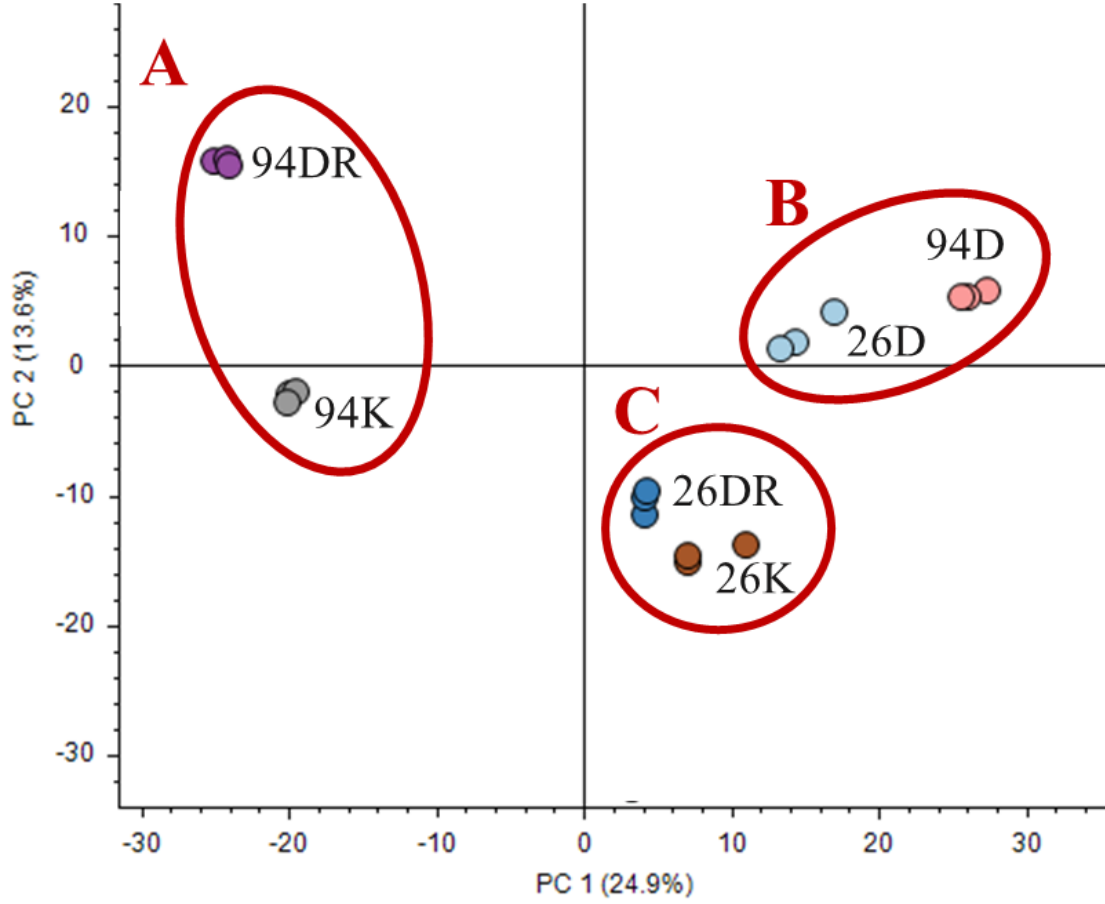
Analize başlamadan önce Kalite Kontrol Materyali olarak 2 μg Pierce HeLa Protein Digest Standard (88329) yüklemesi yapılmıştır. Thermo Proteom Discoverer 2.4 yazılımı ile yapılan Sequest HT taraması sonucunda 905 protein grubu, 1753 peptid grubu, 40026 PSM (Tespit edilen toplam peptit sayısı; peptide spectrum matches) ve 1415/4103 anotasyon protein grubu tespit edilmiştir.

Kütle verilerinin çıkarılması ve analizi, TraceFinder TM yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur. Sequest HT tarama algoritmasına sahip Proteome Discoverer 2.4 yazılımı kullanılarak veri analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerde veriler NCBI Viridiplantae (Taksonomi No: 33090) veri tabanında 0,01 FDR değeri ile taranmıştır.

Sequest HT parametreleri olarak öncül kütle toleransı 10 ppm ve fragman kütle toleransı 0,02 Da kullanılmıştır. Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinin kontrol (K), kuraklık (D) ve kuraklık uygulaması sonrası sulama yapılan (R) gruplarına ait toplam protein örneklerinde kuraklık stres yanıtında protein, peptit sekansı ve peptit gruplarında meydana gelen değişiklikler Proteome Discoverer 2.4 yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir. Çeşitler ve örnek grupları arasında kuraklık stresi ile ilişkili proteom seviyesindeki farkları değerlendirmek için ısı haritası, temel bileşen analiz grafiği ve izoelektrik nokta (pI) dağılım histogramları aynı yazılım kullanılarak oluşturulmuştur. Ek olarak volkan grafikleri oluşturularak çeşitler ve örnek grupları arasında kuraklık stresi ile ilişkili artış ve azalış gösteren proteinler tespit edilerek tablolar halinde listelenmiştir. Analiz edilen proteinlerin kategorizasyonu için Gen ontolojisi (GO) veri tabanı kullanılarak kuraklık stres yanıtında rol alan proteinlerin etki ettiği metabolik yollar biyolojik süreç, hücresel bileşen ve moleküler işlevlerine göre tespit edilerek sınıflandırılmıştır.

Kromatografik analizlerden elde edilen sonuçlara göre, kontrol (K), kuraklık (D) ve kuraklık stres uygulaması sonrasında sulama yapılan (R) gruplar ve bu grupların biyolojik tekrarlarına ilişkin Temel Bileşen Analizi - PCA (Principal component analysis) puan grafiği protein (Şekil 3.71) seviyesinde Thermo Proteome Discoverer 2.4. yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur.

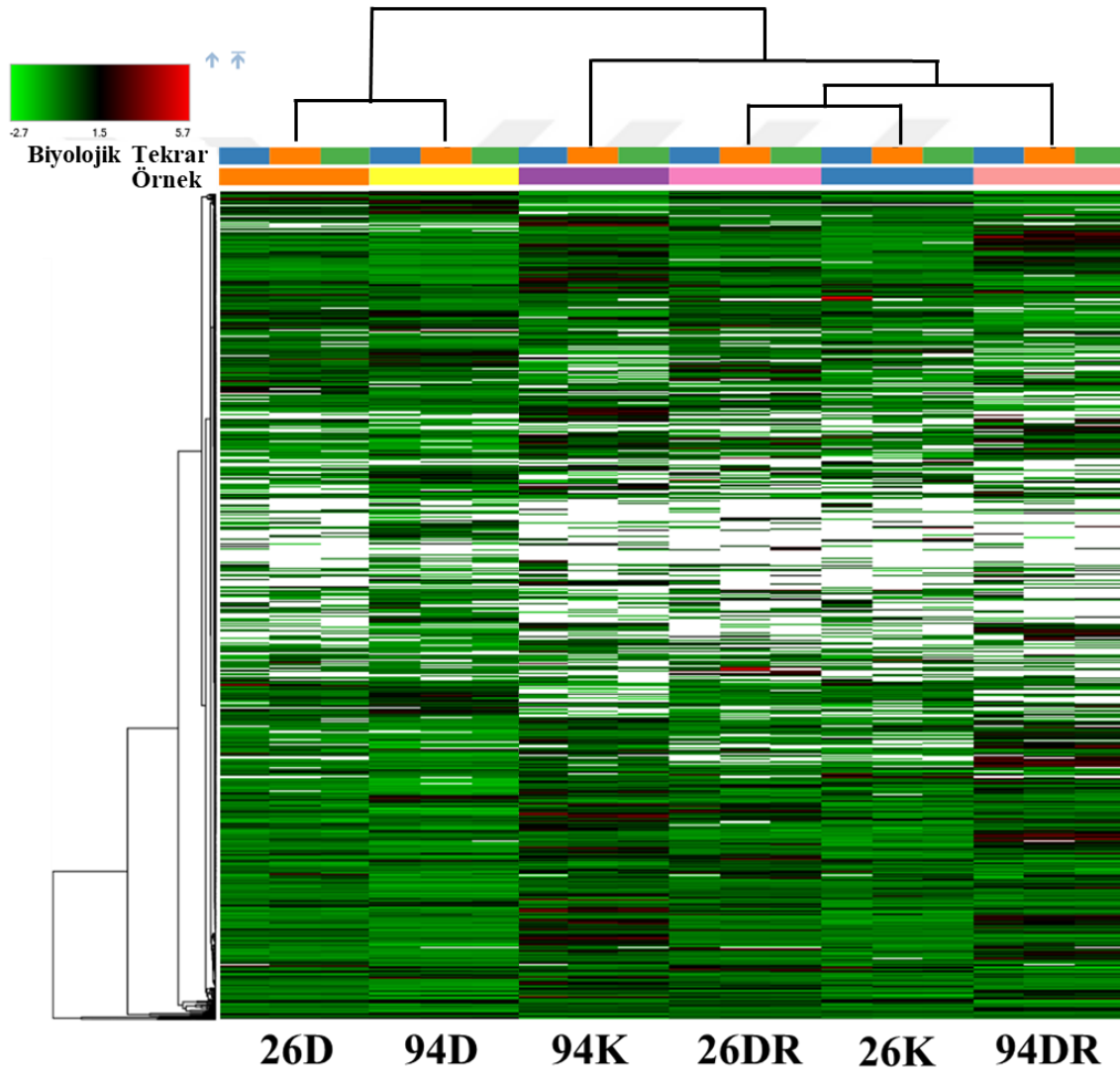
PROTEİN



Şekil 3.71 Tüm örnekler için protein seviyesinde oluşturulan Temel Bileşen Analizi (PCA) puan grafiği (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

Temel Bileşen Analizi - PCA (Principal component analysis) protein puan grafiğinde konumların ayrılmasında PC1'in etkisi %24,9 iken PC2'nin etkisi %13,6 olmuştur. Şekil 3.71'de görüldüğü gibi PC1 ve PC2'ye göre belirlenen analitlerin skor grafiğinde, her bir örnek grup tekrarlarının bir arada gruplaştığı görülmektedir. Protein seviyesinde oluşturulan skor grafiklerde A, B ve C olmak üzere 3 ana grubun oluştuğu görülmektedir. A grubundaki örnekler incelendiği zaman, 94K ve 94DR örneklerinin bir arada gruplandıkları ve toleranslı çeşidin kontrol ve iyileşme gruplarına ait örnekler oldukları görülmektedir. B grubu ise 26D ve 94D örneklerini içermekte ve bu grup kuraklık stres uygulaması yapılan örnek grubunu temsil etmektedir. C grubu ise 26DR ve 26K hassas çeşidin kontrol ve iyileşme gruplarına ait örnekler oldukları görülmektedir.

Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinin kontrol (K), kuraklık (D) ve kuraklık uygulaması sonrası sulama yapılan (R) gruplarında kuraklık stresi altında farklı anlatım yapan proteinlerin (Şekil 3.72) dağılımını göstermek üzere Thermo Proteome Discoverer 2.4. yazılımı kullanılarak ısı haritası oluşturulmuştur. Satırlar LC/MS-MS tarafından tanımlanan spesifik bir proteini temsil etmekteyken sütunlar ise tüm örnekler için bağımsız bir analiz görüntülemektedir. Ekspresyonu azalan proteinler yeşil renkle gösterilirken ekspresyonu artan proteinler kırmızıyla gösterilmektedir. Her rengin parlaklığı, artış ve azalma farklılıklarına göre eşit olarak değişmektedir.

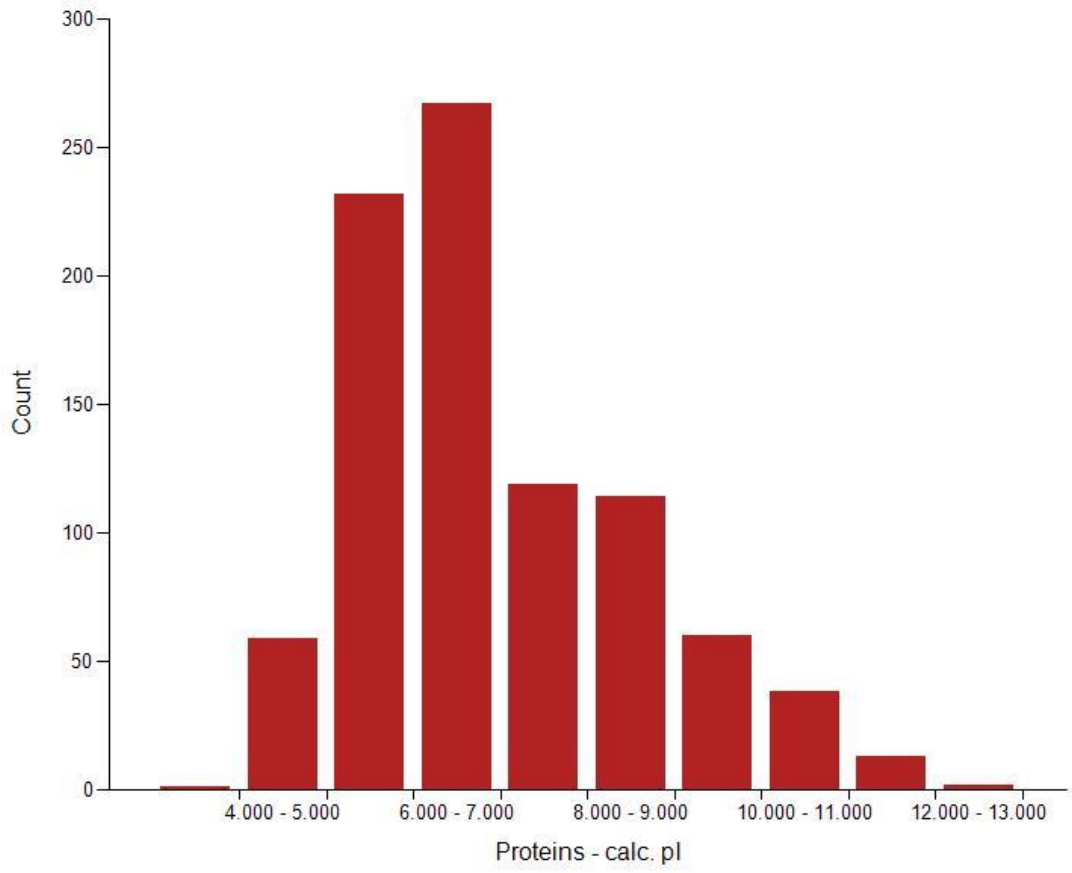


Şekil 3.72 Tüm örneklerin tekrarlı analizinde tanımlanan farklı anlatım yapan proteinlerin ısı haritası (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

Isı haritası sonuçları PCA skor grafikleriyle uyumlu olmakla birlikte özellikle 26D ve 94D örneklerinin kuraklık stres grubu olarak diğer örneklerden bariz bir şekilde ayrıldıkları görülmektedir.

Yaptığımız karşılaştırmalı proteomik analizlerden elde ettiğimiz sonuçlara göre, protein seviyesinde oluşturulan Temel Bileşen Analizi - PCA (Principal component analysis) protein puan grafiğinde A, B ve C olmak üzere 3 ana grubun oluştuğu görülmektedir. A grubundaki örnekler incelendiği zaman, 94K ve 94DR örneklerinin bir arada gruplandıkları ve toleranslı çeşidin kontrol ve iyileşme gruplarına ait örnekler oldukları görülmektedir. B grubu ise 26D ve 94D örneklerini içermekte ve bu grup kuraklık stres uygulaması yapılan örnek grubunu temsil etmektedir. C grubu ise 26DR ve 26K hassas çeşidin kontrol ve iyileşme gruplarına ait örnekler oldukları görülmektedir. Isı haritası sonuçları PCA skor grafikleriyle uyumlu olmakla birlikte özellikle 26D ve 94D örneklerinin kuraklık stres grubu olarak diğer örneklerden bariz bir şekilde ayrıldıkları görülmektedir. Çeşit ve gruplara ait örnek tekrarlarının hem Temel Bileşen protein puan grafiğinde hem de ısı grafiğinde bir arada bulunmaları, elde edilen örnek tekrarlarına ilişkin doğru bir deneysel işleyiş olduğunu göstermektedir. Ek olarak her iki analiz sonucundan elde edilen veriler kuraklık stres gruplarının her iki çeşit için de kontrol ve iyileşme gruplarından belirgin bir şekilde ayrılarak kendi aralarında gruplandıklarını göstermektedir. Bu durum zeytin çeşitlerindeki kuraklık stres yanıtının proteom düzeyinde belirgin bir şekilde fark yarattığını göstermektedir.

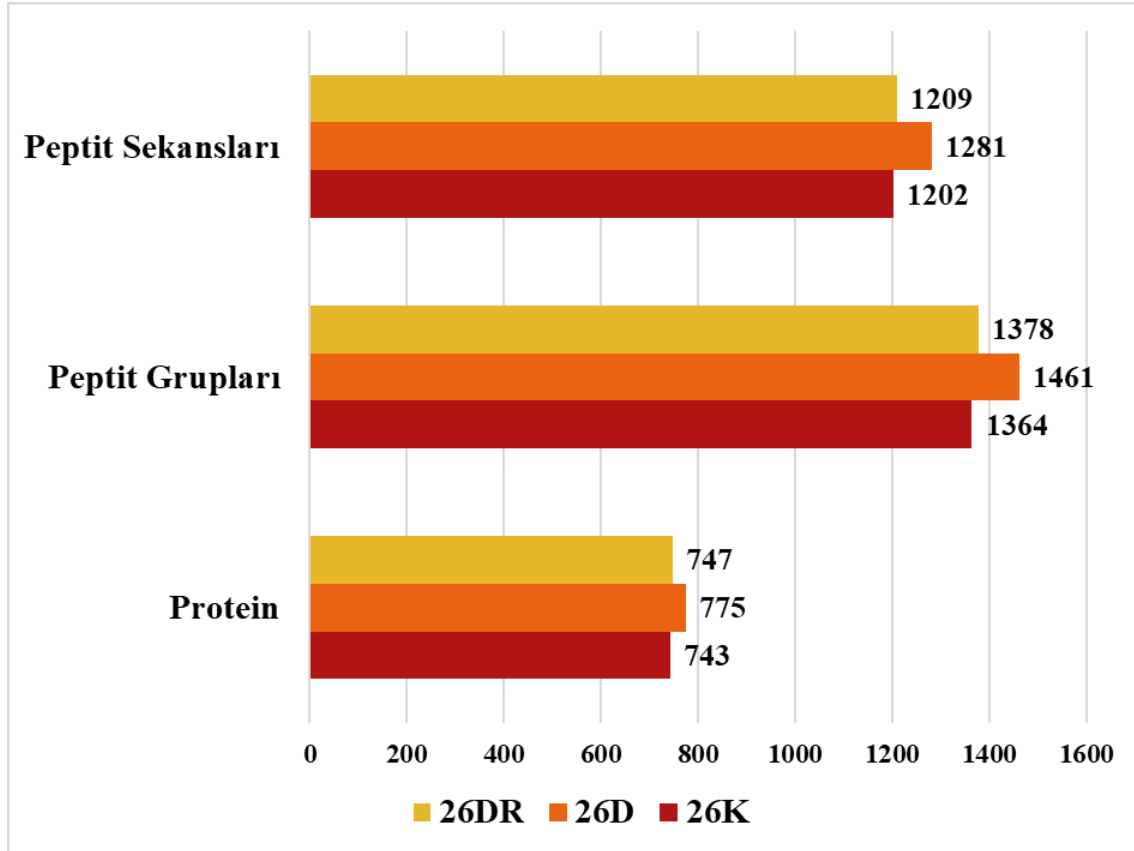
Ek olarak, analiz sonuçlarına göre farklı şekilde ifade edilen proteinlerin izoelektrik noktalarının (pI) dağılımını temsil eden histogram grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.73).



Şekil 3.73 *O. europaea* L. çeşitleri ve örnek gruplarına ait tüm proteinlerin örneklerinin izoelektrik noktalarının (PI) dağılımını temsil eden histogram.

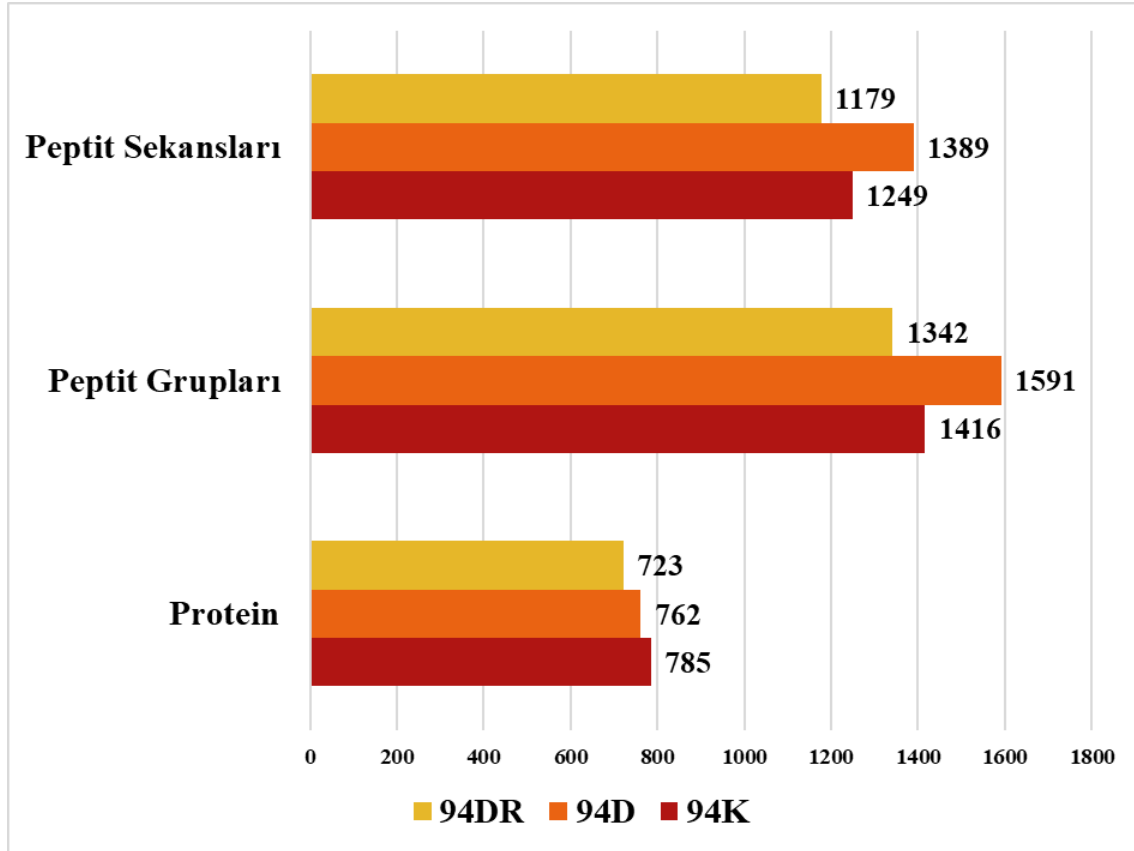
Elde edilen sonuçlara göre toplam protein dağılımı pI değerleri açısından değerlendirildiğinde 5 ile 7 arasında olan proteinlerde belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu durum deneyde kullanılan Protokol B'nin hem asidik hem de bazik proteinler dahil olmak üzere geniş pI aralığındaki proteinleri benzersiz bir şekilde yakaladığını ve genel proteom kapsamında asidik protein yönünden zengin proteinleri tespit etmede etkili olduğunu göstermektedir.

LCMS/MS analiz sonuçlarına göre Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinin kontrol (K), kuraklık (D) ve kuraklık uygulaması sonrası sulama yapılan (R) gruplarında protein, peptit sekansı ve peptit gruplarına ilişkin farklılıklar Thermo Proteome Discoverer 2.4 yazılımı kullanılarak karşılaştırılmıştır (Şekil 3.74, Şekil 3.75).



Şekil 3.74 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik (26) çeşidine ait gruplar için tanımlanan protein sayısı, peptit grupları ve peptit sekanslarına ait veriler.

Elde edilen analiz sonuçlarına göre Gemlik (26) çeşidi için tanımlanan protein sayısı kuraklık stres uygulaması sonrası yaklaşık %4 artarken, peptit gruplarında %7 peptit sekanslarında ise %6'lık bir artış görülmektedir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan grupta ise kontrol grubuna göre protein sayısında %11, peptit gruplarında %13 peptit sekanslarında ise %12'lik bir artış görülmektedir. Kuraklık stresi uygulanan gruba, stres uygulaması sonrası sulama yapılması durumunda ise protein sayısında %4, peptit gruplarında ve peptit sekanslarında %6'lık bir azalma olduğu görülmektedir (Şekil 3.75).



Şekil 3.75 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Memecik (94)çeşidine ait gruplar için tanımlanan protein sayısı, peptit grupları ve peptit sekanslarına ait veriler.

Elde edilen analiz sonuçlarına göre Memecik (94) çeşidi için tanımlanan protein sayısı kuraklık stres uygulaması sonrası yaklaşık %3 azalırken, peptit gruplarında %12 peptit sekanslarında ise %11’lik bir artış görülmektedir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan grupta ise kontrol grubuna göre protein sayısında %0,1 peptit gruplarında %1,1 ve peptit sekanslarında ise %0,4’lük bir azalma görülmektedir. Kuraklık stresi uygulanan gruba, stres uygulaması sonrası sulama yapılması durumunda ise protein sayısında %5, peptit gruplarında %19 ve peptit sekanslarında %19’luk bir azalma olduğu görülmektedir.

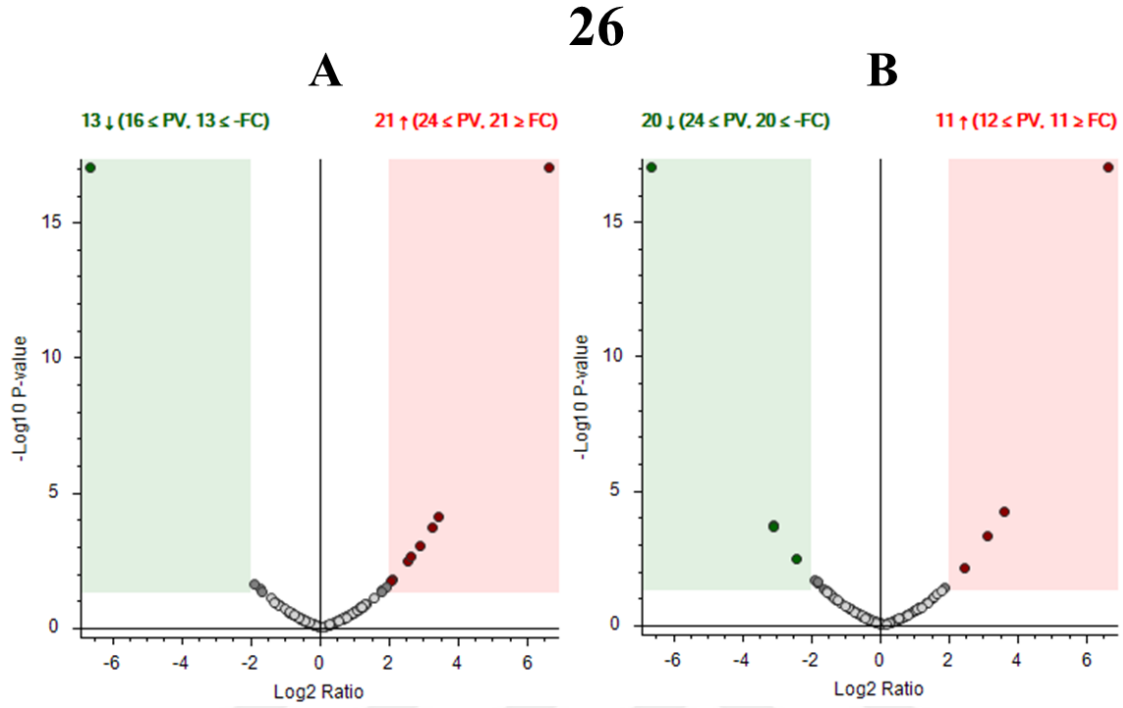
LCMS-MS analiz sonuçlarına göre kuraklık stresi altında Gemlik çeşidinde artan protein sayısı iyileşme gruplarında azalma göstermekle birlikte kontrolden yüksek bir profile sahiptir. Kuraklık stresi altında Memecik çeşidinde azalan protein sayısı iyileşme gruplarında bu eğilimini sürdürmektedir. Her iki çeşide ait peptit sekans ve peptit grup sayıları değerlendirildiği zaman kuraklık stresi altında gözlemlenen artışın Gemlik çeşidi iyileşme gruplarında kontrole göre daha yüksek, Memecik çeşidi iyileşme gruplarında ise

kontrole göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum Gemlik çeşidinin stres koşullarında gösterdiği proteom seviyesindeki düzenlemeyi stres koşulları ortadan kaldırtığında normalize ederek geri düzenlediğini göstermektedir. Memecik çeşidi ise gelecekte olası bir kuraklık stresine karşı geliştirdiği düzenlenmiş proteom seviyesini daha etkin şekilde koruduğunu ve belki de Memecik çeşidinde tespit edilen bu tolerans mekanizmasının proteom seviyesinde bu şekilde düzenlendiğini göstermektedir.

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitleri arasındaki kuraklık stresinin oluşturduğu adaptif stres yanıtları proteom seviyesinde karşılaştırılmıştır. Bu amaçla anlamlı artış ve azalış gösteren proteinlerin tespiti Thermo Proteome Discoverer 2.4 yazılımı kullanılarak oluşturulan volkan grafikleri sonrası tablolar halinde listelenmiştir. Anlamlı artış ve azalış gösteren proteinlerin tespitinde kullanılan filtrelendirme ölçeklerinde “Abundance Ratio P-Value” 0,05’e eşit ya da daha düşük, “Score Sequest HT” 0’dan yüksek ve “Unique peptides” 2’ye eşit ya da daha yüksek olacak şekilde seçilmiştir. “Abundance Ratios (log2 fold change)” artan proteinlerin tespiti için 2’ye eşit ya da daha yüksek, azalan proteinlerin tespiti için 0,5’e eşit ya da daha düşük olacak şekilde belirlenmiştir.

Gemlik (26) çeşidi için Thermo Proteome Discoverer 2.4 yazılımı kullanılarak oluşturulan volkan grafiği sonuçlarına göre; kuraklık stresi uygulanan örneklerde (D) kontrol örneklerine göre 21 anlamlı artış gösteren protein tespit edilmiştir. Tespit edilen 24 artış gösteren protein için p-value değeri 0,05’e eşit ya da daha düşükken 21 artış gösteren protein için Log2 fold change değeri 2’ye eşit ya da daha yüksektir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama uygulaması yapılan örneklerde (R) kuraklık örneklerine göre 11 anlamlı artış gösteren protein tespit edilmiştir. Tespit edilen 12 artış gösteren protein için p-value değeri 0,05’e eşit ya da daha düşükken 11 artış gösteren protein için Log2 fold change değeri 2’ye eşit ya da daha yüksektir. Kuraklık stresi uygulanan örneklerde (D) kontrol örneklerine göre 13 anlamlı azalış gösteren protein tespit edilmiştir. Tespit edilen 16 azalış gösteren protein için p-value değeri 0,05’e eşit ya da daha düşükken 13 azalış gösteren protein için Log2 fold change değeri 0,5’e eşit ya da daha düşüktür. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama uygulaması yapılan örneklerde (R) kuraklık örneklerine göre 20 anlamlı azalış gösteren protein tespit edilmiştir. Tespit edilen 24 azalış gösteren protein için p-value değeri 0,05’e eşit ya da daha düşükken 20

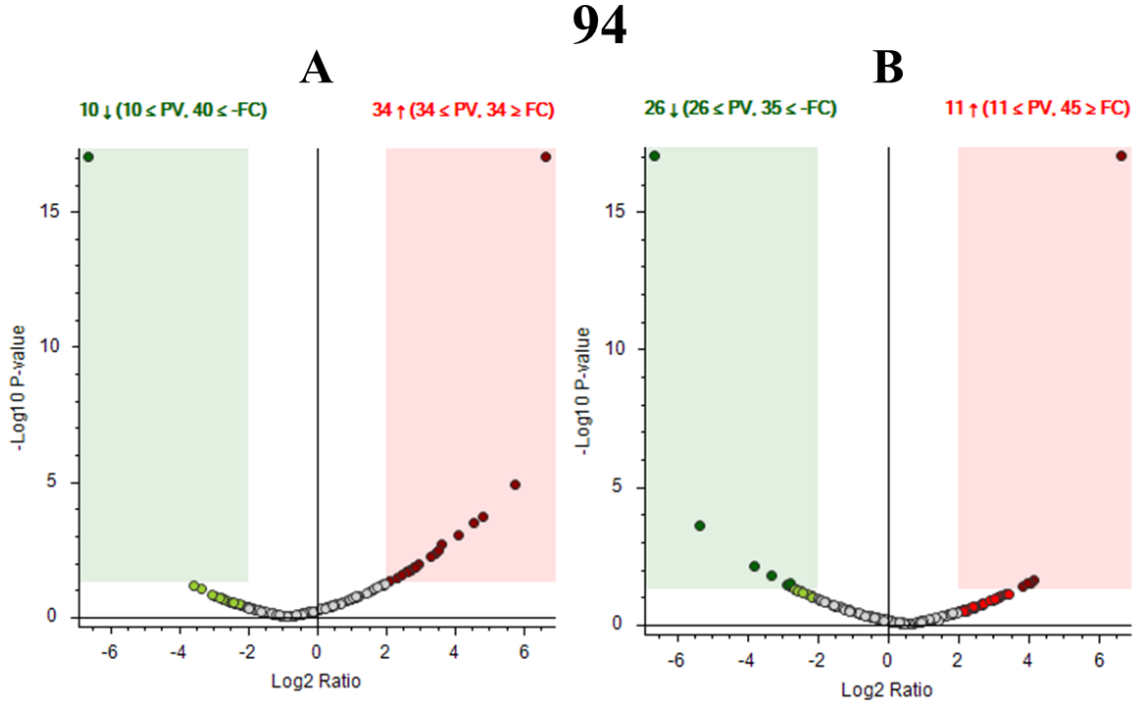
azalış gösteren protein için Log2 fold change değeri 0,5'e eşit ya da daha düşüktür (Şekil 3.76).



Şekil 3.76 Gemlik (26) çeşidine ait kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı proteom analizini özetleyen volkan grafiği. A: 26K ve 26D örnekleri arasında artış ve azalış gösteren proteinler. B: 26D ve 26DR örnekleri arasında artış ve azalış gösteren proteinler (26: Gemlik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

Memecik (94) çeşidi için Thermo Proteome Discoverer 2.4 yazılımı kullanılarak oluşturulan volkan grafiği sonuçlarına göre; kuraklık stresi uygulanan örneklerde (D) kontrol örneklerine göre 34 anlamlı artış gösteren protein tespit edilmiştir. Tespit edilen 34 artış gösteren protein için p-value değeri 0,05'e eşit ya da daha düşükken 34 artış gösteren protein için Log2 fold change değeri 2'ye eşit ya da daha yüksektir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama uygulaması yapılan örneklerde (R) kuraklık örneklerine göre 11 anlamlı artış gösteren protein tespit edilmiştir. Tespit edilen 11 artış gösteren protein için p-value değeri 0,05'e eşit ya da daha düşükken 45 artış gösteren protein için Log2 fold change değeri 2'ye eşit ya da daha yüksektir. Kuraklık stresi uygulanan örneklerde (D) kontrol örneklerine göre 10 anlamlı azalış gösteren protein tespit edilmiştir. Tespit edilen 10 azalış gösteren protein için p-value değeri 0,05'e eşit ya da daha düşükken 40 azalış gösteren protein için Log2 fold change değeri 0,5'e eşit ya da daha düşüktür. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama uygulaması yapılan örneklerde

(R) kuraklık örneklerine göre 26 anlamlı azalış gösteren protein tespit edilmiştir. Tespit edilen 26 azalış gösteren protein için p-value değeri 0,05'e eşit ya da daha düşükken 35 azalış gösteren protein için Log2 fold change değeri 0,5'e eşit ya da daha düşüktür (Şekil 3.77).



Şekil 3.77 Memecik (94) çeşidine ait kontrol ve kuraklık örneklerinin karşılaştırmalı proteom analizini özetleyen volkan grafiği. A: 94K ve 94D örnekleri arasında artış ve azalış gösteren proteinler. B: 94D ve 94DR örnekleri arasında artış ve azalış gösteren proteinler (94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

Oluşturulan volkan grafiklerine göre Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinde kuraklık stres uygulaması ve stres sonrası sulama uygulaması yapılan örneklerde anlamlı artış ve azalış gösteren proteinlerin sayısal değerleri Şekil 3.78'de özetlenmiş ve tablolar halinde listelenmiştir.



Protein Sayısı	Kontrol (K)	Kuraklık (D)	Recovery (R)
	26K	26D	26DR
Yüksek oranda artış (2 kat ve üzeri)		21	11
Yüksek oranda azalış (0,5 kat)		13	20
	94K	94D	94DR
Yüksek oranda artış (2 kat ve üzeri)		34	11
Yüksek oranda azalış (0,5 kat)		10	26

Şekil 3.78 Proteomik çalışmalarında kullanılan karşılaştırma grupları ve karşılaştırma sonucunda elde edilen yüksek oranda artış ve azalış gösteren protein miktarları (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

Elde edilen veriler, kuraklık döneminde hassas zeytin çeşidinde (Gemlik-26) önemli bir protein artışı olduğunu, ancak iyileşme döneminde bu artışın azalarak protein ifadelerinde tespit edilen azalışların arttığını göstermektedir. Buna karşın, kuraklık döneminde toleranslı zeytin çeşidinde (Memecik-94) ise çok daha fazla sayıda proteinin aktive olduğu ve güçlü bir savunma tepkisi geliştirdiği görülmektedir. Bu farklılıklar, proteom düzeyinde kuraklık stresine karşı etkin bir moleküler savunma sisteminin, kuraklığa toleranslı zeytin çeşidinde (Memecik-94) aktif olduğunu, hassas çeşitte (Gemlik-26) ise stres sonrası toparlanma kapasitesinin zayıf olduğunu desteklemektedir.

Proteomik analizler sonucunda kuraklık stresi ile ilişkili olarak anlamlı artış ve azalış gösteren tüm proteinler ve özellikleri tablolar haline getirilerek listelenmiş ve aşağıda gösterildiği gibidir.

1. Kuraklığa hassas Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stresi uygulaması sonucu (26D) yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren 21 protein tespit edilmiştir (Tablo 3.22).

Tablo 3.22 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) çeşidinde yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren proteinlerin listesi.

No	Protein Tanımı	Erişim Numarası	MW [kDa]	calc. pI	Abundance Ratio	Abundance Ratio P-Value
1	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H, chloroplastic [OS= <i>Cicer arietinum</i>]	B5LMS0	45,8	5,36	100	1E-17
2	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1, chloroplastic/mitochondrial [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9ZNZ7-1	176,6	6,32	100	1E-17
3	Phenylalanine ammonia-lyase [OS= <i>Nicotiana tabacum</i>]	P35513	77,3	6,58	100	1E-17
4	Conglutin-7 [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	Q6PSU2-1	20,1	6,34	100	1E-17
5	Heat shock protein 81-1 [OS= <i>Oryza sativa</i> Indica Group]	A2YWQ1	80,1	5,07	100	1E-17
6	Geraniol 8-hydroxylase [OS= <i>Catharanthus roseus</i>]	Q8VWZ7	55,6	8,97	100	1E-17
7	Proteasome subunit alpha type-7-A [OS= <i>Oryza sativa</i> Indica Group]	A2YXU2	27,3	7,43	100	1E-17
8	bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4 [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q6H849	38,7	5,33	100	1E-17
9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8B [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9T0I6	274,6	8,82	100	1E-17
10	T-complex protein 1 subunit delta [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9LV21	57,7	7,68	100	1E-17
11	Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5, mitochondrial [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q945K7	40,6	6,79	100	1E-17
12	glutamate--glyoxylate aminotransferase 2 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9S7E9	53,4	6,58	100	1E-17
13	Protein argonaute 1C [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q6K972	113,1	9,5	100	1E-17
14	peptide methionine sulfoxide reductase [OS= <i>Lactuca sativa</i>]	Q9SEC2	28,8	8,43	10,873	8,34612E-05
15	Heat shock protein 21, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	P31170	25,3	8,38	9,669	0,000186649
16	Chlorophyll a-b binding protein 91R, chloroplastic [OS= <i>Petunia sp.</i>]	P04783	28,4	5,44	9,526	0,000206108
17	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I, chloroplastic [OS= <i>Cucumis sativus</i>]	P08221	27,2	5,26	7,531	0,00091497
18	nucleoside diphosphate kinase b [OS= <i>Flaveria bidentis</i>]	P47920	16,2	6,95	6,346	0,002469791
19	60S ribosomal protein L23a [OS= <i>Daucus carota</i>]	Q9AT35	17,5	10,27	5,931	0,003577758
20	Thiamine thiazole synthase 2, chloroplastic [OS= <i>Vitis vinifera</i>]	F6H7K5	38,1	5,52	4,293	0,017848908
21	Heat shock 70 kDa protein 5 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9S9N1	70,9	5,41	4,239	0,01891662

2. Kuraklığa toleranslı Memecik (94) çeşidinde kuraklık stresi uygulaması sonucu (94D) yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren 34 protein tespit edilmiştir (Tablo 3.23).

Tablo 3.23 Kuraklık stresi altında Memecik (94) çeşidinde yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren proteinlerin listesi.

No	Protein Tanımı	Erişim Numarası	MW [kDa]	calc. pI	Abundance Ratio	Abundance Ratio P-Value
1	Glutelin type-B 1 [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	P14323	56,5	9,14	100	5,88E-17
2	Allergen Ara h 1, clone P41B [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	P43238	71,3	7,06	100	5,88E-17
3	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H, chloroplastic [OS= <i>Cicer arietinum</i>]	B5LMS0	45,8	5,36	100	5,88E-17
4	Phenylalanine ammonia-lyase [OS= <i>Nicotiana tabacum</i>]	P35513	77,3	6,58	100	5,88E-17
5	5-oxoprolinase [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9FIZ7	137,4	5,86	100	5,88E-17
6	Geraniol 8-hydroxylase [OS= <i>Catharanthus roseus</i>]	Q8VWZ7	55,6	8,97	100	5,88E-17
7	bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4 [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q6H849	38,7	5,33	100	5,88E-17
8	Importin subunit alpha-1a [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q71VM4	57,5	5,22	100	5,88E-17
9	26S proteasome regulatory subunit 10B homolog A [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9SEI3	44,8	8,19	100	5,88E-17
10	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 30 [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q5N7W4	72,1	9,73	100	5,88E-17
11	T-complex protein 1 subunit eta [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9SF16	59,7	6,39	100	5,88E-17
12	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic [OS= <i>Hordeum vulgare</i>]	P13564	47,1	5,29	100	5,88E-17
13	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8B [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9T0I6	274,6	8,82	100	5,88E-17
14	T-complex protein 1 subunit delta [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9LV21	57,7	7,68	100	5,88E-17
15	Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5, mitochondrial [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q945K7	40,6	6,79	100	5,88E-17
16	Photosystem II CP47 reaction center protein [OS= <i>Adiantum capillus-veneris</i>]	Q85FJ7	56,2	6,43	53,965	7,57E-05
17	Alpha-glucan water dikinase, chloroplastic [OS= <i>Citrus reticulata</i>]	Q8LPT9	164,7	6,07	27,999	0,001081335

18	Chaperone protein ClpB1 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	P42730	101,2	6,13	23,801	0,001975014
19	Clathrin heavy chain 1 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q0WNJ6	193,1	5,4	17,544	0,005769151
20	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1, chloroplastic/mitochondrial [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9ZNZ7-1	176,6	6,32	12,157	0,012007508
21	(S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO2 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9LRS0	40,3	8,97	11,704	0,020977447
22	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic [OS= <i>Lemna minor</i>]	A9L981	55	5,72	10,766	0,026880876
23	peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase [OS= <i>Spinacia oleracea</i>]	P05414	40,3	9,13	9,99	0,032659058
24	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 5, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9FH02	75,2	5,49	7,836	0,062849862
25	Heat shock protein 21, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	P31170	25,3	8,38	7,32	0,074772327
26	Allergen Ara h 1, clone P17 [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	P43237	70,2	6,86	7,195	0,078166943
27	ATP synthase subunit b, chloroplastic [OS= <i>Coffea arabica</i>]	A0A321	21,6	8,28	6,645	0,093903395
28	ATP synthase gamma chain 1, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q01908	40,9	8	6,46	0,100357044
29	26S proteasome regulatory subunit 7 homolog A [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9SSB5	47,8	6,65	6,298	0,106093777
30	Histone H4.3 [OS= <i>Zea mays</i>]	Q41811	11,5	11,66	6,059	0,116591046
31	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 2, chloroplastic [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	Q655S1-1	72,5	5,72	5,6	0,14062182
32	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	Q35322	23	7,5	5,061	0,174156873
33	Splicing factor U2af large subunit B [OS= <i>Nicotiana glauca</i>]	Q9ZR40	63,8	7,9	5,03	0,176149573
34	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog B [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9MAT0	108,8	5,35	4,374	0,224580477

3. Kuraklığa hassas Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stresi uygulaması sonrası yeniden sulama yapılan iyileşme grubu örneklerinde (26DR) yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren 11 protein tespit edilmiştir (Tablo 3.24).

Tablo 3.24 Kuraklık stresi sonrasında Gemlik çeşidi iyileşme (recovery) grubunda (26DR) çeşidinde yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren proteinlerin listesi.

No	Protein Tanımı	Erişim Numarası	MW [kDa]	calc. pI	Abundance Ratio	Abundance Ratio P-Value
1	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase, chloroplastic [OS= <i>Olea europaea</i>]	Q43593	44,6	6,55	100	1E-17
2	Glutenin, high molecular weight subunit DY10 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P10387	69,6	7,77	100	1E-17
3	Putative 12-oxophytodienoate reductase 6 [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	Q69TI2	43,5	5,64	100	1E-17
4	Glutelin type-B 1 [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	P14323	56,5	9,14	100	1E-17
5	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	P22954	71,3	5,12	100	1E-17
6	Alpha-amylase inhibitor 0.19 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P01085	13,3	7,05	100	1E-17
7	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P16347	19,6	7,21	100	1E-17
8	glycine-rich RNA-binding protein 2 [OS= <i>Sorghum bicolor</i>]	Q99070	16,4	5,25	100	1E-17
9	Elongation factor 2 [OS= <i>Beta vulgaris</i>]	O23755	93,7	6,3	12,352	5,93614E-05
10	Allergen Ara h 1, clone P17 [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	P43237	70,2	6,86	8,937	0,000503556
11	Alpha-glucan water dikinase, chloroplastic [OS= <i>Citrus reticulata</i>]	Q8LPT9	164,7	6,07	5,522	0,007352691

4. Kuraklığa toleranslı Memecik (94) çeşidinde kuraklık stresi uygulaması sonrası yeniden sulama yapılan iyileşme örneklerinde (94DR) yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren 11 protein tespit edilmiştir (Tablo 3.25).

Tablo 3.25 Kuraklık stresi sonrasında Memecik iyileşme (94DR) çeşidinde yüksek oranda (2 kat ve üzeri) artış gösteren proteinlerin listesi.

No	Protein Tanımı	Erişim Numarası	MW [kDa]	calc. pI	Abundance Ratio	Abundance Ratio P-Value
1	Conglutin-7 [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	Q6PSU2-1	20,1	6,34	100	1E-17
2	Serpin-Z1B [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P93693	43	5,69	100	1E-17
3	beta-amylase [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P93594	56,6	5,43	100	1E-17
4	Proteasome subunit alpha type-7-A [OS= <i>Oryza sativa</i> Indica Group]	A2YXU2	27,3	7,43	100	1E-17
5	glycine-rich RNA-binding protein 2 [OS= <i>Sorghum bicolor</i>]	Q99070	16,4	5,25	100	1E-17
6	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	P22954	71,3	5,12	100	1E-17
7	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P16347	19,6	7,21	100	1E-17
8	Monodehydroascorbate reductase, seedling isozyme [OS= <i>Cucumis sativus</i>]	Q42711	47,4	5,4	18,124	0,024198475
9	60S ribosomal protein L26-2 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9FJX2	16,8	11,12	16,573	0,032713274
10	Protein TOC75, chloroplastic [OS= <i>Pisum sativum</i>]	Q43715	88,2	7,4	15,717	0,033439491
11	Glycine-rich RNA-binding protein GRP1A [OS= <i>Sinapis alba</i>]	P49310	16	5,34	14,207	0,04169323

5. Kuraklığa hassas Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stresi uygulaması sonucu (26D) yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren 13 protein tespit edilmiştir (Tablo 3.26).

Tablo 3.26 Kuraklık stresi altında Gemlik (26) çeşidinde yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren proteinlerin listesi.

No	Protein Tanımı	Erişim Numarası	MW [kDa]	calc. pI	Abundance Ratio	Abundance Ratio P-Value
1	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9LSQ5	21,8	6,38	0,01	1E-17
2	Glutenin, high molecular weight subunit DY10 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P10387	69,6	7,77	0,01	1E-17
3	Putative 12-oxophytodienoate reductase 6 [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q69TI2	43,5	5,64	0,01	1E-17
4	Alpha-amylase inhibitor 0.19 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P01085	13,3	7,05	0,01	1E-17
5	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase, chloroplastic [OS= <i>Olea europaea</i>]	Q43593	44,6	6,55	0,01	1E-17
6	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P17314	18,2	7,44	0,01	1E-17
7	Serpin-Z1B [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P93693	43	5,69	0,01	1E-17
8	beta-amylase [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P93594	56,6	5,43	0,01	1E-17
9	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM16 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P16159	15,8	5,41	0,01	1E-17
10	glycine-rich RNA-binding protein 2 [OS= <i>Sorghum bicolor</i>]	Q99070	16,4	5,25	0,01	1E-17
11	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	P22954	71,3	5,12	0,01	1E-17
12	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P16347	19,6	7,21	0,01	1E-17
13	Elongation factor 2 [OS= <i>Beta vulgaris</i>]	O23755	93,7	6,3	0,323	0,046365769

6. Kuraklığa toleranslı Memecik (94) çeşidinde kuraklık stresi uygulaması sonucu (94D) yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren 10 protein tespit edilmiştir (Tablo 3.27).

Tablo 3.27 Kuraklık stresi altında Memecik (94) çeşidinde yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren proteinlerin listesi.

No	Protein Tanımı	Erişim Numarası	MW [kDa]	calc. pI	Abundance Ratio	Abundance Ratio P-Value
1	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9LSQ5	21,8	6,38	0,01	1E-17
2	Glutenin, high molecular weight subunit DY10 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P10387	69,6	7,77	0,01	1E-17
3	Alpha-amylase inhibitor 0.19 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P01085	13,3	7,05	0,01	1E-17
4	Conglutin-7 [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	Q6PSU2-1	20,1	6,34	0,01	1E-17
5	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P17314	18,2	7,44	0,01	1E-17
6	Serpin-Z1B [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P93693	43	5,69	0,01	1E-17
7	beta-amylase [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P93594	56,6	5,43	0,01	1E-17
8	Proteasome subunit alpha type-7-A [OS= <i>Oryza sativa</i> Indica Group]	A2YXU2	27,3	7,43	0,01	1E-17
9	glycine-rich RNA-binding protein 2 [OS= <i>Sorghum bicolor</i>]	Q99070	16,4	5,25	0,01	1E-17
10	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P16347	19,6	7,21	0,01	1E-17

7. Kuraklığa hassas Gemlik (26) çeşidinde kuraklık stresi uygulaması sonrası yeniden sulama yapılan iyileşme örneklerinde (26DR) yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren 20 protein tespit edilmiştir (Tablo 3.28).

Tablo 3.28 Kuraklık stresi sonrasında Gemlik çeşidi iyileşme (recovery) grubunda (26DR) yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren proteinlerin listesi.

No	Protein Tanımı	Erişim Numarası	MW [kDa]	calc. pI	Abundance Ratio	Abundance Ratio P-Value
1	T-complex protein 1 subunit delta [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9LV21	57,7	7,68	0,01	1E-17
2	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic [OS= <i>Fritillaria agrestis</i>]	O49079	34,8	6,61	0,01	1E-17
3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9MB58	82,5	6,29	0,01	1E-17
4	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase [OS= <i>Zea mays</i>]	P30792	60,6	5,53	0,01	1E-17
5	Conglutin [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	Q647G9	16,9	6,52	0,01	1E-17
6	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic [OS= <i>Hordeum vulgare</i>]	P13564	47,1	5,29	0,01	1E-17
7	Protein argonaute 1C [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q6K972	113,1	9,5	0,01	1E-17
8	Conglutin-7 [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	Q6PSU2-1	20,1	6,34	0,01	1E-17
9	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1, chloroplastic/mitochondrial [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9ZNZ7-1	176,6	6,32	0,01	1E-17
10	Proteasome subunit alpha type-7-A [OS= <i>Oryza sativa</i> Indica Group]	A2YXU2	27,3	7,43	0,01	1E-17
11	Serpin-Z1B [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P93693	43	5,69	0,01	1E-17
12	60S ribosomal protein L10-2 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q08770	24,9	10,43	0,01	1E-17
13	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8B [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9T0I6	274,6	8,82	0,01	1E-17
14	Carbamoyl-phosphate synthase large chain, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q42601	129,9	5,73	0,01	1E-17
15	bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4 [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q6H849	38,7	5,33	0,01	1E-17
16	Allergen Ara h 1, clone P41B [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	P43238	71,3	7,06	0,01	1E-17
17	ABC transporter E family member 2 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q8LPJ4	68,3	7,96	0,01	1E-17
18	UDP-glucose 4-epimerase 2 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9T0A7	38,4	6,73	0,117	0,00021181
19	Chlorophyll a-b binding protein 91R, chloroplastic [OS= <i>Petunia sp.</i>]	P04783	28,4	5,44	0,119	0,000227066
20	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I, chloroplastic [OS= <i>Cucumis sativus</i>]	P08221	27,2	5,26	0,188	0,003472845

8. Kuraklığa toleranslı Memecik (94) çeşidinde kuraklık stresi uygulaması sonrası yeniden sulama yapılan iyileşme örneklerinde (94DR) yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren 26 protein tespit edilmiştir (Tablo 3.29).

Tablo 3.29 Kuraklık stresi sonrasında Memecik çeşidi iyileşme (recovery) grubunda (94DR) yüksek oranda azalış (0,5 kat altı) gösteren proteinlerin listesi.

No	Protein Tanımı	Erişim Numarası	MW [kDa]	calc. pI	Abundance Ratio	Abundance Ratio P-Value
1	ABC transporter E family member 2 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q8LPJ4	68,3	7,96	0,01	1E-17
2	Calcium-dependent protein kinase 2 [OS= <i>Zea mays</i>]	P49101	58	6,55	0,01	1E-17
3	Probable zinc metalloproteinase EGY3, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9LMU1	62,7	5,24	0,01	1E-17
4	Clathrin heavy chain 1 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q0WNJ6	193,1	5,4	0,01	1E-17
5	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM16 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P16159	15,8	5,41	0,01	1E-17
6	Allergen Ara h 1, clone P41B [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	P43238	71,3	7,06	0,01	1E-17
7	Protein argonaute 1C [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q6K972	113,1	9,5	0,01	1E-17
8	Adenylosuccinate synthetase, chloroplastic [OS= <i>Solanum bulbocastanum</i>]	A9XLG1	54,6	7,62	0,01	1E-17
9	5-oxoprolinase [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9FIZ7	137,4	5,86	0,01	1E-17
10	UDP-glucuronic acid decarboxylase 5 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9SN95	38,4	7,52	0,01	1E-17
11	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase, chloroplastic [OS= <i>Olea europaea</i>]	Q43593	44,6	6,55	0,01	1E-17
12	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8B [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9T0I6	274,6	8,82	0,01	1E-17
13	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9MB58	82,5	6,29	0,01	1E-17
14	Carbamoyl-phosphate synthase large chain, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q42601	129,9	5,73	0,01	1E-17
15	26S proteasome regulatory subunit 10B homolog A [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	Q9SEI3	44,8	8,19	0,01	1E-17
16	Aconitate hydratase, cytoplasmic [OS= <i>Cucurbita maxima</i>]	P49608	97,9	6,09	0,01	1E-17
17	Importin subunit alpha-1a [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q71VM4	57,5	5,22	0,01	1E-17
18	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	P17314	18,2	7,44	0,01	1E-17
19	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 30 [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	Q5N7W4	72,1	9,73	0,01	1E-17
20	Photosystem II CP47 reaction center protein [OS= <i>Adiantum capillus-veneris</i>]	Q85FJ7	56,2	6,43	0,025	0,000274944
21	Alpha-glucan water dikinase, chloroplastic [OS= <i>Citrus reticulata</i>]	Q8LPT9	164,7	6,07	0,074	0,007732456
22	Chaperone protein ClpB1 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	P42730	101,2	6,13	0,101	0,017097719
23	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 [OS= <i>Atropa belladonna</i>]	Q8S8X5	82,2	7,17	0,138	0,035352803
24	Glutelin type-B 1 [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	P14323	56,5	9,14	0,148	0,030503478
25	Photosystem II D2 protein [OS= <i>Gossypium hirsutum</i>]	Q2L902	39,5	5,55	0,148	0,0417063
26	Photosystem II CP43 reaction center protein [OS= <i>Vitis vinifera</i>]	Q0ZJ24	51,8	7,18	0,152	0,044112025

3.2.2.1 Kuraklık Stres Tepkisi ile İlişkili Başlıca Protein İfadelerinin Çeşitler ve Stres Grupları Arası Karşılaştırmalı Analizi

Bitkilerde kuraklık gibi abiyotik stres koşullarında meydana gelen protein ifade değişiklikleri, strese karşı geliştirdikleri adaptif moleküler mekanizmaları anlamamız için önem taşımaktadır. Yaptığımız çalışmada kuraklığa toleranslı ve hassas zeytin çeşitlerinde kuraklık stresinin oluşturduğu değişiklikler proteom seviyesinde araştırılmıştır. Değişiklik gösteren protein ifadeleri kat artışları (fold change log2) baz alınarak değerlendirilmiş ve kuraklık stres tepkisinde rol alan başlıca protein gruplarının davranışları analiz edilmiştir (Tablo 3.30).



Tablo 3.30 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin bitkisinde tespit edilen kuraklık stresi ile ilişkili proteinlerin kuraklık ve iyileşme gruplarındaki kat değişimleri (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu, +: normalde ifade edilmezken ifade edilmeye başlanan protein, -: normalde ifade edilirken, ifadesi yok olan protein).

Protein Sembolü	Erişim Numarası	Protein Tanımı	26	94		
			Kat artışı (fold change log2)			
			D / K	DR / D	D / K	DR / D
DHN	A8CVF3	dehydrin DHN1 [OS= <i>Avicennia marina</i>]	7.1	0.7	4.8	2.1
AQP	Q7XSQ9	Probable aquaporin PIP1-2 [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	1.9	1.4	0.4	0.5
HSP	Q9S7C0	Heat shock 70 kDa protein 14 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	2.9	0.4	0.7	2.6
	Q9S9N1	Heat shock 70 kDa protein 5 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	4.2	0.8	2.1	0.8
	Q9STW6	Heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	3.8	0.7	4.5	2.1
	Q01899	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial [OS= <i>Phaseolus vulgaris</i>]	0.8	1.1	1.1	0.9
	P09189	Heat shock cognate 70 kDa protein [OS= <i>Petunia x hybrida</i>]	0.9	0.8	1.2	1.4
	P31170	Heat shock protein 21, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	9.7	1.7	7.3	3.7
	A2YWQ1	Heat shock protein 81-1 [OS= <i>Oryza sativa Indica Group</i>]	+	1.4	1.3	2.4
	P51819	heat shock protein 83 [OS= <i>Ipomoea nil</i>]	0.9	1.0	0.7	4.4
	P27879	18.1 kDa class I heat shock protein [OS= <i>Medicago sativa</i>]	+	0.8	1.1	1.6
	Q08275	17.0 kDa class II heat shock protein [OS= <i>Zea mays</i>]	+	-	+	-
	Q0DY72-1	17.8 kDa heat shock protein [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	1.1	1.1	0.3	4.2
	Q9SIF2	Heat shock protein 90-5, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	1.8	0.8	1.4	3.5
SOD	O49073	Superoxide dismutase [Cu-Zn] [OS= <i>Paulownia kawakamii</i>]	2.1	1.0	0.2	17.6
	P93258	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 1 [OS= <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	1.8	1.4	0.5	3.0
	Q8L5E0	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 [OS= <i>Olea europaea</i>]	1.4	0.8	0.2	5.7
	P93407	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	3.0	0.4	0.4	8.3
	P35017	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial [OS= <i>Hevea brasiliensis</i>]	+	-	0.3	24.7
CAT	P49315	Catalase isozyme 1 [OS= <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>]	1.7	0.8	0.8	2.2
	P55308	Catalase isozyme 2 [OS= <i>Hordeum vulgare</i>]	7.6	0.7	+	1.8
	P29756	catalase-1/2 [OS= <i>Glycine max</i>]	4.0	0.6	+	-
	O48561	Catalase-4 [OS= <i>Glycine max</i>]	3.4	0.4	31.4	0.2
APX	Q05431-1	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	1.1	1.8	0.7	1.2
	Q9FE01	L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	0.5	-	0.4	11.3
	Q42592	L-ascorbate peroxidase S, chloroplastic/mitochondrial [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	1.2	1.6	0.4	1.7
PO	P84714	peroxidase [OS= <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>]	0.7	1.6	0.2	6.6
	P85346	Peroxidase 1 [OS= <i>Cycas revoluta</i>]	0.8	1.3	0.2	7.6
	Q96520	Peroxidase 12 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	0.9	0.9	0.2	6.5
	Q9SD46	Peroxidase 36 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	0.5	1.8	-	+
	Q9FLC0	Peroxidase 52 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	1.0	1.0	0.6	1.6
	Q42578	Peroxidase 53 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	1.7	0.9	0.5	4.2
RH	Q56XG6-1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	1.2	0.8	0.5	0.8
	Q8L7S8-1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 3, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	0.8	-	+	-
	Q5N7W4	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 30 [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	0.8	0.9	+	-
	Q2R1M8	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 52C [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	1.1	0.9	4.0	0.3
bAS	I7C6E8	Beta-amyrin 28-oxidase [OS= <i>Panax ginseng</i>]	0.8	2.3	1.0	0.4

Kuraklık stres tepkisinde rol alan başlıca proteinler; geç embriyogenez (LEA) proteinleri, dehidrinler (DHN), ısı şoku proteinleri (HSP) ve antioksidan proteinler (SOD, CAT, APX, PO) ve transkriptom datasında tespit edilip kuraklık stresi ile ilişkisi bildirilen RNA helikazlar (RH) ve beta amyrin (bAS) proteinleri olmak üzere gruplandırılmıştır.

Bu gruplandırma içerisinde LEA (Late Embryogenesis Abundant) protein ailesinin bir alt üyesi olan Dehydrin (DHN) proteinleri, bitkilerde kuraklık stresi sırasında protein ve membran stabilizasyonunu sağlayarak hücre zarı bütünlüğünü ve hücrel su dengesini korumada görev almaktadır (Yıldız ve ark., 2020). Zeytin gibi çok yıllık bitki türlerinde DHN1, kuraklık ve benzeri abiyotik stres koşullarında doku bütünlüğünü koruma ve hayatta kalma şansı artırma açısından kritik kabul edilmektedir (Wang ve ark., 2003; Yang ve ark., 2012). Bu çalışmada kuraklık stresi altında DHN1 proteini için kuraklığa hassas ve toleranslı her iki çeşitte de gözlemlenen ifade artışı, bu proteinin kuraklık stresi karşısında bitkisel savunma sisteminde önemli rol oynadığını göstermektedir. Kuraklık stresi altında özellikle kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde gözlemlenen protein ifade profili hızlı ama kısa süreli bir savunmayı işaret etmektedir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde ise daha dengeli ama iyileşme döneminde de devam eden protein ifadesi (2.1 kat), bu çeşidin stres etkisini uzun vadeli yönetme becerisine sahip olduğuna işaret ediyor olabilir. Bu sonuç, hassas çeşidin strese daha ani yanıtlar verirken toleranslı çeşidin ise stres altında daha dengeli bir adaptif yanıt geliştirdiğini göstermektedir.

Su ve bazı küçük moleküllerin hücre zarından taşınımını sağlayan aquaporinler (AQP), bitkide kuraklık stresi karşısında adaptasyonu su iletimini düzenleyerek geliştiren membran proteinleridir (Maurel ve ark., 2008). Akdeniz bitki örtüsünün karakteristik bir bitkisi olan zeytin bitkisi için AQP ekspresyonunun hassasiyetle düzenlenmesinin, transpirasyon kontrolü ve kök-yaprak su iletimi açısından kritik olduğu bildirilmiştir (Secchi ve Zwieniecki, 2011; Sade ve ark., 2009). Bu çalışmada kuraklık stresi altında kuraklığa hassas ve toleranslı zeytin çeşitlerinde AQP PIP1-2 protein ifadelerinde gözlemlenen farklı stres yanıtları, bu proteinin kuraklık stresi karşısında bitkisel savunma sisteminde çeşitler arası ve toleransa bağlı bir rol oynadığını göstermektedir. Kuraklık stresi altında özellikle kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde gözlemlenen azalan protein ifade profili yüksek su kaybı riskine karşı reaktif bir savunmayı işaret etmekte olabilir. Ayrıca kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidin gözlemlenen düşük ama sabit protein

ifadesi ise daha etkin bir stomatal kapanma ve su tutma kapasitesinin varlığı ile ilişkilendirilebilir.

Isı şoku proteinleri (HSP), kuraklık gibi abiyotik stres koşullarında indüklenen ve moleküler şaperonlar olarak görev yapan önemli proteinlerdir (Tablo 3.31). Normal fizyolojik koşullarda HSP'ler, translasyon sonrası proteinlerin doğru katlanmasını sağlamak ve proteinlerin hücre içi membran sistemleri boyunca taşınmasında görev almaktadır. Ancak kuraklık gibi stres koşullarında bu proteinlerin rolleri daha kritik hâle gelmektedir. Stres sırasında HSP'ler, denatüre olmuş proteinlerin bir araya gelerek agregat (küme) oluşturmasını engellemekte ve bu proteinlerin yeniden fonksiyonel konformasyonlarına kavuşmasına yardımcı olmaktadır (Dolferus, 2014). Bu sayede hücrel protein homeostazı korunur ve stresin neden olduğu yapısal bozulmaların önüne geçilir.

Tablo 3.31 Proteomik analizler sonucunda kuraklık stresi ile ilişkili anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen ısı şoku proteinlerinin organizmadaki konum ve işlevleri.

Protein	Tanım	Konum	İşlev
P31170	HSP21	Kloroplast	PSII stabilitesi, ROS birikiminin önlenmesi
P27879	18.1 kDa HSP	Sitoplazmik	Protein agregatlarının çözünmesi
Q08275	17.0 kDa HSP (class II)	Kloroplast	Membran koruma, termotolerans
Q0DY72-1	17.8 kDa HSP	Kloroplast	ROS detoksifikasyonu ve termal savunma
Q9S7C0	HSP70-14	Sitoplazmik	Protein katlama, koruma (stres yanıtının ilk safhası)
Q9S9N1	HSP70-5	ER	ER stresi altında protein kalitesi kontrolü
Q9STW6	HSP70-6	Kloroplast	Fotosentez proteinlerinin stabilitesi
Q01899	HSP70, mitokondrial	Mitokondri	Solunum proteinlerinin korunması
P09189	Heat shock cognate 70 kDa	Konstitütif HSP	Normal metabolizma altında görevli "housekeeping" HSP
A2YWQ1	HSP81-1	Sitozol	Sinyal proteinleri ile etkileşim, termotolerans
P51819	HSP83	Sitozol	Protein yeniden katlanma, onarım
Q9SIF2	HSP90-5	Kloroplast	Protein komplekslerinin stabilitesi, fotosentez regülasyonu

Düşük moleküler ağırlıklı HSP'lerin genellikle çevresel stres koşullarında oksidatif strese karşı erken stres yanıtında rol oynadığı bildirilmiştir (Wahid ve ark., 2007; Sedaghatmehr ve ark., 2016). Bu rolleri ile kloroplast içinde özellikle fotosistem II (PSII) bileşenlerinin stabilitesini sağlayarak membran yapısını ve Rubisco'yu korumaktadırlar. ROS birikimi

nedeniyle hasar görmüş proteinlerin agregasyonunu da önlerler (Waters, 2013). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar kuraklık stresi sırasında ve sonrasında kuraklığa hassas ve toleranslı her iki çeşitte genel olarak düşük moleküler ağırlıklı HSP'lerin protein ifadelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Kuraklık stresiyle artan ifade profili sergileyen HSP proteinleri içerisinde özellikle HSP21 öne çıkmaktadır. Kuraklığa hassas zeytin çeşidinde kuraklık stresine bağlı ifade artışı toleranslı çeşitten daha yüksek, iyileşme döneminde ise her iki çeşitte gözlemlenen ifade artışı hassas çeşitte toleranslıya göre daha düşüktür. Bu durum özellikle bu protein özelinde bir hafıza proteini olarak kuraklık stres tepkisinde rol oynadığını düşündürmektedir. Ayrıca kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde daha dengeli ve iyileşme döneminde de devam eden protein ifadesi, bu çeşidin stres etkisini uzun vadeli yönetme becerisine işaret etmektedir. Genel olarak zeytin bitkisinde kuraklık stresine bağlı artan ifade profili sergileyen HSP proteinleri, bitkinin artan ROS birikimini azaltmada ve kloroplast özelinde fotosentez sistemlerinin korunması yönünde bu proteinleri aktive ettiğini göstermektedir. Bu durum PSII kompleksinin stabilizasyonu ve stres altında zarar gören fotosentez performansının yeniden kazanımı ile ilişkilendirilebilir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde gözlemlenen daha dengeli stres yanıtının kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde ani artış ve azalış olarak belirlenmesi toleranslı çeşidin stres altında daha dengeli bir adaptif yanıt geliştirdiğini de göstermektedir.

Daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan ATP bağımlı şaperonlardan HSP70 ailesi üyelerinin genel olarak kuraklık gibi abiyotik stres koşullarında protein katlanması, agregat çözünmesi ve translokasyon görevlerini üstlendiği tespit edilmiştir (Wang ve ark, 2004; Lin ve ark, 2001). HSP90 ve HSP80 ailelerinin de genel olarak transkripsiyon faktörleri ile sinyal proteinlerinin taşınımı ve aktivasyonu gibi daha kompleks görevlere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu proteinler translasyon sonrası protein modifikasyonu süreçlerinde de rol oynamaktadır (Sangster ve Queitsch, 2005). Hücrel stres sırasında proteinlerin doğru katlanmasını sağlayan HSP70-14 (Q9S7C0) protein ifadesinin kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık sırasında gözlemlenen hızlı artışı iyileşme döneminde ani şekilde düşmektedir. Bu durum hassas zeytin çeşidinde kuraklık stresi ile birlikte oluşan proteotoksik stress kaynaklı olabilir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde ise iyileşme sırasında belirgin bir artış

gözlenmiştir. Bu durum, kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde stres sonrası protein yeniden yapılandırmasını etkin biçimde gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Endoplazmik retikulumda bulunan ve proteinlerin katlanma kalitesini artırarak hücre içi homeostazı koruyan HSP70-5 (Q9S9N1) protein için kuraklık sırasında kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde toleranslı çeşide kıyasla daha yüksek gözlemlenen ifade artışı hassas çeşidin daha fazla proteotoksik stres yaşandığına işaret edebilir. Ayrıca her iki çeşit için de iyileşme döneminde gözlemlenen düşük ifade profili ilgili proteinin stress yanıtıyla ilişkili olarak active edildiğini ve stress sonrası inaktif olduğunu göstermektedir. Kloroplastlarda bulunan ve fotosentez enzimlerinin stabilizasyonu ile ilişkilendirilen HSP70-6 (Q9STW6) protein ifadesinin kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık sırasında gözlemlenen hızlı artışı iyileşme döneminde ani şekilde düşmektedir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde ise kuraklık stresi ile artan protein ifadesi iyileşme döneminde düşmekte fakat hala anlatımı kontrole göre yüksektir. Bu durum, kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinin kloroplast fonksiyonlarını daha etkili koruduğunu göstermektedir. Yüksek molekül ağırlıklı diğer HSP proteinlerinden HSP90-5 (Q9SIF2) ve HSP83 (P51819) için özellikle iyileşme grupları için kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde gözlemlenen stres sonrası protein artışı dikkat çekmektedir. Bu durum stres sonrası sinyal yollarının yeniden aktivasyonu ve protein komplekslerinin restorasyonu anlamına gelmektedir. Yapılan çalışmalar HSP90 ailesinin özellikle toleranslı genotiplerde kuraklık sonrası toparlanma başarısının bir göstergesi olduğunu belirtmiştir (Sangster ve Queitsch, 2005).

Bitkilerde kuraklık stresine bağlı olarak artan reaktif oksijen türleri (ROS), oksidatif hasara yol açmaktadır. Bu nedenle antioksidan sistemlerin aktive edilmesi, hücresel zararlardan korunma ve metabolik dengenin korunması için yaşamsal önem taşımaktadır (Gill ve Tuteja, 2010).

Genellikle kloroplast, mitokondri ve sitozolde konumlanan SOD enzimleri süperoksit radikalini H_2O_2 'ye dönüştürerek oksidatif hasarı önlemektedirler (Gill ve Tuteja, 2010). SOD aktivitesi, zeytinde kuraklık toleransının en önemli biyokimyasal göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (Bajji ve ark., 2002; Sofo ve ark., 2005). Çalışmamızda özellikle kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidi iyileşme gruplarının kloroplastik ve mitokondrial SOD'larında gözlemlenen dramatik artışlar kuraklığa hassas

(Gemlik-26) zeytin çeşidinde oldukça düşük olarak tespit edilmiştir. İyileşme sürecinde, özellikle kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde gözlemlenen yüksek SOD ifadesi, ROS ile mücadelede daha güçlü ve kalıcı bir savunmaya işaret etmekte ve toleranslı çeşidin oksidatif hasarı etkin şekilde tolere edebildiğini göstermektedir.

Genel olarak peroksizomlarda yer alarak β -oksidasyon ve fotorespirasyon sırasında oluşan H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştüren temel antioksidan enzim olan katalaz (CAT) fotosentez yapan dokularda ROS birikimini sınırlayarak kloroplast fonksiyonunun devamını sağlamaktadır (Aebi, 1984; Mittler, 2002). Çalışmamızda özellikle kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidi için kuraklık stresi sırasında tespit edilen tüm CAT ifadelerindeki dramatik artış bitkide mitokondriyal oksidatif strese karşı çok güçlü bir stres yanıtının oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca ilgili proteinde gözlemlenen bu artış dengeli ve uzun sürelidir. Özellikle toleranslı türlerde bu artışın daha uzun süreli olduğunun gözlemlenmesi literatürle uyumludur. (Nahar ve ark., 2016; Mhamdi ve ark., 2010). Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidi için ise kuraklık stresi sırasında ve sonrasında yüksek ama kısa süreli stres tepkileri olduğu gözlenmiştir.

Özellikle kloroplast, mitokondri ve sitozolde konumlanan askorbat peroksidaz (APX) enzimi, H_2O_2 'yi askorbat kullanarak indirgemekte ve detoksifiye etmektedir. APX'nin yüksek aktivitesi, fotosentetik dokularda H_2O_2 'nin hassas kontrolünü sağlamaktadır. Özellikle kloroplastik APX-S izoformlarının kuraklık altında stabil kalması, fotosistem II'nin korunması açısından kritik öneme sahiptir (Gill ve Tuteja, 2010; Foyer ve Noctor, 2005). Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde özellikle APX2'nin (Q9FE01) başta olmak üzere iyileşme döneminde dikkat çekici biçimde arttığı gözlemlenmiştir. Literatürde yapılan benzer bir çalışmada da bir APX2 izoformunun iyileşme döneminde 10 katın üzerinde arttığını bildirmiştir (Zhou ve ark., 2022). Bu durum oksidatif hasarı etkin şekilde tolere edilmeye başlanarak askorbat-glutasyon döngüsünün yeniden aktive olduğunu gösteriyor olabilir. Ayrıca bu durum uzun vadeli bir antioksidan stres yanıtının oluştuğunu da göstermektedir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidi için ise bu artış yok denecek kadar azdır. Bu durum kuraklık sonrası antioksidan sistemin tam toparlanamadığını gösteriyor olabilir.

Peroksidazlar (PO) lignin biyosentezine katkı sağlarken aynı zamanda ros detoksifikasyonunda görev almaktadır. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin

çeşidinde özellikle PO36'nın (Q9SD46) başta olmak üzere iyileşme döneminde dikkat çekici biçimde arttığı gözlemlenmiştir. Peroksidaz izoformlarının özellikle kuraklık sonrası iyileşme döneminde toleranslı genotiplerde daha yüksek oranda ifade edildiği bildirilmiştir (Passardi ve ark., 2005; Cosio ve Dunand, 2009). Bu durumun kuraklık stresi sonrasında ligninleşmenin artışına bağlı olarak hücre duvarının yeniden yapılandırılarak su kaybına karşı doğal ve kalıcı koruyucu yanıtların oluşturulmasına katkı sağladığını düşündürmektedir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidi için ise bu artışın daha kısıtlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum aynı zamanda PO enzimlerinin her iki çeşit için de bir hafıza proteini olarak ifade edilebileceğini göstermektedir.

DEAD-box RNA helikazlar, stres adaptasyonu süreçlerinde transkripsiyonel düzenleme mRNA işlenmesi, taşınması ve çevirisi görevlerini üstlendiği bildirilmiştir (Owtrim, 2006). Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlara göre, kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) her iki zeytin çeşidinde de RH15 proteini için kuraklık gruplarında hafif ifade artışı, iyileşme gruplarında ise hafif ifade azalışı gözlemlenmiştir. Bu durum kuraklık stresi sırasında genel RNA işleme aktivitesinin arttığını ve stres sonrası bu ifadenin baskılandığını göstermektedir. Özellikle kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde RH3 ve RH30 protein ifadelerinde kuraklık stres ve sonrası sırasıyla gözlemlenen dramatik artış ve azalış dikkat çekmektedir. Bu durum toleranslı çeşidin adaptif mRNA işleme mekanizması kuraklık stres ilişkili olarak aktive ettiğini ve aktif RNA modifikasyonu gerçekleştirdiğini göstermektedir. Toleranslı çeşitte gözlemlenen ilgili proteindeki bu ifade profili hassas çeşitte gözlemlenememekle birlikte bu ifade profilinin bitki stres tolerans mekanizmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Son olarak Toleranslı çeşitte tespit edilen kuraklık stresi ile birlikte RH52C proteininde meydana gelen 4 katlık ifade artışının iyileşme grubunda azalan bir profil sergilemesi, ilgili proteinin toleranslı çeşitte stres yanıtında özelleşmiş mRNA modifikasyonu ile ilişkili aktive olduğunu düşündürmektedir.

Triterpenoid saponinlerin biyosentezinde görev alan ve bitkilerde kuraklık gibi çevresel streslere karşı koruyucu rol oynayan Beta-amyrin 28-oxidase (bAS) proteininin kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık stresi ile birlikte artarken iyileşme gruplarında ifadesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu stresten sonra hücre zarlarının güçlendirilmesi ve bitki savunmasının aktive edildiğini gösterir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde ise ilgili protein ifadesinin hassas çeşitte tespit edilenin

tam tersi olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum toleranslı çeşitte stres sonrası sekonder metabolitlere bağlı gelişen savunma ihtiyacının azaldığı için genel stres yükünün daha az olduğunu düşündürmektedir.

Elde edilen bulgular, kuraklığa hassas ve toleranslı zeytin çeşitlerinin moleküler düzeyde farklı yanıt mekanizmalarına sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Hassas çeşitte stres sırasında ani ve güçlü bir protein aktivasyonu gözlenirken, toleranslı çeşidin daha dengeli ve uzun vadeli adaptif savunma mekanizmaları geliştirdiği tespit edilmiştir. Özellikle HSP ve antioksidan enzimlerin ekspresyon paternleri, bu adaptasyon farklarının belirleyici biyobelirteçleri arasında yer almaktadır. Bu proteinler, kuraklık stresine toleranslı genotiplerin tanımlanmasında ve ıslah çalışmalarında potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebilir.

3.2.2.2 Kuraklık Stres Tepkisi ile İlişkili Değişiklik Gösterdiği Tespit Edilen Protein İfadelerinin Çeşitler ve Stres Grupları Arası Karşılaştırmalı Analizi

Yaptığımız çalışmada ek olarak kuraklığa hassas ve toleranslı zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi sırasında ve iyileşme dönemlerinde ortak artış ve azalış gösteren proteinler tespit edilerek protein ifadeleri kat artışları (fold change log2) baz alınarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.32, Tablo 3.33, Tablo 3.34, Tablo 3.35).

Tablo 3.32 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik ve Memecik çeşitlerinde tespit edilen ortak proteinlerin kuraklık gruplarındaki kat değişimlikleri (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, +inf: normalde ifade edilmezken ifade edilmeye başlanan protein).

Erişim Numarası	Protein Tanımı	(26D) / (26K)	(94D) / (94K)
B5LMS0	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H, chloroplastic [OS= <i>Cicer arietinum</i>]	+ inf	+ inf
P35513	Phenylalanine ammonia-lyase [OS= <i>Nicotiana tabacum</i>]	+ inf	+ inf
Q8VWZ7	Geraniol 8-hydroxylase [OS= <i>Catharanthus roseus</i>]	+ inf	+ inf
Q6H849	bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4 [OS= <i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	+ inf	+ inf
Q9T016	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8B [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	+ inf	+ inf
Q9LV21	T-complex protein 1 subunit delta [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	+ inf	+ inf
Q945K7	Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5, mitochondrial [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	+ inf	+ inf
Q9ZNZ7-1	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1, chloroplastic/mitochondrial [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	+ inf	12.157
P31170	Heat shock protein 21, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	9.669	7.32

Tablo 3.33 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik ve Memecik çeşitlerinde tespit edilen ortak proteinlerin iyileşme gruplarındaki kat değişimlikleri (26: Gemlik, 94: Memecik, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu, +inf: normalde ifade edilmezken ifade edilmeye başlanan protein).

Erişim Numarası	Protein Tanımı	(26DR) / (26D)	(94DR) / (94D)
P22954	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	+ inf	+ inf
P16347	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	+ inf	+ inf
Q99070	glycine-rich RNA-binding protein 2 [OS= <i>Sorghum bicolor</i>]	+ inf	+ inf

Tablo 3.34 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik ve Memecik çeşitlerinde tespit edilen ortak proteinlerin kuraklık gruplarındaki kat değişimlikleri (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, -inf: normalde ifade edilirken, ifadesi yok olan protein).

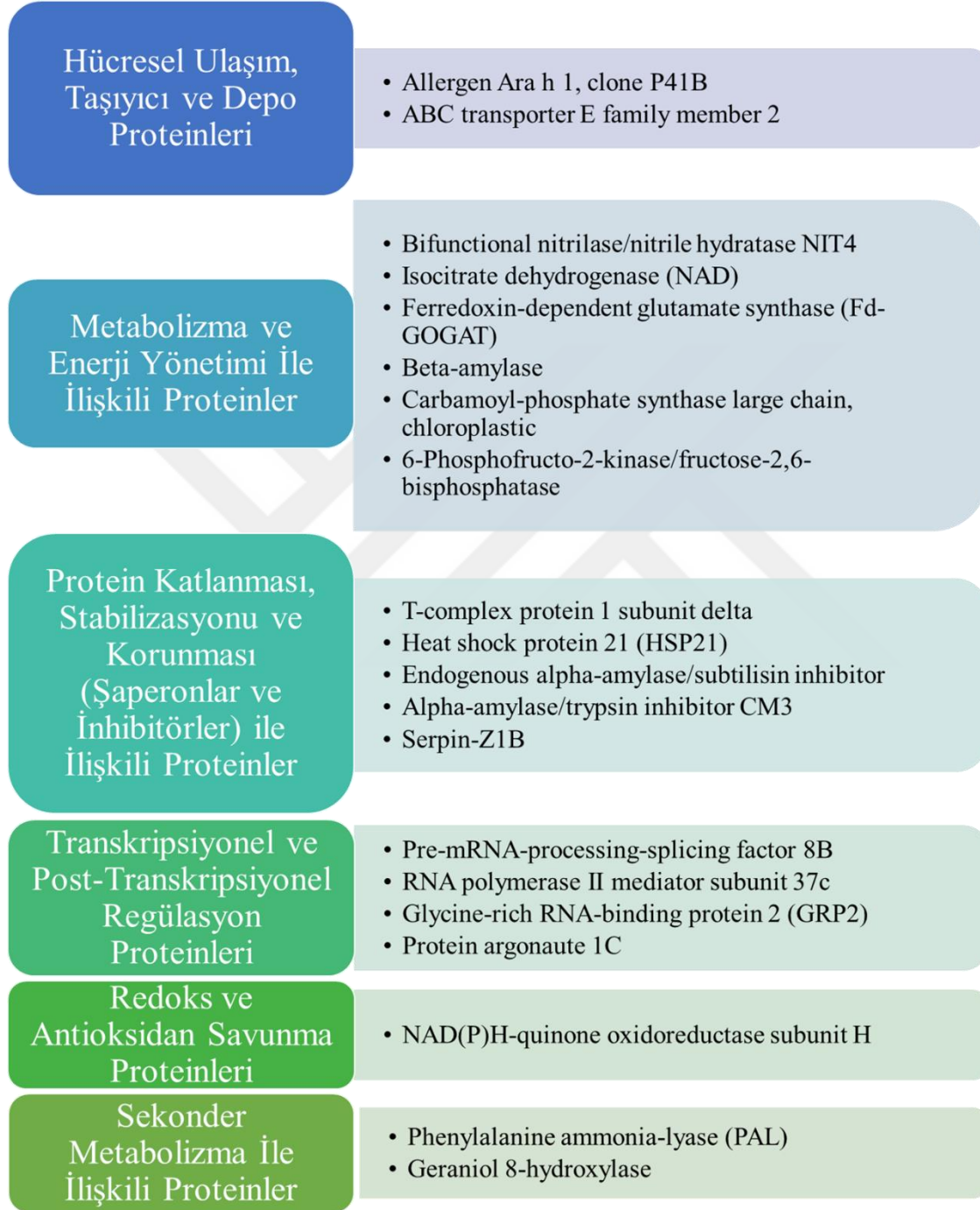
Erişim Numarası	Protein Tanımı	(26D) / (26K)	(94D) / (94K)
P17314	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3 [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	- inf	- inf
P93693	Serpin-Z1B [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	- inf	- inf
P93594	beta-amylase [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	- inf	- inf
Q99070	glycine-rich RNA-binding protein 2 [OS= <i>Sorghum bicolor</i>]	- inf	- inf
P16347	Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor [OS= <i>Triticum aestivum</i>]	- inf	- inf

Tablo 3.35 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre Gemlik ve Memecik çeşitlerinde tespit edilen ortak proteinlerin iyileşme gruplarındaki kat değişimlikleri (26: Gemlik, 94: Memecik, K: Kontrol grubu, R: İyileşme (recovery) grubu, -inf: normalde ifade edilirken, ifadesi yok olan protein).

Erişim Numarası	Protein Tanımı	(26DR) / (26D)	(94DR) / (94D)
Q9MB58	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	- inf	- inf
Q6K972	Protein argonaute 1C [OS= <i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	- inf	- inf
Q9T016	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8B [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	- inf	- inf
Q42601	Carbamoyl-phosphate synthase large chain, chloroplastic [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	- inf	- inf
P43238	Allergen Ara h 1, clone P41B [OS= <i>Arachis hypogaea</i>]	- inf	- inf
Q8LPJ4	ABC transporter E family member 2 [OS= <i>Arabidopsis thaliana</i>]	- inf	- inf

Zeytin bitkisinde her iki çeşitte de kuraklık stres tepkisinde ortak olarak rol aldığı tespit edilen proteinler, hücresel ulaşım ve taşıyıcı ve depo proteinleri; metabolizma ve enerji yönetimi ile ilişkili proteinler; protein katlanması, stabilizasyonu ve korunması (şaperonlar ve inhibitörler) ile ilişkili proteinler; transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel

regülasyon proteinleri, redoks ve antioksidan savunma proteinleri, sekonder metabolizma ile ilişkili proteinler; olmak üzere 6 grup altında sınıflandırılarak yorumlanmıştır (Şekil 3.79).



Şekil 3.79 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre kuraklık stresi ile ilişkili olduğu tespit edilen Gemlik ve Memecik çeşitlerindeki ortak proteinler ve ait oldukları metabolik yollar.

3.2.2.2.1 Transkripsiyonel ve Post-Transkripsiyonel Regülasyon İle İlişkili Proteinler

Bitkiler, çevresel streslere karşı karmaşık bir genetik yanıt ağı geliştirerek hayatta kalmaya çalışmaktadır. Bu ağda yer alan transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel regülasyon proteinleri, gen ekspresyonunun zamanlaması, seviyesi ve çeşitliliğini kontrol ederek alternatif splicing ve mRNA stabilitesi sağlanmasında rol oynamakta ve böylece bitkinin stres toleransının temelini oluşturarak, strese karşı korumaktadır (Staiger ve Brown, 2013; Ling ve ark., 2021). Zeytin bitkisinde kuraklık stresi ile ilişkili tespit edilen transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel regülasyon proteinleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.36).

Tablo 3.36 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel regülasyon ile ilişkili proteinlerin listesi.

Protein Adı	İşlevsel Sınıf	Kuraklık Yanıtındaki Rolü	Kaynak
Pre-mRNA-processing-splicing factor 8B	RNA işleme (splicing)	Spliceozom bileşeni olarak stres altında alternatif splicing yoluyla stresle ilişkili genlerin düzenlenmesinde rol oynar.	Staiger ve Brown, 2013
RNA polymerase II mediator subunit 37c	Transkripsiyon regülasyonu	Gen ekspresyonunu başlatan RNA polimeraz II kompleksinin parçası olarak stresle ilişkili genlerin transkripsiyonel regülasyonuna katkı sağlar.	Liu ve ark., 2022
Glycine-rich RNA-binding protein 2 (GRP2)	RNA-bağlayıcı protein	mRNA stabilitesi, taşınması ve translasyonu ile ilgili olarak kuraklıkta post-transkripsiyonel regülasyona katkı sağlar.	Kim ve ark., 2007
Protein argonaute 1C	RNAi regülasyonu	RNA interferans yolunun bileşeni olarak mRNA susturulmasında görev alır.	Mallory ve Vaucheret, 2010

3.2.2.2.1.1 Glycine-Rich RNA-Binding Protein 2 (GRP2)

Bitkiler, çevresel stres koşullarına karşı hayatta kalabilmek için gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyen çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalardan biri, RNA metabolizmasında görev alan glycine-rich RNA-binding protein (GR-RBPs) ailesidir. Glycine-rich RNA-binding proteinler (GRP), bitkilerde genellikle stres koşullarına karşı hızlı ve geçici yanıtların düzenlenmesinde görev alan post-transkripsiyonel regülatör proteinlerdir. GR-RBP'ler çeşitli RNA molekülleriyle etkileşime girerek, RNA metabolizmasının farklı aşamalarında görev alırlar. GRP2, bu

ailenin önemli bir üyesi olarak hem mRNA işlenmesi, transportu ve stabilizasyonu, hem de çevresel uyarılara bağlı olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Ma ve ark., 2021; Kim ve ark., 2008; Ambrosone ve ark., 2012).

Arabidopsis ve pirinç gibi model türlerde GRP ailesi üyeleri, kuraklık ve soğuk gibi streslerde farklılaşan ifade düzeyleriyle dikkat çekmektedir (Kim ve ark., 2007; Shim ve ark., 2021). *Arabidopsis thaliana*'da yapılan çalışmalar, GRP2'nin soğuk stres altında tohum çimlenmesi ve fide gelişimini hızlandırdığını, ayrıca soğuk ve don toleransını artırdığını göstermiştir (Kim ve ark., 2007). Ancak, kuraklık stresi gibi diğer abiyotik stres koşullarında GRP2'nin rolü daha az anlaşılmıştır.

Yaptığımız çalışmada hem toleranslı (Memecik-94) hem de hassas (Gemlik-26) zeytin çeşitlerinde GRP2 ekspresyonu kuraklık döneminde önemli düzeyde artmakta, iyileşme sürecinde ise azalmaktadır. Bu durum, GRP2'nin stres sırasında aktif, ancak stres ortadan kalktığında baskılanan bir stres yanıt proteinine işaret ettiğini göstermektedir.

Kuraklık stresi sırasında hücresel su kaybı, iyon dengesizlikleri ve oksidatif stres birikimi gibi faktörler, mRNA'nın işlenmesini ve stabilitesini olumsuz etkileyebilir. Bu koşullar altında zeytin bitkisinde tespit edilen kuraklık stresi altında GRP2 protein ifadesinin azalması, bitkinin enerji tasarrufu yapma ve hayati olmayan süreçleri baskılama stratejisinin bir parçası olabilir. Bu azalma, RNA metabolizmasıyla ilişkili süreçlerin sınırlandırılmasına yol açarak, bitkinin hayatta kalma şansını artırmak için enerji ve kaynaklarını daha kritik süreçlere yönlendirmesini sağlayabilir (Fennoy ve Bailey-Serres, 1993). Benzer şekilde, pirinçte yapılan çalışmalar, GRP3'ün kuraklık toleransında olumlu bir düzenleyici rol oynadığını ve stres yanıtı genlerinin mRNA stabilitesini modüle ederek reaktif oksijen türlerinin birikimini azalttığını göstermiştir (Shim ve ark., 2021).

Bu bağlamda, zeytin bitkisinde GRP2 proteininin kuraklık stresi altında azalan ifadesi, bitkinin stres koşullarında genetik düzenlemelerini yeniden yapılandırma çabasının bir göstergesi olabilir. Bu durum, bitkinin hayatta kalma şansını artırmak için enerji ve kaynaklarını daha kritik süreçlere yönlendirmesini sağlayabilir.

GR-RBP'nin zeytin bitkisindeki spesifik rolleri üzerine daha fazla araştırma yapılması, bu proteinlerin kuraklık toleransındaki katkılarını daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır. Bu bilgiler, zeytin gibi ekonomik öneme sahip bitkilerde kuraklık toleransını artırmaya yönelik genetik iyileştirme stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Zeytin bitkisinde tespit edilen kuraklık stresi sonrası iyileşme döneminde gözlemlenen GRP2 protein ifadesinin artması stres sonrası iyileşme döneminde mRNA transkriptlerinin stabilizasyonu ve protein sentezinin düzenlenmesi için RNA bağlayıcı proteinlere yeniden ihtiyaç duymasından kaynaklanıyor olabilir (Liu ve ark., 2023; Ambrosone ve ark., 2012). Bu durum zeytin çeşitlerinin iyileşme döneminde normal metabolik faaliyetlerini yeniden başlatıp protein sentezi, büyüme ve onarım süreçlerini tekrar aktive ettiğini göstermektedir. Bu artış, zeytin bitkisinin stres sonrası toparlanma kapasitesi ile doğrudan ilişkilidir.

3.2.2.2.1.2 Argonaute 1C (AGO1C)

Argonaute (AGO) proteinleri, bitkilerde küçük RNA'larla (miRNA, siRNA) kompleks oluşturarak post-transkripsiyonel gen susturma (PTGS) ve transkripsiyonel gen susturma (TGS) süreçlerinde kilit rol oynamaktadırlar (Mallory ve Vaucheret, 2010). Özellikle AGO1C, bitkisel sistemlerde miRNA aracılı gen regülasyonu ve stres yanıt modülasyonu açısından önemli bir izoformdur (Vaucheret, 2008).

Kuraklık gibi abiyotik stres koşulları altında bitkiler, hayatta kalmalarını desteklemek amacıyla bazı genlerin ekspresyonunu baskılamak ve bazı genleri aktive etmek için RNAi (RNA interference) yollarını devreye sokmaktadır. AGO1C, bu süreçte stres adaptasyonu için gerekli olan transkriptlerin seçici susturulmasında görev almaktadır. Özellikle, su dengesini, oksidatif stres toleransını ve hücrel homeostazı düzenleyen birçok genin miRNA aracılığıyla kontrol edilmesinde AGO1C aktif rol oynadığı bildirilmiştir (Fang ve Qi, 2016; Bologna ve Voinnet, 2014).

İyileşme sürecinde stres uyarıları azaldığı için stresle ilişkili gen susturma mekanizmalarına olan ihtiyaç azalmakta, bitkinin normal metabolik faaliyetlere (büyüme, fotosentez, gelişim) dönmesi için gen ekspresyonunun yeniden düzenlenmesi gerekmektedir. Bu adaptasyon süreci kapsamında AGO1C ekspresyonu azalması olasıdır (Liu ve ark., 2022). Yaptığımız çalışmada hem toleranslı (Memecik-94) hem de hassas (Gemlik-26) zeytin çeşitlerinde AGO1C protein ifadesinin iyileşme sürecinde azaldığı tespit edilmiştir. Özellikle zeytin bitkisi gibi yavaş büyüyen ve uzun ömürlü pereniyal türlerde, iyileşme sürecinde AGO1C düzeylerinin azalması büyüme ile ilişkili genlerin yeniden aktive edildiğini gösteriyor olabilir. Bu adaptif azalma, zeytin bitkisinin metabolik esnekliği artırarak normal fizyolojik dengenin (homeostazın) hızlıca yeniden

kurulmasına katkıda bulunmakta ve iyileşme sürecinde kontrollü bir toparlanma stratejisi geliştirdiğini göstermektedir.

3.2.2.2.1.3 Pre-mRNA-Processing-Splicing Factor 8B (PRPF8B)

Bitkilerin abiyotik streslere karşı geliştirdiği adaptif yanıtlar, transkripsiyon ve post-transkripsiyonel düzenleme düzeyinde yeniden yapılanmalarla karakterize edilmektedir. Bu yeniden yapılanmanın önemli unsurlarından biri, RNA işleme ve alternatif splicing mekanizmalarıdır. Pre-mRNA-processing-splicing factor 8B (PRPF8B), spliceozomun merkezi bileşenlerinden biri olarak, pre-mRNA'nın doğru ve verimli şekilde olgun mRNA'ya dönüştürülmesini sağlamaktadır (Luo ve ark., 1999; Marquez ve ark., 2012). Bu nedenle *PRPF8B*, gen ekspresyon düzenlenmesinin çok katmanlı kontrolünde merkezi bir role sahiptir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, PRPF8B proteininin ifade düzeyinin hem kuraklık stresine toleranslı (Memecik-94) hem de hassas (Gemlik-26) zeytin çeşitlerinde, kuraklık stresi koşullarında arttığını, ancak sulama sonrası iyileşme (recovery) grubunda azaldığını ortaya koymuştur. Bu sonuç, zeytin bitkisinin stres altındaki hücresel işlevlerini koruma ve düzenleme çabasında RNA işleme mekanizmalarını aktive ettiğini, stres ortadan kalktıktan sonra ise bu sistemin yeniden baskılandığını göstermektedir (Ner-Gaon ve ark., 2004; Ling ve ark., 2021). Ek olarak bu mekanizmanın kuraklık stresi ile ilişkili aktivasyonunun genotip ve tolerans seviyesinden bağımsız olarak genelleştirilmiş bir yanıt olduğunu da göstermektedir.

PRPF8B'nin kuraklık stresi altında artan ifadesi, spliceozomal aktivitenin strese karşı savunma amaçlı hızlandığını düşündürmektedir. Zira stres koşullarında bazı genlerin alternatif splicing yoluyla farklı izoformlarının üretimi, bitkiye çevresel koşullara karşı esneklik kazandırmaktadır (Staiger ve Brown, 2013). Zeytin bitkisinde her iki çeşit için de kuraklık stresi altında PRPF8B protein ifadesindeki artış, stres koşullarına uyum sağlayabilmek için iyon taşıyıcıları, antioksidan enzimler ve su kanal proteinleri (aquaporinler) gibi proteinlerin farklı izoformlarının üretimini destekleyerek, hücre içi metabolik esnekliğin artırılmasını sağladığını düşündürmektedir. Elde edilen sonuçlar, *Arabidopsis* ve mısır gibi model sistemlerde de PRPF8 benzeri spliceozomal proteinlerin kuraklık, tuz ve sıcaklık stresi altında regüle edildiğini gösteren önceki raporlarla da uyumludur (Filichkin ve ark., 2015).

Kuraklık stresinin sona erdiği iyileşme döneminde çevresel stres sinyalleri azalmakta ve bitkiler stabil bir proteom dengesine yönelmektedir. Bu durumda bitkinin normal büyüme ve gelişimi için splicing aktivitesini de yeniden düzenlemesi gerekmektedir. PRPF8B proteininin ekspresyon düzeyinin hem toleranslı hem de hassas çeşitte azalması, bitkinin stres koşullarından çıktıktan sonra normal fizyolojik süreçlerini yeniden aktive etmeye başladığının bir göstergesidir (Filichkin ve ark., 2015). Bu durum, RNA işleme süreçlerinin de yeniden bazal seviyelere çekildiğini düşündürmektedir. Zeytin bitkisi gibi uzun ömürlü ağaç türlerinde bu geçişin kontrollü olması, özellikle stres sonrası verim ve gelişme performansının korunması açısından kritiktir.

3.2.2.2.1.4 Probable Mediator of RNA Polymerase II Transcription Subunit 37c (MED37c)

Mediator kompleksinin bir alt birimi olan MED37c, bitkilerde RNA polimeraz II'ye bağlı gen transkripsiyonunu düzenleyen önemli bir regülatör proteindir. Yapısal olarak ısı şok proteinleri (HSP70) ailesi ile benzerlik gösterdiği bilinmekte olup, stres koşullarında moleküler şaperon işlevi görerek proteostazın korunmasına da katkı sağlayabilmektedir (Kim ve Chen, 2011). Mediator kompleksi, çevresel sinyallerin algılanmasından sonra stres yanıt genlerinin veya büyüme-gelişme ile ilişkili genlerin ekspresyonunun doğru zamanda ve doğru seviyede gerçekleştirilmesinde kritik rol oynar (Mathur ve ark., 2011; Samanta ve Thakur, 2015).

Literatürde, mediator kompleksinin ısı, ozmotik ve tuz stresi gibi abiyotik faktörlere karşı bitki savunma genlerinin regülasyonunda yer aldığı bildirilmiştir (He ve ark., 2021). Kuraklık stresi sırasında mediator kompleksinin belirli üyelerinin aktif büyüme ve gelişimle ilgili transkripsiyonel aktiviteleri sınırlı tutarak MED37c ekspresyonunun genellikle baskılandığı veya sınırlı kaldığı bildirilmiştir (De Lorenzo ve ark., 2018).

Zeytin bitkisinde kuraklık stres sonrası iyileşme döneminde MED37c proteininin artan ifadesi, bu proteinin stresle ilişkili genlerin regülasyonunda aktif rol aldığını göstermektedir. Ayrıca bitkinin kuraklık sonrası büyüme, gelişme ve metabolik yeniden yapılanma süreçlerini aktive etmek için güçlü bir transkripsiyonel yeniden programlama gerçekleştirdiğini göstermektedir. Bu artış, stres sonrası hızlı toparlanmanın ve verimli büyümenin moleküler bir belirteci olarak değerlendirilebilir.

3.2.2.2.2 Sekonder Metabolizma İle İlişkili Proteinler

Kuraklık stresi, bitkilerde metabolik ve fizyolojik süreçleri etkileyerek, sekonder metabolitlerin sentezinde önemli değişikliklere yol açmaktadır. Bu stres koşulları altında, bazı enzimlerin ekspresyon düzeylerinde artış gözlemlenmekte ve bu enzimler bitkinin adaptif yanıtlarında kritik roller üstlenmektedir. Zeytin bitkisinde kuraklık stresi ile ilişkili tespit edilen sekonder metabolizma ile ilişkili proteinler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.37).

Tablo 3.37 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan sekonder metabolizma ile ilişkili proteinlerin listesi.

Protein Adı	İşlevsel Sınıf	Kuraklık Yanıtındaki Rolü	Kaynak
Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	Sekonder metabolizma	Fenilpropan yoluyla lignin ve flavonoid sentezinde rol alır.	Dong ve Lin, 2021
Geraniol 8-hydroxylase	Sekonder metabolizma	Terpenoid savunma bileşikleri üretiminde rol alır.	Sintupachee ve ark., 2015

3.2.2.2.2.1 Geraniol 8-Hydroxylase (G8H)

Geraniol 8-hydroxylase (G8H), bitkilerde monoterpenoid biyosentez yolunda görev yapan bir sitokrom P450 monooxygenaz enzimidir. Bu enzim, geraniol adlı uçucu bir bileşiğin 8-hidroksilasyonunu gerçekleştirir ve böylece sekonder metabolitlerin (örneğin iridoid glikozitler gibi savunma bileşiklerinin) üretimini başlatır (Collu ve ark., 2001).

G8H enzimi, geraniolün 8-hidroksilasyonunu gerçekleştirerek 8-hidroksigeraniol üretir. Bu reaksiyon, terpenoid indol alkaloidlerin (TIA) biyosentezinde önemli bir adımdır. TIA'lar, bitkilerde savunma mekanizmalarında ve çevresel streslere karşı adaptasyon süreçlerinde rol oynayan sekonder metabolitlerdir (Collu ve ark., 2001). Ayrıca, *G8H*'nin ekspresyonu, bazı bitkilerde kuraklık stresi gibi abiyotik stres koşullarında artış göstermektedir. Örneğin, *Catharanthus roseus* bitkisinde yapılan bir çalışmada, kuraklık stresi altında *G8H* gen ekspresyonunun arttığı ve bu artışın TIA üretimiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir (Sung ve ark., 2011).

Zeytin bitkisinde, kuraklık stresi altında G8H proteininin ekspresyonunun artması, bitkinin stres koşullarına karşı adaptif yanıtlarının bir parçası olarak değerlendirilebilir. Geraniol 8-hydroxylase (G8H) proteininin kuraklık stresi altında artan ekspresyonu, zeytin bitkisinin stres koşullarına karşı savunma mekanizmalarını güçlendirmek,

oksidatif zararı sınırlamak ve çevresel sinyal ağlarını aktive etmek için monoterpenoid metabolizmasını hızlandırdığını göstermektedir (Pérez-Pérez ve ark., 2024). Bu mekanizma, hem hücrel koruma hem de çevresel stres sinyalleme açısından stratejik bir öneme sahiptir. Ancak, zeytin bitkisinde G8H'nin ekspresyonu ve fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle, zeytin bitkisinde G8H'nin rolünü daha iyi anlamak için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

3.2.2.2.2 Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL)

Fenilalanin amonyak liyaz (PAL) enzimi, fenilpropanoid yolunun anahtar bir giriş enzimidir ve fenilalaninden cinnamik asit oluşumunu katalizleyerek lignin, flavonoidler, fenolik asitler ve stilbenoidler gibi sekonder metabolitlerin sentezini başlatır (Dong ve Lin, 2021). Bu metabolitler, bileşikler, bitkinin yapısal bütünlüğünü korumada ve çevresel streslere karşı savunmasında kritik rol oynar (Yuan ve ark., 2024).

Kuraklık stresi, bitki dokularında reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini tetiklemekte ve bu durum, antioksidan savunma sisteminin ve fenolik bileşik üretiminin artırılmasını gerekli kılmaktadır. PAL enzimi, bu savunma yanıtlarında merkezi rol oynayarak, ROS temizlenmesini destekleyen flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin sentezini artırmaktadır (Moura ve ark., 2010).

Zeytin bitkisinde, kuraklık stresi altında PAL proteininin ekspresyonunun artması ile lignin birikimini teşvik ederek ksilem hücre duvarlarının kalınlaşmasına ve su iletim sisteminin stabilitesine katkı sağladığını düşündürmektedir. Ayrıca, flavonoidlerin ve diğer fenolik bileşiklerin üretimi, oksidatif stresin azaltılmasına ve hücrel hasarın önlenmesine yardımcı olmaktadır (Yuan ve ark., 2024). Bu adaptif yanıt, hem hücrel yapısal dayanıklılığı artırmak hem de oksidatif zararı sınırlamak için fenilpropanoid yolunu aktive ettiğini göstermektedir.

Zeytin bitkisinde yapılan son çalışmalar, kuraklık koşullarında *PAL* gen ekspresyonunun ve PAL protein seviyesinin anlamlı düzeyde arttığını göstermektedir. Ortega-García ve Peragón (2014), soğuk stresi altında zeytin yapraklarında PAL aktivitesinin belirgin şekilde arttığını ve bu durumun fenolik bileşiklerin birikimiyle doğrudan ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bu artış, zeytin bitkisinin kuraklık koşullarında oksidatif hasara karşı fenolik metabolit üretimi yoluyla geliştirdiği bir adaptasyon stratejisini yansıtmaktadır.

Bu bulgular, PAL enzimini yalnızca bir biyokimyasal gösterge olarak değil, aynı zamanda zeytin bitkisinde kuraklık toleransını yöneten kritik bir düzenleyici unsur olarak konumlandırmaktadır. Özellikle PAL'in regülasyonunun, kuraklık stresine dayanıklı genotiplerin seçimi ve geliştirilmesinde potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

3.2.2.2.3 Redoks ve Antioksidan Savunma İle İlişkili Proteinler

Kuraklık stresi, bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı birikimine yol açarak hücre zarlarına, proteinlere, DNA'ya zarar veren oksidatif strese neden olmaktadır. Bitkiler, bu zararı önlemek amacıyla antioksidan enzimler ve redoks düzenleyici proteinler üretmektedir. Bu proteinler, hücresel redoks dengesini koruyarak metabolik stabiliteyi ve hücre bütünlüğünü sağlamaktadır (Apel ve Hirt, 2004; Kruk ve ark., 2005). Zeytin bitkisinde kuraklık stresi ile ilişkili tespit edilen redoks ve antioksidan savunma ile ilişkili proteinler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.38).

Tablo 3.38 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan redoks ve antioksidan savunma ile ilişkili proteinlerin listesi.

Protein Adı	İşlevsel Sınıf	Kuraklık Yanıtındaki Rolü	Kaynak
NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H	Redoks düzenleyici	Elektron taşıma ve oksidatif stres tepkisinde görev alır.	Falk ve Holländer-Czytko, 2009

3.2.2.2.3.1 NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase Subunit H (NDH-H)

Kuraklık stresi, bitkilerde fotosentetik verimliliği düşürerek enerji üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu stres koşulları altında, kloroplastlarda yer alan NAD(P)H-quinone oxidoreductase (NDH) kompleksi, fotosistem I (PSI) etrafında gerçekleşen döngüzel elektron taşınımında (CET) görev alarak bitkinin enerji üretimini ve redoks dengesini korumada kritik bir rol oynamaktadır (Yamori ve Shikanai, 2016).

NDH kompleksinin H alt birimi (NDH-H), NAD(P)H'den plastokinona elektron transferini sağlayarak ATP üretimini desteklemekle birlikte stromal redoks dengesini korumaktadır. (Yamori ve ark., 2016). Kuraklık stresi sırasında, karbon fiksasyonunun azalmasıyla birlikte NADPH birikimi artmakta ve bu durum stromada aşırı indirgenmeye yol açmaktadır. NDH-H'nin artan ekspresyonu, bu aşırı indirgenmeyi dengeleyerek fotosentetik mekanizmanın korunmasına katkıda bulunmaktadır (Shikanai, 2016).

Zeytin bitkisinde, kuraklık stresi altında NDH-H proteininin ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış, NDH kompleksinin CET yoluyla ATP üretimini destekleyerek, stomatal kapanma ve karbon fiksasyonunun azaldığı koşullarda bile enerji dengesini sağlamaya yardımcı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, NDH-H'nin artan ekspresyonu, kloroplast içindeki redoks dengesinin korunmasına ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikiminin önlenmesine katkıda bulunur (Yamori ve ark., 2016). Bu bulgular, NDH-H proteininin zeytin bitkisinde kuraklık stresine karşı adaptif bir yanıt olarak rol oynadığını ve bu proteinin ekspresyon düzeylerinin, kuraklık toleransının bir göstergesi olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

3.2.2.2.4 Metabolizma ve Enerji Yönetimi ile İlişkili Proteinler

Kuraklık stresi, bitkilerde hem morfolojik hem de moleküler düzeyde çeşitli savunma ve adaptasyon yanıtlarını tetikleyen başlıca abiyotik stres faktörlerinden biridir. Bu stres durumunda, bitkiler enerji kaynaklarını korumak ve hayatta kalmayı sürdürmek amacıyla metabolik önceliklerini yeniden yapılandırmaktadır (Zhu, 2016).

Bu yeniden yapılandırma süreci, özellikle glikoliz ve glukoneogenez gibi enerji metabolizması yollarında görev yapan ve karbon rezervlerinin mobilizasyonunda rol oynayan enzimlerin ekspresyon düzeylerini doğrudan etkilemektedir (Rider ve ark., 2004). Bu süreçte görev alan proteinler, stresin şiddetine ve süresine bağlı olarak aşağı ya da yukarı regüle edilmektedir (Wei ve ark., 2023; Suzuki ve Knaff, 2005. Thalmann ve Santelia, 2017). Zeytin bitkisinde kuraklık stresi ile ilişkili tespit edilen metabolizma ve enerji yönetimi ile ilişkili proteinler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.39).

Tablo 3.39 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan metabolizma ve enerji yönetimi ile ilişkili proteinlerin listesi.

Protein Adı	İşlevsel Sınıf	Kuraklık Yanıtındaki Rolü	Kaynak
Bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4	Azot metabolizması	Azotlu bileşiklerin detoksifikasyonunda görev alır.	Howden ve ark., 2009
Isocitrate dehydrogenase (NAD)	Enerji metabolizması	TCA döngüsünde görev alarak enerji üretimi ve redoks dengesi için önemlidir.	Shen ve ark., 2019
Ferredoxin-dependent glutamate synthase (Fd-GOGAT)	Azot metabolizması	Glutamat üretiminde görev alarak azot asimilasyonu ve stres toleransı için kritik önem taşımaktadır.	Suzuki ve Knaff, 2005
Beta-amylase	Karbon metabolizması	Nişasta yıkımıyla enerji üretimini düzenler.	Thalmann ve Santelia, 2017
Carbamoyl-phosphate synthase large chain, chloroplastic	Azot ve nükleotid metabolizması	Azot metabolizmasında rol oynayarak pirimidin biyosentezi için önemlidir.	Wang ve ark., 2019
6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase	Glikoliz regülatörü	Glikolizin ana düzenleyici enzimlerinden biri olarak enerji üretimini düzenler.	Okar ve ark., 2001

3.2.2.2.4.1 Bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4

Kuraklık gibi abiyotik stres koşullarında, hücre içi metabolit dengesizlikleri ve toksik bileşik birikimi meydana gelmektedir. Bu gibi durumlarda nitril gruplarını detoksifiye edebilen enzimlerin artışı, stresin neden olduğu toksisiteyi sınırlamak açısından oldukça kritiktir. NIT4, stres koşullarında biriken nitril bileşiklerini ve siyanür türevlerini detoksifiye etmede ve amino asit türevi bileşiklerin dönüşümünde rol oynamaktadır (Howden ve ark., 2009; Piotrowski, 2008).

Kuraklık stresi altında her iki zeytin çeşidinde de tespit edilen NIT4 protein ifadesindeki artış, strese bağlı olarak oluşan nitril bileşiklerin detoksifikasyonu ve azotlu bileşiklerin geri dönüşümü açısından bir adaptasyon mekanizması olarak değerlendirilebilir. Her iki genotipte de bu enzimin artması, detoksifikasyon yollarının aktiflediğini ve bitkinin homeostazı koruma çabasını gösterir. Ancak Memecik genotipinde bu artışın daha erken ve düzenli olması, stres sinyal yollarının daha etkin işlediğine işaret etmektedir (Mittler, 2017).

3.2.2.2.4.2 Isocitrate dehydrogenase (NAD-dependent)

Isocitrate dehydrogenase (IDH), TCA döngüsünde izositratı α -ketoglutarata çevirerek NADH üretimi sağlamaktadır. NADH, enerji üretiminde ve redoks dengesinin korunmasında kritik öneme sahiptir. Aynı zamanda bu reaksiyonla oluşan α -ketoglutarat, Fd-GOGAT enziminin substratıdır ve bu iki enzimin ekspresyonunun eş zamanlı artışı, entegre metabolik yanıtın göstergesidir (Hodges ve ark., 2003; Feng ve ark., 2023).

Kuraklık stresi altında her iki zeytin çeşidinde de tespit edilen IDH5 protein ifadesindeki artış, zeytin bitkisinin enerji üretimini ve redoks homeostazını koruyarak kuraklık stresine karşı dayanıklılığını artırdığını göstermektedir. Stres altında mitokondriyal enerji üretimi azalsa da IDH5 protein ekspresyonundaki artış, sınırlı kaynaklarla maksimum enerji elde etme çabası olarak yorumlanabilir (Sharma ve ark., 2013). Bu adaptif mekanizma, stres sonrası hızlı metabolik toparlanmayı desteklemekte ve zeytin gibi perennial türlerde enerji metabolizmasının stres adaptasyonundaki önemini vurgulamaktadır (Wu ve ark., 2024).

3.2.2.2.4.3 Ferredoxin-dependent glutamate synthase (Fd-GOGAT)

Fd-GOGAT enzimi kloroplastta yer alan, nitrat asimilasyonunda görev yapan ve glutamin ile α -ketoglutarat'tan glutamat üreten anahtar bir enzimdir. Glutamat, amino asit sentezinde, antioksidan savunmada (örneğin glutatyon sentezi), azot taşınmasında ve sinyal iletiminde önemli roller oynamaktadır (Suzuki ve Knaff, 2005).

Kuraklık koşulları altında nitrat alımı sınırlansa da azot metabolizması tamamen durmamakta ve özellikle glutamat gibi çok işlevli bileşiklerin üretimi sürdürülmektedir. Glutamat üretiminin sürdürülmesi, azotun hücre içinde etkin kullanımı ve yeniden mobilizasyonu, ozmoprotektan üretiminin hızlandırılması ve hücrel redoks dengesi ile enerji metabolizmasının desteklenmesi konusunda önem taşımaktadır (Bashir ve ark., 2021; Tripathi ve Singh, 2013). Kuraklık stresi altında her iki zeytin çeşidinde de tespit edilen IDH5 protein ifadesindeki artış, zeytin bitkisinin azot metabolizmasını stres koşullarına uygun şekilde yeniden programladığını ve bu sayede osmotik denge, enerji üretimi ve antioksidan savunmayı desteklediğini göstermektedir. Bu durum yaprak dokularında glutamat ve türevlerinin birikmesi ile su kaybının azaltılması yoluyla

osmotik dengenin kurulması ve oksidatif stresin hafifletilmesi açısından yaşamsaldır (Zhang ve Komatsu, 2018).

3.2.2.2.4.4 β -Amilaz (Beta-Amylase)

Karbon metabolizması, bitki fizyolojisinin merkezi bir bileşeni olup, çevresel stres koşullarında ciddi şekilde etkilenmektedir. Özellikle kuraklık gibi su eksikliğiyle ilgili stres durumları, karbon rezervlerinin mobilizasyonunda rol oynayan enzimlerin ekspresyon düzeylerini doğrudan etkilemektedir. Bu enzimlerden biri olan β -amilaz (EC 3.2.1.2), α -1,4-glikozidik bağlarını parçalayarak maltoz üretimini sağlayarak nişasta metabolizmasında önemli rol oynayan bir hidrolazdır (Thalmann ve Santelia, 2017; Li ve ark., 2023).

Zeytin bitkisi, kuraklığa kısmen toleranslı, kserofitik bir Akdeniz türüdür. Ancak kuraklık stresinin şiddetlendiği durumlarda, fotosentetik karbon asimilasyonu azalırken, nişasta yıkımı gibi ikincil enerji kaynaklarının devreye girmesi beklenir. Buna rağmen, yapılan bazı proteomik analizlerde, zeytin gibi odunsu türlerde β -amilaz proteininin ekspresyonunun kuraklık stresi altında azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, bitkinin karbon rezervlerini koruma stratejisiyle açıklanabilir. Enerji krizine giren bitki hücresi, hayatta kalmak adına karbon kullanımını kısıtlayarak metabolizmayı baskılayabilir (Apelt ve ark., 2017).

β -amilaz ekspresyonundaki bu azalma, zeytin bitkisinin su stresine verdiği kontrollü bir yanıt olarak değerlendirilebilir. Karbon rezervlerinin sınırlı kullanımı, hücre içi ozmotik basıncın dengelenmesine ve aşırı şeker birikimi nedeniyle oluşabilecek oksidatif stresin önlenmesine katkıda bulunabilir. Aynı zamanda, stres süresince nişastanın parçalanmaması, iyileşme dönemine yönelik enerji rezervlerinin korunmasına da olanak tanır (Thalmann ve ark., 2017). Bu durum, özellikle zeytin gibi uzun ömürlü ağaç türlerinde, stres sonrası toparlanmayı desteklemek için kritik bir moleküler mekanizma olarak değerlendirilebilir.

Bununla birlikte, farklı zeytin çeşitlerinde β -amilaz ekspresyonundaki değişim farklılık gösterebilir. Kuraklığa daha toleranslı çeşitlerde bu enzimin ekspresyonunun daha kontrollü bir şekilde sürdürüldüğü, duyarlı çeşitlerde ise daha belirgin bir baskılanma yaşandığı rapor edilmiştir (Ben-Ayed ve ark., 2022).

3.2.2.2.4.5 Carbamoyl-Phosphate Synthase Large Chain, Chloroplastic

Carbamoyl-phosphate synthase large chain, chloroplastic (CPS) proteini, kloroplastta bulunan glutamin, amonyak ve bikarbonattan karbamoil fosfat sentezleyen bir enzimdir. Karbamoil fosfat, pirimidin nükleotidleri ve arginin biyosentezi için öncü bir moleküldür (Moffatt ve Ashihara, 2002).

Carbamoyl-phosphate synthase (CPS) proteininin iyileşme sürecinde azalan ekspresyonu, her iki zeytin çeşidinde de stres sonrası homeostazı yeniden kurma ve hayati olmayan metabolik yolları baskılama stratejisinin bir parçası olabilir. Bu durum zeytin bitkisinin kuraklık sırasında aktive ettiği azot metabolizmasını yeniden düzenlediğini ve stres sonrasında büyüme ve gelişim yollarını önceliklendirdiğini göstermektedir (Mushtaq ve ark., 2021). Ayrıca nükleotid ve amino asit biyosentezinin sınırlandırılmasına yol açacak olan bu durum bitkinin hayatta kalma şansını artırmak için enerji kaynaklarını daha kritik süreçlere yönlendirerek metabolik dengeyi sağlamaya çalıştığını gösteriyor olabilir (Nelson ve Cox, 2008).

3.2.2.2.4.6 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2)

Çift fonksiyonlu bir enzim olan 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2), hem glikolizin aktivasyonunu hem de glukoneogenez inhibitörlüğünü dolaylı olarak düzenleyerek hücrel enerji dengesinde önemli bir role sahiptir (Rider ve ark., 2004; Mustroph ve ark., 2009). Dolayısıyla PFK-2/FBPase-2 düzeylerindeki değişiklikler, enerji metabolizmasının yönünü belirlemede kritik öneme sahiptir (Okar ve ark., 2001). Kuraklık stresi sırasında enerji eksikliği olduğu için glikoliz hızlandırılarak daha fazla ATP üretilmektedir. Bu kapsamda PFK2/F2,6BPase ekspresyonunun artması öngörülebilir.

İyileşme döneminde ise bitki glikolitik aktiviteye ihtiyaç duymadan metabolik sistemini daha kontrollü ve dengeli çalıştırmaya başlar. PFK2/F2,6BPase'nin baskılanması, bitkinin glikolitik akışı sınırlandırarak enerji tüketimini azaltma ve metabolik hızını düşürme stratejisi olarak değerlendirilebilir (Obata ve Fernie, 2012). Aynı zamanda, düşük PFK2/F2,6BPase seviyeleri sayesinde glukoneogenez üzerindeki baskı ortadan kalkar ve karbon rezervlerinin yeniden yapılandırılması sağlanır. Böylelikle zeytin bitkisi, kuraklık

koşullarında glikolize yönelmek yerine karbon birikimini ve hücrel homeostazi korumaya odaklanır. Bu durum, özellikle zeytin gibi uzun ömürlü ve yarı-kserofitik bitkilerde, strese karşı dayanıklılığın sürdürülebilirliği açısından önemli bir adaptasyon mekanizmasıdır (Thalmann ve Santelia, 2017).

Zeytin bitkisi özelinde, iyileşme döneminde PFK2/F2,6BPase ekspresyonunun azalması, aşırı glikolitik aktiviteyi sınırlandırarak karbon ve enerji kaynaklarını dengeli bir şekilde kullanmak, normal büyüme süreçlerine (örneğin hücre duvarı sentezi, yeni doku oluşumu) yönelmek ve oksidatif metabolizmanın yeniden aktive edilmesini sağlamak gibi amaçlarla uyumlu bir stratejidir (Foyer ve Noctor, 2020).

3.2.2.2.5 Hücrel Ulaşım ve Taşıyıcı ve Depolama ile İlişkili Proteinler

Kuraklık stresi bitki hücrelerinde su, iyon, metabolit ve hormonların taşınma dengesini bozmaktadır. Bu koşullarda, taşıyıcı proteinler (transporters) ve kanal proteinleri, hem hücre içi ozmotik dengenin korunmasında hem de stres sinyallerinin iletilmesi açısından kritik roller üstlenmektedir. Bu proteinler, hücre zarında aktif ve pasif taşıma süreçlerini düzenleyerek bitkilerin kuraklığa uyumunu desteklemektedir (Maurel ve ark., 2008; Kang ve ark., 2011). Zeytin bitkisinde kuraklık stresi ile ilişkili tespit edilen hücrel ulaşım ve taşıyıcı ve depolama ile ilişkili proteinler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.40).

Tablo 3.40 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan hücrel ulaşım ve taşıyıcı ve depolama ile ilişkili proteinlerin listesi.

Protein Adı	İşlevsel Sınıf	Kuraklık Yanıtındaki Rolü	Kaynak
Allergen Ara h 1, clone P41B	Depo proteini	Stres ile ilişkili rolü sınırlıdır.	Radauer ve Breiteneder, 2007
ABC transporter E family member 2	Taşıyıcı protein	ABA ve sekonder metabolit taşınmasında rol alır.	Kang ve ark., 2011

3.2.2.2.5.1 Allergen Ara h 1 (clone P41B)

Bitkilerde Allergen Ara h1 proteini kuraklık stresi sırasında, bazı depo proteinleri geçici karbon/azot kaynağı sağlamak, osmoprotektif etki göstermek veya koruyucu protein yapıları oluşturmak amacıyla aktive edilmektedir (Kim ve ark., 2008; Koppelman ve ark., 2005; Radauer ve Breiteneder, 2007). Allergen Ara h 1 proteini, esasen *Arachis hypogaea* (yer fıstığı) bitkisinde bulunan bir depo proteini olup, 7S globulin ailesine ait vicilin

benzeri bir protein olarak tanınmaktadır. Normal koşullarda bu protein, yer fıstığı tohumlarında enerji depolama, çimlenme sürecinin desteklenmesi ve embriyo gelişiminin korunması gibi fizyolojik rollere sahiptir (Ramos ve ark., 2020). Son yıllarda yapılan çalışmalarda Ara h 1 benzeri proteinlerin yalnızca tohum depolama fonksiyonlarının dışında, abiyotik stres yanıtlarında sekonder koruyucu roller üstlendikleri de ortaya konmuştur (Battaglia ve ark., 2008; Wise ve Tunnacliffe, 2004). Ancak bu fonksiyonlar yalnızca stres altında gerekli olduğundan, stres sonrasında gereklilik ortadan kalkmakta, protein üretimi, enerji tasarrufu ve metabolik dengeyi yeniden kurma amacıyla baskılanmaktadır (Verslues ve ark., 2006; Deeba ve ark., 2012). İyileşme süreci, hücresel düzeyde homeostazın yeniden sağlanması, stres proteinlerinin baskılanması ve büyüme ile ilgili genlerin yeniden aktive edilmesi ile karakterize edilmektedir (Skirycz ve Inzé, 2010; Fujita ve ark., 2011). İyileşme döneminde bu tarz proteinlerin baskılanması, bitkinin stres yanıtından çıkış yaptığını, yeniden büyüme ve gelişme fazına geçtiğini göstermektedir (Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki, 2006). Allergen Ara h 1 (clone P41B) benzeri depo proteinlerinin iyileşme sürecinde azalan ekspresyonu, zeytin bitkisinin kuraklık stresine karşı geliştirdiği geçici koruma stratejilerini bırakıp, metabolik olarak enerji ve kaynaklarını büyüme ve gelişmeye yönlendirdiğini göstermektedir (Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki, 2006; Tunnacliffe ve Wise, 2007).

3.2.2.2.5.2 ABC Transporter E Family Member 2

ATP-binding cassette (ABC) taşıyıcı proteinleri, bitkilerde hormonlar, sekonder metabolitler, toksinler ve çeşitli sinyal moleküllerinin hücre içi ve hücreler arası taşınımında görev alan, büyük ve işlevsel bir protein ailesidir (Kang ve ark., 2011; Hwang ve ark., 2016). Özellikle ABC transporter E2 alt grubunun, kuraklık gibi abiyotik stres koşullarında hücresel stres yanıtlarını düzenleyen abscisic acid (ABA) gibi fitohormonların taşınımında kritik rol aldığı ve kuraklık stresi sırasında ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Kuromori ve ark., 2010; Seo ve Koshiba, 2011).

Kuraklık koşullarında bitkiler, ABA sentezini artırarak stomaların kapanması, osmoprotektan üretimi ve antioksidan savunma gibi yanıtstres yanıtları oluşturmaktadır (Nambara ve Marion-Poll, 2005). ABC transporter E family member 2, bu süreçte ABA'nın sentezlendiği hücrelerden hedef dokulara taşınmasını sağlayarak, kuraklık tolerans mekanizmasının bir parçası olarak görev yapmaktadır (Kang ve ark., 2011;

Kuromori ve ark., 2010). Bitkiler kuraklık stresi sırasında bu taşıyıcıların ekspresyonunu arttırarak ABA iletim hatlarını etkinleştirir ve stres sinyallerini sistemik hale getirerek savunma tepkisi oluşturur (Fujita ve ark., 2011; Park ve ark., 2016).

Kuraklık stresi sonlandığında ozmotik stresin ortadan kalkmasıyla birlikte bitki ABA sentezini azaltmakta ve metabolik süreçleri yeniden yapılandırmaktadır. Enerjiye bağlı çalışan ABC taşıyıcı proteinleri ATP hidrolizi yoluyla taşıma işlevini yerine getirmektedir (Verrier ve ark., 2008; Baral ve ark., 2021).. Bu dönemde, ABC taşıyıcılarının özellikle ABA ile ilişkili olanların ekspresyonunun baskılanması, stres yanıtının sonlanması sonucunda enerji verimliliğinin yeniden sağlanması anlamına gelmektedir (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Umezawa ve ark., 2006; Seo ve Koshiba, 2011). Ayrıca, yüksek düzeyde ABA sinyalleme büyüme üzerinde baskılayıcı etki yaratabileceğinden, iyileşme döneminde bu sinyallerin geri çekilmesi büyüme ve gelişme konusunda yeniden yapılandırılma açısından da önem taşımaktadır (Acharya ve ark., 2023).

Zeytin bitkisinde hem toleranslı (Memecik-94) hem de hassas (Gemlik-26) genotiplerde iyileşme döneminde ABC transporter E family member 2 ekspresyonunun azalması, bu homeostatik geçiş sürecinin bir göstergesidir. ABC transporter E family member 2 proteininin iyileşme sürecinde azalan ifadesi, bitkinin aktif stres yanıtından çıkıp normal fizyolojik süreçlere geçişinin bir göstergesidir. Bu azalma: ABA taşınımının sınırlandırıldığını, stres sinyallerinin bastırıldığını, enerji ekonomisinin yeniden kurulduğunu ve gelişimsel süreçlerin yeniden aktive olduğunu göstermektedir (Cutler ve ark., 2010; Verslues ve ark., 2006).

3.2.2.2.6 Protein Katlanması, Stabilizasyonu ve Korunması (Şaperonlar ve İnhibitörler) ile İlişkili Proteinler

Kuraklık stresi, bitki hücrelerinde protein katlanması, stabilitesi ve hücresel iskelet organizasyonu gibi temel süreçleri bozan çok yönlü bir abiyotik stres faktörüdür. Bu stres koşulları altında hücre içi protein homeostazını sürdürebilmek amacıyla bitkiler, başta şaperon proteinler ve proteaz inhibitörleri olmak üzere birçok düzenleyici proteini aktive etmektedir. Bu proteinler, hücresel protein homeostazını sağlayarak stres toleransına katkı sağlamaktadır (Wang ve ark., 2004; Finkina ve ark., 2016). Zeytin bitkisinde kuraklık stresi ile ilişkili tespit edilen protein katlanması, stabilizasyonu ve korunması

(şaperonlar ve inhibitörler) ile ilişkili proteinler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.41).

Tablo 3.41 LCMS-MS analiz sonuçlarına göre zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi ile uyarılan protein katlanması, stabilizasyonu ve korunması (şaperonlar ve inhibitörler) ile ilişkili proteinlerin listesi.

Protein Adı	İşlevsel Sınıf	Kuraklık Yanıtındaki Rolü	Kaynak
T-complex protein 1 subunit delta	Şaperon	Proteinlerin doğru katlanmasını ve stabilizasyonu sağlar.	Wang ve ark., 2004
Heat shock protein 21 (HSP21)	Şaperon	Proteinlerin doğru katlanmasını sağlar; hücreyi termal ve abiyotik stresten korur.	Wang ve ark., 2004
Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor	Proteaz inhibitörü	α -amilaz ve subtilisin gibi proteazları inhibe ederek protein yapısını korur.	Zhou ve ark., 2016
Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	Proteaz inhibitörü	Sindirim enzimlerini inhibe eder; savunma ve karbon metabolizmasının düzenlenmesi ile ilişkilidir.	Finkina ve ark., 2016
Serpin-Z1B	Proteaz inhibitörü	Serin proteaz inhibitörü; hücre içi protein yıkımını düzenler.	Finkina ve ark., 2016

3.2.2.2.6.1 Heat shock protein 21 (HSP21)

Kuraklık stresi, bitki hücrelerinde ozmotik dengesizlik, reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi ve protein denatürasyonu gibi çok yönlü zararlar oluşturur. Bu stres koşullarında bitkiler, protein yapılarını ve metabolik dengeyi korumak üzere başta ısı şok proteinleri (HSP'ler) olmak üzere çeşitli moleküler şaperonları aktive eder (Wang ve ark., 2004; Kotak ve ark., 2007).

HSP21 proteini, hücre içi su kaybı ve buna bağlı protein denatürasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi ve kloroplast zar bütünlüğünün bozulması gibi kuraklığa bağlı fizyolojik zararları önleyici işlev görmektedir. Kuraklık koşullarında kloroplastlar, özellikle fotosistem II (PSII) ve Rubisco gibi temel fotosentetik enzimlerin işlevselliğini sürdürebilmek için bu tür şaperon proteinlerine ihtiyaç duymaktadır (Sun ve ark., 2002; Waters, 2013). Bu bağlamda, chloroplastik Heat shock protein 21 (HSP21) proteininin kuraklık koşulları altında her iki zeytin çeşidinde de artan ekspresyonu, kloroplast işlevlerini koruma, fotosentetik verimliliği sürdürme ve oksidatif stres hasarını minimize etme yeteneğinin temel moleküler göstergelerinden biridir.

Zeytin bitkisinde yapılan çalışmalarda, HSP21'in ekspresyonunun kuraklık koşullarında anlamlı düzeyde arttığı ve bu artışın özellikle toleranslı genotiplerde daha belirgin olduğu rapor edilmiştir. Bu durum, HSP21'in fotosentetik sistemin korunmasında ve stres toleransının moleküler düzeyde inşasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Zhou ve ark., 2015). Bazı çalışmalarda HSP21'in iyileşme döneminde de yüksek kaldığı ve sonraki streslere karşı "hazır" bir yanıt oluşturarak stres hafızası oluşturduğu bildirilmiştir (Sedaghatmehr ve ark., 2016).

3.2.2.2.6.2 T-complex Protein 1 Subunit Delta (TCP-1δ)

T-complex protein 1 subunit delta (TCP-1δ), çok alt birimli CCT/TRiC şaperon kompleksinin bir bileşeni olup, aktin, tübülün ve diğer sitoskeletal proteinlerin ATP-bağımlı katlanmasında görev almaktadır (Valpuesta ve ark., 2002; Dekker ve ark., 2008). Bu katlanma işlemi, hücre şeklinin korunması, sitoplazmik taşıma, vezikül hareketi ve hücre bölünmesi gibi yaşamsal olayların devamı açısından önem taşımaktadır (Yam ve ark., 2008). Bu işleviyle TCP-1δ, bitkilerin çevresel streslere karşı hücre bütünlüğü koruma ve stres sonrası yeniden yapılanmayı kolaylaştırma kapasitesinde kritik rol oynamaktadır.

Kuraklık stresi koşullarında proteinler yanlış katlanma eğilimindedir ve bu durum hem yapısal bozulmalara hem de fonksiyonel kayıplara neden olur. TCP-1δ'nin artan ifadesi, denatüre proteinleri stabilize etmek, hücre içi taşıma sistemlerini korumak ve programlı hücre ölümünü önlemek gibi amaçlarla aktive olmaktadır (Gestaut ve ark., 2019). Bu bağlamda, T-complex protein 1 subunit delta (TCP-1δ) proteininin kuraklık stresi altında artan ifadesi, zeytin bitkisinin hücre yapısı ve fonksiyon bütünlüğünü koruma çabası ve kuraklıkla ilişkili protein katlama sistemlerinin aktivasyonunun önemli bir göstergesidir.

Zeytin bitkisinde kuraklık stresi altında TCP-1δ proteininin ekspresyonunda gözlenen artış, bitkinin özellikle sitoskeletal yapıların korunmasına ve hücre içi protein homeostazının sağlanmasına yönelik uyumsal yanıtını göstermektedir. Zira kuraklık stresi sırasında aktin filamentleri ve mikrotübül sistemleri, su kaybına bağlı olarak destabilize olabilmektedir. TCP-1δ gibi şaperonlar, bu sistemlerin işlevselliğini sürdürerek taşınım, fotosentez ve hücre proliferasyonu gibi süreçlerin aksamasını önleyebilir (Wang ve ark., 2022).

3.2.2.2.6.3 Serpin-Z1B

Bitkilerde kuraklık stresi, hem metabolik hem de hücresel düzeyde önemli değişikliklere yol açmakta ve protein metabolizması bu süreçten doğrudan etkilenmektedir. Bu stres faktörleri altında, proteaz aktivitesi genellikle artmakta, bu da hücresel proteinlerin yıkımıyla sonuçlanabilmektedir. Bu bağlamda, proteaz inhibitörleri özellikle serin proteaz inhibitörleri (serpinler), hücresel homeostazın korunmasında önemli rol oynamaktadır (Roberts ve Hejgaard., 2008).

Serpin-Z1B, bitkisel sistemlerde serin proteazların aşırı aktivitesini engelleyen bir inhibitör olarak görev yapar. Normal koşullarda, Serpin-Z1B gibi proteinler, hücresel yapıların korunması, programlı hücre ölümünün düzenlenmesi ve stres yanıtlarının modülasyonu gibi görevlerde yer almaktadır (Finkina ve ark., 2016). Ancak bazı durumlarda, özellikle uzun süreli veya şiddetli kuraklık stresi altında, bu proteinlerin ekspresyon düzeylerinde azalma gözlemlenmektedir (Grudkowska ve Zagdanska, 2004).

Serpin-Z1B proteininin kuraklık stresi altında azalması, zeytin bitkisinin stres koşullarında kontrollü proteolizin belirli bir eşiğe kadar tolere edilmesine izin vererek, zarar gören proteinlerin ortadan kaldırılmasını ve metabolik yeniden yapılanmayı tercih ettiğini göstermektedir. Bu adaptif yanıt, bitkinin strese bağlı olarak kaynakların etkin kullanımını sağlayarak aktif savunma ve onarım mekanizmaları yerine metabolik yeniden düzenleme stratejisi geliştirdiğini göstermektedir.

3.2.2.2.6.4 Alpha-amylase/Trypsin Inhibitor CM3 (ATI-CM3)

Kuraklık stresi sırasında bitkiler enerji kaynaklarını korumak ve hayatta kalmayı sürdürmek amacıyla metabolik önceliklerini yeniden yapılandırmaktadır. Bu yeniden yapılandırma, bazı savunma proteinlerinin ekspresyonunun baskılanması şeklinde de ortaya çıkabilmektedir (Zhu, 2016). Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3 (ATI-CM3) proteini, özellikle tahıllarda yaygın olarak bulunan ve zararlı organizmalara karşı bitkisel savunmada görev alan serin proteaz inhibitörlerinden biridir (Simonetti ve ark., 2022). Bu proteinler, tripsin ve α -amilaz gibi enzimlerin aktivitesini inhibe ederek, potansiyel patojenlerin sindirim mekanizmalarını engellemektedir. Ancak bu savunma mekanizması, kuraklık gibi fizyolojik stres koşullarında farklı şekilde regüle edilebilmektedir.

Zeytin bitkisi gibi uzun ömürlü ve kserofitik özellikler taşıyan türlerde, kuraklık stresi altında ATI-CM3 proteininin ekspresyonunun azalması, bitkinin enerji verimliliğini maksimize etme stratejisinin bir parçası olabilir. Bitki, bu gibi stres koşullarında, doğrudan hayatta kalma ile ilişkili olmayan metabolik yolları geçici olarak baskılayarak, su tutma, antioksidan üretimi ve stresle başa çıkmada daha etkili olan proteinlere öncelik tanımaktadır (Gupta ve ark., 2020).

ATI-CM3 ekspresyonunun baskılanması ayrıca, proteaz aktivitesinin bir dereceye kadar serbest kalmasına izin vererek hücrel protein dönüşümünü ve stres sonrası yeniden yapılanmayı kolaylaştırabilir. Bu yönüyle, ATI-CM3 gibi inhibitörlerin kuraklık yanıtı sırasında aşağı regülasyonu, zeytin bitkisinin çevresel değişikliklere karşı esnekliğinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

3.2.2.2.6.5 Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor (ASI)

Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor (ASI) proteinleri, normal koşullarda hücre içi proteaz ve amilaz aktivitelerini düzenleyerek protein stabilitesini ve doku bütünlüğünü korumakta önemli rol oynamaktadır. Ancak kuraklık koşullarında bitkiler, hayati olmayan metabolik aktiviteleri sınırlandırarak enerji ve kaynak tasarrufu sağlama eğilimine girmektedir (Farooq ve ark., 2009).

Zeytin bitkisinde kuraklık stresi altında ASI proteininin ekspresyon seviyesinin azalması, bitkinin stres koşulları sırasında su dengesini korumak için metabolik süreçlerini yeniden düzenlediğini göstermektedir. Öte yandan, kuraklık stresinin ortadan kalkmasıyla birlikte iyileşme döneminde ASI protein ekspresyonunda belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu artış, stres sırasında zarar gören proteinlerin ve hücrel yapıların korunması ve yeniden yapılanması için gerekli olan proteaz inhibitörlerinin önemine işaret etmektedir. İyileşme sürecinde, proteaz aktivitesinin aşırı artışını engelleyerek kontrollü bir protein döngüsü sağlanması, bitkinin normal metabolik fonksiyonlarını yeniden kazanabilmesi için kritik bir süreçtir (Anjum ve ark., 2011; Huang ve ark., 2023). Zeytin bitkisi özelinde yapılan çalışmalar da, kuraklık sonrası toparlanma sürecinde proteaz inhibitörleri dahil çeşitli koruyucu proteinlerin ekspresyonunda artış olduğunu, bu durumun da stres sonrası hücrel iyileşmeyi hızlandığını göstermektedir (Ben Ahmed ve ark., 2009; Chartzoulakis and Psarras, 2005).

Bu sonuçlar, ASI proteinlerinin kuraklık stresi ve sonrasındaki toparlanma süreçlerinde zeytin bitkisinin adaptif yanıtlarının önemli bir parçası olduğunu ve bu proteinlerin özellikle stres sonrası doku onarım ve homeostazis süreçlerinde kritik bir rol üstlendiğini ortaya koymaktadır.

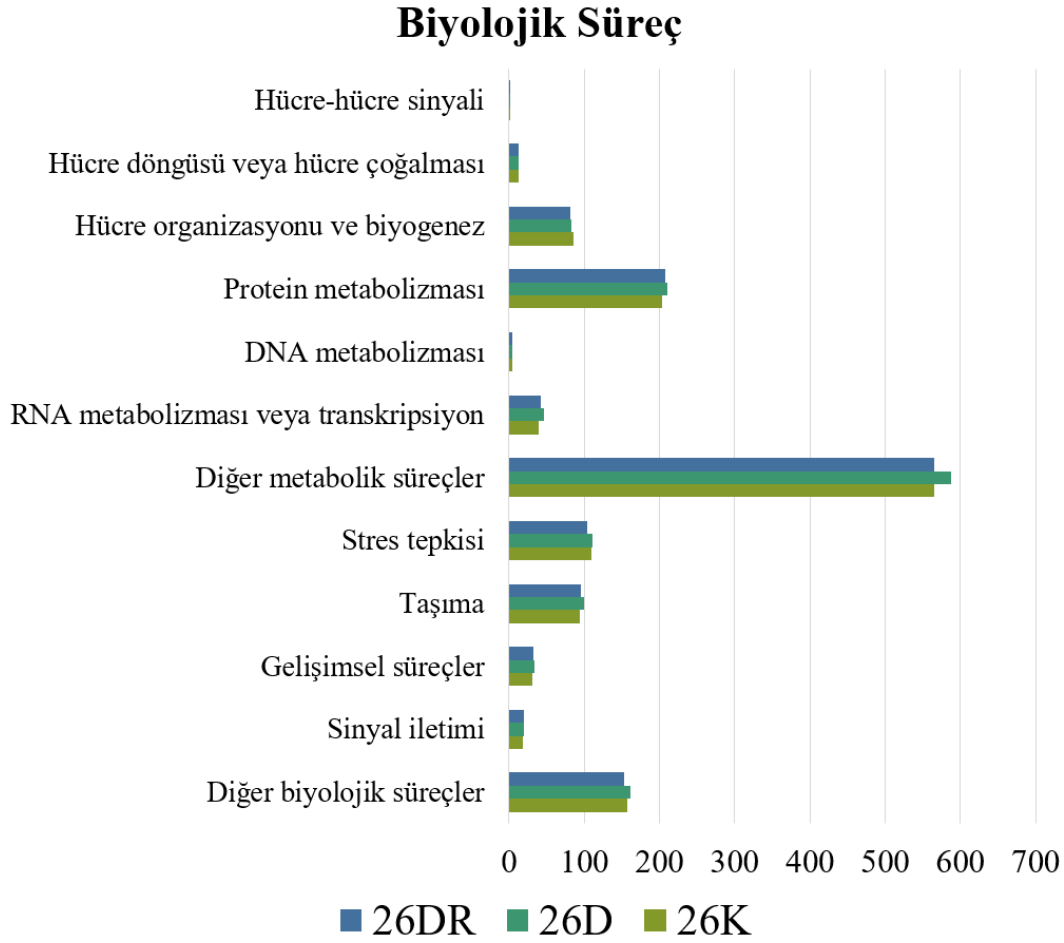
3.2.2.3 Proteomik Analiz Sonuçlarına Göre Elde Edilen Gen Ontolojisi (GO) Sonuçları

Gemlik (26) ve Memecik (94) çeşitlerinin kontrol (K), kuraklık (D) ve kuraklık uygulaması sonrası sulama yapılan (R) gruplarında farklı anlatım yapan proteinlerin kategorizasyonu için Gen ontolojisi (GO) veri tabanı kullanılmıştır. Bu amaçla hiyerarşik olarak yapılandırılmış üç ana bağımsız alt ontolojiden (biyolojik süreç, hücresel bileşenler ve moleküler işlevler) yararlanılmıştır.

3.2.2.3.1 Gemlik (26) Çeşidine Ait GO Analiz Sonuçları

GO analiz sonuçlarına göre biyolojik süreçler alt ontolojisinde Gemlik (26) çeşidi kontrol gruplarında (K) tanımlanan proteinlerin %2,45'i sinyal iletimi, %3,99'u gelişimsel süreçler, %12,10'u taşıma, %14,03'ü stres tepkisi, %72,72'si diğer metabolik süreçler, %5,15'i RNA metabolizması veya transkripsiyon, %0,51'i DNA metabolizması, %26,13'ü protein metabolizması, %10,94'ü hücre organizasyonu ve biyogenez, %1,67'si hücre döngüsü veya hücre çoğalması, %0,13'ü hücre-hücre sinyali ve %20,21'i diğer biyolojik süreçleri içeren yollarda görev almaktadır. Kuraklık stresi uygulanan gruplarda (D) tanımlanan proteinlerin ise %2,51'i sinyal iletimi, %4,27'si gelişimsel süreçler, %12,56'sı taşıma, %13,94'ü stres tepkisi, %73,87'si diğer metabolik süreçler, %5,78'i RNA metabolizması veya transkripsiyon, %0,50'si DNA metabolizması, %26,38'i protein metabolizması, %10,43'ü hücre organizasyonu ve biyogenez, %1,63'ü hücre döngüsü veya hücre çoğalması, %0,13'ü hücre-hücre sinyali ve %20,35'i diğer biyolojik süreçleri içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan gruplarda (DR) tanımlanan proteinlerin ise %2,60'ı sinyal iletimi, %4,16'sı gelişimsel süreçler, %12,35'i taşıma, %13,52'si stres tepkisi, %73,47'si diğer metabolik süreçler, %5,46'sı RNA metabolizması veya transkripsiyon, %0,52'si DNA metabolizması, %27,05'i protein metabolizması, %10,66'sı hücre organizasyonu ve biyogenez, %1,69'u hücre döngüsü veya hücre çoğalması, %0,13'ü

hücre-hücre sinyali ve %19,90'ı diğer biyolojik süreçleri içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.80).

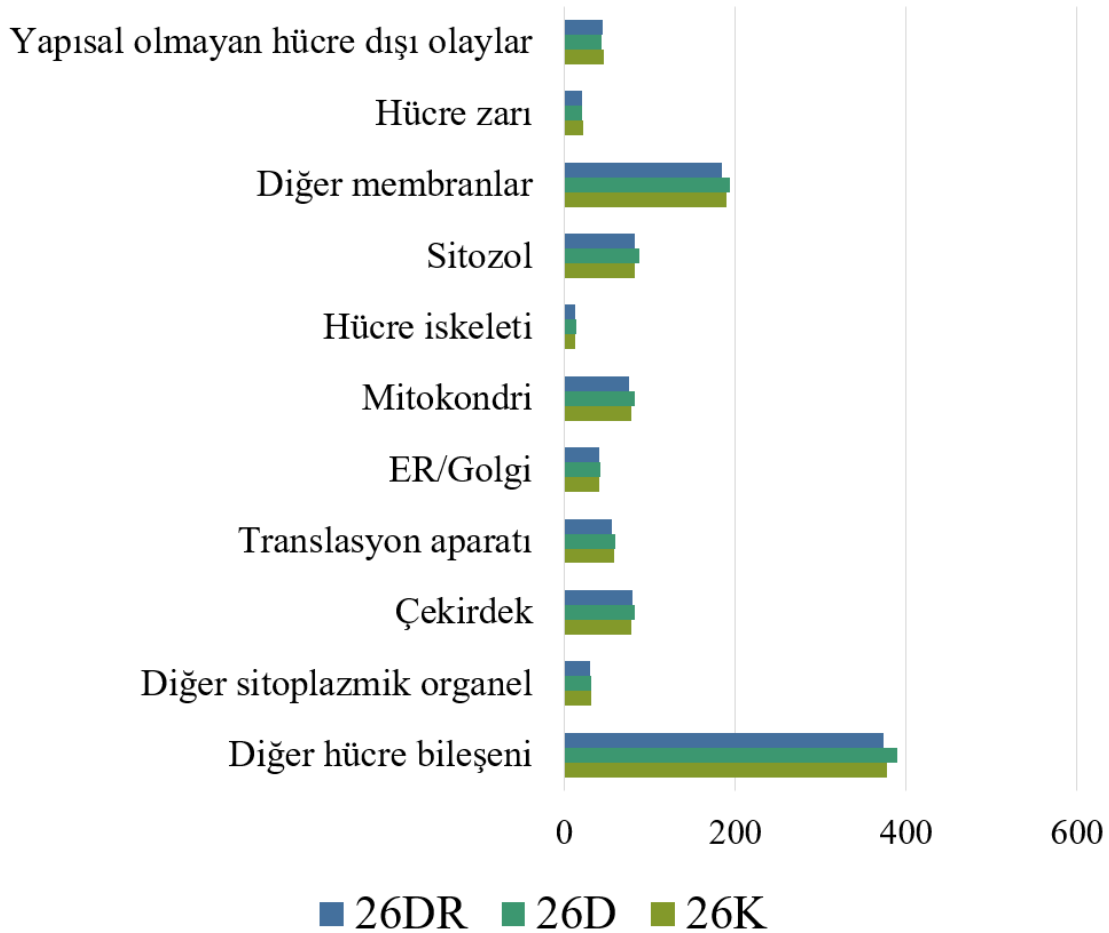


Şekil 3.80 Biyolojik süreçler için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (26: Gemlik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

GO analiz sonuçlarına göre hücresel bileşenler alt ontolojisinde Gemlik (26) çeşidi kontrol gruplarında (K) tanımlanan proteinlerin %48,52'si diğer hücre bileşeni, %3,99'u diğer sitoplazmik organel, %10,04'ü çekirdek, %7,46'sı translayon aparatı, %5,28'i ER/golgi, %10,17'si mitokondri, %1,67'si hücre iskeleti, %10,68'i sitozol, %24,45'i diğer membranlar, %2,83'ü hücre zarı ve %5,92'si yapısal olmayan hücre dışı olayları içeren yollarda görev almaktadır. Kuraklık stresi uygulanan gruplarda (D) tanımlanan proteinlerin ise %48,99'u diğer hücre bileşeni, %3,89'u diğer sitoplazmik organel, %10,43'ü çekirdek, %7,41'i translayon aparatı, %5,28'i ER/golgi, %10,30'u mitokondri, %1,76'sı hücre iskeleti, %11,06'sı sitozol, %24,37'si diğer membranlar, %2,64'ü hücre zarı ve %5,40'ı yapısal olmayan hücre dışı olayları içeren yollarda

görev aldığı tespit edilmiştir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan gruplarda (DR) tanımlanan proteinlerin ise %48,50'si diğer hücre bileşeni, %3,90'ı diğer sitoplazmik organel, %10,40'ı çekirdek, %7,15'i translasyon aparatı, %5,33'ü ER/golgi, %9,88'i mitokondri, %1,69'u hücre iskeleti, %10,79'u sitozol, %24,06'sı diğer membranlar, %2,73'ü hücre zarı ve %5,85'i yapısal olmayan hücre dışı olayları içeren yolaklarda görev aldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.81).

Hücresel Bileşen

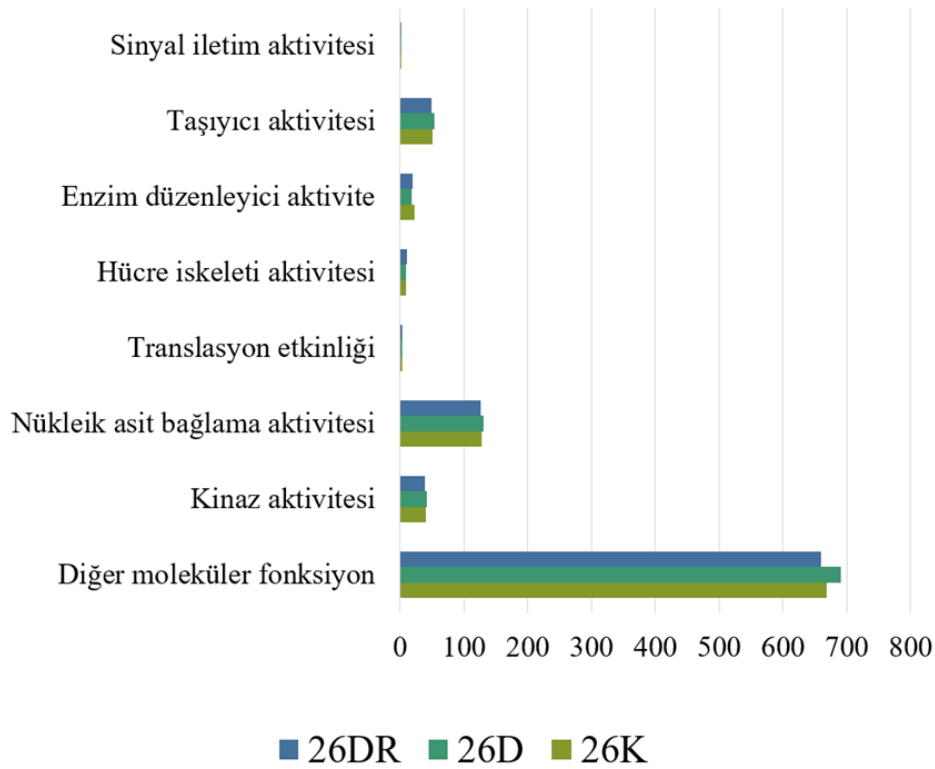


Şekil 3.81 Hücresel bileşenler için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (26: Gemlik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

GO analiz sonuçlarına göre moleküler fonksiyon alt ontolojisinde Gemlik (26) çeşidi kontrol gruplarında (K) tanımlanan proteinlerin %86,10'u diğer moleküler fonksiyon, %5,15'i kinaz aktivitesi, %16,34'ü nükleik asit bağlama aktivitesi, %0,39'u translasyon etkinliği, %1,16'sı hücre iskeleti aktivitesi, %2,83'ü enzim düzenleyici aktivite, %6,44'ü taşıyıcı aktivitesi ve %0,13'ü sinyal iletim aktivitesi veya reseptör bağlanması olaylarını

içeren yollarda görev almaktadır. Kuraklık stresi uygulanan gruplarda (D) tanımlanan proteinlerin ise %86,61'i diğer moleküler fonksiyon, %5,28'i kinaz aktivitesi, %16,33'ü nükleik asit bağlama aktivitesi, %0,38'i translasyon etkinliği, %1,13'ü hücre iskeleti aktivitesi, %2,26'sı enzim düzenleyici aktivite, %6,66'sı taşıyıcı aktivitesi ve %0,13'ü sinyal iletim aktivitesi veya reseptör bağlanması olaylarını içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan gruplarda (DR) tanımlanan proteinlerin ise %85,83'ü diğer moleküler fonksiyon, %5,07'si kinaz aktivitesi, %16,38'i nükleik asit bağlama aktivitesi, %0,39'u translasyon etkinliği, %1,30'u hücre iskeleti aktivitesi, %2,60'ı enzim düzenleyici aktivite, %6,37'si taşıyıcı aktivitesi ve %0,13'ü sinyal iletim aktivitesi veya reseptör bağlanması olaylarını içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.82).

Moleküler Fonksiyon

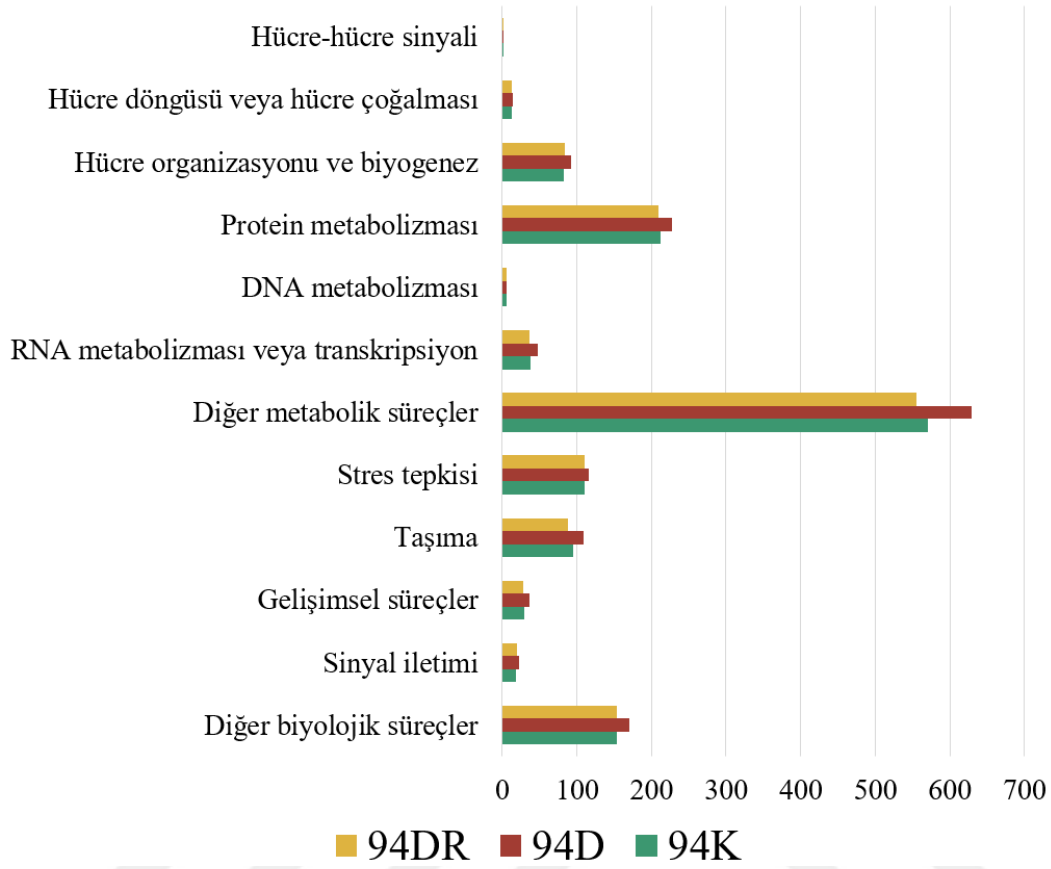


Şekil 3.82 Moleküler fonksiyon için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (26: Gemlik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

3.2.2.3.2 Memecik (94) Çeşidine Ait GO Analiz Sonuçları

GO analiz sonuçlarına göre biyolojik süreçler alt ontolojisinde Memecik (94) çeşidi kontrol gruplarında (K) tanımlanan proteinlerin %2,30'u sinyal iletimi, %3,84'ü gelişimsel süreçler, %12,16'sı taşıma, %14,08'i stres tepkisi, %73,11'i diğer metabolik süreçler, %4,87'si RNA metabolizması veya transkripsiyon, %0,77'si DNA metabolizması, %27,14'ü protein metabolizması, %10,50'si hücre organizasyonu ve biyogenez, %1,54'ü hücre döngüsü veya hücre çoğalması, %0,13'ü hücre-hücre sinyali ve %19,59'u diğer biyolojik süreçleri içeren yollarda görev almaktadır. Kuraklık stresi uygulanan gruplarda (D) tanımlanan proteinlerin ise %2,58'i sinyal iletimi, %4,22'si gelişimsel süreçler, %12,78'i taşıma, %13,60'ı stres tepkisi, %73,74'ü diğer metabolik süreçler, %5,63'ü RNA metabolizması veya transkripsiyon, %0,70'i DNA metabolizması, %26,73'ü protein metabolizması, %10,79'u hücre organizasyonu ve biyogenez, %1,64'ü hücre döngüsü veya hücre çoğalması, %0,12'si hücre-hücre sinyali ve %20,05'i diğer biyolojik süreçleri içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan gruplarda (DR) tanımlanan proteinlerin ise %2,52'si sinyal iletimi, %3,72'si gelişimsel süreçler, %11,69'u taşıma, %14,61'i stres tepkisi, %73,84'ü diğer metabolik süreçler, %4,78'i RNA metabolizması veya transkripsiyon, %0,66'sı DNA metabolizması, %27,76'sı protein metabolizması, %11,16'sı hücre organizasyonu ve biyogenez, %1,73'ü hücre döngüsü veya hücre çoğalması, %0,13'ü hücre-hücre sinyali ve %20,32'si diğer biyolojik süreçleri içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.83).

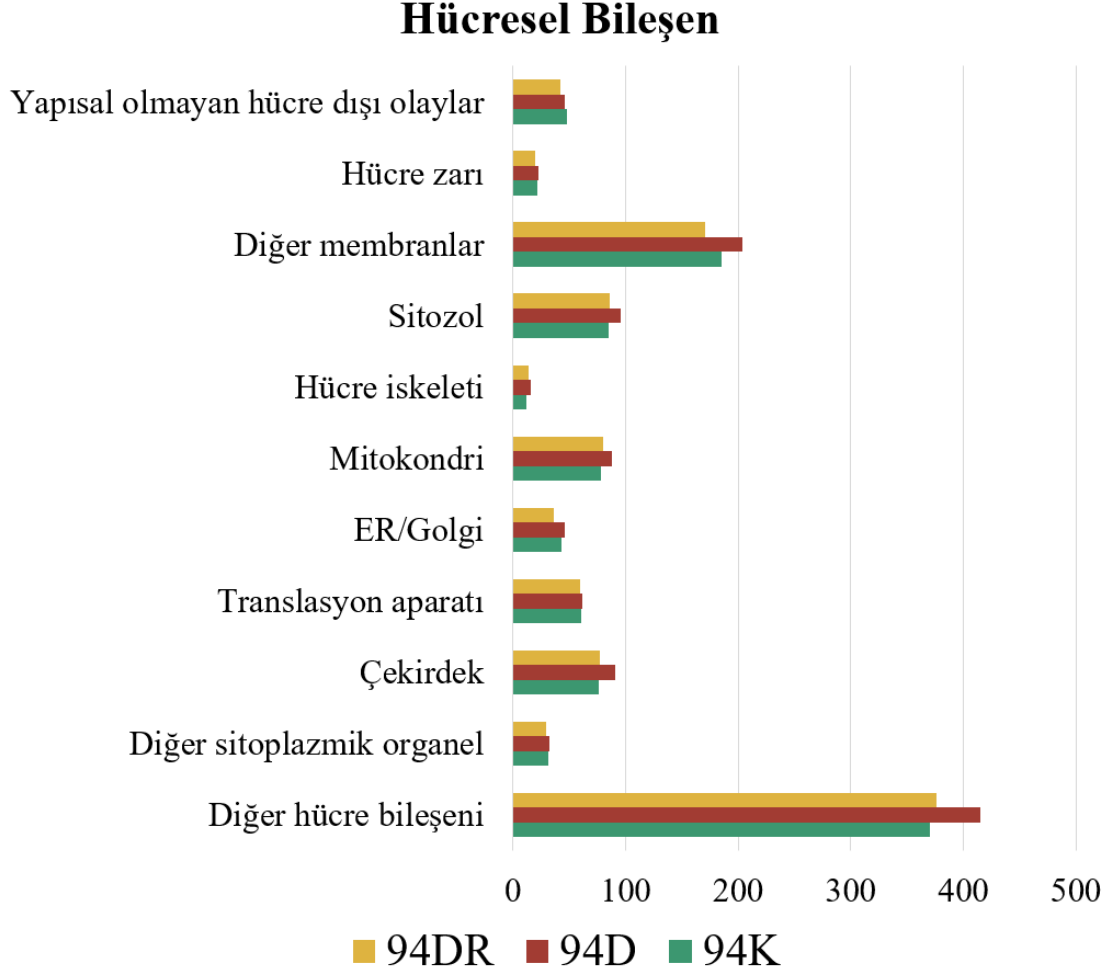
Biyolojik Süreç



Şekil 3.83 Biyolojik süreçler için GO (Gen Ontoloji) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

GO analiz sonuçlarına göre hücresel bileşenler alt ontolojisinde Memecik (94) çeşidi kontrol gruplarında (K) tanımlanan proteinlerin %47,38'i diğer hücre bileşeni, %3,97'si diğer sitoplazmik organel, %9,73'ü çekirdek, %7,81'i translasyon aparatı, %5,51'i ER/golgi, %9,99'u mitokondri, %1,54'ü hücre iskeleti, %10,88'i sitozol, %23,69'u diğer membranlar, %2,82'si hücre zarı ve %6,15'i yapısal olmayan hücre dışı olayları içeren yollarda görev almaktadır. Kuraklık stresi uygulanan gruplarda (D) tanımlanan proteinlerin ise %48,65'i diğer hücre bileşeni, %3,75'i diğer sitoplazmik organel, %10,67'si çekirdek, %7,27'si translasyon aparatı, %5,39'u ER/golgi, %10,32'si mitokondri, %1,88'i hücre iskeleti, %11,25'i sitozol, %23,92'si diğer membranlar, %2,70'i hücre zarı ve %5,39'u yapısal olmayan hücre dışı olayları içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan gruplarda (DR) tanımlanan proteinlerin ise %49,93'ü diğer hücre bileşeni, %3,85'i diğer sitoplazmik organel, %10,23'ü çekirdek, %7,97'si translasyon aparatı, %4,78'i ER/golgi,

%10,62'si mitokondri, %1,86'sı hücre iskeleti, %11,42'si sitozol, %22,71'i diğer membranlar, %2,66'sı hücre zarı ve %5,58'i yapısal olmayan hücre dışı olayları içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.84).

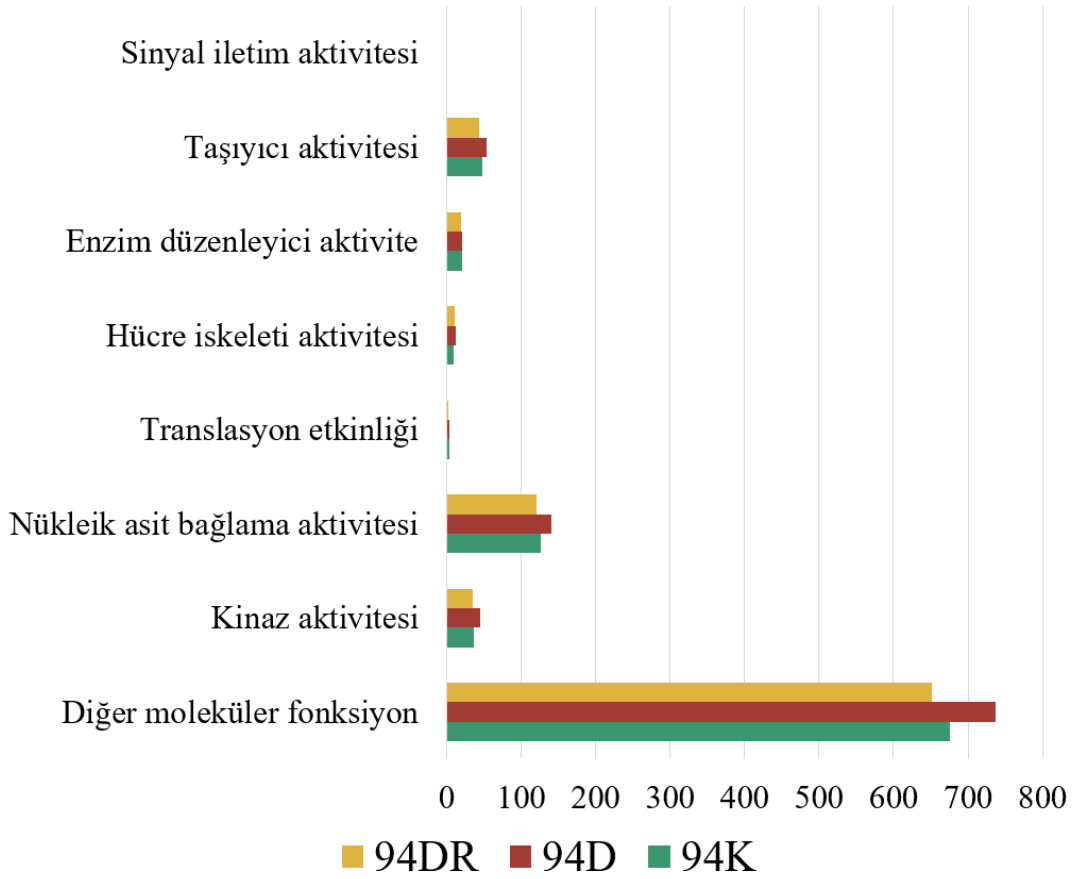


Şekil 3.84 Hücresel bileşenler için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

GO analiz sonuçlarına göre moleküler fonksiyon alt ontolojisinde Memecik (94) çeşidi kontrol gruplarında (K) tanımlanan proteinlerin %86,43'ü diğer moleküler fonksiyon, %4,74'ü kinaz aktivitesi, %16,13'ü nükleik asit bağlama aktivitesi, %0,38'i translasyon etkinliği, %1,15'i hücre iskeleti aktivitesi, %2,69'u enzim düzenleyici aktivite, %6,15'i taşıyıcı aktivitesi ve %0,13'ü sinyal iletim aktivitesi veya reseptör bağlanması olaylarını içeren yollarda görev almaktadır. Kuraklık stresi uygulanan gruplarda (D) tanımlanan proteinlerin ise %86,40'ı diğer moleküler fonksiyon, %5,28'i kinaz aktivitesi, %16,53'ü nükleik asit bağlama aktivitesi, %0,35'i translasyon etkinliği, %1,41'i hücre iskeleti

aktivitesi, %2,46'sı enzim düzenleyici aktivite, %6,33'ü taşıyıcı aktivitesi ve %0,12'si sinyal iletim aktivitesi veya reseptör bağlanması olaylarını içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir. Kuraklık stres uygulaması sonrası sulama yapılan gruplarda (DR) tanımlanan proteinlerin ise %86,59'u diğer moleküler fonksiyon, %4,65'i kinaz aktivitesi, %16,07'si nükleik asit bağlama aktivitesi, %0,27'si translasyon etkinliği, %1,46'sı hücre iskeleti aktivitesi, %2,52'si enzim düzenleyici aktivite, %5,84'ü taşıyıcı aktivitesi ve %0,13'ü sinyal iletim aktivitesi veya reseptör bağlanması olaylarını içeren yollarda görev aldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.85).

Moleküler Fonksiyon



Şekil 3.85 Moleküler fonksiyon için GO (Gen Ontolojisi) verilerini görüntüleyen pasta grafikleri (94: Memecik, K: Kontrol grubu, D: Kuraklık grubu, R: İyileşme (recovery) grubu).

3.2.2.4 Gen Ontoloji Analizlerinin Çeşitler Arası Karşılaştırılması

Bu kısımda kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitlerinin, proteom seviyesinde hiyerarşik olarak yapılandırılmış üç ana bağımsız alt ontolojiden (biyolojik süreçler, hücresel bileşenler ve moleküler fonksiyonlar) yararlanılarak elde edilen kuraklık stres yanıtlarındaki farklı stratejilerine ilişkin sonuçlar yorumlanmıştır.

3.2.2.4.1 Biyolojik Süreçler

Kuraklık stres uygulaması ve iyileşme süreçlerinde kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitleri arasında biyolojik süreçlerin yoğunluğu ve değişim yönü bakımından önemli farklılıklar bulunduğu görülmektedir. Genel olarak her iki zeytin çeşidinde de diğer metabolik süreçler ve protein metabolizması kategorilerinde en yüksek protein sayısına sahip olduğu ve stres tepkisi, taşıma, hücre organizasyonu gibi süreçlerde de farklı derecelerde değişimler gösterdiği gözlemlenmektedir.

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında, RNA metabolizması ve transkripsiyon süreçlerinde bariz bir artış gözlenmektedir. Stres tepkisi, taşıma ve gelişimsel süreçlerde belirgin değişimler olduğu tespit edilmiştir. İyileşme aşamasında ise genel olarak kuraklık süreci ile benzer profil gözlemlenmesine rağmen RNA metabolizması ile ilişkili proteinlerde ifade azalması olduğu tespit edilmiştir. Bu durum kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinin, kuraklık stresine karşı genel bir metabolik adaptasyon ve transkripsiyonel yeniden düzenleme ile yanıt verdiğini göstermektedir (Golldack ve ark., 2014). Ancak iyileşme sürecinde özellikle RNA metabolizması ve protein metabolizması gibi temel süreçlerde tam bir normalleşme gözlenememesi iyileşme kapasitesinin sınırlı olduğunu düşündürmektedir.

Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında, diğer metabolik süreçler ve stres tepkisi kategorilerinde anlamlı bir artış gözlenmektedir. Ayrıca protein metabolizması ve taşıma aktivitelerinin de aktif şekilde sürdürüldüğü görülmektedir. İyileşme aşamasında ise genel olarak kuraklık süreci ile benzer profil gözlemlenmekte ve özellikle stres tepkisi ve RNA metabolizması gibi süreçlerde kuraklık sonrası normal seviyelere yakın bir düzen göstermektedir. Bu durum kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinin, kuraklık stresinde savunma ve metabolik adaptasyon

mekanizmalarını aktif şekilde çalıştırdığını, iyileşme döneminde ise bu yanıtları hızlı ve etkili bir şekilde normale döndürerek metabolik dengeyi sağladığını göstermektedir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde gözlemlenen bu protein yanıt yüksek stres toleransı ve hızlı iyileşme yeteneği gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında gözlemlenen bu proteomik değişiklikler, bitkinin temel biyolojik süreçlerini modüle edebildiğini ancak stres sonrası tam homeostazı kuramadığını göstermektedir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında gözlemlenen bu proteomik değişiklikler, bitkinin temel metabolik ve taşıma süreçlerini yüksek oranda koruduğunu ve iyileşme döneminde bu süreçleri hızlı bir şekilde eski düzeylerine çekerek daha dengeli ve koruyucu bir stress yanıtı geliştirdiğini göstermektedir. Bu farklılıklar, kuraklık toleransının sadece anlık bir stres yanıtı değil, aynı zamanda stres sonrası toparlanma yeteneğiyle de doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir.

3.2.2.4.2 Hücresel Bileşenler

Kuraklık stres uygulaması ve iyileşme süreçlerinde kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitleri arasında hücresel bileşenlerin dağılım ve değişim oranları bakımından belirgin farklılıklar bulunduğu görülmektedir. Genel olarak her iki zeytin çeşidinde de diğer hücre bileşeni, diğer membranlar ve sitoplazma (Sitoplazmik organeller, sitozol) kategorilerinde en yüksek protein sayısına sahip oldukları görülmektedir.

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında, diğer membranlar ve sitoplazmik organeller kategorilerinde hafif bir artış gözlenmektedir. Sitoplazma ve çekirdek ile ilişkili proteinlerin dağılımında ise sınırlı değişim olduğu tespit edilmiştir. İyileşme aşamasında ise genel olarak kuraklık süreci ile benzer profil gözlemlenerek stres sonrası toparlanma tespit edilememiştir. Bu durum kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinin, kuraklık stresine karşı özellikle membranlar ve sitoplazmik bölgelerde sınırlı proteomik değişimler gösterdiğini, iyileşme sürecinde ise hücresel seviyede bir homeostazı yeniden kurmakta zorlandığını düşündürmektedir.

Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında, sitoplazmik organeller, sitoplazma, çekirdek ve hücre iskeleti ile ilgili proteinlerde anlamlı

değişiklikler gözlenmektedir. Ayrıca hücre zarı ile ilişkili proteinlerde dikkat çekici bir artış var tespit edilmiştir. İyileşme aşamasında ise genel olarak kuraklık süreci ile benzer profil gözlemlenmekte ve özellikle membran yapıları ile çekirdek ile ilişkili proteinlerinde kuraklık sonrası normal seviyelere yakın bir düzen göstermektedir. Bu durum kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinin, kuraklık stresine karşı hücre içi organizasyonu koruyarak ve membran bütünlüğünü destekleyerek daha aktif bir proteomik yanıt oluşturduğunu göstermektedir. İyileşme döneminde ise bu yanıtları hızlı ve etkili bir şekilde normale döndürerek homeostatik dengeyi sağladığını göstermektedir (Kosová ve ark., 2011).

Bu sonuçlar, kuraklık stresinin zeytin çeşitlerinde hücresel organizasyon ve membran bütünlüğü üzerinde farklı etkiler yarattığını göstermektedir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında gözlemlenen bu proteomik değişiklikler, bitkinin hücresel yapılarını koruma konusunda daha pasif kaldığını ve iyileşme sürecinde etkin bir yanıt geliştirmede zorlandığını göstermektedir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında gözlemlenen bu proteomik değişiklikler, bitkinin hücresel bileşenleriyle ilişkili süreçlerde aktif adaptasyon göstererek hem stres sırasında hem de iyileşme sürecinde hücresel organizasyonu koruyabildiğini göstermektedir. Çeşitler arasında gözlemlenen bu fark, kuraklığa toleranslı çeşidin sadece metabolik süreçlerde değil, aynı zamanda hücresel düzeyde yapı koruma ve yeniden yapılanmada da daha etkin olduğu kanıtlamaktadır.

3.2.2.4.3 Moleküler Fonksiyonlar

Kuraklık stres uygulaması ve iyileşme süreçlerinde kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitleri arasında moleküler fonksiyon değişim dinamiklerinin çeşitler arası farklılık göstermektedir. Genel olarak her iki zeytin çeşidinde de diğer moleküler fonksiyonlar kategorisinde en yüksek protein sayısına sahip olduğu ve nükleik asit bağlama aktivitesi, kinaz aktivitesi ve taşıyıcı aktivitesi kategorilerinde dikkate değer değişimler gösterdiği gözlemlenmektedir.

Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında, diğer moleküler fonksiyonlar kategorisinde bir artış gözlenmektedir. Nükleik asit bağlama, kinaz ve taşıyıcı aktiviteleri ile ilişkili proteinlerin dağılımında ise sınırlı değişim olduğu tespit edilmiştir. İyileşme aşamasında ise genel olarak kuraklık süreci ile benzer profil

gözlemlenerek stres sonrası toparlanma tespit edilememiştir. Bu durum kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinin, kuraklık stresine karşı özellikle temel moleküler işlevlerini (özellikle nükleik asit bağlama ve sinyal iletimi) korumakta zayıf kaldığını, iyileşme sürecinde de bu fonksiyonları yeniden aktive etme kapasitesinin de sınırlı olduğunu göstermektedir. Ek olarak bu durum, stres sonrası metabolik esneklik eksikliğine işaret etmektedir.

Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında, nükleik asit bağlama ve kinaz aktivitesi ile ilişkili proteinlerde bariz bir artış gözlenmektedir. Ayrıca sinyal iletim ve taşıyıcı aktivitesinin de önemli ölçüde aktive edilmiş olduğu görülmektedir. İyileşme aşamasında ise genel olarak kuraklık süreci ile benzer protein profili gözlemlenmekte ve kuraklık sonrası normal seviyelere yakın bir düzen göstermektedir. Bu durum kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinin, kuraklık stresine karşı özellikle sinyal iletim, nükleik asit bağlama ve enzim düzenleyici aktivitelerini aktif hale getirerek hücreler arası iletişim, stres algılama ve yanıt üretimi süreçlerini güçlendirdiğini göstermektedir. İyileşme döneminde ise bu yanıtları hızlı ve etkili bir şekilde normale döndürerek homeostatik dengeyi sağladığı görülmektedir.

Bu sonuçlar, bitkilerde kuraklık stres toleransının sağlanmasında sadece gen ekspresyonunun değil, moleküler işlevlerin doğru yönetilmesinin de kritik olduğunu göstermektedir. Kuraklığa hassas (Gemlik-26) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında gözlemlenen bu proteomik değişiklikler, bitkinin moleküler fonksiyon aktivasyonlarının zayıf kalarak sinyal algılama ve transkripsiyonel düzenleme gibi hayati süreçlerde etkin bir yanıt veremediğini göstermektedir. Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşidinde kuraklık stresi sırasında gözlemlenen bu proteomik değişiklikler ise, bitkinin kuraklık stresinde çok yönlü moleküler savunma mekanizmalarını aktive ederek stres ortadan kalktığında bu mekanizmaları kontrollü bir şekilde dengeye getirebilmekte olduğunu göstermektedir.

3.3. KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK VE TRANSKRİPTOMİK ANALİZLER

Kuraklık stresine karşı bitkilerin verdiği moleküler yanıtların anlaşılması için transkriptomik ve proteomik analizlerin birlikte gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Transkriptomik analizler, belirli genlerin transkripsiyon düzeyindeki (mRNA üretimi) değişimlerini ortaya koyarken; proteomik analizler ise bu genlerden sentezlenen proteinlerin gerçek bolluk seviyeleri ile translasyon sonrası modifikasyonlarını değerlendirmektedir. Her iki analiz düzeyinde elde edilen verilerin bütüncül bir şekilde karşılaştırılması, gen ekspresyonundan translasyona ve fonksiyonel protein üretimine kadar uzanan karmaşık süreçlerin nasıl düzenlendiğinin anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada yürütülen transkriptomik ve proteomik analizler, zeytin bitkisinin kuraklık stresine karşı hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde kompleks, koordineli ve çok katmanlı bir adaptasyon stratejisi geliştirdiğini ortaya koymuştur.

Kuraklık stresi altında zeytin bitkisinde transkriptomik düzeyde gerçekleşen değişimler incelendiğinde, farklı fonksiyonel kategorilerde yer alan gen gruplarının ekspresyon düzeylerinde belirgin değişiklikler olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, zeytin bitkisinin kuraklık stresine karşı kapsamlı, çok yönlü ve adaptif bir moleküler yanıt geliştirdiğini ortaya koymaktadır. Analizlerde dikkat çeken bazı genlerin ekspresyon profilleri, kuraklık toleransı ile ilişkili potansiyel biyobelirteç adayları olarak değerlendirilmiştir.

Özellikle savunma ve stres yanıtıyla ilişkili olan peroxidase 12-like geninin toleranslı çeşitte anlamlı şekilde (yaklaşık 4,3 kat) artış göstermesi, bu genin oksidatif stresin kontrol edilmesinde etkin bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, antioksidan savunma sisteminin temel bileşenlerinden olan copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) geninde her iki çeşitte de gözlenen artış, antioksidan savunmanın zeytin bitkisinde kuraklık stresine karşı ortak ve kritik bir yanıt mekanizması olduğunu desteklemektedir. Hücrel su dengesinin düzenlenmesinde ve su transport mekanizmalarında görev alan aquaporin PIP2-2-like geninin toleranslı çeşitte ekspresyonunun kuraklık sırasında yaklaşık 7 kat azalması, bitkinin su kaybını sınırlandırmaya yönelik bir adaptasyon mekanizması geliştirdiğine işaret etmektedir.

Stres sonrası iyileşme (recovery) döneminde bu genin ekspresyonunun yeniden artması, adaptif mekanizmaların geçici ve çevresel koşullara duyarlı olduğunu göstermektedir. Sekonder metabolizma ile ilişkili olan beta-amyrin 28-oxidase-like geninin ekspresyonu, toleranslı çeşitte stres sonrası dönemde artış gösterirken hassas çeşitte belirgin şekilde azalmıştır. Bu bulgu, triterpenoid türevi sekonder metabolitlerin kuraklık stresine karşı bitkiyi koruyucu bir rol üstlenebileceğine işaret etmektedir. DNA ve RNA düzeyinde regülasyonda görev alan DEAD-box helicase 7-like geninin ekspresyonu ise hassas çeşitte artarken, toleranslı çeşitte baskılanmıştır. Bu durum, kuraklık stresine karşı çeşitler arasında farklı transkripsiyonel kontrol mekanizmalarının etkin olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca pinin-like geninin yalnızca toleranslı çeşitte anlamlı derecede ekspresyon artışı göstermesi, bu genin kuraklık stres toleransı açısından potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Hücre duvarının yapısal düzenlenmesinde rol alan expansin geninin ekspresyon düzeyinin kuraklığa hassas çeşitte artarken toleranslı çeşitte azalması, toleranslı çeşidin hücre duvarı bütünlüğünü koruyucu adaptif mekanizmalar geliştirdiğini göstermektedir.

Tüm bu sonuçlar, zeytin bitkisinde kuraklık stresine yanıt olarak hem hücresel savunma sistemlerinin hem de gen ekspresyonunu düzenleyici mekanizmaların aktif olarak devreye girdiğini, bu süreçte yer alan bazı genlerin ise stres toleransına doğrudan katkı sağlayabilecek biyobelirteç adayları olduğunu göstermektedir. Belirlenen genlerin fonksiyonel validasyonunun yapılması, kuraklık tolerans mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılmasına ve ileride stres toleranslı zeytin çeşitlerinin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

Kuraklık stresi altında zeytin bitkisinde proteomik düzeyde meydana gelen değişimler incelendiğinde, hücrelerin aktif adaptasyon için metabolik ve fonksiyonel olarak kapsamlı bir yeniden yapılanma sürecine girdiği belirlenmiştir. Özellikle fotosentez ile ilişkili proteinlerde (örneğin Rubisco, Klorofil a-b bağlanma proteinleri ve Fotosistem II D1 proteini) ifade seviyelerinde belirgin azalma ya da önemli değişiklikler tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, zeytin bitkisinin kuraklık stresinde fotosentez verimliliğini azaltarak genel metabolizma hızını yavaşlatma yönünde adaptif bir strateji uyguladığını düşündürmektedir. Kuraklık stresine bağlı olarak oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerini engellemek amacıyla antioksidan savunma sistemlerine ait proteinlerin

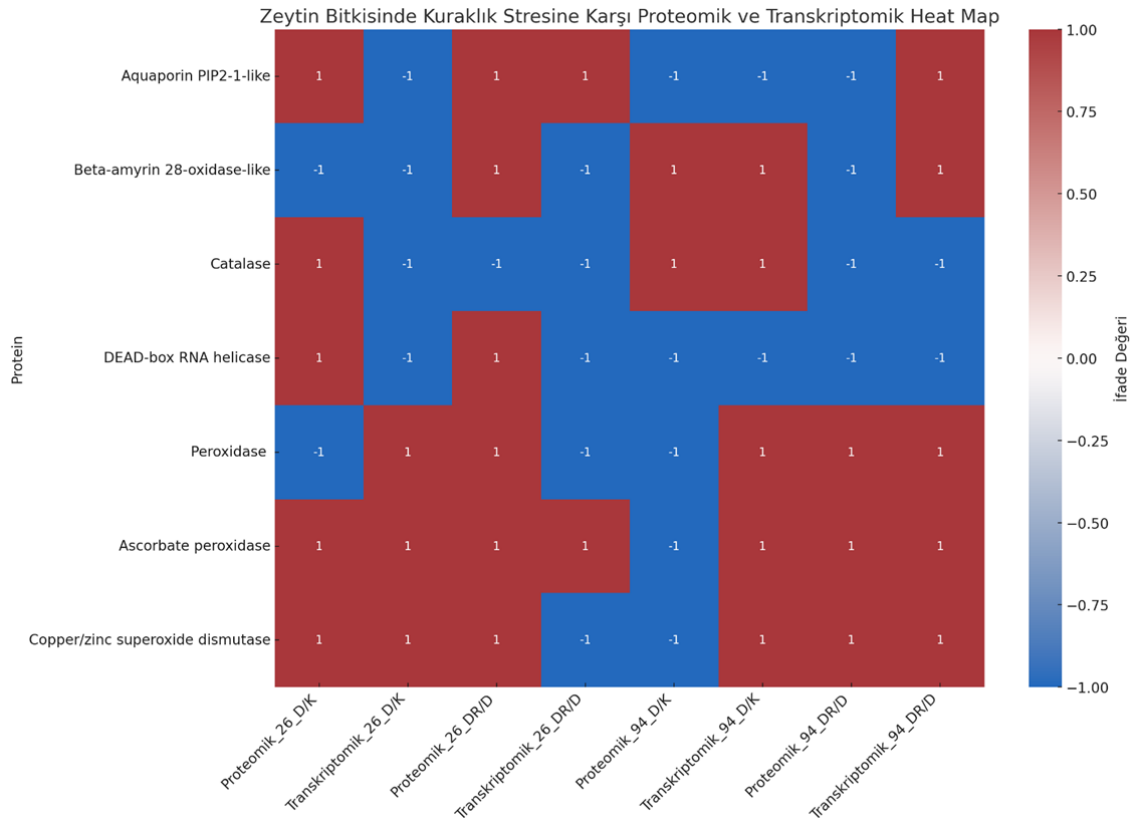
(özellikle Süperoksit Dismutaz - SOD gibi) ifade seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Enerji metabolizmasıyla ilişkili proteinlerin (malik enzim ve karbonik anhidraz gibi) ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler ise, bitkinin stres koşullarında enerji tasarrufu stratejilerine başvurduğunu ortaya koymaktadır. Stres koşullarında proteinlerin yapısal bütünlüğünü korumak ve hasarlı proteinlerin onarımını sağlamak amacıyla, ısı şok proteinlerinin (özellikle HSP70 ve HSP18.1) ekspresyon düzeylerinde belirgin artışlar saptanmıştır. Ribozomal proteinlerde gözlenen ekspresyon değişimleri ise genel protein sentez hızının düzenlenmesine yönelik olup, belirli proteinlerin sentezinin baskılanması ya da arttırılması ile ilişkili translasyonel adaptasyon mekanizmalarını yansıtmaktadır.

Sonuç olarak, zeytin bitkisinde proteom düzeyinde gözlenen bu değişimler, kuraklık stresine karşı bitkinin kompleks, çok katmanlı ve dinamik adaptasyon mekanizmalarını aktif hâle getirdiğini göstermektedir. Bu adaptif yanıtlar, fotosentez aktivitesinin düzenlenmesi, antioksidan savunmanın güçlendirilmesi, enerji tasarrufu, protein stabilizasyonu ve hasar onarımı gibi süreçleri içermekte olup bitkinin stres toleransının temel bileşenlerini oluşturmaktadır.

Genel olarak transkriptomik analizler sonucunda, zeytin bitkisinin kuraklık stresine erken dönemde verdiği moleküler yanıtların transkripsiyon faktörleri, iyon taşınım mekanizmaları ve hücrel sinyallerin iletim yolları gibi hazırlayıcı düzenlemeleri içerdiği görülmüştür. Buna karşın proteomik düzeyde yapılan incelemeler, bitkinin fotosentez süreçleri, enerji metabolizması, protein stabilizasyonu ve oksidatif stres cevabı gibi fonksiyonel metabolik süreçlerde somut değişimler gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır.

Hem transkriptom hem de proteom düzeyinde anlamlı değişimler sergileyen bazı genler ve proteinler, zeytin bitkisinin kuraklık stresine karşı oluşturduğu temel adaptasyon mekanizmalarını temsil etmektedir. Bu kritik moleküller arasında aquaporin PIP2-1, beta-amirin 28-oksidad, katalaz, DEAD-box RNA helikaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz ve Cu/Zn süperoksit dismutaz enzimleri yer almaktadır (Şekil 3.86). Bu moleküllerin her iki analiz düzeyinde de anlamlı değişiklikler göstermesi, bu proteinlerin stres yanıtı sırasında hem transkripsiyonel düzenleme hem de metabolik adaptasyon süreçlerinde aktif rol aldığını ve dolayısıyla potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilebileceklerini işaret

etmektedir. Bu tür biyobelirteçlerin belirlenmesi, kuraklık stresine karşı dayanıklı zeytin çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik gelecekteki çalışmalara önemli katkılar sağlayacaktır.



Şekil 3.86 Zeytin çeşitlerinde anlamlı artış ve azalış gösterdiği tespit edilen ortak transkript ve proteinlerin karşılaştırmalı ısı haritası.

Bu sonuçlar ışığında, zeytin bitkisinde kuraklık stresine karşı geliştirilen tolerans mekanizmasının, hem genetik düzenlemeler hem de metabolik adaptasyonların kombinasyonu ile sağlandığı ifade edilebilir. Ancak transkriptomik ve proteomik analiz düzeyleri çoğu zaman bire bir örtüşmemekte; erken dönemde gerçekleşen bazı gen ekspresyon değişimleri, protein seviyesinde hemen belirgin hâle gelmemektedir. Bitkilerin çevresel streslere verdiği moleküler yanıtların anlaşılması için transkriptom (mRNA ifadesi) ve proteom (protein bolluğu) analizleri kritik öneme sahiptir. Ancak bu iki analiz düzeyi arasında genellikle sadece kısmi bir örtüşme bulunmakta ve sıklıkla farklı sonuçlar elde edilmektedir (Liu ve ark., 2016). Bu durumun temel nedeni, transkript seviyesindeki değişimlerin her zaman protein bolluğunda eşzamanlı bir karşılığa sahip olmamasıdır. Çünkü proteinler, transkriptlerden farklı olarak, bitkilerin stres koşullarına

karşı verdiği moleküler yanıtlarda doğrudan ve fonksiyonel roller üstlenmektedir (Gao ve ark., 2011).

Bitkilerin çevresel streslere karşı geliştirdikleri moleküler ve hücrel adaptasyon stratejilerinin önemli bir kısmı, protein seviyesindeki spesifik değişimlerle şekillenmektedir (Jedrowski ve ark., 2014). Ancak proteinlerin yapısal özellikleri, miktarı, hücrel lokalizasyonları ve biyolojik fonksiyonları, DNA dizisi veya mRNA ekspresyon verilerine bakılarak tek başına yeterince anlaşılamamaktadır (Salekdeh ve ark., 2002). Çünkü sentezlenen mRNA moleküllerinin stabilitesi, translasyonel verimlilikleri ve translasyon sonrası modifikasyonları gibi birçok faktör protein sentez süreçlerini doğrudan etkilemektedir. Ayrıca proteinlerin kararlılığı ve hücrel dönüşüm oranları, sahip oldukları biyolojik fonksiyonlar ve lokalizasyonlarına göre önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Zivy ve Vienne, 2000; Gao ve ark., 2011; Zomeno ve ark., 2014).

Tüm bu nedenlerle yapılan araştırmalar, genellikle transkript düzeyi ile protein bolluğu arasında nispeten zayıf bir ilişkinin var olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, çevresel stres koşullarına karşı geliştirilen işlevsel adaptasyonların daha doğru ve bütüncül bir şekilde anlaşılabilmesi için yalnızca transkript düzeyinde analizlerin yeterli olmadığını, hücre içindeki protein seviyesinde meydana gelen değişimlerin de doğrudan incelenmesi gerektiğini açıkça göstermektedir (Wang ve ark., 2016; Wang ve ark., 2017; Michaletti ve ark., 2018; Xin ve ark., 2018). Benzer şekilde yürütülen çalışmamızda, bazı genlerin transkriptomik düzeyde yüksek log₂ fold değişimleri göstermesine karşın, bu değişimlerin proteomik düzeyde karşılıklarının olmadığı saptanmıştır. Bu farklılığın, transkripsiyonel olarak sentezlenen mRNA moleküllerinin translasyon aşamasında baskılanması sonucu protein sentezinin gerçekleşmemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Baerenfaller ve ark., 2012). Bu durum, bitkilerin strese maruz kaldıkları erken aşamalarda, adaptasyona yönelik genetik hazırlıkların başlatıldığını ancak bu sürecin henüz protein düzeyinde bir yanıt dönüşmediğini göstermektedir. Transkriptomik ve proteomik bulgular arasındaki bu uyumsuzluk genel olarak translasyon sonrası düzenlemeler (post-translational regulation), sentezlenen proteinlerin hızlı bir şekilde yıkımı veya fosforilasyon, glikozilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyon (PTM) süreçleri ile ilişkilendirilebilir. Bu mekanizmaların varlığı,

bitkilerin stres koşullarında moleküler tepkilerini çok boyutlu ve dinamik bir şekilde düzenlediklerini göstermektedir.

Buna karşılık bazı proteinlerde gözlenen anlamlı düzeydeki artışların, ilgili mRNA seviyelerinde belirgin bir ekspresyon değişikliğine neden olmadığı belirlenmiştir. Özellikle zeytin bitkisinde kuraklık stresi koşullarında, fotosentez, enerji üretimi ve karbon metabolizması gibi temel fizyolojik süreçlerin doğrudan etkilenecek protein seviyesinde değişimlere yol açtığı gözlemlenmiştir. Bu süreçlerin bir kısmının, transkript düzeyinde bir değişikliğe ihtiyaç duymaksızın doğrudan protein stabilitesi veya translasyon sonrası modifikasyonlar aracılığıyla düzenlenmesi olasıdır. Nitekim gen ekspresyonundaki değişimler hızlı ve geçici olabilmekte; protein düzeyindeki değişimlerin ise ortaya çıkması ve tespit edilebilir hale gelmesi daha uzun süre alabilmektedir. Bu durum, ilgili proteinlerin stabilitesinin yüksek olduğunu ya da translasyon sonrası düzenleme mekanizmalarının aktive edildiğini düşündürmektedir (Ma ve ark., 2020). Ayrıca proteom düzeyinde gözlenen bu değişimlerin, protein stabilitesindeki artışlar, degradasyon (yıkım) mekanizmalarının baskılanması veya fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi translasyon sonrası modifikasyon (PTM) süreçlerinin aktive edilmesi gibi nedenlere bağlı olabileceği de değerlendirilmektedir. Bu durum, bitkilerin stres koşullarında sadece gen ekspresyonu düzeyinde değil, protein seviyesinde de çok yönlü ve kompleks düzenleyici mekanizmaları kullandıklarını göstermektedir.

Transkriptomik ve proteomik analizlerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda, zeytin bitkisinin kuraklık stresi altında hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde çok katmanlı, dinamik ve seçici bir moleküler yanıt oluşturduğu gözlemlenmiştir. Her iki düzeyde gözlenen uyumlu değişimler, bitkinin doğrudan savunma veya metabolik adaptasyon yanıtlarını temsil ederken; uyumsuzluk gösteren durumlar ise hücre düzeyindeki translasyonel kontrol mekanizmaları ve translasyon sonrası modifikasyonlar aracılığıyla gerçekleştirilen adaptasyon süreçlerini yansıtmaktadır. Bu nedenle, elde edilen transkriptomik ve proteomik verilerin bütüncül olarak değerlendirilmesi, zeytin çeşitlerinde kuraklık stresine karşı geliştirilen kompleks moleküler stratejilerin tam olarak anlaşılması açısından kritik öneme sahiptir.

Her iki analizde paralel olarak saptanan artışlar, bitkinin aktif savunma mekanizmalarını veya metabolik aktivasyon süreçlerini ortaya koyarken; paralel olarak saptanan azalışlar ise fonksiyonel baskılanma, metabolik yükün azaltılması veya enerji ve kaynak tasarrufu gibi stratejik adaptasyon süreçleri olarak yorumlanabilir. Özellikle zeytin gibi uzun ömürlü (pereniyal) bitkilerde, stres koşullarında metabolik bütünlüğün korunması, enerji rezervlerinin stratejik yönetimi, protein stabilitesi ve redoks dengesinin sağlanması kritik önem taşımaktadır. Bu bağlamda, proteomik ve transkriptomik düzeylerde görülen uyumsuzluklar, bu türlerin kuraklık stresine karşı geliştirdiği moleküler adaptasyon süreçlerinin doğal ve beklenen bir sonucu olarak değerlendirilebilir.



4. SONUÇLAR

Bu çalışma kuraklığa hassas (Gemlik-26) ve kuraklığa toleranslı (Memecik-94) zeytin çeşitlerinde, kuraklık stresi ile ilişkili transkriptom ve proteom düzeylerinde gelişen yanıtları ortaya koyarak, kuraklık toleransının altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmayı amaçlamıştır. Bulgular, kuraklık stresine karşı gelişen moleküler yanıtların gen ekspresyonu ve protein düzeyinde çeşitlere özgü farklılıklar gösterdiğini ve bu yanıtların zamanlaması, kapsamı ve etkinliği bakımından önemli farklılıklar içerdiğini göstermektedir.

4.1. Kuraklık Stresi (D) Altında Çeşide Bağlı Gelişen Transkriptom Düzeyinde Yanıtlar

Toleranslı Çeşit (Memecik-94): *peroxidase 12-like*, *ascorbate peroxidase*, *PO*, *glutamate dehydrogenase B* ve *ethylene-responsive TF5-like* gibi genlerde anlamlı düzeyde ekspresyon artışı tespit edilmiştir. Bu durum, toleranslı çeşidin kuraklık koşullarında savunma mekanizmalarını hızlı ve etkili bir biçimde devreye sokabildiğini, özellikle antioksidan sistemler ve metabolik düzenleyici yollar aracılığıyla stres koşullarına karşı güçlü bir adaptif yanıt geliştirdiğini göstermektedir.

Hassas Çeşit (Gemlik-26): *ascorbate peroxidase* ve *ethylene-responsive TF5-like* gibi bazı gen ifadelerinde artış gözlemlenmiş olsa da *glutathione peroxidase 8*, *histone H1-like* ve *beta-amyrin 28-oxidase-like* gibi birçok gende baskılanma veya istatistiksel olarak anlamlı olmayan değişiklikler kaydedilmiştir. Bu bulgular, hassas çeşidin kuraklık stresine karşı daha sınırlı ve düzensiz bir transkripsiyonel yanıt geliştirdiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.1 Zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi altında transkriptom düzeyinde gelişen yanıtların karşılaştırılması

Özellik	Memecik-94 (Toleranslı)	Gemlik-26 (Hassas)
Gen ekspresyon profili	Belirgin şekilde yukarı düzenlenmiş	Kısmi artışlarla beraber birçok gende baskılanma
Öne çıkan genler	<i>Peroxidase 12-like, ascorbate peroxidase, PO, glutamate dehydrogenase B, ethylene-responsive TF5-like</i>	<i>Ascorbate peroxidase ve ethylene-responsive TF5-like (artış); glutathione peroxidase 8, histone H1-like ve beta-amyrin 28-oxidase-like (baskılanma)</i>
Genel yanıt karakteri	Koordineli, savunma ve metabolik sistemlerde güçlü aktivasyon	Zayıf ve düzensiz gen ekspresyonu
Yorum	Antioksidan savunma ve metabolik adaptasyon etkin	Gen anlatımı düzeyinde parçalı ve yetersiz stres yanıtı

4.2. Kuraklık Stresi (D) Altında Çeşide Bağlı Gelişen Proteom Düzeyinde Yanıtlar

Toleranslı Çeşit (Memecik-94): Kuraklık stresi altında Memecik (94) çeşidinde toplam 34 protein ifadesinde anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. Bu proteinlerin büyük çoğunluğu, azot metabolizması (glutamine synthetase, glutamate synthase), protein düzenleme (RNA helicase, proteasome subunitler), fotosentez ve enerji üretimi (photosystem II components) gibi yaşamsal süreçlerde rol almaktadır. Öte yandan, sadece 10 protein ifadesinde anlamlı düzeyde azalma meydana gelmiş ve bu proteinler genellikle taşıma, inhibitör fonksiyon ve karbon metabolizması ile ilişkilendirilmiştir. Elde edilen bu bulgular, toleranslı zeytin çeşidinin kuraklık stresine karşı savunma, enerji üretimi ve protein regülasyonu süreçlerini kapsayan çok yönlü bir proteomik yanıt geliştirdiğini ve bu sayede etkili bir stres toleransı sergilediğini göstermektedir.

Hassas Çeşit (Gemlik-26): Kuraklık stresi altında Gemlik (26) çeşidinde toplam 21 proteinin ifadesinde anlamlı artış tespit edilmiştir. Bu proteinler arasında, antioksidan savunma (NAD(P)H-quinone oxidoreductase), sekonder metabolit (phenylalanine ammonia-lyase) ve enerji metabolizması (isocitrate dehydrogenase) ile ilişkili proteinlerin yanı sıra RNA işlenmesi (Pre-mRNA processing-splicing factor 8B) ve şaperon (HSP81-1, HSP21) gibi gen düzenleyicileri yer almaktadır. Bununla birlikte 13

proteinde anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir. Bu proteinler arasında glutenin, alpha/beta-amylase inhibitörleri, serpin-Z1B, glycine-rich RNA-binding protein 2 ve elongation factor 2 gibi protein sentezi, inhibisyon mekanizmaları ve RNA işleme süreçleriyle ilişkili olduğu bilinen regülasyon proteinleri bulunmaktadır. Bu veriler, hassas zeytin çeşidinin bazı savunma yollarını aktive edebilse de, genel olarak daha dengesiz, parçalı ve düşük düzeyde organize olmuş bir proteomik yanıt geliştirdiğini ve kuraklık koşullarına karşı etkin bir moleküler adaptasyon sergileyemediğini göstermektedir.

Tablo 4.2 Zeytin çeşitlerinde kuraklık stresi altında proteom düzeyinde gelişen yanıtların karşılaştırılması

Özellik	Memecik-94 (Toleranslı)	Gemlik-26 (Hassas)
Artış gösteren protein sayısı	34	21
Artan protein grupları	Azot metabolizması (glutamine synthetase, glutamate synthase), protein düzenleme (RNA helicase, proteasome subunitler) ve fotosentez ve enerji üretimi (photosystem II components)	Antioksidan savunma (NAD(P)H-quinone oxidoreductase), sekonder metabolit (Phenylalanine ammonia-lyase) ve enerji metabolizması (Isocitrate dehydrogenase)
Azalan protein sayısı	10	13
Azalan protein grupları	Taşıma, inhibisyon mekanizmaları ve karbon metabolizması	Protein sentezi, inhibisyon mekanizmaları ve RNA işleme
Genel yanıt karakteri	Savunma, enerji üretimi ve protein regülasyonu süreçlerini kapsayan çok yönlü bir proteomik yanıt ve etkili bir stres toleransı	Dengesiz, parçalı ve düşük düzeyde organize olmuş bir proteomik yanıt

4.3. İyileşme (Recovery, R) Döneminde Çeşide Bağlı Transkriptom Düzeyinde Gelişen Yanıtlar

Toleranslı çeşit (Memecik-94): İyileşme döneminde Memecik-94 çeşidinde gen ekspresyon düzeyleri büyük ölçüde stabil kalmış ve çoğu genin ifadesi kontrol seviyelerine yaklaşarak normalize olmuştur. Özellikle *peroxidase (PO)*, *ascorbate peroxidase (APX)* ve *glutamate dehydrogenase B (GDH-B)* genlerinde ekspresyon artışının sürdüğü gözlenmiştir. Bu bulgular, toleranslı çeşidin metabolik dengesini koruyarak, stres sonrası döneme hızlı ve kontrollü bir adaptasyon yanıtı verdiğini göstermektedir.

Hassas çeşit (Gemlik-26): Gemlik-26 çeşidinde ise iyileşme süreci boyunca gen ekspresyon düzeylerinde düzensiz dalgalanmalar gözlemlenmiştir. Örneğin, *ascorbate peroxidase* gen ifadesinde yaklaşık 2 kat azalma, *expansin B3-like* geninde ise yaklaşık 4 katlık bir düşüş meydana gelmiştir. Bu dalgalı yanıtlar, hassas çeşidin stres sonrası toparlanma sürecinde genetik olarak yeterince organize olamadığını ve adaptif mekanizmaların etkin çalışmadığını göstermektedir.

Tablo 4.3 Zeytin çeşitlerinde iyileşme döneminde transkriptom düzeyinde gelişen yanıtların karşılaştırılması

Özellik	Memecik-94 (Toleranslı)	Gemlik-26 (Hassas)
Gen ekspresyon profili	Stabil ya da normale yakın; kontrollü normale dönüş	Dalgalı ve düzensiz; ani artış ve düşüşler
Transkripsiyonel denge	Korunmuş / normalize olmuş	Bozulmuş / düzensiz
Adaptasyon hızı	Yüksek	Düşük
Genetik toparlanma	Kontrollü ve etkili	Gecikmeli ve dalgalı
Antioksidan sistem aktivitesi	Aktif	Zayıflamış
Yorum	Genetik stabilite korunmuş, hızlı iyileşme	Dalgalı ekspresyon desenleri, toparlanma sürecinde yetersizlik, adaptasyonda gecikme

Sonuç olarak, Memecik-94 çeşidi iyileşme döneminde genetik düzeyde kararlılığını korumuş, antioksidan savunma sistemleri ve metabolik düzenlemeyle ilişkili genlerde sürdürülebilir ekspresyon artışı sağlayarak etkili bir toparlanma profili ortaya koymuştur. Buna karşın, Gemlik-26 çeşidi stres sonrası süreçte genetik uyum açısından zayıf bir yanıt geliştirmiş, dalgalı ekspresyon desenleri ve antioksidan sistemlerdeki zayıflık, bu çeşidin stres sonrası toparlanma kapasitesinin düşük olduğuna işaret etmektedir.

4.4. İyileşme (Recovery, R) Döneminde Çeşide Bağlı Proteom Düzeyinde Gelişen Yanıtlar

Toleranslı çeşit (Memecik-94): İyileşme döneminde Memecik-94 çeşidinde toplam 11 proteinin ifadesinde anlamlı artışa tespit edilmiştir. Bu proteinler arasında, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenleme süreçlerinde görev alan RNA polimerase II alt birimleri ile glycine-rich RNA-binding proteinler, protein taşıma mekanizmasında yer alan TOC75 kompleksi, ayrıca Serpin-Z1B ve beta-amylase gibi proteaz inhibitörleri yer almaktadır. Bu proteinler, iyileşme sürecinde hücresel yeniden yapılandırma, metabolik denge sağlama ve protein stabilitesinin korunması açısından önemli roller üstlenmektedir. Buna karşın, 26 proteinin ifadesinde anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir. Bu proteinlerin büyük çoğunluğu kloroplast fotosistem bileşenleri, heat shock proteinler, ABC taşıyıcıları, RNA helicase ve diğer düzenleyici proteinlerden oluşmaktadır. Bu durum, Memecik çeşidinin iyileşme döneminde enerji tasarrufuna yönelik bir regülasyon stratejisi izlediğini ve stres sonrası fazlalık proteinlerin aktif olarak baskılandığını göstermektedir. Böylelikle, iyileşme süreci kontrollü bir moleküler yeniden yapılanma ile desteklenmektedir.

Hassas çeşit (Gemlik-26): İyileşme döneminde Gemlik-26 çeşidinde ise lipid metabolizması (stearoyl-ACP desaturase), depo proteinleri (glutelin), protein senteziyle ilişkili (elongation factor 2, alpha-amylase inhibitor) toplam 11 proteinde artış kaydedilmiştir. Buna karşılık, 20 proteinin ifadesinde anlamlı düzeyde azalma saptanmış; bu grupta fotosistem proteinleri, klorofil a-b bağlanma proteinler, RNA işleme faktörleri, proteazom alt üniteleri ve transkripsiyon regülatörleri yer almaktadır. Bu düzensiz ve parçalı yanıt, hassas çeşidin iyileşme döneminde hücresel işlevselliği tam olarak geri kazanamadığını, yeterli düzeyde bir yeniden yapılanma gerçekleştirmediğini ve stres sonrası kalıcı hasarlarla mücadelede zorlandığını ortaya koymaktadır.

Tablo 4.4 Zeytin çeşitlerinde iyileşme döneminde proteom düzeyinde gelişen yanıtların karşılaştırılması

Özellik	Memecik-94 (Toleranslı)	Gemlik-26 (Hassas)
Artan protein	11	11
Artan protein grupları	Transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenleme, proteaz inhibitörleri, protein taşıma mekanizması	Lipid metabolizması, depo proteinleri
Azalan protein	26	20
Azalan protein grupları	Kloroplast fotosistem bileşenleri, ısı şoku proteinleri, ABC taşıyıcıları, RNA helikaz ve diğer düzenleyici proteinler	Fotosistem proteinleri, RNA işleme faktörleri, transkripsiyon regülatörleri
Genel yanıt karakteri	Hücre içi savunma, protein sentezi ve transkripsiyon aktivasyonu ön planda, enerji tasarrufu ve metabolik denge için stratejik baskılama	Parçalı ve dengesiz toparlanma; sınırlı adaptasyon, iyileşme sürecinde işlevsel kayıplar, yetersiz yeniden yapılanma

4.5. Toleranslı (Memecik-94) ve Hassas (Gemlik-26) Zeytin Çeşitlerinin Karşılaştırmalı Moleküler Yanıtları

Bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, zeytin bitkisinin kuraklığa karşı çok katmanlı ve çeşitlere özgü savunma stratejileri geliştirdiğini, bu süreçte hem erken transkripsiyonel yanıtların hem de geç dönem protein adaptasyonlarının önemli rol oynadığı anlaşılmaktadır. Özellikle toleranslı çeşit olan Memecik-94, hem kuraklık stresi hem de iyileşme döneminde erken, sistematik ve çok yönlü bir yanıt profili sergilemiş; antioksidan savunma sistemleri, enerji metabolizması ve protein düzenleyici mekanizmalar gibi temel biyolojik yolları yüksek verimle aktive etmiştir. Buna karşılık, hassas çeşit olan Gemlik-26, daha geç başlayan, parçalı ve sınırlı bir moleküler yanıt geliştirmiştir. Bu farklılıklar, kuraklık toleransının genetik altyapısını anlamada önemli ipuçları sunmaktadır.

Bu farklılıklar, kuraklık toleransının moleküler düzeyde nasıl şekillendiğine dair önemli ipuçları sunmakta ve ileriye dönük ıslah çalışmalarında değerlendirilebilecek

biyobelirteçlerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular, zeytin bitkisinin değişen iklim koşullarına bağlı olarak artan kuraklık altında sürdürülebilir üretimin sağlanabilmesi açısından önemli ipuçları sunmaktadır.

Kuraklık toleransında belirleyici rol oynayan başlıca moleküler mekanizmalar şunlardır:

- Antioksidan savunma sistemleri
- Enerji metabolizması
- Hücrel taşıyım sistemleri
- Transkripsiyonel kontrol mekanizmaları
- Protein sentezi ve ribozomal bileşenlerin regülasyonu
- Sterol ve triterpen biyosentezi

Memecik-94 çeşidinin bu sistemleri etkin şekilde kullanabilmesi, onu strese daha toleranslı kılar; Gemlik-26 çeşidi bu yolları etkinleştirmede yetersiz kalmıştır.

Tablo 4.5 Kuraklığa toleranslı (Memecik-94) ve hassas (Gemlik-26) zeytin çeşitlerinin kuraklık stresine karşı moleküler düzeyde verdikleri yanıtların karşılaştırılması

Kriter	Memecik-94 (Toleranslı)	Gemlik-26 (Hassas)
Transkriptom yanıtı	Stabil gen ekspresyonu; bazı genlerde sürdürülebilir artış. Güçlü, hızlı ve dengeli.	Değişken ekspresyon profili; yetersiz genetik toparlanma.
Proteom yanıtı	Çok sayıda protein ile etkin stres savunması. Savunma ve adaptasyon proteinlerinde artış; enerji proteinlerinde stratejik baskılama	Parçalı protein artışı; temel metabolizma proteinlerinde baskılama. Daha az sayıda protein, sınırlı etki
Savunma sistemleri	HSP'ler, PO/APX gibi antioksidanlar etkin	Sadece belirli HSP ve redoks proteinlerinde aktivasyon
Enerji & metabolizma	<i>ATP sentaz, isocitrate dehydrogenase, glutamate synthase</i> güçlü şekilde aktive	Sınırlı düzeyde aktivasyon; bazı redoks enzimleri baskılı
Toparlanma potansiyeli	Yüksek (stres sırasında etkin düzenleme)	Düşük (yanıt düzensiz, organizasyon zayıf)
Genel değerlendirme	Etkili stres yanıtı ve biyokimyasal adaptasyon tüm düzeylerde	Sınırlı aktivasyon, zayıf transkripsiyonel ve proteomik koordinasyon

4.6. Kuraklık Toleransının Moleküler Temelleri

Transkriptom ve proteom seviyesinde anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen bazı transkript ve proteinler zeytin bitkisinin kuraklık stresine karşı geliştirdiği adaptif yanıtların önemli belirleyicileri olarak öne çıkmaktadır. Bunlar arasında aquaporin PIP2-1, aquaporin TIP1-1, beta-amirin 28-oksidad, katalaz, DEAD-box RNA helikaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz, Cu/Zn süperoksit dismutaz enzimleri bulunmaktadır. Bu proteinler hem genetik düzenleme hem de metabolik dönüşüm süreçlerinde aktif rol oynamaları açısından potansiyel biyobelirteç adaylarıdır.

Bu çalışmada zeytin bitkisinde kuraklık stresine karşı gelişen moleküler yanıtları ortaya koymak amacıyla yapılan transkriptom analizleri sonucunda, sekiz genin (*Pinin-like*, *beta-amyrin 28-oxidase-like*, *phospholipase D alpha 1-like (transcript variant x1)*, *probable glutathione peroxidase 8*, *chalcone synthase J-like*, *glutamate dehydrogenase B transcript variant x2*, *galactinol synthase 2-like* ve *DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like*) kuraklık stresine duyarlılığı ve toleransı yansıtan potansiyel biyobelirteç adayları olduğu belirlenmiştir.

Pinin-like geni, stres altında özellikle toleranslı çeşitlerde artan ekspresyonuyla dikkat çekmiş; hücre yapısının stabilizasyonu ve sinyal iletimiyle ilişkili yapısal işlevleri sayesinde kuraklık stresine adaptif yanıtın bir parçası olabileceğini göstermiştir. Literatürde pinin proteini ve genleriyle ilgili yapılan çalışmaların sınırlı olması ve genel olarak onkolojik çalışmaları içermesi, bitkiler üzerinde özellikle de kuraklık stresi ile ilgili zeytin bitkisinde yapılan bir çalışmanın da ayrıca bulunmamaktadır. Bu durum çalışmamızın benzersiz bir bilimsel katkı sağladığını göstermekle birlikte PNN'nin bitki hücrelerindeki işlevi hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Seçilen bir diğer gen olan *beta-amyrin 28-oxidase-like*, adını zeytin bitkisinden alan oleanolik asidin biyosentezinde öncü bir molekül olarak kritik bir rol oynamaktadır. Mevcut araştırmalar, kuraklık da dâhil olmak üzere çeşitli abiyotik stres koşullarında, triterpenoid biyosentetik yolunda yer alan beta-amyrin synthase (bAS) geninin ekspresyonunun yukarı yönde düzenlendiğini göstermektedir. Her ne kadar literatürde β -amyrin oksidad genine yönelik doğrudan bir stres çalışması bulunmasa da, bu genin

oleanolik asit biyosentezindeki kilit rolü açıkça ortaya konmuştur. Ayrıca, mevcut veriler oleanolik asidin, bitkilerde su kaybının önlenmesi ve patojenlere karşı savunmanın sağlanmasında önemli işlevler üstlendiğini desteklemektedir. Özellikle kuraklığa toleranslı çeşitlerde seçici olarak aktive edilmesi ve kalıcı gen ekspresyon profili sergilemesi, bu geni güçlü bir biyobelirteç adayı haline getirmektedir. Bu özellikleri sayesinde, kuraklık stresine karşı bitkinin verdiği yanıtı ve tolerans düzeyini gösteren genetik/moleküler göstergeler arasında öne çıkmaktadır. *Phospholipase D alpha 1-like (X1) geni*, ABA sinyalleme ve stoma kontrolü gibi kuraklıkla mücadelede kilit fizyolojik süreçleri düzenleyerek, özellikle toleranslı çeşitlerdeki belirgin ekspresyonuyla öne çıkmaktadır. *Probable glutathione peroxidase 8* ve *Glutamate dehydrogenase B (X2)* genleri, oksidatif stresle başa çıkmada rol oynayan antioksidan sistemleri temsil ederken, bu genlerin stres koşullarında yukarı yönde düzenlenmesi, hücre hasarının önlenmesine katkı sunduklarını göstermektedir. *Chalcone synthase J-like*, flavonoid sentezi üzerinden oksidatif stres tepkilerine dolaylı koruma sağlayarak, fenolik bileşik üretimiyle stres toleransını desteklemektedir. *Galactinol synthase 2-like geni*, osmotik düzenleme ve karbon metabolizmasındaki rolüyle dikkat çekmiş; özellikle osmoprotektan üretimi yoluyla kuraklıkta hücresel dengeyi korumada etkilidir. *DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like* ise RNA metabolizması ve transkripsiyonel yeniden programlama ile ilgili işlevleri sayesinde stres koşullarında gen ekspresyonunun yeniden düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır.

Bu sekiz genin stres koşullarında gösterdiği anlamlı ekspresyon farklılıkları, onların zeytin bitkisinde kuraklık toleransını yöneten savunma ve düzenleme ağlarında kritik roller oynadığını göstermekte; bu yönleriyle söz konusu genler, kuraklık stresine karşı güçlü moleküler biyobelirteç adayları olarak değerlendirilmektedir.

Kuraklık stresine karşı bitkisel yanıtların anlaşılmasına yönelik yapılan proteom analizinde, farklı işlevsel gruplara ait proteinler değerlendirilmiş ve özellikle bazı proteinlerin kuraklık stresi göstergesi (biyobelirteç) potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir (Tablo 3.32, Tablo 3.33, Tablo 3.34, Tablo 3.35). Bu çalışmada kuraklık stresine karşı zeytin bitkisinin verdiği moleküler tepkileri değerlendirmek amacıyla analiz edilen proteinlerden üçü, gen düzeyindeki ifade desenleriyle birlikte biyobelirteç adayı olarak tanımlanmıştır.

Pre-mRNA-processing-splicing factor 8B (Q9T0I6): Hem kuraklığa hassas (26) hem de toleranslı (94) çeşitte kuraklık uygulaması sırasında (D/K karşılaştırmaları) yukarı yönlü ifade artışı (+inf) göstermiştir. Bu durum, stres koşullarında gen ekspresyonunun yeniden düzenlenmesinde görev alan bu genin aktif hale geldiğini göstermekte ve onu transkripsiyonel düzenleme ile ilişkili güçlü bir stres yanıt göstergesi olarak öne çıkarmaktadır. Ancak stres sonrası toparlanma dönemlerinde ifadesinin düşmesi, bu genin erken stres yanıtı verdiğini düşündürmektedir.

Glycine-rich RNA-binding protein 2 (Q99070): Kuraklık uygulaması sırasında baskılanan (-inf), ancak toparlanma döneminde tekrar artış gösteren (+inf) bu gen, stres sonrası yeniden yapılanma ve gen ekspresyon onarımı ile ilişkilidir. Bu ifade modeli, GRP2 geninin özellikle iyileşme sürecine özgü bir biyobelirteç olabileceğini ortaya koymaktadır.

Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor (P16347): Hem hassas hem de toleranslı çeşitlerde kuraklık stresi sırasında baskılanırken (-inf), iyileşme sürecinde anlamlı şekilde artmıştır (+inf). Bu ifade paterni, genin stres koşullarında baskılanıp, stres baskısı kalktıktan sonra yeniden aktive olduğunu ve muhtemelen koruyucu veya düzenleyici bir rol üstlendiğini göstermektedir. Bu yönüyle, stres sonrası toparlanmanın moleküler göstergesi olarak biyobelirteç değeri taşımaktadır.

Bu genlerin ekspresyon paternleri, yalnızca kuraklık stresine karşı farklılaşan yanıtları değil, aynı zamanda stres sonrası iyileşme süreçlerini de yansıttığından, zeytin bitkisinde stresin hem akut etkilerini hem de iyileşme sürecini izlemeye olanak tanıyan etkili biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir.

4.7. Proteomik Analizlerde Ekstraksiyon Yönteminin Önemi

Asidik ve hidrofilik proteinlerin baskınlığı, stres koşullarında bitkinin protein düzeyinde geliştirdiği evrimsel adaptasyonu yansıtmaktadır. Kuraklık stresine yönelik proteomik analizlerin güvenilirliğini artırmak amacıyla ekstraksiyon yöntemlerinin de ayrıca karşılaştırıldığı bu çalışmada, Protokol B'nin asidik pI değerlerine sahip ve hidrofilik özellik gösteren strese özgü proteinlerin etkin ekstraksiyonunda öne çıktığı belirlenmiştir. Yaptığımız çalışma da göstermektedir ki fenolik bileşiklerce zengin olan zeytin gibi

türlerde, uygun ekstraksiyon yöntemlerin optimize edilmesi proteinlerin verimli analizi konusunda önem taşımaktadır.

4.8. Transkriptom ve Proteom Düzeylerinin Bütüncül Değerlendirilmesi

Transkriptomik ve proteomik düzeylerde elde edilen veriler, bitkilerin çevresel streslere çok katmanlı yanıtlar geliştirdiğini ortaya koymuştur. Kuraklık stresinin fotosentez, enerji üretimi ve karbon metabolizması gibi temel süreçlerde özellikle protein düzeyinde etkili olduğu; transkriptom düzeyinde ise transkripsiyon faktörleri, iyon taşınımı ve sinyal iletim yolları gibi hazırlık mekanizmalarının aktive edildiği saptanmıştır.

Bununla birlikte, bazı genlerde gözlenen transkript artışının protein düzeyine yansımadağı; bu durumun translasyonel gecikmeler, protein stabilitesi farklılıkları veya post-translasyonel düzenlemelerle ilişkili olabileceğı düşünölmektedir. Bu bulgular, transkriptomik verilerin tek başına moleköler yanıtları tam olarak açıklamakta yetersiz kalabileceğini ve proteom analizleriyle birlikte değeriendirilmesinin zorunlu olduğunu göstermektedir.

4.9. Öneriler

Bu tez kapsamında elde edilen bulgular:

- Zeytinde kuraklık toleransını artırmaya yönelik ıslah çalışmaları için güçlü moleköler aday gen ve proteinleri tanımlamakta,
- Transkriptomik ve proteomik analizlerin birlikte kullanılması gerektiğini açık biçimde ortaya koymakta,
- Değışen iklim koşullarına karşı zeytin üretiminde sürdürülebilirlik için yeni bakış açıları sunmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma, kuraklığa toleranslı zeytin çeşitlerinin belirlenmesinde çok katmanlı "omik" yaklaşımların önemini vurgulamakta; ileri düzey biyoteknolojik ve klasik ıslah uygulamaları için bilimsel zemin oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., & Zarrouk, M. (2015). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants* 4, 682–698. *Go to original source*.
2. Abaza, L., Talorete, T. P., Yamada, P., Kurita, Y., Zarrouk, M., & Isoda, H. (2007). Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(5), 1306-1312.
3. Abbasi, A., Malekpour, M., & Sobhanverdi, S. (2021). The *Arabidopsis* expansin gene (AtEXPA18) is capable to ameliorate drought stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Molecular Biology Reports*, 48, 5913-5922.
4. Abdallah, M. B., Trupiano, D., Polzella, A., De Zio, E., Sassi, M., Scaloni, A., ... & Scippa, G. S. (2018). Unraveling physiological, biochemical and molecular mechanisms involved in olive (*Olea europaea* L. cv. Chétoui) tolerance to drought and salt stresses. *Journal of plant physiology*, 220, 83-95.
5. Abdel-Ghany, S. E., Muller-Moule, P., Niyogi, K. K., Pilon, M., & Shikanai, T. (2005). Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell*, 17(4), 1233-1251.
6. Abdelhakam, S., Rabei, S. H., Nada, R. M., & Abogadallah, G. M. (2021). The complementary role of root and leaf PIP1 and PIP2 aquaporins drives the anisohydric behavior in *Helinathus annuus* L. *Environmental and experimental botany*, 182, 104314.
7. Abdel-Kader, M. S., Soliman, G. A., Abdel-Rahman, R. F., Saeedan, A. S., Abdel-Salam, R. M., & Ogaly, H. A. (2019). Effect of olive leaves extract on the antidiabetic effect of glyburide for possible herb-drug interaction. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(8), 1182-1195.
8. Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., & Shinozaki, K. (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell*, 9(10), 1859-1868.
9. Acharya, A. K., Acharya, S., Kushwaha, A., & Dahal, K. C. (2023). Understanding bud fruitfulness and importance of gibberellic acid (GA3)

- application (s) in successful grapevine cultivation. In *Proceeding 2nd International Conference on Horticulture* (Vol. 3).
10. Aebersold, R., & Mann, M. (2016). Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*, 537(7620), 347-355.
 11. Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.
 12. Afzal, Z., Howton, T. C., Sun, Y., & Mukhtar, M. S. (2016). The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of developmental biology*, 4(1), 9.
 13. Afzal, Z., Howton, T. C., Sun, Y., & Mukhtar, M. S. (2016). The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of developmental biology*, 4(1), 9.
 14. Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K., & Sopory, S. K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant cell reports*, 25, 1263-1274.
 15. Aharon, R., Shahak, Y., Wininger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y., & Galili, G. (2003). Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *The Plant Cell*, 15(2), 439-447.
 16. Ahmad, F., Huang, X., Lan, H. X., Huma, T., Bao, Y. M., Huang, J., & Zhang, H. S. (2014). Comprehensive gene expression analysis of the DNA (cytosine-5) methyltransferase family in rice (*Oryza sativa* L.). *Genet Mol Res*, 13(3), 5159-5172.
 17. Ahmad, S., Jeridi, M., Siddiqui, S., Shah, A. Z., & Ali, S. (2023). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the Chalcone Synthase gene family in *Oryza sativa* under Abiotic Stresses. *Plant Stress*, 9, 100201.
 18. Ahmed, C. B., Rouina, B. B., Sensoy, S., Boukhris, M., & Abdallah, F. B. (2009). Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and experimental botany*, 67(2), 345-352.
 19. Alaca, M. (2019) İstanbul İlinde Küresel Isınma Bilinci Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

20. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland Science.
21. Alesci, A., Miller, A., Tardugno, R., & Pergolizzi, S. (2022). Chemical analysis, biological and therapeutic activities of *Olea europaea* L. extracts. *Natural Product Research*, 36(11), 2932-2945.
22. Alexandersson, E., Danielson, J. Å., Råde, J., Moparthi, V. K., Fontes, M., Kjellbom, P., & Johanson, U. (2010). Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *The Plant Journal*, 61(4), 650-660.
23. Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., ... & Kjellbom, P. (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant molecular biology*, 59, 469-484.
24. Al-Khayri, J. M., Rashmi, R., Toppo, V., Chole, P. B., Banadka, A., Sudheer, W. N., ... & Rezk, A. A. S. (2023). Plant secondary metabolites: The weapons for biotic stress management. *Metabolites*, 13 (6), 716.
25. Allagulova, C. R., Gimalov, F. R., Shakirova, F. M., & Vakhitov, V. A. (2003). The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Moscow)*, 68, 945-951.
26. Alowaiesh, B. F., El-Mansy, A. B., El-Alakmy, D. A., Rehema, E. A., & Abd El-Moneim, D. (2023). Biochemical, physiological, and molecular responses of diverse olive cultivars to different irrigation regimes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 51(4), 13395-13395.
27. Ambrosone, A., Costa, A., Leone, A., & Grillo, S. (2012). Beyond transcription: RNA-binding proteins as emerging regulators of plant response to environmental constraints. *Plant Science*, 182, 12-18.
28. Amin, M., Elias, S. M., Hossain, A., Ferdousi, A., Rahman, M. S., Tuteja, N., & Seraj, Z. I. (2012). Over-expression of a DEAD-box helicase, PDH45, confers both seedling and reproductive stage salinity tolerance to rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular breeding*, 30, 345-354.
29. An, J. P., Zhang, X. W., Bi, S. Q., You, C. X., Wang, X. F., & Hao, Y. J. (2020). The ERF transcription factor MdERF38 promotes drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in apple. *The Plant Journal*, 101(3), 573-589.

30. Anami, S., De Block, M., Machuka, J., & Van Lijsebettens, M. (2009). Molecular improvement of tropical maize for drought stress tolerance in sub-Saharan Africa. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(1-2), 16-35.
31. Anchimowicz, J., Zielonka, P., & Jakiela, S. (2025). Plant Secondary Metabolites as Modulators of Mitochondrial Health: An Overview of Their Anti-Oxidant, Anti-Apoptotic, and Mitophagic Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(1), 380.
32. Andrés-Colás, N., Sancenón, V., Rodríguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D. J., Ecker, J. R., ... & Peñarrubia, L. (2006). The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *The Plant Journal*, 45(2), 225-236.
33. Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (No Title).
34. Anguraj Vadivel, A. K., Krysiak, K., Tian, G., & Dhaubhadel, S. (2018). Genome-wide identification and localization of chalcone synthase family in soybean (*Glycine max* [L] Merr). *BMC Plant Biology*, 18, 1-13.
35. Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, 6(9), 2026-2032.
36. Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, 6(9), 2026-2032.
37. Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Peirats-Llobet, M., Pizzio, G. A., Fernandez, M. A., ... & Rodriguez, P. L. (2013). PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant physiology*, 161(2), 931-941.
38. Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55(1), 373-399.
39. Apelt, F., Breuer, D., Olas, J. J., Annunziata, M. G., Flis, A., Nikoloski, Z., ... & Stitt, M. (2017). Circadian, carbon, and light control of expansion growth and leaf movement. *Plant Physiology*, 174(3), 1949-1968.

40. Arimura, G. I., Huber, D. P., & Bohlmann, J. (2004). Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (–)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *The Plant Journal*, 37(4), 603-616.
41. Arya, N., Kharjul, M. D., Shishoo, C. J., Thakare, V. N., & Jain, K. S. (2014). Some molecular targets for antihyperlipidemic drug research. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85, 535-568.
42. Asakura, Y., Galarneau, E., Watkins, K. P., Barkan, A., & van Wijk, K. J. (2012). Chloroplast RH3 DEAD box RNA helicases in maize and *Arabidopsis* function in splicing of specific group II introns and affect chloroplast ribosome biogenesis. *Plant physiology*, 159(3), 961-974.
43. Ashraf, M. F. M. R., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59(2), 206-216.
44. Atif, R. M., Shahid, L., Waqas, M., Ali, B., Rashid, M. A. R., Azeem, F., ... & Chung, G. (2019). Insights on calcium-dependent protein kinases (CPKs) signaling for abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5298.
45. Baccouch, R., Rascol, E., Stoklosa, K., & Alves, I. D. (2022). The role of the lipid environment in the activity of G protein coupled receptors. *Biophysical chemistry*, 285, 106794.
46. Bacelar, E. A., Santos, D. L., Moutinho-Pereira, J. M., Gonçalves, B. C., Ferreira, H. F., & Correia, C. M. (2006). Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science*, 170(3), 596-605.
47. Bacelar, E. A., Santos, D. L., Moutinho-Pereira, J. M., Lopes, J. I., Gonçalves, B. C., Ferreira, T. C., & Correia, C. M. (2007). Physiological behaviour, oxidative damage and antioxidative protection of olive trees grown under different irrigation regimes. *Plant and Soil*, 292, 1-12.

48. Baerenfaller, K., Grossmann, J., Grobei, M. A., Hull, R., Hirsch-Hoffmann, M., Yalovsky, S., ... & Baginsky, S. (2008). Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science*, 320(5878), 938-941.
49. Baerenfaller, K., Massonnet, C., Walsh, S., Baginsky, S., Bühlmann, P., Hennig, L., ... & Gruissem, W. (2012). Systems-based analysis of *Arabidopsis* leaf growth reveals adaptation to water deficit. *Molecular systems biology*, 8(1), 606.
50. Bajji, M., Kinet, J. M., & Lutts, S. (2002). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant growth regulation*, 36, 61-70.
51. Baker, M. A., & Brown, A. J. (2019). A detour to sterol synthesis. *Nature microbiology*, 4(2), 214-215.
52. Balestrini, R., Cosgrove, D. J., & Bonfante, P. (2005). Differential location of α -expansin proteins during the accommodation of root cells to an arbuscular mycorrhizal fungus. *Planta*, 220(6), 889-899.
53. Balotf, S., Wilson, R., Tegg, R. S., Nichols, D. S., & Wilson, C. R. (2022). Shotgun proteomics as a powerful tool for the study of the proteomes of plants, their pathogens, and plant–pathogen interactions. *Proteomes*, 10(1), 5.
54. Baloun, J., Nevrtalova, E., Kovacova, V., Hudzieczek, V., Cegan, R., Vyskot, B., & Hobza, R. (2014). Characterization of the HMA7 gene and transcriptomic analysis of candidate genes for copper tolerance in two *Silene vulgaris* ecotypes. *Journal of plant physiology*, 171(13), 1188-1196.
55. Barcia, R. A., Pena, L. B., Zawoznik, M. S., Benavides, M. P., & Gallego, S. M. (2014). Osmotic adjustment and maintenance of the redox balance in root tissue may be key points to overcome a mild water deficit during the early growth of wheat. *Plant growth regulation*, 74, 107-117.
56. Bargmann, B. O., & Munnik, T. (2006). The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current opinion in plant biology*, 9(5), 515-522.
57. Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. Critical reviews in plant sciences, 24(1), 23-58.
58. Bashir, S. S., Hussain, A., Hussain, S. J., Wani, O. A., Zahid Nabi, S., Dar, N. A., ... & Mansoor, S. (2021). Plant drought stress tolerance: Understanding its

- physiological, biochemical and molecular mechanisms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1912-1925.
59. Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5.
 60. Batool, T. S., Aslam, R., Gul, A., Paracha, R. Z., Ilyas, M., De Abreu, K., ... & Williams, L. E. (2023). Genome-wide analysis of heavy metal ATPases (HMA s) in Poaceae species and their potential role against copper stress in *Triticum aestivum*. *Scientific Reports*, 13(1), 7551.
 61. Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant physiology*, 148(1), 6-24.
 62. Ben Ayed, A., Zanin, G., Aissa, E., & Haouala, F. (2022). Volatile oil components of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves obtained from plants cultivated under salinity stress conditions. *Horticulturae*, 8(5), 442.
 63. Benny, J., Marchese, A., Giovino, A., Marra, F. P., Perrone, A., Caruso, T., & Martinelli, F. (2020). Gaining insight into exclusive and common transcriptomic features linked to drought and salinity responses across fruit tree crops. *Plants*, 9(9), 1059.
 64. Besnard, G., Garcia-Verdugo, C., Rubio de Casas, R., Treier, U. A., Galland, N., & Vargas, P. (2008). Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Annals of Botany*, 101(1), 25-30.
 65. Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P., & Bervillé, A. (2002). *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 1353-1361.
 66. Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., El Bakkali, A., Arrigo, N., ... & Savolainen, V. (2013). The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756), 20122833.
 67. Besnard, G., Rubio de Casas, R., Christin, P. A., & Vargas, P. (2009). Phylogenetics of *Olea* (Oleaceae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA

- sequences: tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. *Annals of botany*, 104(1), 143-160.
68. Bhargava, S., & Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant breeding*, 132(1), 21-32.
 69. Bhargava, S., & Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant breeding*, 132(1), 21-32.
 70. Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. K. (2008). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant cell reports*, 27, 411-424.
 71. Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(5), 229-242.
 72. Bies-Etheve, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., ... & Delseny, M. (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 67, 107-124.
 73. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü, FAO, <https://www.fao.org/home/en/>, (23.11.2024)
 74. Bista, D. R., Heckathorn, S. A., Jayawardena, D. M., Mishra, S., & Boldt, J. K. (2018). Effects of drought on nutrient uptake and the levels of nutrient-uptake proteins in roots of drought-sensitive and-tolerant grasses. *Plants*, 7(2), 28.
 75. Blattler, A., & Farnham, P. J. (2013). Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34287-34294.
 76. Bologna, N. G., & Voinnet, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual review of plant biology*, 65(1), 473-503.
 77. Boncan, D. A. T., Tsang, S. S., Li, C., Lee, I. H., Lam, H. M., Chan, T. F., & Hui, J. H. (2020). Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7382.
 78. Bordoloi, K., Dihingia, P., Krishnatreya, D., & Agarwala, N. (2021). Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the expansin gene

- family under drought stress in tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Science Today*, 8(1), 32-44.
79. Boucher, V., Buitink, J., Lin, X., Boudet, J., Hoekstra, F. A., Hundertmark, M., ... & Leprince, O. (2010). MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. *Plant, cell & environment*, 33(3), 418-430.
 80. Bourguet, P., Picard, C. L., Yelagandula, R., Pélissier, T., Lorković, Z. J., Feng, S., ... & Mathieu, O. (2021). The histone variant H2A. W and linker histone H1 co-regulate heterochromatin accessibility and DNA methylation. *Nature Communications*, 12(1), 2683.
 81. Boursiac, Y., Boudet, J., Postaire, O., Luu, D. T., Tournaire-Roux, C., & Maurel, C. (2008). Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *The Plant Journal*, 56(2), 207-218.
 82. Bouzid, M., He, F., Schmitz, G., Häusler, R. E., Weber, A. P. M., Mettler-Altmann, T., & De Meaux, J. (2019). Arabidopsis species deploy distinct strategies to cope with drought stress. *Annals of botany*, 124(1), 27-40.
 83. Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., & Nucci, R. (2002). *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4934-4940.
 84. Brito, C., Dinis, L. T., Ferreira, H., Moutinho-Pereira, J., & Correia, C. (2018b). The role of nighttime water balance on *Olea europaea* plants subjected to contrasting water regimes. *Journal of plant physiology*, 226, 56-63.
 85. Brito, C., Dinis, L. T., Luzio, A., Silva, E., Gonçalves, A., Meijón, M., ... & Correia, C. M. (2019). Kaolin and salicylic acid alleviate summer stress in rainfed olive orchards by modulation of distinct physiological and biochemical responses. *Scientia Horticulturae*, 246, 201-211.
 86. Brito, C., Dinis, L. T., Meijón, M., Ferreira, H., Pinto, G., Moutinho-Pereira, J., & Correia, C. (2018a). Salicylic acid modulates olive tree physiological and growth responses to drought and rewatering events in a dose dependent manner. *Journal of plant physiology*, 230, 21-32.

87. Brito, G., Loureiro, J., Lopes, T., Rodriguez, E., & Santos, C. (2008). Genetic characterisation of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 657-664.
88. Britto, D. T., & Kronzucker, H. J. (2002). NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of plant physiology*, 159(6), 567-584.
89. Bruce, T. J., Matthes, M. C., Napier, J. A., & Pickett, J. A. (2007). Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant science*, 173(6), 603-608.
90. Brummell, D. A., Harpster, M. H., & Dunsmuir, P. (1999). Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Molecular Biology*, 39, 161-169.
91. Bubna, G. A., Lima, R. B., Zanardo, D. Y. L., Dos Santos, W. D., Ferrarese, M. D. L. L., & Ferrarese-Filho, O. (2011). Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Physiology*, 168(14), 1627-1633.
92. Bucciantini, M., Leri, M., Nardiello, P., Casamenti, F., & Stefani, M. (2021). Olive polyphenols: Antioxidant and anti-inflammatory properties. *Antioxidants*, 10(7), 1044.
93. Bullones, A., Castro, A. J., Lima-Cabello, E., Alché, J. D. D., Luque, F., Claros, M. G., & Fernandez-Pozo, N. (2023). OliveAtlas: A Gene Expression Atlas Tool for *Olea europaea*. *Plants*, 12(6), 1274.
94. Bush, M. S., Crowe, N., Zheng, T., & Doonan, J. H. (2015). The RNA helicase, eIF 4A-1, is required for ovule development and cell size homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 84(5), 989-1004.
95. Bustin, S. A., & Nolan, T. (2020). RT-qPCR testing of SARS-CoV-2: a primer. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 3004.
96. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.
97. Bülow, N., & König, W. A. (2000). The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry*, 55(2), 141-168.

98. Caballero-Guerrero, B., Garrido-Fernandez, A., Feroso, F. G., Rodríguez-Gutierrez, G., Fernández-Prior, M. Á., Reinhard, C., ... & Arroyo-López, F. N. (2022). Antimicrobial effects of treated olive mill waste on foodborne pathogens. *LWT*, 164, 113628.
99. Čabarkapa, A., Živković, L., Žukovec, D., Djelić, N., Bajić, V., Dekanski, D., & Spremo-Potporević, B. (2014). Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicology in Vitro*, 28(3), 451-456.
100. Cabello, J. V., Lodeyro, A. F., & Zurbriggen, M. D. (2014). Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 62-70.
101. Calvo-Polanco, M., Ruiz-Lozano, J. M., Azcón, R., Molina, S., Beuzon, C. R., García, J. L., ... & Aroca, R. (2019). Phenotypic and molecular traits determine the tolerance of olive trees to drought stress. *Plant physiology and biochemistry*, 139, 521-527.
102. Câmara, J. S., Perestrelo, R., Ferreira, R., Berenguer, C. V., Pereira, J. A., & Castilho, P. C. (2024). Plant-derived terpenoids: A plethora of bioactive compounds with several health functions and industrial applications—A comprehensive overview. *Molecules*, 29(16), 3861.
103. Cansev, A. (2008). Gemlik Zeytin Çeşidi'nin düşük sıcaklık koşullarında fizyolojik ve moleküler açıdan karakterizasyonu.
104. Cao, X., & Sudhof, T. C. (2001). A transcriptively active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 293(5527), 115-120.
105. Cao, Y., Luo, Q., Tian, Y., & Meng, F. (2017). Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *Amygdalus Mira* (Koehne) Yü et Lu roots. *BMC plant biology*, 17, 1-16.
106. Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Foglia, P., Piovesana, S., Samperi, R., Stampachiacchiere, S., & Laganà, A. (2013). Proteomic platform for the identification of proteins in olive (*Olea europaea*) pulp. *Analytica Chimica Acta*, 800, 36-42.

107. Case, R. M., Eisner, D., Gurney, A., Jones, O., Muallem, S., & Verkhatsky, A. (2007). Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell calcium*, 42(4-5), 345-350.
108. Castillo, J. J., Alcaraz, M., & Benavente-García, O. (2010). Antioxidant and radioprotective effects of olive leaf extract. In *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 951-958). Academic Press.
109. Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F. W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., ... & Stanca, A. M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field crops research*, 105(1-2), 1-14.
110. Catty, P., Boutigny, S., Miras, R., Joyard, J., Rolland, N., & Seigneurin-Berny, D. (2011). Biochemical characterization of AtHMA6/PAA1, a chloroplast envelope Cu (I)-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36188-36197.
111. Cecchi, L., Schuster, N., Flynn, D., Bechtel, R., Bellumori, M., Innocenti, M., ... & Guinard, J. X. (2019). Sensory profiling and consumer acceptance of pasta, bread, and granola bar fortified with dried olive pomace (pâté): A byproduct from virgin olive oil production. *Journal of food science*, 84(10), 2995-3008.
112. Chappell, J. (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Current opinion in plant biology*, 5(2), 151-157.
113. Chartzoulakis, K., & Psarras, G. (2005). Global change effects on crop photosynthesis and production in Mediterranean: the case of Crete, Greece. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106(2-3), 147-157.
114. Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M. J., & Jung, R. (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant physiology*, 125(3), 1206-1215.
115. Chaves, M. M., & Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of experimental botany*, 55(407), 2365-2384.
116. Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4), 551-560.

117. Che, J., Yamaji, N., Shen, R. F., & Ma, J. F. (2016). An Al-inducible expansin gene, Os EXPA 10 is involved in root cell elongation of rice. *The Plant Journal*, 88(1), 132-142.
118. Chen, H., & Xiong, L. (2012). Genome-wide transcriptional reprogramming under drought stress. In *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features* (pp. 273-289). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
119. Chen, K., Tang, W., Zhou, Y., Chen, J., Xu, Z., Ma, R., ... & Chen, M. (2022). AP2/ERF transcription factor GmDREB1 confers drought tolerance in transgenic soybean by interacting with GmERFs. *Plant physiology and biochemistry*, 170, 287-295.
120. Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., & Yu, D. (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 120-128.
121. Chen, S. (2023). Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *Imeta*, 2(2), e107.
122. Chen, Y., Feng, L., Wei, N., Liu, Z. H., Hu, S., & Li, X. B. (2017). Overexpression of cotton PYL genes in *Arabidopsis* enhances the transgenic plant tolerance to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 229-238.
123. Chen, Y., Han, Y., Zhang, M., Zhou, S., Kong, X., & Wang, W. (2016). Overexpression of the wheat expansin gene TaEXPA2 improved seed production and drought tolerance in transgenic tobacco plants. *PLoS One*, 11(4), e0153494.
124. Cheng, S. H., Willmann, M. R., Chen, H. C., & Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant physiology*, 129(2), 469-485.
125. Cheng, X. X., Yu, M., Zhang, N., Zhou, Z. Q., Xu, Q. T., Mei, F. Z., & Qu, L. H. (2016). Reactive oxygen species regulate programmed cell death progress of endosperm in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under waterlogging. *Protoplasma*, 253, 311-327.
126. Chi, W., He, B., Mao, J., Li, Q., Ma, J., Ji, D., ... & Zhang, L. (2012). The function of RH22, a DEAD RNA helicase, in the biogenesis of the 50S ribosomal subunits of *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Physiology*, 158(2), 693-707.

127. Chiappetta, A., Muto, A., Bruno, L., Woloszynska, M., Lijsebettens, M. V., & Bitonti, M. B. (2015). A dehydrin gene isolated from feral olive enhances drought tolerance in *Arabidopsis* transgenic plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 392.
128. Cho, E. K., & Hong, C. B. (2006). Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Plant cell reports*, 25, 349-358.
129. Cho, H. T., & Cosgrove, D. J. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(12), 3237-3253.
130. Cho, H. T., & Kende, H. (1997). Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *The Plant Cell*, 9(9), 1661-1671.
131. Choi, D., Cho, H. T., & Lee, Y. (2006). Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia plantarum*, 126(4), 511-518.
132. Choi, H. I., Hong, J. H., Ha, J. O., Kang, J. Y., & Kim, S. Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1723-1730.
133. Choi, H. I., Park, H. J., Park, J. H., Kim, S., Im, M. Y., Seo, H. H., ... & Kim, S. Y. (2005). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiology*, 139(4), 1750-1761.
134. Chrispeels, M. J., Crawford, N. M., & Schroeder, J. I. (1999). Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *The Plant Cell*, 11(4), 661-675.
135. Chua, N. K., Coates, H. W., & Brown, A. J. (2020). Squalene monooxygenase: a journey to the heart of cholesterol synthesis. *Progress in lipid research*, 79, 101033.
136. Chung, E., Cho, C. W., Kim, K. Y., Chung, J., Kim, J. I., Chung, Y. S., ... & Lee, J. H. (2007). Molecular characterization of the GmAMS1 gene encoding β -amyrin synthase in soybean plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54, 518-523.
137. Cillingová, A., Tóth, R., Mojáková, A., Zeman, I., Vrzoňová, R., Siváková, B., ... & Nosek, J. (2022). Transcriptome and proteome profiling

- reveals complex adaptations of *Candida parapsilosis* cells assimilating hydroxyaromatic carbon sources. *PLoS Genetics*, 18(3), e1009815.
138. Close, T. J. (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia plantarum*, 97(4), 795-803.
 139. Close, T. J. (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia plantarum*, 97(4), 795-803.
 140. Coca, M. A., Almoguera, C., & Jordano, J. (1994). Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Molecular Biology*, 25, 479-492.
 141. Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L., & Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of experimental biology*, 217(1), 67-75.
 142. Collu, G., Unver, N., Peltenburg-Looman, A. M., van der Heijden, R., Verpoorte, R., & Memelink, J. (2001). Geraniol 10-hydroxylase1, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS letters*, 508(2), 215-220.
 143. Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., ... & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, 17, 1-19.
 144. Contreras, M. D. M., Lama-Muñoz, A., Gutiérrez-Pérez, J. M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2019). Integrated process for sequential extraction of bioactive phenolic compounds and proteins from mill and field olive leaves and effects on the lignocellulosic profile. *Foods*, 8(11), 531.
 145. Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2015). Reactive sulfur species (RSS): possible new players in the oxidative metabolism of plant peroxisomes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 116.
 146. Cosio, C., & Dunand, C. (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of experimental botany*, 60(2), 391-408.
 147. Costa, G. G., Cardoso, K. C., Del Bem, L. E., Lima, A. C., Cunha, M. A., de Campos-Leite, L., ... & Da Silva, M. J. (2010). Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. *BMC genomics*, 11, 1-9.

148. Costa, R., Costa, J., Sagastizábal, I., Brandao, A. T., Moreira, P., Mafra, I., ... & Pereira, C. M. (2021). Electrochemical and optical biosensing platforms for the immunorecognition of hazelnut Cor a 14 allergen. *Food Chemistry*, 361, 130122.
149. Craciun, A. R., Meyer, C. L., Chen, J., Roosens, N., De Groodt, R., Hilson, P., & Verbruggen, N. (2012). Variation in HMA4 gene copy number and expression among *Noccaea caerulescens* populations presenting different levels of Cd tolerance and accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 4179-4189.
150. Cui, M., Lin, Y., Zu, Y., Efferth, T., Li, D., & Tang, Z. (2015). Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 58, 193-201.
151. Cun, P., Sarrobert, C., Richaud, P., Chevalier, A., Soreau, P., Auroy, P., ... & Vavasseur, A. (2014). Modulation of Zn/Cd P1B2-ATPase activities in *Arabidopsis* impacts differently on Zn and Cd contents in shoots and seeds. *Metallomics*, 6(11), 2109-2116.
152. Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Absciscic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology*, 61(1), 651-679.
153. Çepel, N. (2003). Ekolojik sorunlar ve çözümleri. Tübitak. Çepel, N. (2003). Ekolojik sorunlar ve çözümleri. Tübitak.
154. ÇIRAK, C., & ESENDAL, E. (2006). Soyada kuraklik stresi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(2), 231-237.
155. da Silva, E. C., Nogueira, R. J. M. C., da Silva, M. A., & de Albuquerque, M. B. (2011). Drought stress and plant nutrition. *Plant stress*, 5(1), 32-41.
156. Dai, F., Zhang, C., Jiang, X., Kang, M., Yin, X., Lü, P., ... & Gao, J. (2012). RhNAC2 and RhEXPA4 are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals. *Plant physiology*, 160(4), 2064-2082.
157. Dalal, M., Sahu, S., Tiwari, S., Rao, A. R., & Gaikwad, K. (2018). Transcriptome analysis reveals interplay between hormones, ROS metabolism

- and cell wall biosynthesis for drought-induced root growth in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 482-492.
158. Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., ... & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2), giab008.
 159. Dastkar, E., Soleimani, A., Jafary, H., de Dios Alche, J., Bahari, A., Zeinalabedini, M., & Salami, S. A. (2020). Differential expression of genes in olive leaves and buds of ON-versus OFF-crop trees. *Scientific Reports*, 10(1), 15762.
 160. De Diego, N., Pérez-Alfocea, F., Cantero, E., Lacuesta, M., & Moncaleán, P. (2012). Physiological response to drought in radiata pine: phytohormone implication at leaf level. *Tree Physiology*, 32(4), 435-449.
 161. De Diego, N., Rodríguez, J. L., Dodd, I. C., Pérez-Alfocea, F., Moncaleán, P., & Lacuesta, M. (2013). Immunolocalization of IAA and ABA in roots and needles of radiata pine (*Pinus radiata*) during drought and rewatering. *Tree physiology*, 33(5), 537-549.
 162. De Lorenzo, G., Ferrari, S., Cervone, F., & Okun, E. (2018). Extracellular DAMPs in plants and mammals: immunity, tissue damage and repair. *Trends in immunology*, 39(11), 937-950.
 163. Dean, R. T., FU, S., Stocker, R., & Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324(1), 1-18.
 164. Debbarma, J., Sarki, Y. N., Saikia, B., Boruah, H. P. D., Singha, D. L., & Chikkaputtaiah, C. (2019). Ethylene response factor (ERF) family proteins in abiotic stresses and CRISPR–Cas9 genome editing of ERFs for multiple abiotic stress tolerance in crop plants: a review. *Molecular biotechnology*, 61(2), 153-172.
 165. Deeba, F., Pandey, A. K., Ranjan, S., Mishra, A., Singh, R., Sharma, Y. K., ... & Pandey, V. (2012). Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53, 6-18.

166. DeFalco, T. A., Bender, K. W., & Snedden, W. A. (2010). Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochemical Journal*, 425(1), 27-40.
167. Dekanski, D., Janićijević-Hudomal, S., Tadić, V., Marković, G., Arsić, I., & Mitrović, D. M. (2009). Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(4), 367-377.
168. Dekker, C., Stirling, P. C., McCormack, E. A., Filmore, H., Paul, A., Brost, R. L., ... & Willison, K. R. (2008). The interaction network of the chaperonin CCT. *The EMBO journal*, 27(13), 1827-1839.
169. Diez, C. M., Trujillo, I., Martinez-Urdiroz, N., Barranco, D., Rallo, L., Marfil, P., & Gaut, B. S. (2015). Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist*, 206(1), 436-447.
170. Dini, I. R., Wawan, W. W., Hapsoh, H. H., & Devi, R. (2020). eksplorasi dan karakterisasi bakteri rhizobium asal tanaman Mucuna bracteata di tanah gambut. *Jurnal Agroekoteknologi*, 12(1), 1-12.
171. Dippe, M., & Ulbrich-Hofmann, R. (2009). Substrate specificity in phospholipid transformations by plant phospholipase D isoenzymes. *Phytochemistry*, 70(3), 361-365.
172. Distéfano, A. M., Valiñas, M. A., Scuffi, D., Lamattina, L., Ten Have, A., García-Mata, C., & Laxalt, A. M. (2015). Phospholipase D δ knock-out mutants are tolerant to severe drought stress. *Plant Signaling & Behavior*, 10(11), e1089371.
173. Dolferus, R. (2014). To grow or not to grow: a stressful decision for plants. *Plant Science*, 229, 247-261.
174. Dong, N. Q., & Lin, H. X. (2021). Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. *Journal of integrative plant biology*, 63(1), 180-209.
175. dos Santos, T. B., Budzinski, I. G., Marur, C. J., Petkowicz, C. L., Pereira, L. F., & Vieira, L. G. (2011). Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(4), 441-448.
176. Douglas, C. J. (1996). Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends in Plant Science*, 1(6), 171-178.

177. Du, H., Liu, H., & Xiong, L. (2013). Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Frontiers in plant science*, 4, 397.
178. Du, J., Johnson, L. M., Groth, M., Feng, S., Hale, C. J., Li, S., ... & Jacobsen, S. E. (2014). Mechanism of DNA methylation-directed histone methylation by KRYPTONITE. *Molecular cell*, 55(3), 495-504.
179. Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33(4), 751-763.
180. Duong, V. A., & Lee, H. (2023). Bottom-up proteomics: advancements in sample preparation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5350.
181. Eckardt, N. A. (2019). DREB duo defines distinct drought and cold response pathways. *The Plant Cell*, 31(6), 1196-1197.
182. El Zerey-Belaskri, A., Belyagoubi-Benhammou, N., & Benhassaini, H. (2022). From traditional knowledge to modern formulation: potential and prospects of *Pistacia atlantica* desf. essential and fixed oils uses in cosmetics. *Cosmetics*, 9(6), 109.
183. El, S. N., & Karakaya, S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition reviews*, 67(11), 632-638.
184. Elmore, J. M., Griffin, B. D., & Walley, J. W. (2021). Advances in functional proteomics to study plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 63, 102061.
185. Estrada-Melo, A. C., Chao, C., Reid, M. S., & Jiang, C. Z. (2015). Overexpression of an ABA biosynthesis gene using a stress-inducible promoter enhances drought resistance in petunia. *Horticulture Research*, 2.
186. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048.
187. Fall, P. L., Falconer, S. E., & Lines, L. (2002). Agricultural intensification and the secondary products revolution along the Jordan Rift. *Human ecology*, 30, 445-482.

188. Fan, J., Shen, Y., He, L. W., Deng, D. Q., & Meng, X. C. (2022). Effects of drought stress on the quality of licorice. *Pharmacognosy Magazine*, 18(80).
189. Fang, X., & Qi, Y. (2016). RNAi in plants: an argonaute-centered view. *The Plant Cell*, 28(2), 272-285.
190. Fang, X., Ma, J., Guo, F., Qi, D., Zhao, M., Zhang, C., ... & Zhang, S. (2022). The AP2/ERF GmERF113 positively regulates the drought response by activating GmPR10-1 in soybean. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8159.
191. Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S. E., & Abdel-Massih, R. M. (2011). The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 58-63.
192. Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., & Siddique, K. H. M. (2012). Drought stress in plants: an overview. *Plant responses to drought stress*, 1-33.
193. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable agriculture*, 153-188.
194. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable agriculture* (pp. 153-188). Dordrecht: Springer Netherlands.
195. Fatemi, H., Zaghdoud, C., Nortes, P. A., Carvajal, M., & Martínez-Ballesta, M. D. C. (2020). Differential aquaporin response to distinct effects of two Zn concentrations after foliar application in pak choi (*Brassica rapa* L.) plants. *Agronomy*, 10(3), 450.
196. Featherstone, S. (Ed.). (2015). *A Complete Course in Canning and Related Processes: Volume 1 Fundamental Information on Canning*. Woodhead Publishing.
197. Feng, K., Hou, X. L., Xing, G. M., Liu, J. X., Duan, A. Q., Xu, Z. S., ... & Xiong, A. S. (2020). Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant. *Critical reviews in biotechnology*, 40(6), 750-776.
198. Feng, Y. X., Yang, L., Lin, Y. J., Song, Y., & Yu, X. Z. (2023). Merging the occurrence possibility into gene co-expression network deciphers the

- importance of exogenous 2-oxoglutarate in improving the growth of rice seedlings under thiocyanate stress. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1086098.
199. Fennoy, S. L., & Bailey-Serres, J. (1993). Synonymous codon usage in *Zea mays* L. nuclear genes is varied by levels of C and G-ending codons. *Nucleic acids research*, 21(23), 5294-5300.
 200. Fernandez, J. E. (2014). Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. *Environmental and Experimental Botany*, 103, 158-179.
 201. Fernández, J. E., & Moreno, F. (2000). Water use by the olive tree. *Journal of crop production*, 2(2), 101-162.
 202. Fernández-Costa, C., Martínez-Bartolomé, S., McClatchy, D. B., Saviola, A. J., Yu, N. K., & Yates III, J. R. (2020). Impact of the identification strategy on the reproducibility of the DDA and DIA results. *Journal of proteome research*, 19(8), 3153-3161.
 203. Fernando, V. D., & Schroeder, D. F. (2016). Role of ABA in *Arabidopsis* salt, drought, and desiccation tolerance. In *Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives*. IntechOpen.
 204. Ferrari, M., Muto, A., Bruno, L., Muzzalupo, I., & Chiappetta, A. (2023). Modulation of Anthocyanin Biosynthesis-Related Genes during the Ripening of *Olea europaea* L. cvs Carolea and Tondina Drupes in Relation to Environmental Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8770.
 205. Filichkin, S. A., Cumbie, J. S., Dharmawardhana, P., Jaiswal, P., Chang, J. H., Palusa, S. G., ... & Mockler, T. C. (2015). Environmental stresses modulate abundance and timing of alternatively spliced circadian transcripts in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 8(2), 207-227.
 206. Finkina, E. I., Melnikova, D. N., & Bogdanov, I. V. (2016). Lipid transfer proteins as components of the plant innate immune system: structure, functions, and applications. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 8(2 (29)), 47-61.
 207. Flemetakis, E., Efrose, R. C., Desbrosses, G., Dimou, M., Delis, C., Aivalakis, G., ... & Katinakis, P. (2004). Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(12), 1283-1293.

208. Flexas, J., & Medrano, H. (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of botany*, 89(2), 183-189.
209. Flexas, J., Gallé, A., Galmés, J., Ribas-Carbo, M., & Medrano, H. (2012). The response of photosynthesis to soil water stress. *Plant responses to drought stress: from morphological to molecular features*, 129-144.
210. Foresti, O., Ruggiano, A., Hannibal-Bach, H. K., Ejlsing, C. S., & Carvalho, P. (2013). Sterol homeostasis requires regulated degradation of squalene monooxygenase by the ubiquitin ligase Doa10/Teb4. *Elife*, 2, e00953.
211. Fotiadis, D., Jenö, P., Mini, T., Wirtz, S., Muller, S. A., Frayssé, L., ... & Engel, A. (2001). Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1707-1714.
212. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The plant cell*, 17(7), 1866-1875.
213. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2020). Redox homeostasis and signaling in a higher-CO₂ world. *Annual Review of Plant Biology*, 71(1), 157-182.
214. Fu, J. Y. (2013). Molecular cloning and expression analysis of a putative sesquiterpene synthase gene from tea plant (*Camellia sinensis*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 289-293.
215. Fu, J., & Huang, B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 45(2), 105-114.
216. Fu, S., Arráez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menéndez, J. A., Menéndez-Gutiérrez, M. P., Micol, V., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397, 643-654.
217. Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of

- novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(12), 3470-3488.
218. Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of plant research*, 124, 509-525.
 219. Gahlaut, V., Jaiswal, V., Kumar, A., & Gupta, P. K. (2016). Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 129, 2019-2042.
 220. Gahlaut, V., Samtani, H., & Khurana, P. (2020). Genome-wide identification and expression profiling of cytosine-5 DNA methyltransferases during drought and heat stress in wheat (*Triticum aestivum*). *Genomics*, 112(6), 4796-4807.
 221. Galili, E., Stanley, D. J., Sharvit, J., & Weinstein-Evron, M. (1997). Evidence for earliest olive-oil production in submerged settlements off the Carmel coast, Israel. *Journal of archaeological Science*, 24(12), 1141-1150.
 222. Galmés, J., Pou, A., Alsina, M. M., Tomas, M., Medrano, H., & Flexas, J. (2007). Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta*, 226, 671-681.
 223. Gao, K., Xu, J. S., Sun, J., Xu, Y. H., Wei, J. H., & Sui, C. (2016). Molecular cloning and expression of squalene epoxidase from a medicinal plant, *Bupleurum chinense*. *Chinese Herbal Medicines*, 8(1), 67-74.
 224. Gao, L., Yan, X., Li, X., Guo, G., Hu, Y., Ma, W., & Yan, Y. (2011). Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry*, 72(10), 1180-1191.
 225. Gao, Q., Zhao, M., Li, F., Guo, Q., Xing, S., & Wang, W. (2008). Expansins and coleoptile elongation in wheat. *Protoplasma*, 233, 73-81.
 226. Gariboldi, P., Jommi, G., & Verotta, L. (1986). Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 25(4), 865-869.
 227. Gattolin, S., Sorieul, M., & Frigerio, L. (2011). Mapping of tonoplast intrinsic proteins in maturing and germinating Arabidopsis seeds reveals dual

- localization of embryonic TIPs to the tonoplast and plasma membrane. *Molecular Plant*, 4(1), 180-189.
228. Ge, L. F., Chao, D. Y., Shi, M., Zhu, M. Z., Gao, J. P., & Lin, H. X. (2008). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene OsTPP1 confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta*, 228, 191-201.
 229. George, S., Manoharan, D., Li, J., Britton, M., & Parida, A. (2017). Transcriptomic responses to drought and salt stress in desert tree *Prosopis juliflora*. *Plant Gene*, 12, 114-122.
 230. Gestaut, D., Limatola, A., Joachimiak, L., & Frydman, J. (2019). The ATP-powered gymnastics of TRiC/CCT: an asymmetric protein folding machine with a symmetric origin story. *Current opinion in structural biology*, 55, 50-58.
 231. Ghanepour, S., Shakiba, M. R., Toorchi, M., & Oustan, S. (2015). Role of Zn nutrition in membrane stability, leaf hydration status, and growth of common bean grown under soil moisture stress. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 6(4), 9-20.
 232. Gholmohammadi, M., Sofalian, O., Taheri, M., Ghanbari, A., & Rasoli, V. (2019). Effect of drought stress on physiological traits and antioxidant activities in some olive cultivars. *Cellular and Molecular Biology*, 65(7), 46-54.
 233. Gil-Amado, J. A., & Gomez-Jimenez, M. C. (2013). Transcriptome analysis of mature fruit abscission control in olive. *Plant and Cell Physiology*, 54(2), 244-269.
 234. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
 235. Gill, S. S., Tajrishi, M., Madan, M., & Tuteja, N. (2013). A DESD-box helicase functions in salinity stress tolerance by improving photosynthesis and antioxidant machinery in rice (*Oryza sativa* L. cv. PB1). *Plant molecular biology*, 82, 1-22.
 236. Gilroy, S., Białasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., & Mittler, R. (2016). ROS, calcium, and electric signals: key

- mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant physiology*, 171(3), 1606-1615.
237. Giorgi, F., & Lionello, P. (2008). Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and planetary change*, 63(2-3), 90-104.
 238. Goh, H. H., Sloan, J., Dorca-Fornell, C., & Fleming, A. (2012). Inducible repression of multiple expansin genes leads to growth suppression during leaf development. *Plant physiology*, 159(4), 1759-1770.
 239. Golldack, D., Li, C., Mohan, H., & Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in plant science*, 5, 151.
 240. Golmohammadi, M., Sofalian, O., Taheri, M., Ghanbari, A., & Rasoli, V. (2020). Changes in fruit yield and photosynthesis parameters IN different olive cultivars (*Olea europaea* L.) under contrasting water regimes. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 19(3), 135-147.
 241. Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F. R., Talon, M., & Primo-Millo, E. (1996). Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant physiology*, 112(1), 401-408.
 242. Gong, Z., Dong, C. H., Lee, H., Zhu, J., Xiong, L., Gong, D., ... & Zhu, J. K. (2005). A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(1), 256-267.
 243. Gong, Z., Lee, H., Xiong, L., Jagendorf, A., Stevenson, B., & Zhu, J. K. (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11507-11512.
 244. González-Guzmán, M., Rodríguez, L., Lorenzo-Orts, L., Pons, C., Sarrion-Perdigones, A., Fernández, M. A., ... & Rodríguez, P. L. (2014). Tomato PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors show high expression in root, differential sensitivity to the abscisic acid agonist quinabactin, and the capability to enhance plant drought resistance. *Journal of experimental botany*, 65(15), 4451-4464.

245. González-Plaza, J. J., Ortiz-Martín, I., Muñoz-Mérida, A., García-López, C., Sánchez-Sevilla, J. F., Luque, F., ... & Beuzón, C. R. (2016). Transcriptomic analysis using olive varieties and breeding progenies identifies candidate genes involved in plant architecture. *Frontiers in plant science*, 7, 240.
246. Gorantla, M., Babu, P. R., Reddy Lachagari, V. B., Reddy, A. M. M., Wusirika, R., Bennetzen, J. L., & Reddy, A. R. (2007). Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *Journal of experimental botany*, 58(2), 253-265.
247. Goyal, K., Walton, L. J., & Tunnacliffe, A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical journal*, 388(1), 151-157.
248. Green, P. S. (2002). A revision of *Olea* L.(Oleaceae). *Kew Bulletin*, 91-140.
249. Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M. H., Grunwald, D., & Macherel, D. (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant physiology*, 137(1), 157-167.
250. Gros-Balthazard, M., Besnard, G., Sarah, G., Holtz, Y., Leclercq, J., Santoni, S., ... & Khadari, B. (2019). Evolutionary transcriptomics reveals the origins of olives and the genomic changes associated with their domestication. *The Plant Journal*, 100(1), 143-157.
251. Grudkowska, M., & Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3), 609-624.
252. Grusak, M. A. (2001). Plant macro-and micronutrient minerals. *e LS*.
253. Gstaiger, M., & Aebersold, R. (2009). Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nature Reviews Genetics*, 10(9), 617-627.
254. Gu, H., Wang, Y., Xie, H., Qiu, C., Zhang, S., Xiao, J., ... & Ding, Z. (2020). Drought stress triggers proteomic changes involving lignin, flavonoids and fatty acids in tea plants. *Scientific reports*, 10(1), 15504.
255. Gu, L., Xu, T., Lee, K., Lee, K. H., & Kang, H. (2014). A chloroplast-localized DEAD-box RNA helicase AtRH3 is essential for intron splicing and

- plays an important role in the growth and stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 309-318.
256. Guerfel, M., Ouni, Y., Boujnah, D., & Zarrouk, M. (2009). Photosynthesis parameters and activities of enzymes of oxidative stress in two young 'Chemlali' and 'Chetoui' olive trees under water deficit. *Photosynthetica*, 47, 340-346.
 257. Guerfel, M., Ouni, Y., Boujnah, D., & Zarrouk, M. (2009). Photosynthesis parameters and activities of enzymes of oxidative stress in two young 'Chemlali' and 'Chetoui' olive trees under water deficit. *Photosynthetica*, 47, 340-346.
 258. Guo, L., Li, S., He, Z., Fu, Y., Qiu, F., Liu, R., & Yang, G. (2024). Electroplated copper additives for advanced packaging: a review. *ACS omega*, 9(19), 20637-20647.
 259. Guo, W., Zhao, J., Li, X., Qin, L., Yan, X., & Liao, H. (2011). A soybean β -expansin gene GmEXPB2 intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses. *The Plant Journal*, 66(3), 541-552.
 260. Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266-269.
 261. Gupta, N., Ram, H., & Kumar, B. (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 89-109.
 262. Hand, S. C., Menze, M. A., Toner, M., Boswell, L., & Moore, D. (2011). LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annual review of physiology*, 73, 115-134.
 263. Hanikenne, M., Talke, I. N., Haydon, M. J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., ... & Krämer, U. (2008). Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, 453(7193), 391-395.
 264. Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., & Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant signaling & behavior*, 6(10), 1503-1509.

265. Happi, G. M., Ntabo, V. K., Tcho, A. T., & Wansi, J. D. (2022). Naturally occurring dimeric triterpenoids: Occurrence, chemistry and bioactivities. *Phytochemistry*, 200, 113242.
266. Hara, M., Fujinaga, M., & Kuboi, T. (2004). Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(7-8), 657-662.
267. Hara, M., Terashima, S., & Kuboi, T. (2001). Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu. *Journal of Plant Physiology*, 158(10), 1333-1339.
268. Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., & Kuboi, T. (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217, 290-298.
269. Harmer, S., Orford, S., & Timmis, J. (2002). Characterisation of six α -expansin genes in *Gossypium hirsutum* (upland cotton). *Molecular Genetics and Genomics*, 268, 1-9.
270. Hashmi, M. A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U., & Perveen, S. (2015). Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 541591.
271. Hassan, M. U., Aamer, M., Chattha, M. U., Haiying, T., Shahzad, B., Barbanti, L., ... & Guoqin, H. (2020). The critical role of zinc in plants facing the drought stress. *Agriculture* 10: 396.
272. Hatanaka, R., Hagiwara-Komoda, Y., Furuki, T., Kanamori, Y., Fujita, M., Cornette, R., ... & Kikawada, T. (2013). An abundant LEA protein in the anhydrobiotic midge, PvLEA4, acts as a molecular shield by limiting growth of aggregating protein particles. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(11), 1055-1067.
273. He, H., Denecker, J., Van Der Kelen, K., Willems, P., Pottie, R., Phua, S. Y., ... & Mhamdi, A. (2021). The *Arabidopsis* mediator complex subunit 8 regulates oxidative stress responses. *The Plant Cell*, 33(6), 2032-2057.

274. He, X., Chen, Z., Wang, J., Li, W., Zhao, J., Wu, J., ... & Chen, X. (2015). A sucrose: fructan-6-fructosyltransferase (6-SFT) gene from *Psathyrostachys huashanica* confers abiotic stress tolerance in tobacco. *Gene*, 570(2), 239-247.
275. He, Z., Zhong, J., Sun, X., Wang, B., Terzaghi, W., & Dai, M. (2018). The maize ABA receptors ZmPYL8, 9, and 12 facilitate plant drought resistance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 422.
276. Heinzen, H., de Vries, J. X., Moyna, P., Remberg, G., Martinez, R., & Tietze, L. F. (1996). Mass spectrometry of labelled triterpenoids: thermospray and electron impact ionization analysis. *Phytochemical Analysis*, 7(5), 237-244.
277. Henikoff, S., & Comai, L. (1998). A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics*, 149(1), 307-318.
278. Henzler, T. Q. Y. E., Ye, Q., & Steudle, E. (2004). Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant, Cell & Environment*, 27(9), 1184-1195.
279. Hera, M. H. R., Hossain, M., & Paul, A. K. (2018). Effect of foliar zinc spray on growth and yield of heat tolerant wheat under water stress. *Int. J. Biol. Environ. Eng*, 1, 10-16.
280. Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., & Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends in plant science*, 14(3), 125-132.
281. Hernández, J. A., Jiménez, A., & Mullineaux, P. M. (2011). Proteomics of plant stress responses. Springer.
282. Hinch, D. K., & Thalhammer, A. (2012). LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochemical Society Transactions*, 40(5), 1000-1003.
283. Hodges, M., Flesch, V., Gálvez, S., & Bismuth, E. (2003). Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(6-7), 577-585.
284. Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*, 6(9), 431-438.

285. Hoi, P. X., Hue, H. T. T., Hang, P. T., & Phuong, N. D. (2019). Expression of *Oryza sativa* galactinol synthase gene in maize (*Zea mays* L.). *Tap Chi Sinh Hoc*, 41(2), 101-109.
286. Hong, L., Yang, L., Yang, H., & Wang, W. (2020). Research advances in AP2/ERF transcription factors in regulating plant responses to abiotic stress. *Chinese Bulletin of Botany*, 55(4), 481.
287. Hong, Y., Zhang, W., & Wang, X. (2010). Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, cell & environment*, 33(4), 627-635.
288. Hossain, M. M., Li, X., Evans, I. H., & Rahman, M. A. (2014). A proteomic analysis of seed proteins expressed in a Brassica somatic hybrid and its two parental species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 24(1), 11-26.
289. Hossain, Z., Khatoon, A., & Komatsu, S. (2013). Soybean proteomics for unraveling abiotic stress response mechanism. *Journal of proteome research*, 12(11), 4670-4684.
290. Hou, Q., Li, S., Shang, C., Wen, Z., Cai, X., Hong, Y., & Qiao, G. (2022). Genome-wide characterization of chalcone synthase genes in sweet cherry and functional characterization of CpCHS1 under drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 989959.
291. Hou, Q., Li, X., Qiu, Z., Hong, Y., Tian, T., Li, S., ... & Qiao, G. (2022). Chinese cherry (*Cerasus pseudocerasus* Lindl.) ARF7 participates in root development and responds to drought and low phosphorus. *Horticulturae*, 8(2), 158.
292. Houghton, J. (2005). Global warming. *Reports on Progress in Physics*, 68(6), 1343.
293. Houghton, J. (2009). *Global warming: the complete briefing*. Cambridge university press.
294. Howden, A. J., Jill Harrison, C., & Preston, G. M. (2009). A conserved mechanism for nitrile metabolism in bacteria and plants. *The Plant Journal*, 57(2), 243-253.

295. Hsu, S. Y., Chen, Y. J., & Ouyang, P. (2011). Pnn and SR family proteins are differentially expressed in mouse central nervous system. *Histochemistry and cell biology*, 135, 361-373.
296. Hsu, Y. F., Chen, Y. C., Hsiao, Y. C., Wang, B. J., Lin, S. Y., Cheng, W. H., ... & Wang, C. S. (2014). A t RH 57, a DEAD-box RNA helicase, is involved in feedback inhibition of glucose-mediated abscisic acid accumulation during seedling development and additively affects pre-ribosomal RNA processing with high glucose. *The Plant Journal*, 77(1), 119-135.
297. Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., ... & Liu, Q. (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*, 3(3), e161.
298. Hu, J. G. (2011). *Impact of dormancy genotypes on differential protein expression profiles and redox-sensitive proteome in seeds of hybrid spring wheat lines* (Doctoral dissertation, Memorial University of Newfoundland).
299. Huang, B., & Xu, C. (2008). Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *Journal of integrative plant biology*, 50(10), 1230-1237.
300. Huang, B., Kong, L., Wang, C., Ju, F., Zhang, Q., Zhu, J., ... & Bu, D. (2023). Protein structure prediction: challenges, advances, and the shift of research paradigms. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 21(5), 913-925.
301. Huang, C. K., Huang, L. F., Huang, J. J., Wu, S. J., Yeh, C. H., & Lu, C. A. (2010). A DEAD-box protein, AtRH36, is essential for female gametophyte development and is involved in rRNA biogenesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 51(5), 694-706.
302. Huang, C. K., Shen, Y. L., Huang, L. F., Wu, S. J., Yeh, C. H., & Lu, C. A. (2016). The DEAD-box RNA helicase AtRH7/PRH75 participates in pre-rRNA processing, plant development and cold tolerance in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 57(1), 174-191.
303. Huang, L., Zhang, F., Zhang, F., Wang, W., Zhou, Y., Fu, B., & Li, Z. (2014). Comparative transcriptome sequencing of tolerant rice introgression line and its parents in response to drought stress. *BMC genomics*, 15, 1-16.

304. Huang, X. Y., Deng, F., Yamaji, N., Pinson, S. R., Fujii-Kashino, M., Danku, J., ... & Ma, J. F. (2016). A heavy metal P-type ATPase OsHMA4 prevents copper accumulation in rice grain. *Nature Communications*, 7(1), 12138.
305. Hundertmark, M., & Hinch, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*, 9, 1-22.
306. Hundertmark, M., & Hinch, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*, 9, 1-22.
307. Hussain, D., Haydon, M. J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S. M., Young, J., ... & Cobbett, C. S. (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *The plant cell*, 16(5), 1327-1339.
308. Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S., & Wang, L. (2018). Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities. *Frontiers in plant science*, 9, 393.
309. Hwang, J. U., Song, W. Y., Hong, D., Ko, D., Yamaoka, Y., Jang, S., ... & Lee, Y. (2016). Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle. *Molecular plant*, 9(3), 338-355.
310. Indrastata, N. N. N., Hidayah, I. S., Faradisah, H. N., & Arief, R. Q. (2023, January). A Review Article: Potential Anti-cholesterol of Extract Olive Oil (*Olea europaea* L.). In *Proceedings of International Conference on Halal Food and Health Nutrition* (Vol. 1, No. 1, pp. 44-50).
311. Ingram, J., & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 377-403.
312. Ingram, J., & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 377-403.
313. Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M. H., & Maeshima, M. (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 579(25), 5814-5820.

314. Islam, M. M., El-Sappah, A. H., Ali, H. M., Zandi, P., Huang, Q., Soaud, S. A., ... & Liang, Y. (2023). Pathogenesis-related proteins (PRs) countering environmental stress in plants: A review. *South African Journal of Botany*, 160, 414-427.
315. Iwaki, S., Hayakawa, K., Fu, B. X., & Otobe, C. (2021). Changes in hydrophobic interactions among gluten proteins during dough formation. *Processes*, 9(7), 1244.
316. İpek, A., İpek, M., Ercişli, S., & Tangu, N. A. (2017). Transcriptome-based SNP discovery by GBS and the construction of a genetic map for olive. *Functional & integrative genomics*, 17, 493-501.
317. Jahangeer, M., Fatima, R., Ashiq, M., Basharat, A., Qamar, S. A., Bilal, M., & Iqbal, H. (2021). Therapeutic and Biomedical Potentialities of Terpenoids- A Review. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 15(2)
318. Jain, M., Nagar, P., Goel, P., Singh, A. K., Kumari, S., & Mustafiz, A. (2018). Second messengers: central regulators in plant abiotic stress response. *Abiotic stress-mediated sensing and signaling in plants: an omics perspective*, 47-94.
319. Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., & Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science*, 7(3), 106-111.
320. Jan, A. U., Hadi, F., Midrarullah, A. A., & Rahman, K. (2017). Role of CBF/DREB gene expression in abiotic stress tolerance. A review. *Int J Hortic Agric*, 2, 1-12.
321. Jan, N., Rather, A. M. U. D., John, R., Chaturvedi, P., Ghatak, A., Weckwerth, W., ... & Mir, R. R. (2023). Proteomics for abiotic stresses in legumes: present status and future directions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 43(2), 171-190.
322. Jang, H. Y., & Ahn, S. J. (2015). Overexpression of *Jatropha* aquaporin genes, *JcPIP1* and *JcPIP2*, does not alter response to salt and drought stresses in transgenic Arabidopsis. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 18, 27-33.
323. Jang, J. Y., Kim, D. G., Kim, Y. O., Kim, J. S., & Kang, H. (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in

- response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 54, 713-725.
324. Javot, H., & Maurel, C. (2002). The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, 90(3), 301-313.
 325. Jedmowski, C., Ashoub, A., Beckhaus, T., Berberich, T., Karas, M., & Brüggemann, W. (2014). Comparative analysis of *Sorghum bicolor* proteome in response to drought stress and following recovery. *International journal of proteomics*.
 326. Ji, T., Li, S., Li, L., Huang, M., Wang, X., Wei, M., ... & Yang, F. (2018). Cucumber Phospholipase D alpha gene overexpression in tobacco enhanced drought stress tolerance by regulating stomatal closure and lipid peroxidation. *BMC plant biology*, 18, 1-14.
 327. Ji, T., Li, S., Li, L., Huang, M., Wang, X., Wei, M., ... & Yang, F. (2018). Cucumber Phospholipase D alpha gene overexpression in tobacco enhanced drought stress tolerance by regulating stomatal closure and lipid peroxidation. *BMC plant biology*, 18, 1-14.
 328. Jiang, M., Zhao, C., Zhao, M., Li, Y., & Wen, G. (2020). Phylogeny and evolution of calcineurin B-like (CBL) gene family in grass and functional analyses of rice CBLs. *Journal of plant biology*, 63, 117-130.
 329. Jiménez-Ruiz, J., de la O Leyva-Pérez, M., Vidoy-Mercado, I., Barceló, A., & Luque, F. (2018). Transcriptomic time-series analysis of early development in olive from germinated embryos to juvenile tree. *BMC genomics*, 19, 1-14.
 330. Jin, M., Li, D., Liu, W., Wang, P., Xiang, Z., & Liu, K. (2021). Pinin acts as a poor prognostic indicator for renal cell carcinoma by reducing apoptosis and promoting cell migration and invasion. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(9), 4340-4348.
 331. Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Frayssé, L., ... & Kjellbom, P. (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant physiology*, 126(4), 1358-1369.
 332. Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Frayssé, L., ... & Kjellbom, P. (2001). The complete set of genes encoding major

- intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant physiology*, 126(4), 1358-1369.
333. Johnson, L. A. S. (1957). A review of the family Oleaceae. Contributions from the New South Wales National Herbarium, 2, 395-418.
 334. Johnson, S. M., Lim, F. L., Finkler, A., Fromm, H., Slabas, A. R., & Knight, M. R. (2014). Transcriptomic analysis of *Sorghum bicolor* responding to combined heat and drought stress. *BMC genomics*, 15, 1-19.
 335. Jones, H. G. (1998). Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal of experimental botany*, 387-398.
 336. Joo, J. H., Ryu, D., Peng, Q., & Sugrue, S. P. (2014). Role of Pnn in alternative splicing of a specific subset of lncRNAs of the corneal epithelium. *Molecular vision*, 20, 1629.
 337. Jorrin Novo, J. V. (2021). Proteomics and plant biology: contributions to date and a look towards the next decade. *Expert Review of Proteomics*, 18(2), 93-103.
 338. Jorrín-Novó, J. V., Maldonado, A. M., Echevarría-Zomeño, S., Valledor, L., Castillejo, M. A., Curto, M., ... & Redondo, I. (2009). Plant proteomics update (2007–2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of proteomics*, 72(3), 285-314.
 339. Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., ... & Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in plant science*, 7, 1029.
 340. Julca, I., Marcet-Houben, M., Cruz, F., Gómez-Garrido, J., Gaut, B. S., Díez, C. M., ... & Gabaldón, T. (2020). Genomic evidence for recurrent genetic admixture during the domestication of Mediterranean olive trees (*Olea europaea* L.). *BMC biology*, 18(1), 1-25.
 341. Jung, S. (2004). Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science*, 166(2), 459-466.

342. Jung, S. (2004). Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant science*, 166(2), 459-466.
343. Jung, S. E., Bang, S. W., Kim, S. H., Seo, J. S., Yoon, H. B., Kim, Y. S., & Kim, J. K. (2021). Overexpression of OsERF83, a vascular tissue-specific transcription factor gene, confers drought tolerance in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7656.
344. Kacar, B., Katkat, V., & Öztürk, Ş. (2002). Bitki Fizyolojisi, Uludağ Üniv. Güçlendirme Vakfı, Yayın, (198), 493-494.
345. Kaeidi, A., Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Abbasnejad, M., Rasoulia, B., Hajializadeh, Z., & Afrazi, S. (2011). Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: in vitro and in vivo studies. *Journal of ethnopharmacology*, 136(1), 188-196.
346. Kaldenhoff, R., Kölling, A., Meyers, J., Karmann, U., Ruppel, G., & Richter, G. (1995). The blue light-responsive AthH2 gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. *The Plant Journal*, 7(1), 87-95.
347. Kalefetoğlu, T., & Ekmekci, Y. (2005). The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *Gazi University Journal of Science*, 18(4), 723-740.
348. Kalefetoğlu, T., & Ekmekci, Y. (2005). The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *Gazi University Journal of Science*, 18(4), 723-740.
349. Kang, G. J., Park, M. K., Byun, H. J., Kim, H. J., Kim, E. J., Yu, L., ... & Lee, C. H. (2020). SARNP, a participant in mRNA splicing and export, negatively regulates E-cadherin expression via interaction with pinin. *Journal of cellular physiology*, 235(2), 1543-1555.
350. Kang, J., Hwang, J. U., Lee, M., Kim, Y. Y., Assmann, S. M., Martinoia, E., & Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 107(5), 2355-2360.

351. Kang, S. H., Pandey, R. P., Lee, C. M., Sim, J. S., Jeong, J. T., Choi, B. S., ... & Sohng, J. K. (2020). Genome-enabled discovery of anthraquinone biosynthesis in *Senna tora*. *Nature communications*, 11(1), 5875.
352. Kaniewski, D., Van Campo, E., Boiy, T., Terral, J. F., Khadari, B., & Besnard, G. (2012). Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews*, 87(4), 885-899.
353. KAPLAN, M., & ARIHAN, S. K. (2012). Antikçağdan günümüze bir şifa kaynağı: Zeytin ve zeytinyağının halk tıbbında kullanımı. *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi*, 52(2), 1-15.
354. Karami, A., Shahbazi, M., Niknam, V., Shobbar, Z. S., Tafreshi, R. S., Abedini, R., & Mabood, H. E. (2013). Expression analysis of dehydrin multigene family across tolerant and susceptible barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes in response to terminal drought stress. *Acta physiologiae plantarum*, 35, 2289-2297.
355. Karim, M. R., Zhang, Y. Q., Zhao, R. R., Chen, X. P., Zhang, F. S., & Zou, C. Q. (2012). Alleviation of drought stress in winter wheat by late foliar application of zinc, boron, and manganese. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(1), 142-151.
356. Katsuhara, M., Hanba, Y. T., Shiratake, K., & Maeshima, M. (2008). Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles. *Functional Plant Biology*, 35(1), 1-14.
357. Kavar, T., Maras, M., Kidrič, M., Šuštar-Vozlič, J., & Meglič, V. (2008). Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding*, 21, 159-172.
358. Khelouf, I., Karoui, I. J., Lakoud, A., Hammami, M., & Abderrabba, M. (2023). Comparative chemical composition and antioxidant activity of olive leaves *Olea europaea* L. of Tunisian and Algerian varieties. *Heliyon*, 9(12).
359. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature biotechnology*, 37(8), 907-915.
360. Kim, J. S., Jung, H. J., Lee, H. J., Kim, K. A., Goh, C. H., Woo, Y., ... & Kang, H. (2008). Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress

- responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 55(3), 455-466.
361. Kim, J. S., Kim, K. A., Oh, T. R., Park, C. M., & Kang, H. (2008). Functional characterization of DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant and cell physiology*, 49(10), 1563-1571.
 362. Kim, J. S., Lee, S. Y., & Park, S. U. (2008). Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African journal of biotechnology*, 7(20).
 363. Kim, J. Y., Park, S. J., Jang, B., Jung, C. H., Ahn, S. J., Goh, C. H., ... & Kang, H. (2007). Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *The Plant Journal*, 50(3), 439-451.
 364. Kim, M. S., Cho, S. M., Kang, E. Y., Im, Y. J., Hwangbo, H., Kim, Y. C., ... & Cho, B. H. (2008). Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1643-1653.
 365. Kim, T. H. (2014). Mechanism of ABA signal transduction: agricultural highlights for improving drought tolerance. *Journal of Plant Biology*, 57, 1-8.
 366. Kim, T. H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual review of plant biology*, 61, 561-591.
 367. Kim, Y. J., & Chen, X. (2011). The plant Mediator and its role in noncoding RNA production. *Frontiers in biology*, 6, 125-132.
 368. Kizis, D., & Pagès, M. (2002). Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *The Plant Journal*, 30(6), 679-689.
 369. Kizis, D., Lumbreras, V., & Pagès, M. (2001). Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS letters*, 498(2-3), 187-189.
 370. Klay, I., Gouia, S., Liu, M., Mila, I., Khoudi, H., Bernadac, A., ... & Pirrello, J. (2018). Ethylene Response Factors (ERF) are differentially regulated by different abiotic stress types in tomato plants. *Plant science*, 274, 137-145.

371. Klein, A., Keyster, M., & Ludidi, N. (2013). Caffeic acid decreases salinity-induced root nodule superoxide radical accumulation and limits salinity-induced biomass reduction in soybean. *Acta physiologiae plantarum*, 35, 3059-3066.
372. Koag, M. C., Fenton, R. D., Wilkens, S., & Close, T. J. (2003). The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant physiology*, 131(1), 309-316.
373. Koh, A. J., & Betancourt, P. P. (2010). Wine and olive oil from an Early Minoan I hilltop fort. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 10(2), 15-23.
374. Kolo, Z., Majola, A., Phillips, K., Ali, A. E. E., Sharp, R. E., & Ludidi, N. (2022). Water deficit-induced changes in phenolic acid content in maize leaves is associated with altered expression of cinnamate 4-hydroxylase and p-coumaric acid 3-hydroxylase. *Plants*, 12(1), 101.
375. Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., & Nakamura, M. (1999). Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), 9159-9164.
376. Koppelman, S. J., De Jong, G. A. H., Laaper-Ertmann, M. D., Peeters, K. A. B. M., Knulst, A. C., Hefle, S. L., & Knol, E. F. (2005). Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2. *Clinical & Experimental Allergy*, 35(4), 490-497.
377. Kosová, K., Prášil, I. T., & Vítámvás, P. (2019). Role of dehydrins in plant stress response. In *Handbook of Plant and Crop Stress, Fourth Edition* (pp. 175-196). CRC Press.
378. Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., & Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics*, 74(8), 1301-1322.
379. Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M. O., & Prášil, I. T. (2013). Plant proteome responses to salinity stress—comparison of glycophytes and halophytes. *Functional Plant Biology*, 40(9), 775-786.

380. 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.
381. Kruk, J., Holländer-Czytko, H., Oettmeier, W., & Trebst, A. (2005). Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology*, 162(7), 749-757.
382. Kudla, J., Batistič, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell*, 22(3), 541-563.
383. Kuluev, B. R., Knyazev, A. V., Mikhaylova, E. V., & Chemeris, A. V. (2017). The role of expansin genes PtrEXPA3 and PnEXPA3 in the regulation of leaf growth in poplar. *Russian Journal of Genetics*, 53, 651-660.
384. Kumar, A., Heaton, J. C., & McCalley, D. V. (2013). Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography a*, 1276, 33-46.
385. Kumar, K., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.) subjected to abiotic stress conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 115, 13-22.
386. Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., ... & Shinozaki, K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2361-2366.
387. Kuromori, T., Mizoi, J., Umezawa, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2014). Drought Stress Signaling Network 13. *Stephen H. Howell Editor*, 383.
388. Kushiro, T., Shibuya, M., & Ebizuka, Y. (1998). β -Amyrin synthase: cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *European Journal of Biochemistry*, 256(1), 238-244.
389. Lange, H., Sement, F. M., & Gagliardi, D. (2011). MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 68(1), 51-63.

390. Laranjeira, S., Amorim-Silva, V., Esteban, A., Arró, M., Ferrer, A., Tavares, R. M., ... & Azevedo, H. (2015). *Arabidopsis* squalene epoxidase 3 (SQE3) complements SQE1 and is important for embryo development and bulk squal
391. Laranjeira, S., Amorim-Silva, V., Esteban, A., Arró, M., Ferrer, A., Tavares, R. M., ... & Azevedo, H. (2015). *Arabidopsis* squalene epoxidase 3 (SQE3) complements SQE1 and is important for embryo development and bulk squalene epoxidase activity. *Molecular plant*, 8(7), 1090-1102.
392. Lata, C., & Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of experimental botany*, 62(14), 4731-4748.
393. Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., & Dietz, K. J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8(4), 94.
394. Le Tutour, B., & Guedon, D. (1992). Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 31(4), 1173-1178.
395. Lee, K. H., Park, J., Williams, D. S., Xiong, Y., Hwang, I., & Kang, B. H. (2013). Defective chloroplast development inhibits maintenance of normal levels of abscisic acid in a mutant of the *Arabidopsis* RH 3 DEAD-box protein during early post-germination growth. *The Plant Journal*, 73(5), 720-732.
396. Lee, K. H., Park, J., Williams, D. S., Xiong, Y., Hwang, I., & Kang, B. H. (2013). Defective chloroplast development inhibits maintenance of normal levels of abscisic acid in a mutant of the *Arabidopsis* RH 3 DEAD-box protein during early post-germination growth. *The Plant Journal*, 73(5), 720-732.
397. Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P. L., Chang, Y. T., & Huang, P. L. (2003). Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(4), 1029-1037.
398. Lei, Y., Yin, C., & Li, C. (2006). Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum*, 127(2), 182-191.

399. Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 529(7584), 84–87.
400. Li, C., Fu, K., Guo, W., Zhang, X., Li, C., & Li, C. (2023). Starch and sugar metabolism response to post-anthesis drought stress during critical periods of elite wheat (*Triticum aestivum* L.) endosperm development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(9), 5476-5494.
401. Li, C., Meng, D., Zhang, J., & Cheng, L. (2019). Genome-wide identification and expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes in apple (*Malus domestica*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 600-612.
402. Li, F., Xing, S., Guo, Q., Zhao, M., Zhang, J., Gao, Q., ... & Wang, W. (2011). Drought tolerance through over-expression of the expansin gene TaEXPB23 in transgenic tobacco. *Journal of plant physiology*, 168(9), 960-966.
403. Li, L., & Yi, H. (2022). Enhancement of drought tolerance in *Arabidopsis* plants induced by sulfur dioxide. *Ecotoxicology*, 31(4), 637-648.
404. Li, M., Zhang, Y., Zhang, H., Wang, J., & Shen, C. (2022). Integrative omics approaches for dissecting plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 828475.
405. Li, S., Assmann, S. M., & Albert, R. (2006). Predicting essential components of signal transduction networks: a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS biology*, 4(10), e312.
406. Li, X., Li, C., Zhu, J., Zhong, S., Zhu, H., & Zhang, X. (2023). Functions and mechanisms of RNA helicases in plants. *Journal of Experimental Botany*, 74(7), 2295-2310.
407. Li, Z., Tian, Y., Xu, J., Fu, X., Gao, J., Wang, B. O., ... & Yao, Q. (2018). A tomato ERF transcription factor, SlERF84, confers enhanced tolerance to drought and salt stress but negatively regulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 683-695.
408. Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & redox signaling*, 19(9), 998-1011.
409. Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.

410. Licausi, F., Ohme-Takagi, M., & Perata, P. (2013). APETALA 2/Ethylene Responsive Factor (AP 2/ERF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, 199(3), 639-649.
411. Lima, A. L. S., DaMatta, F. M., Pinheiro, H. A., Totola, M. R., & Loureiro, M. E. (2002). Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and experimental botany*, 47(3), 239-247.
412. Lin, B. L., Wang, J. S., Liu, H. C., Chen, R. W., Meyer, Y., Barakat, A., & Delseny, M. (2001). Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones*, 6(3), 201.
413. Ling, Y., Mahfouz, M. M., & Zhou, S. (2021). Pre-mRNA alternative splicing as a modulator for heat stress response in plants. *Trends in plant science*, 26(11), 1153-1170.
414. Liphshitz, N., Gophna, R., Hartman, M., & Biger, G. (1991). The beginning of olive (*Olea europaea*) cultivation in the Old World: a reassessment. *Journal of Archaeological Science*, 18(4), 441-453.
415. Liu, C., Wang, Y., Pan, K., Li, W., Zhang, L., Shen, X., ... & Deng, M. (2014). Responses of the antioxidant defense system to drought stress in the leaves of *Fargesia denudata* seedlings, the staple food of the giant panda. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61, 374-383.
416. Liu, C., Zhang, X., Zhang, K., An, H., Hu, K., Wen, J., ... & Fu, T. (2015). Comparative analysis of the *Brassica napus* root and leaf transcript profiling in response to drought stress. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 18752-18777.
417. Liu, D., Tu, L., Wang, L., Li, Y., Zhu, L., & Zhang, X. (2008). Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in elongating cotton fibers. *Plant cell reports*, 27, 1385-1394.
418. Liu, H., Able, A. J., & Able, J. A. (2022). Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends in plant science*, 27(7), 699-716.
419. Liu, J., & Zhu, J. K. (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 280(5371), 1943-1945.

420. Liu, J., Chen, C., Wan, X., Yao, G., Bao, S., Wang, F., ... & Jiang, H. (2022). Identification of the sesquiterpene synthase AcTPS1 and high production of (–)-germacrene D in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 89.
421. Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C. S., & Zhu, J. K. (2000). 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.
422. Liu, J., Wei, Q., Jin, Y., Jin, Y., & Jiang, Y. (2023). Cold-Induced RNA-Binding Protein and RNA-Binding Motif Protein 3: Two RNA Molecular Chaperones Closely Related to Reproductive Development and Reproductive System Diseases. *Protein and Peptide Letters*, 30(1), 2-12.
423. Liu, J., Zhao, F. L., Guo, Y., Fan, X. C., Wang, Y. J., & Wen, Y. Q. (2019). The ABA receptor-like gene VyPYL9 from drought-resistance wild grapevine confers drought tolerance and ABA hypersensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138, 543-558.
424. Liu, L., Hao, Z., Weng, J., Li, M., Zhang, D., Bai, L., ... & Zhang, S. (2012). Identification of drought-responsive genes by cDNA-amplified fragment length polymorphism in maize. *Annals of applied biology*, 161(3), 203-213.
425. Liu, Q., Umeda, M., & Uchimiya, H. (1994). Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Molecular Biology*, 26, 2003-2007.
426. Liu, S., de Jonge, J., Trejo-Arellano, M. S., Santos-González, J., Köhler, C., & Hennig, L. (2021). Role of H1 and DNA methylation in selective regulation of transposable elements during heat stress. *New Phytologist*, 229(4), 2238-2250.
427. Liu, S., Hua, Y., Wang, J., Li, L., Yuan, J., Zhang, B., ... & Kong, D. (2021). RNA polymerase III is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Cell*, 184(5), 1314-1329.
428. Liu, S., Wang, X., Wang, H., Xin, H., Yang, X., Yan, J., ... & Qin, F. (2013). Genome-wide analysis of ZmDREB genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L. *PLoS genetics*, 9(9), e1003790.

429. Liu, W., Shoji, K., Naganuma, M., Tomari, Y., & Iwakawa, H. O. (2022). The mechanisms of siRNA selection by plant Argonaute proteins triggering DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 50(22), 12997-13010.
430. Liu, X., Wang, Z., Wang, L., Wu, R., Phillips, J., & Deng, X. (2009). LEA 4 group genes from the resurrection plant *Boea hygrometrica* confer dehydration tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science*, 176(1), 90-98.
431. Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell*, 165(3), 535-550.
432. Liu, Y., Jiang, H., Zhao, Z., & An, L. (2011). Absciscic acid is involved in brassinosteroids-induced chilling tolerance in the suspension cultured cells from *Chorispora bungeana*. *Journal of Plant Physiology*, 168(9), 853-862.
433. Liu, Y., Tabata, D., & Imai, R. (2016). A cold-inducible DEAD-box RNA helicase from *Arabidopsis thaliana* regulates plant growth and development under low temperature. *PLoS One*, 11(4), e0154040.
434. Lo, T. S., Le, H. D., Nguyen, V. T. T., Chu, H. H., Le, V. S., & CHu, H. M. (2015). Overexpression of a soybean expansin gene, GmEXP1, improves drought tolerance in transgenic tobacco. *Turkish Journal of Botany*, 39(6), 988-995.
435. Long, T., Debler, E. W., & Li, X. (2022). Structural enzymology of cholesterol biosynthesis and storage. *Current opinion in structural biology*, 74, 102369.
436. Lozano-Juste, J., Infantes, L., Garcia-Maquilon, I., Ruiz-Partida, R., Merilo, E., Benavente, J. L., ... & Albert, A. (2023). Structure-guided engineering of a receptor-agonist pair for inducible activation of the ABA adaptive response to drought. *Science advances*, 9(10), eade9948.
437. Lozano-Juste, J., Infantes, L., Garcia-Maquilon, I., Ruiz-Partida, R., Merilo, E., Benavente, J. L., ... & Albert, A. (2023). Structure-guided engineering of a receptor-agonist pair for inducible activation of the ABA adaptive response to drought. *Science advances*, 9(10), eade9948.
438. Lu, G., Wang, X., Liu, J., Yu, K., Gao, Y., Liu, H., ... & Broglie, R. M. (2014). Application of T-DNA activation tagging to identify glutamate receptor-

- like genes that enhance drought tolerance in plants. *Plant cell reports*, 33, 617-631.
439. Lu, M., Sun, Q. P., Zhang, D. F., Wang, T. Y., & Pan, J. B. (2015). Identification of 7 stress-related NAC transcription factor members in maize (*Zea mays* L.) and characterization of the expression pattern of these genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(2), 144-150.
 440. Luo, D., Mubeen, S., Rehman, M., Cao, S., Wang, C., Yue, J., ... & Chen, P. (2024). The AP2/ERF transcription factor HcERF5 confers drought tolerance via ABA-mediated signaling in kenaf. *bioRxiv*, 2024-08.
 441. LUO, H. R., MOREAU, G. A., LEVIN, N., & MOORE, M. J. (1999). The human Prp8 protein is a component of both U2-and U12-dependent spliceosomes. *Rna*, 5(7), 893-908.
 442. Ma, D., Sun, D., Wang, C., Ding, H., Qin, H., Hou, J., ... & Guo, T. (2017). Physiological responses and yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress. *Frontiers in plant science*, 8, 860.
 443. Ma, L., Cheng, K., Li, J., Deng, Z., Zhang, C., & Zhu, H. (2021). Roles of plant glycine-rich RNA-binding proteins in development and stress responses. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5849.
 444. Ma, S., Sun, C., Su, W., Zhao, W., Zhang, S., Su, S., ... & Zheng, J. (2024). Transcriptomic and physiological analysis of *Atractylodes chinensis* in response to drought stress reveals the putative genes related to sesquiterpenoid biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 24(1), 91.
 445. Ma, S., Sun, C., Su, W., Zhao, W., Zhang, S., Su, S., ... & Zheng, J. (2024). Transcriptomic and physiological analysis of *Atractylodes chinensis* in response to drought stress reveals the putative genes related to sesquiterpenoid biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 24(1), 91.
 446. Ma, Y., Cao, J., He, J., Chen, Q., Li, X., & Yang, Y. (2018). Molecular mechanism for the regulation of ABA homeostasis during plant development and stress responses. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3643.
 447. Ma, Y., Dias, M. C., & Freitas, H. (2020). Drought and salinity stress responses and microbe-induced tolerance in plants. *Frontiers in plant science*, 11, 591911.

448. Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930), 1064-1068.
449. Ma, Z., Hu, L., & Jiang, W. (2024). Understanding AP2/ERF transcription factor responses and tolerance to various abiotic stresses in plants: A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 893.
450. Mach, J. (2018). Questions about coenzyme Q? A new genetic/metabolic study has answers.
451. Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
452. Mahalingam, R. Buitrago, A.M.G. Eckardt, N. Shah, N. Garcia, A.G. Day, P. Raina, R. Ve Fedoroff, N.V. (2003). Characterizing the stress/defense transcriptome of Arabidopsis, *Genome Biology*, 4: 10-20.
453. Malik, N. S., Perez, J. L., Kunta, M., & Olanya, M. (2015). Changes in Polyphenol Levels in Satsuma (Citrus unshiu) leaves in response to asian citrus psyllid infestation and water stress.
454. Mallory, A., & Vaucheret, H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant Cell*, 22(12), 3879-3889.
455. Man, D., Bao, Y. X., Han, L. B., & Zhang, X. (2011). Drought tolerance associated with proline and hormone metabolism in two tall fescue cultivars. *HortScience*, 46(7), 1027-1032.
456. Man, W., Wanting, Z., Xiang, Z., Siqi, L., Xueqian, W., Luhong, W., ... & Dali, L. (2021). Transcription Factor BvMYB44 Gene in Energy Beet: Expression Characteristics in Response to Cadmium Stress and Its Bioinformatics Analysis. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 37(35), 25-33.
457. Mane, S. P., Vasquez-Robinet, C., Sioson, A. A., Heath, L. S., & Grene, R. (2007). Early PLD α -mediated events in response to progressive drought stress in Arabidopsis: a transcriptome analysis. *Journal of experimental botany*, 58(2), 241-252.
458. Manzoor, H., Kelloniemi, J., Chiltz, A., Wendehenne, D., Pugin, A., Poinssot, B., & Garcia-Brugger, A. (2013). Involvement of the glutamate receptor

- A t GLR 3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *The Plant Journal*, 76(3), 466-480.
459. Mao, X., Chen, S., Li, A., Zhai, C., & Jing, R. (2014). Novel NAC transcription factor TaNAC67 confers enhanced multi-abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 9(1), e84359.
 460. Marquez, Y., Brown, J. W., Simpson, C., Barta, A., & Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome research*, 22(6), 1184-1195.
 461. Marrero, A. D., Cárdenas, C., Castilla, L., Ortega-Vidal, J., Quesada, A. R., Martínez-Poveda, B., & Medina, M. Á. (2024). Antiangiogenic Potential of an Olive Oil Extract: Insights from a Proteomic Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(23), 13023-13038.
 462. Marschner, H. (Ed.). (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
 463. Martin, J. A., & Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, 12(10), 671-682.
 464. Martinez, J. A. (2012). Natural fungicides obtained from plants. In *Fungicides for plant and animal diseases*. IntechOpen.
 465. Martínez-Beamonte, R., Sanclemente, T., Surra, J. C., & Osada, J. (2020). Could squalene be an added value to use olive by-products?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(3), 915-925.
 466. Mathur, S., Vyas, S., Kapoor, S., & Tyagi, A. K. (2011). The Mediator complex in plants: structure, phylogeny, and expression profiling of representative genes in a dicot (*Arabidopsis*) and a monocot (rice) during reproduction and abiotic stress. *Plant physiology*, 157(4), 1609-1627.
 467. Maurel, C., & Chrispeels, M. J. (2001). Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant physiology*, 125(1), 135-138.
 468. Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D. T., Santoni, V., Shahzad, Z., & Verdoucq, L. (2015). Aquaporins in plants. *Physiological reviews*, 95(4), 1321-1358.

469. Maurel, C., Santoni, V., Luu, D. T., Wudick, M. M., & Verdoucq, L. (2009). The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current opinion in plant biology*, 12(6), 690-698.
470. Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. T., & Santoni, V. (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59(1), 595-624.
471. McAdam, S. A., & Brodribb, T. J. (2014). Separating active and passive influences on stomatal control of transpiration. *Plant Physiology*, 164(4), 1578-1586.
472. McQueen-Mason, S., & Cosgrove, D. J. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6574-6578.
473. Mega, R., Abe, F., Kim, J. S., Tsuboi, Y., Tanaka, K., Kobayashi, H., ... & Okamoto, M. (2019). Tuning water-use efficiency and drought tolerance in wheat using abscisic acid receptors. *Nature plants*, 5(2), 153-159.
474. Mehrabad Pour-Benab, S., Fabriki-Ourang, S., & Mehrabi, A. A. (2019). Expression of dehydrin and antioxidant genes and enzymatic antioxidant defense under drought stress in wild relatives of wheat. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1063-1073.
475. Mendoza, L. M., de Nadra, M. C. M., & Farías, M. E. (2010). Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance: Partial characterization of inhibitory compounds produced by yeasts. *Food research international*, 43(8), 1990-1998.
476. Meng, C., Zhang, S., Deng, Y. S., Wang, G. D., & Kong, F. Y. (2015). Overexpression of a tomato flavanone 3-hydroxylase-like protein gene improves chilling tolerance in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 388-400.
477. Mengel, K., & Kirkby, E. A. (1987). *Principles of plant nutrition* (No. Ed. 4, p. 687pp).
478. Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., & Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal*, 25(3), 295-303.

479. Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145(15), dev164376.
480. Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4197-4220.
481. Michaletti, A., Naghavi, M. R., Toorchi, M., Zolla, L., & Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific reports*, 8(1), 1-18.
482. Migocka, M. (2015). Copper-transporting ATPases: The evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems. *IUBMB life*, 67(10), 737-745.
483. Mills, R. F., Francini, A., da Rocha, P. S. F., Baccarini, P. J., Aylett, M., Krijger, G. C., & Williams, L. E. (2005). The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS letters*, 579(3), 783-791.
484. Mishra, G., Zhang, W., Deng, F., Zhao, J., & Wang, X. (2006). A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science*, 312(5771), 264-266.
485. Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Zhao, F. J., & Ma, J. F. (2011). The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic. *Journal of experimental botany*, 62(12), 4391-4398.
486. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
487. Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
488. Mittler, R., & Zilinskas, B. A. (1994). Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal*, 5(3), 397-405.

489. Moffatt, B. A., & Ashihara, H. (2002). Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 1, e0018.
490. Moglia, A., Gianoglio, S., Acquadro, A., Valentino, D., Milani, A. M., Lanteri, S., & Comino, C. (2019). Identification of DNA methyltransferases and demethylases in *Solanum melongena* L., and their transcription dynamics during fruit development and after salt and drought stresses. *PLoS One*, 14(10), e0223581.
491. Mohanta, T. K., Yadav, D., Khan, A. L., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., & Al-Harrasi, A. (2019). Molecular players of EF-hand containing calcium signaling event in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1476.
492. Molina, C., Rotter, B., Horres, R., Udupa, S. M., Besser, B., Bellarmino, L., ... & Winter, P. (2008). SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC genomics*, 9, 1-28.
493. Montealegre, C., Esteve, C., García, M. C., García-Ruiz, C., & Marina, M. L. (2014). Proteins in olive fruit and oil. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(5), 611-624.
494. Morgan, P. W. (1990). Effects of abiotic stresses on plant hormone systems. Plant biology (USA).
495. Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., ... & Lopato, S. (2011). Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant biotechnology journal*, 9(2), 230-249.
496. Moschen, S., Di Rienzo, J. A., Higgins, J., Tohge, T., Watanabe, M., González, S., ... & Heinz, R. A. (2017). Integration of transcriptomic and metabolic data reveals hub transcription factors involved in drought stress response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant molecular biology*, 94(4), 549-564.
497. Moschen, S., Di Rienzo, J. A., Higgins, J., Tohge, T., Watanabe, M., González, S., ... & Heinz, R. A. (2017). Integration of transcriptomic and metabolic data reveals hub transcription factors involved in drought stress

- response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant molecular biology*, 94(4), 549-564.
498. Moura, J. C. M. S., Bonine, C. A. V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C., & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of integrative plant biology*, 52(4), 360-376.
 499. Mousavi et al., 2023. *Advances in proteomics and transcriptomics of drought-stressed crops*.
 500. Mousavi, S., Mariotti, R., Bagnoli, F., Costantini, L., Cultrera, N. G., Arzani, K., ... & Baldoni, L. (2017). The eastern part of the Fertile Crescent concealed an unexpected route of olive (*Olea europaea* L.) differentiation. *Annals of Botany*, 119(8), 1305-1318.
 501. Mousavi, S., Regni, L., Bocchini, M., Mariotti, R., Cultrera, N. G., Mancuso, S., ... & Proietti, P. (2019). Physiological, epigenetic and genetic regulation in some olive cultivars under salt stress. *Scientific reports*, 9(1), 1093.
 502. Mughal, A., Jabeen, N., Ashraf, K., Sultan, K., Farhan, M., Hussain, M. I., ... & uz Zaman, Q. (2024). Exploring the role of caffeic acid in mitigating abiotic stresses in plants: A review. *Plant Stress*, 100487.
 503. Muller, E. B., Ananthasubramaniam, B., Klanjšček, T., & Nisbet, R. M. (2011). Entrainment of cell division in phytoplankton with dynamic energy budgets. *Journal of sea research*, 66(4), 447-455.
 504. Mungur, R. (2002). *Metabolic Profiles of GDH transgenic crops* (Doctoral dissertation, MS thesis, SIUC Carbondale).
 505. Mungur, R., Wood, A. J., & Lightfoot, D. A. (2006). Water potential is maintained during water deficit in *Nicotiana tabacum* expressing the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene. *Plant growth regulation*, 50, 231-238.
 506. Munné-Bosch, S. (2005). Oleosin expression and its role in plant stress responses. *Physiologia Plantarum*, 123(4), 465-473.
 507. Mushtaq, A., Tariq, M., Ahmed, M., Zhou, Z., Ali, I., & Mahmood, R. T. (2021). Carbamoyl phosphate synthase subunit CgCPS1 is necessary for virulence and to regulate stress tolerance in *Colletotrichum gloeosporioides*. *The plant pathology journal*, 37(3), 232.

508. Mustroph, A., Zanetti, M. E., Jang, C. J., Holtan, H. E., Repetti, P. P., Galbraith, D. W., ... & Bailey-Serres, J. (2009). Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18843-18848.
509. Muthamilarasan, M., Theriappan, P., & Prasad, M. (2013). Recent advances in crop genomics for ensuring food security. *Current Science*, 105(2), 155-158.
510. Muzzalupo, I. (Ed.). (2012). *Olive Germplasm: The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. BoD–Books on Demand.
511. Nahar, K., Rahman, M., Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Rahman, A., Suzuki, T., & Fujita, M. (2016). Physiological and biochemical mechanisms of spermine-induced cadmium stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 21206-21218.
512. Nai, G., Mao, J., Lu, S., Li, Y., Ma, Z., & Chen, B. (2020). Genome-wide analysis and expression characterization of zinc finger homeodomain (ZHD) family genes responded to different abiotic stresses and hormonal treatments in grape (*Vitis vinifera* L.).
513. Naing, A. H., & Kim, C. K. (2021). Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1711-1723.
514. Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant physiology*, 149(1), 88-95.
515. Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in plant science*, 5, 170.
516. Nan, J. N., Ververis, K., Bollu, S., Rodd, A. L., Swarup, O., & Karagiannis, T. C. (2014). Biological effects of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: An extra view from genome-wide transcriptome analysis. *Hellenic journal of nuclear medicine*, 17, 62-69.

517. Nasrollahi, V., Mirzaie-Asl, A., Piri, K., Nazeri, S., & Mehrabi, R. (2014). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Phytochemistry*, 103, 32-37.
518. Nawaz, G., & Kang, H. (2017). Chloroplast-or mitochondria-targeted DEAD-box RNA helicases play essential roles in organellar RNA metabolism and abiotic stress responses. *Frontiers in plant science*, 8, 871.
519. Nawaz, G., & Kang, H. (2019). Rice OsRH58, a chloroplast DEAD-box RNA helicase, improves salt or drought stress tolerance in *Arabidopsis* by affecting chloroplast translation. *BMC plant biology*, 19, 1-11.
520. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. *Lehninger principles of biochemistry*, 4, 521-559.
521. Ner-Gaon, H., Halachmi, R., Savaldi-Goldstein, S., Rubin, E., Ophir, R., & Fluhr, R. (2004). Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 39(6), 877-885.
522. Netting, A. G. (2000). pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations. *Journal of Experimental Botany*, 51(343), 147-158
523. Neuman, S. D., Levine, T. P., & Bashirullah, A. (2022). A novel superfamily of bridge-like lipid transfer proteins. *Trends in Cell Biology*, 32(11), 962-974.
524. Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., & Xu, H. E. (2014). Abscisic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(5), 567-584.
525. Nguyen, P. N., Tossounian, M. A., Kovacs, D. S., Thu, T. T., Stijlemans, B., Vertommen, D., ... & Tompa, P. (2020). Dehydrin ERD14 activates glutathione transferase Phi9 in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1864(3), 129506.
526. Nguyen, T. X., & Sticklen, M. (2013). Barley HVA1 gene confers drought and salt tolerance in transgenic maize (*Zea mays* L.). *Adv Crop Sci Tech*, 1(105), 2.

527. Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey.
528. Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). *Olive processing waste management* (pp. 23-60). Amsterdam (Netherlands): Elsevier Science.
529. Nie, S., & Wang, D. (2023). AP2/ERF transcription factors for tolerance to both biotic and abiotic stress factors in plants. *Tropical Plant Biology*, 16(3), 105-112.
530. Nik, Z. B., Mirza, M., & Ghaffari, M. (2008). Effect of drought stress on growth and essential oil contents in *Parthenium argentatum* Gray. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(4), 423-429.
531. Nishiyama, T., Sugiura, K., Sugikawa, K., Ikeda, A., & Mizuno, T. (2021). Construction of protein-loadable protein cages using the hybrid proteins of the oleosin hydrophobic domain and hydrophilic dimeric coiled-coil. *Colloid and Interface Science Communications*, 40, 100352.
532. Nishizawa, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant physiology*, 147(3), 1251-1263.
533. Nunez-Vazquez, R., Desvoyes, B., & Gutierrez, C. (2022). Histone variants and modifications during abiotic stress response. *Frontiers in plant science*, 13, 984702.
534. Obata, T., & Fernie, A. R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 3225-3243.
535. Ogunrinde, A., Munro, K., Davidson, A., Ubaid, M., & Snedden, W. A. (2017). Arabidopsis calmodulin-like proteins, CML15 and CML16 possess biochemical properties distinct from calmodulin and show non-overlapping tissue expression patterns. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2175.
536. Ohara, K., Kokado, Y., Yamamoto, H., Sato, F., & Yazaki, K. (2004). Engineering of ubiquinone biosynthesis using the yeast coq2 gene confers oxidative stress tolerance in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 40(5), 734-743.

537. Ohara, K., Yamamoto, K., Hamamoto, M., Sasaki, K., & Yazaki, K. (2006). Functional characterization of OsPPT1, which encodes p-hydroxybenzoate polyprenyltransferase involved in ubiquinone biosynthesis in *Oryza sativa*. *Plant and cell physiology*, 47(5), 581-590.
538. Ohyama, K., Suzuki, M., Kikuchi, J., Saito, K., & Muranaka, T. (2009). Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 725-730.
539. Okada, K., Ohara, K., Yazaki, K., Nozaki, K., Uchida, N., Kawamukai, M., ... & Yamane, H. (2004). The AtPPT1 gene encoding 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase in ubiquinone biosynthesis is required for embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 55, 567-577.
540. Okar, D. A., Lange, A. J., Manzano, À., Navarro-Sabatè, A., Riera, L., & Bartrons, R. (2001). PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2, 6-bisphosphate. *Trends in biochemical sciences*, 26(1), 30-35.
541. Ormeno, E., Mévy, J. P., Vila, B., Bousquet-Mélou, A., Greff, S., Bonin, G., & Fernandez, C. (2007). Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. *Chemosphere*, 67(2), 276-284.
542. Ortega-García, F., & Peragón, J. (2009). The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1565-1573.
543. Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5, 86.
544. Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5, 86.
545. Otto, B., & Kaldenhoff, R. (2000). Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 211, 167-172.

546. Owttrim, G. W. (2006). RNA helicases and abiotic stress. *Nucleic acids research*, 34(11), 3220-3230.
547. Ozdemir Ozgenturk, N., Oruç, F., Sezerman, U., Kuçukural, A., Vural Korkut, S., Toksoz, F., & Un, C. (2010). Generation and analysis of expressed sequence tags from *Olea europaea* L. *International Journal of Genomics*, 2010(1), 757512.
548. Ozsolak, F., & Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews genetics*, 12(2), 87-98.
549. Ozturk, I., Ercisli, S., & Kara, M. (2009). Chosen physical properties of olive cultivars [*Olea europaea* L.]. *International agrophysics*, 23(3), 309-312.
550. Öksüz, E. (1998). *Ülkemizde zeytin hasat mekanizasyonu düzeyi, hasat edilebilirlik kriterleri ve maliyetinin belirlenmesi üzerine bir araştırma* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
551. Örs, S., Ekinci, M. (2015). Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. *Derim*, 32(2), 237-250.
552. Özcan, M. M., & Matthäus, B. (2017). A review: Benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243, 89-99.
553. Öztürk Gökçe, Z. N., Gökçe, A. F., Junaid, M. D., & Chaudhry, U. K. (2022). Comparative transcriptomics of drought stress response of taproot meristem region of contrasting purple carrot breeding lines supported by physio-biochemical parameters. *Functional & Integrative Genomics*, 22(4), 697-710.
554. Öztürk Gökçe, Z. N., Gökçe, A. F., Junaid, M. D., & Chaudhry, U. K. (2022). Comparative transcriptomics of drought stress response of taproot meristem region of contrasting purple carrot breeding lines supported by physio-biochemical parameters. *Functional & Integrative Genomics*, 22(4), 697-710.
555. Öztürk, N. Z. (2015). Bitkilerin kuraklık stresine tepkilerinde bilinenler ve yeni yaklaşımlar. *Turkish Journal Of Agriculture-Food Science And Technology*, 3(5), 307-315.
556. Paieri, F., Tadini, L., Manavski, N., Kleine, T., Ferrari, R., Morandini, P., ... & Leister, D. (2018). The DEAD-box RNA helicase RH50 is a 23S-4.5 S rRNA

- maturation factor that functionally overlaps with the plastid signaling factor GUN1. *Plant Physiology*, 176(1), 634-648.
557. Palapol, Y., Kunyamee, S., Thongkhum, M., Ketsa, S., Ferguson, I. B., & van Doorn, W. G. (2015). Expression of expansin genes in the pulp and the dehiscence zone of ripening durian (*Durio zibethinus*) fruit. *Journal of plant physiology*, 182, 33-39.
 558. Pandey, S., Nelson, D. C., & Assmann, S. M. (2009). Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell*, 136(1), 136-148.
 559. Pandey, S., Tiwari, S. B., Upadhyaya, K. C., & Sopory, S. K. (2000). Calcium signaling: linking environmental signals to cellular functions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(4), 291-318.
 560. Pang, T., Guo, L., Shim, D., Cannon, N., Tang, S., Chen, J., ... & Carlson, J. E. (2015). Characterization of the transcriptome of the xerophyte *Ammopiptanthus mongolicus* leaves under drought stress by 454 pyrosequencing. *PLoS One*, 10(8), e0136495.
 561. Pantin, F., Monnet, F., Jannaud, D., Costa, J. M., Renaud, J., Muller, B., ... & Genty, B. (2013). The dual effect of abscisic acid on stomata. *New Phytologist*, 197(1), 65-72.
 562. Papadakis, I. E., Tsiantas, P. I., Psychoyou, M., & Vemmos, S. N. (2014, May). The effects of boron on the uptake of various mineral elements by loquat plants. In *IV International Symposium on Loquat 1092* (pp. 227-233).
 563. Park, S. I., Kwon, H. J., Cho, M. H., Song, J. S., Kim, B. G., Baek, J., ... & Yoon, I. S. (2021). The OsERF115/AP2EREBP110 transcription factor is involved in the multiple stress tolerance to heat and drought in rice plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7181.
 564. Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., ... & Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *science*, 324(5930), 1068-1071.
 565. Park, W., Scheffler, B. E., Bauer, P. J., & Campbell, B. T. (2012). Genome-wide identification of differentially expressed genes under water deficit stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC plant biology*, 12, 1-12.

566. Park, Y., Xu, Z. Y., Kim, S. Y., Lee, J., Choi, B., Lee, J., ... & Hwang, I. (2016). Spatial regulation of ABCG25, an ABA exporter, is an important component of the mechanism controlling cellular ABA levels. *The Plant Cell*, 28(10), 2528-2544.
567. Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant cell reports*, 24, 255-265.
568. Patel, J., & Mishra, A. (2021). Plant aquaporins alleviate drought tolerance in plants by modulating cellular biochemistry, root-architecture, and photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1030-1044.
569. Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P. A., & Saedler, H. (1987). The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO journal*, 6(12), 3553-3558.
570. Peleg, Z., & Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 290-295.
571. Perez-Martin, A., Torres-Ruiz, J. M., Fernández, J. E., Diaz-Espejo, A., Flexas, J., Michelazzo, C., & Sebastiani, L. (2010, August). Physiological and genetic response of olive leaves to water stress and recovery: implications of mesophyll conductance and genetic expression of aquaporins and carbonic anhydrase. In *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on 922* (pp. 99-105).
572. Pérez-Pérez, J., Minguillón, S., Kabbas-Piñango, E., Payá, C., Campos, L., Rodríguez-Concepción, M., ... & Lisón, P. (2024). Metabolic crosstalk between hydroxylated monoterpenes and salicylic acid in tomato defense response against bacteria. *Plant Physiology*, 195(3), 2323-2338.
573. Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., Koundouras, S., & Giannakoula, A. (2012). Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant physiology and biochemistry*, 60, 1-11.
574. Petrucci, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., & Vianello, A. (2013). Plant flavonoids—biosynthesis, transport and

- involvement in stress responses. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 14950-14973.
575. Phillips, D. R., Rasbery, J. M., Bartel, B., & Matsuda, S. P. (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 305-314.
 576. Phuong, N. D., Tuteja, N., Nghia, P. T., & Hoi, P. X. (2015). Identification and characterization of a stress-inducible gene OsNLI-IF enhancing drought tolerance in transgenic tobacco. *Current Science*, 541-551.
 577. Phuong, N. D., Tuteja, N., Nghia, P. T., & Hoi, P. X. (2015). Identification and characterization of a stress-inducible gene OsNLI-IF enhancing drought tolerance in transgenic tobacco. *Current Science*, 541-551.
 578. Pilati, S., Bagagli, G., Sonago, P., Moretto, M., Brazzale, D., Castorina, G., ... & Moser, C. (2017). Absciscic acid is a major regulator of grape berry ripening onset: new insights into ABA signaling network. *Frontiers in plant science*, 8, 1093.
 579. Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of experimental botany*, 62(3), 869-882.
 580. Pinheiro, H. A., DaMatta, F. M., Chaves, A. R., Fontes, E. P., & Loureiro, M. E. (2004). Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant science*, 167(6), 1307-1314.
 581. Piotrowski, M. (2008). Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry*, 69(15), 2655-2667.
 582. Pizzio, G. A., Rodriguez, L., Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Yunta, C., Merilo, E., ... & Rodriguez, P. L. (2013). The PYL4 A194T mutant uncovers a key role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA interaction for absciscic acid signaling and plant drought resistance. *Plant Physiology*, 163(1), 441-455.
 583. Pollier, J., & Goossens, A. (2012). Oleanolic acid. *Phytochemistry*, 77, 10-15.

584. Ponti, L., Gutierrez, A. P., Basso, B., Neteler, M., Ruti, P. M., Dell'Aquila, A., & Iannetta, M. (2013). Olive agroecosystems in the Mediterranean Basin: multitrophic analysis of climate effects with process-based representation of soil water balance. *Procedia Environmental Sciences*, 19, 122-131.
585. Posé, D., Castanedo, I., Borsani, O., Nieto, B., Rosado, A., Taconnat, L., ... & Botella, M. A. (2009). Identification of the *Arabidopsis* dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *The Plant Journal*, 59(1), 63-76.
586. Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(4), 722-727.
587. Pustovoitova, T. N., Zhdanova, N. E., & Zholkevich, V. N. (2004). Changes in the levels of IAA and ABA in cucumber leaves under progressive soil drought. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51, 513-517.
588. Qin, F., Sakuma, Y., Li, J., Liu, Q., Li, Y. Q., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant and Cell Physiology*, 45(8), 1042-1052.
589. Qiu, S., Zhang, J., He, J., Sha, W., Li, M., Zhao, Y., & Zhai, Y. (2020). Overexpression of GmGolS2-1, a soybean galactinol synthase gene, enhances transgenic tobacco drought tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143(3), 507-516.
590. Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant physiology*, 133(4), 1755-1767.
591. Radauer, C., & Breiteneder, H. (2007). Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 518-525.
592. Raeesi Sadati, S. Y., Jahanbakhsh Godehkahriz, S., Ebadi, A., & Sedghi, M. (2021). Study of expression pattern of some transcription factors in wheat

- under drought stress and zinc nanoparticles. *Plant Genetic Researches*, 7(2), 135-144.
593. Rahimi, A., Karimipour Fard, H., & Mohamadzadeh, H. (2025). A Review of Secondary Metabolites and Inhibitory Effect of Medicinal Plants on some Plant Pathogens. *Journal of Medicinal plants and By-Products*, 14(1), 1-8.
 594. Raja, V., Qadir, S. U., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2020). Impact of drought and heat stress individually and in combination on physio-biochemical parameters, antioxidant responses, and gene expression in *Solanum lycopersicum*. *3 Biotech*, 10, 1-18.
 595. Ramezani, S., Abbasi, A., Sobhanverdi, S., Shojaeiyan, A., & Ahmadi, N. (2020). The effects of water deficit on the expression of monoterpene synthases and essential oils composition in *Salvia* ecotypes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 2199-2207.
 596. Ramírez-Tejero, J. A., Jiménez-Ruiz, J., Leyva-Pérez, M. D. L. O., Barroso, J. B., & Luque, F. (2020). Gene expression pattern in olive tree organs (*Olea europaea* L.). *Genes*, 11(5), 544.
 597. Ramos, A., Rapoport, H. F., Cabello, D., & Rallo, L. (2018). Chilling accumulation, dormancy release temperature, and the role of leaves in olive reproductive budburst: Evaluation using shoot explants. *Scientia Horticulturae*, 231, 241-252.
 598. Ramos, J. P. C., Dutra, W. F., de Lira Guerra, Y., da Luz, L. N., Cavalcanti, J. J. V., da Silva, C. R. C., ... & dos Santos, R. C. (2020). Prediction of genotypic values and selection gains in peanut lines derived from a synthetic amphidiploid. *environments*, 14, 15.
 599. Ramos-Gómez, S., Busto, M. D., Albillos, S. M., & Ortega, N. (2016). Novel qPCR systems for olive (*Olea europaea* L.) authentication in oils and food. *Food chemistry*, 194, 447-454.
 600. Ranjan, A., & Sawant, S. (2015). Genome-wide transcriptomic comparison of cotton (*Gossypium herbaceum*) leaf and root under drought stress. *3 Biotech*, 5, 585-596.

601. Rasheed, S., Bashir, K., Matsui, A., Tanaka, M., & Seki, M. (2016). Transcriptomic analysis of soil-grown *Arabidopsis thaliana* roots and shoots in response to a drought stress. *Frontiers in plant science*, 7, 180.
602. Rastgoo, L., Alemzadeh, A., & Afsharifar, A. (2011). Isolation of two novel isoforms encoding zinc-and copper-transporting P1B-ATPase from Gouan (*Aeluropus littoralis*). *Plant Omics J*, 4(7), 377-383.
603. Raza, A., Salehi, H., Rahman, M. A., Zahid, Z., Madadkar Haghighi, M., Najafi-Kakavand, S., ... & Zhuang, W. (2022). Plant hormones and neurotransmitter interactions mediate antioxidant defenses under induced oxidative stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 961872.
604. Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., Jutur, P. P., & Sumithra, K. (2004). Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and experimental botany*, 52(1), 33-42.
605. Rehman, Z., Baig, A., Shabir, G., Aslam, K., Shahzad, M., Rehman, S., ... & Khan, A. R. (2021). Drought stress induces differential DNA methylation shift at symmetric and asymmetric cytosine sites in the promoter region of ZmEXPB2 gene in maize.
606. Rejeb, K. B., Abdelly, C., & Savaure, A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 278-284.
607. Reyes, J. L., RODRIGO, M. J., COLMENERO-FLORES, J. M., GIL, J. V., GARAY-ARROYO, A. D. R. I. A. N. A., Campos, F., ... & Covarrubias, A. A. (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell & Environment*, 28(6), 709-718.
608. Riaz, U., Kharal, M. A., Murtaza, G., uz Zaman, Q., Javaid, S., Malik, H. A., ... & Abbas, Z. (2019). Prospective roles and mechanisms of caffeic acid in counter plant stress: A mini review. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 32(1), 8.
609. Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., & Hue, L. (2004). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal*, 381(3), 561-579.

610. Riyazuddin, R., Nisha, N., Singh, K., Verma, R., & Gupta, R. (2022). Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants. *Plant cell reports*, 41(3), 519-533.
611. Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., & Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant physiology*, 134(4), 1683-1696.
612. Roberts, T. H., & Hejgaard, J. (2008). Serpins in plants and green algae. *Functional & integrative genomics*, 8, 1-27.
613. Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology*, 11, 1-9.
614. Rodriguez, P. L., Lozano-Juste, J., & Albert, A. (2019). Pyr/Pyl/Rcar Aba Receptors. In *Advances in botanical research* (Vol. 92, pp. 51-82). Academic Press.
615. Rodríguez-Calzada, T., Qian, M., Strid, Å., Neugart, S., Schreiner, M., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2019). Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 134, 94-102.
616. Romero, M., Toral, M., Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Galindo, P., Sánchez, M., ... & Duarte, J. (2016). Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food & function*, 7(1), 584-593.
617. Romero-García, J. M., Niño, L., Martínez-Patiño, C., Álvarez, C., Castro, E., & Negro, M. J. (2014). Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. *Bioresource Technology*, 159, 421-432.
618. Rong, W., Qi, L., Wang, A., Ye, X., Du, L., Liang, H., ... & Zhang, Z. (2014). The ERF transcription factor Ta ERF 3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat. *Plant biotechnology journal*, 12(4), 468-479.
619. Rougé, P., & Barre, A. (2008). A molecular modeling approach defines a new group of Nodulin 26-like aquaporins in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(1), 60-66.

620. Ru, J. N., Hou, Z. H., Zheng, L., Zhao, Q., Wang, F. Z., Chen, J., ... & Xu, Z. S. (2021). Genome-wide analysis of DEAD-box RNA helicase family in wheat (*Triticum aestivum*) and functional identification of TaDEAD-box57 in abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 12, 797276.
621. Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M. B., Galle, A., Kim, T. H., ... & Rodriguez, P. L. (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant physiology*, 150(3), 1345-1355.
622. Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M. B., Galle, A., Kim, T. H., ... & Rodriguez, P. L. (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant physiology*, 150(3), 1345-1355.
623. Rucińska-Sobkowiak, R. (2016). Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 1-13.
624. Rugini, E., Baldoni, L., Muleo, R., & Sebastiani, L. (Eds.). (2016). *The olive tree genome* (Vol. 978, pp. 3-319). Berlin, Germany:: Springer.
625. Russo, G., Beritognolo, I., Bufacchi, M., Stanzione, V., Pisanelli, A., Ciolfi, M., ... & Brush, S. B. (2020). Advances in biocultural geography of olive tree (*Olea europaea* L.) landscapes by merging biological and historical assays. *Scientific Reports*, 10(1), 7673.
626. Rutowicz, K., Puzio, M., Halibart-Puzio, J., Lirski, M., Kotliński, M., Kroteń, M. A., ... & Jerzmanowski, A. (2015). A specialized histone H1 variant is required for adaptive responses to complex abiotic stress and related DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 169(3), 2080-2101.
627. Rutowicz, K., Puzio, M., Halibart-Puzio, J., Lirski, M., Kotliński, M., Kroteń, M. A., ... & Jerzmanowski, A. (2015). A specialized histone H1 variant is required for adaptive responses to complex abiotic stress and related DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 169(3), 2080-2101.
628. Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P. D., Lavee, S., & Robards, K. (2002). Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardy's mammoth. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6716-6724.

629. SA, B. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 4611-622.
630. Sade, N., Vinocur, B. J., Diber, A., Shatil, A., Ronen, G., Nissan, H., ... & Moshelion, M. (2009). Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SlTIP2; 2 a key to isohydric to anisohydric conversion?. *New Phytologist*, 181(3), 651-661.
631. Sade, N., Vinocur, B. J., Diber, A., Shatil, A., Ronen, G., Nissan, H., ... & Moshelion, M. (2009). Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SlTIP2; 2 a key to isohydric to anisohydric conversion?. *New Phytologist*, 181(3), 651-661.
632. Safronov, O., Kreuzwieser, J., Haberer, G., Alyousif, M. S., Schulze, W., Al-Harbi, N., ... & Kangasjärvi, J. (2017). Detecting early signs of heat and drought stress in *Phoenix dactylifera* (date palm). *PloS one*, 12(6), e0177883.
633. Saibo, N. J., Lourenço, T., & Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of botany*, 103(4), 609-623.
634. Saito, T., Tuan, P. A., Katsumi-Horigane, A., Bai, S., Ito, A., Sekiyama, Y., ... & Moriguchi, T. (2015). Development of flower buds in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) from late autumn to early spring. *Tree Physiology*, 35(6), 653-662.
635. Sakouhi, F., Harrabi, S., Absalon, C., Sbei, K., Boukhchina, S., & Kallel, H. (2008). α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europaea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*, 108(3), 833-839.
636. Salah, M. B., Abdelmelek, H., & Abderraba, M. (2012). Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Med chem*, 2(5), 107-111.
637. Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B., & Bennett, J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *PROTEOMICS: International Edition*, 2(9), 1131-1145.

638. Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B., & Bennett, J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *PROTEOMICS: International Edition*, 2(9), 1131-1145.
639. Samanta, S., & Thakur, J. K. (2015). Importance of Mediator complex in the regulation and integration of diverse signaling pathways in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 757.
640. Samet, I., Han, J., Jlaiel, L., Sayadi, S., & Isoda, H. (2014). Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
641. Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome biology*, 6, 1-11.
642. Sanaullah, M., Rumpel, C., Charrier, X., & Chabbi, A. (2012). How does drought stress influence the decomposition of plant litter with contrasting quality in a grassland ecosystem?. *Plant and Soil*, 352, 277-288.
643. Sánchez-Blanco, M. J., Rodriguez, P., Morales, M. A., Ortuño, M. F., & Torrecillas, A. (2002). Comparative growth and water relations of *Cistus albidus* and *Cistus monspeliensis* plants during water deficit conditions and recovery. *Plant Science*, 162(1), 107-113.
644. Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*, 14(suppl_1), S401-S417.
645. Sang, Y., Zheng, S., Li, W., Huang, B., & Wang, X. (2001). Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase Dα. *The Plant Journal*, 28(2), 135-144.
646. Sangster, T. A., & Queitsch, C. (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Current opinion in plant biology*, 8(1), 86-92.
647. Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., ... & Rodriguez, P. L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant Journal*, 60(4), 575-588.

648. Santosh Kumar, V. V., Yadav, S. K., Verma, R. K., Shrivastava, S., Ghimire, O., Pushkar, S., ... & Chinnusamy, V. (2021). The abscisic acid receptor OsPYL6 confers drought tolerance to indica rice through dehydration avoidance and tolerance mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, 72(4), 1411-1431.
649. Sanz, L., Albertos, P., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Lechón, T., Fernández-Marcos, M., & Lorenzo, O. (2015). Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of experimental botany*, 66(10), 2857-2868.
650. Sauter, A., Davies, W. J., & Hartung, W. (2001). The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of experimental botany*, 52(363), 1991-1997.
651. Sawai, S., & Saito, K. (2011). Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Frontiers in plant science*, 2, 25.
652. Schäffner, A. R. (1998). Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations?. *Planta*, 204(2), 131-139.
653. Scippa, G. S., Di Michele, M., Onelli, E., Patrignani, G., Chiatante, D., & Bray, E. A. (2004). The histone-like protein H1-S and the response of tomato leaves to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 55(394), 99-109.
654. Scippa, G. S., Griffiths, A., Chiatante, D., & Bray, E. A. (2000). The H1 histone variant of tomato, H1-S, is targeted to the nucleus and accumulates in chromatin in response to water-deficit stress. *Planta*, 211, 173-181.
655. Secchi, F., & Zwieniecki, M. A. (2011). Sensing embolism in xylem vessels: the role of sucrose as a trigger for refilling. *Plant, cell & environment*, 34(3), 514-524.
656. Secchi, F., Lovisolo, C., & Schubert, A. (2007). Expression of OePIP2. 1 aquaporin gene and water relations of *Olea europaea* twigs during drought stress and recovery. *Annals of Applied Biology*, 150(2), 163-167.
657. Secchi, F., Lovisolo, C., Uehlein, N., Kaldenhoff, R., & Schubert, A. (2007). Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea* L.). *Planta*, 225(2), 381-392.

658. Sedaghatmehr, M., Mueller-Roeber, B., & Balazadeh, S. (2016). The plastid metalloprotease FtsH6 and small heat shock protein HSP21 jointly regulate thermomemory in Arabidopsis. *Nature communications*, 7(1), 12439.
659. Seigneurin-Berny, D., Gravot, A., Auroy, P., Mazard, C., Kraut, A., Finazzi, G., ... & Rolland, N. (2006). HMA1, a new Cu-atpase of the chloro plast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2882-2892.
660. Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., ... & Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional & integrative genomics*, 2(6), 282-291.
661. Sengupta Ghatak, A., & Ghatak, A. (2016). Precipitantless Crystallization of Protein Molecules Induced by High Surface Potential. *Crystal Growth & Design*, 16(9), 5323-5329.
662. Senji, B. M., & Mandoulakani, B. A. (2018). The impact of cold stress on genes expression pattern of mono-and sesquiterpene biosynthesis and their contents in *Ocimum basilicum* L. *Phytochemistry*, 156, 250-256.
663. Seo, M., & Koshiba, T. (2011). Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *Journal of plant research*, 124, 501-507.
664. Sepiol, C. J., Yu, J., & Dhaubhadel, S. (2017). Genome-Wide Identification of chalcone reductase gene family in soybean: insight into root-specific GmCHR s and phytophthora sojae resistance. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2073.
665. Serraj, R. A. C. H. I. D., & Sinclair, T. R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. *Plant, cell & environment*, 25(2), 333-341.
666. Sezer, F. (2024). Identification and Expression Profiling of LEA Gene Family in Olive (*Olea europaea* L.). *COMU Journal of Agriculture Faculty*, 12(2), 294-305.
667. Shabani, L., Ehsanpour, A. A., & Esmaeili, A. (2010). Assessment of squalene synthase and beta-amyrin synthase gene expression in licorice roots

- treated with methyl jasmonate and salicylic acid using real-time qPCR. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57, 480-484.
668. Shafi, A., Mir, M. A., & Zahoor, I. (2017). Oxidative Stress Response Induced by PEG in *Arabidopsis* Engineered with the Cu/Zn-SOD and Mn-SOD Antioxidant System Genes.
 669. Shanker, A. K., Maheswari, M., Yadav, S. K., Desai, S., Bhanu, D., Attal, N. B., & Venkateswarlu, B. (2014). Drought stress responses in crops. *Functional & integrative genomics*, 14(1), 11-22.
 670. Sharif, R., Xie, C., Zhang, H., Arnao, M. B., Ali, M., Ali, Q., ... & Li, Y. (2018). Melatonin and its effects on plant systems. *Molecules*, 23(9), 2352.
 671. Sharma, E., Sharma, R., Borah, P., Jain, M., & Khurana, J. P. (2015). Emerging roles of auxin in abiotic stress responses. *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants: Functional Genomics Perspectives, Volume 1*, 299-328.
 672. Sharma, P., Lakra, N., Goyal, A., Ahlawat, Y. K., Zaid, A., & Siddique, K. H. (2023). Drought and heat stress mediated activation of lipid signaling in plants: a critical review. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1216835.
 673. Sharma, R., De Vleeschauwer, D., Sharma, M. K., & Ronald, P. C. (2013). Recent advances in dissecting stress-regulatory crosstalk in rice. *Molecular Plant*, 6(2), 250-260.
 674. Sharp, R. E., & LeNoble, M. E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of experimental botany*, 53(366), 33-37.
 675. Sheffield, J., & Wood, E. F. (2012). Drought: past problems and future scenarios. Routledge.
 676. Shen, C., Bai, Y., Wang, S., Zhang, S., Wu, Y., Chen, M., ... & Qi, Y. (2010). Expression profile of PIN, AUX/LAX and PGP auxin transporter gene families in *Sorghum bicolor* under phytohormone and abiotic stress. *The FEBS journal*, 277(14), 2954-2969.
 677. Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food chemistry*, 383, 132531.

678. Shen, Y., Li, J., He, F., Zhu, J., Han, Q., Zhan, X., & Xing, B. (2019). Phenanthrene-triggered tricarboxylic acid cycle response in wheat leaf. *Science of the Total Environment*, 665, 107-112.
679. Shi, Y., Zeng, W., Xu, M., Li, H., Zhang, F., Chen, Z., ... & Rehman, S. (2022). Comprehensive Analysis of Glutamate Receptor-like Genes in Rice (*Oryza sativa* L.): Genome-Wide Identification, Characteristics, Evolution, Chromatin Accessibility, gcHap Diversity, Population Variation and Expression Analysis. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(12), 6404-6427.
680. Shikanai, T. (2016). Chloroplast NDH: a different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(7), 1015-1022.
681. Shim, J. S., Park, S. H., Lee, D. K., Kim, Y. S., Park, S. C., Redillas, M. C. F. R., ... & Kim, J. K. (2021). The rice GLYCINE-RICH PROTEIN 3 confers drought tolerance by regulating mRNA stability of ROS scavenging-related genes. *Rice*, 14, 1-19.
682. Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
683. Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
684. Shojaie, B., Mostajeran, A., & Esmaeili, A. (2015). Different drought conditions could modulate growth responses of *Arabidopsis thaliana* through regulation of mRNA expression of genes encoding plasma membrane PIN proteins. *Int J Adv Res Biol Sci*, 2, 241-254.
685. Siemianowski, O., Barabasz, A., Kendziorek, M., Ruszczyńska, A., Bulska, E., Williams, L. E., & Antosiewicz, D. M. (2014). HMA4 expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier. *Journal of experimental botany*, 65(4), 1125-1139.
686. Simonetti, E., Bosi, S., Negri, L., & Dinelli, G. (2022). Amylase trypsin inhibitors (ATIs) in a selection of ancient and modern wheat: effect of genotype and growing environment on inhibitory activities. *Plants*, 11(23), 3268.

687. Simonsen, J. L., & Ross, W. C. J. (1957). The triterpenes and their derivatives hydroxy acids, hydroxy lactones, hydroxyaldehyde acids hydroxyketo acids and the stereochemistry of the triterpenes. (No Title).
688. Singh, D., & Laxmi, A. (2015). Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in plant science*, 6, 895.
689. Singh, N., & Kumaria, S. (2020). Molecular cloning and characterization of chalcone synthase gene from *Coelogyne ovalis* Lindl. and its stress-dependent expression. *Gene*, 762, 145104.
690. Sintupachee, S., Promden, W., Ngamrojanavanich, N., Sitthithaworn, W., & De-Eknamkul, W. (2015). Functional expression of a putative geraniol 8-hydroxylase by reconstitution of bacterially expressed plant CYP76F45 and NADPH-cytochrome P450 reductase CPR I from *Croton stellatopilosus* Ohba. *Phytochemistry*, 118, 204-215.
691. Skirycz, A., & Inzé, D. (2010). More from less: plant growth under limited water. *Current opinion in biotechnology*, 21(2), 197-203.
692. Škodáček, Z., & Prášil, I. T. (2011). New possibilities for research of barley (*Hordeum vulgare* L.) drought resistance. *Úroda*, 8, 24-29.
693. Skodra, C., Titeli, V. S., Michailidis, M., Bazakos, C., Ganopoulos, I., Molassiotis, A., & Tanou, G. (2021). Olive fruit development and ripening: break on through to the “-omics” side. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5806.
694. Skopelitis, D. S., Paranychanakis, N. V., Paschalidis, K. A., Pliakonis, E. D., Delis, I. D., Yakoumakis, D. I., ... & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2006). Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant Cell*, 18(10), 2767-2781.
695. Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., & Masia, A. (2004). Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science*, 166(2), 293-302.

696. Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., & Masia, A. (2005). Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32(1), 45-53.
697. Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., & Masia, A. (2005). Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32(1), 45-53.,
698. Song, J., CampbellPalmer, L., Vinqvist-Tymchuk, M., Fillmore, S., Forney, C., Luo, H., & Zhang, Z. (2020). Proteomic changes in antioxidant system in strawberry during ripening. *Frontiers in Plant Science*, 11, 594156.
699. Song, W.Y., Park, J., Eisenach, C., Maeshima, M., Lee, Y., Martinoia, E., 2014. ABC transporters and heavy metals. In: *Plant ABC Transporters*. Springer International Publishing, pp. 1–17.
700. Sopory, S. K., & Munshi, M. (1998). Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signaling in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(3), 245-318.
701. Soubeyrand, E., Johnson, T. S., Latimer, S., Block, A., Kim, J., Colquhoun, T. A., ... & Basset, G. J. (2018). The peroxidative cleavage of kaempferol contributes to the biosynthesis of the benzenoid moiety of ubiquinone in plants. *The Plant Cell*, 30(12), 2910-2921.
702. Soulages, J. L., Kim, K., Arrese, E. L., Walters, C., & Cushman, J. C. (2003). Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant physiology*, 131(3), 963-975.
703. Sporn, M. B., Liby, K. T., Yore, M. M., Fu, L., Lopchuk, J. M., & Gribble, G. W. (2011). New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *Journal of natural products*, 74(3), 537-545.
704. Srivalli, B., Sharma, G., & Khanna-Chopra, R. (2003). Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 503-512.

705. Staiger, D., & Brown, J. W. (2013). Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *The Plant Cell*, 25(10), 3640-3656.
706. Stark, R., Grzelak, M., & Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics*, 20(11), 631-656.
707. Stein, R. E., Nauerth, B. H., Binmöller, L., Zühl, L., Loreth, A., Reinert, M., ... & Schmidt, A. (2021). RH17 restricts reproductive fate and represses autonomous seed coat development in sexual Arabidopsis. *Development*, 148(19), dev198739.
708. Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G. K., Tignor, M. M., Allen, S. K., Boschung, J., ... & Midgley, P. M. (2014). Climate Change 2013: The physical science basis. contribution of working group I to the fifth assessment report of IPCC the intergovernmental panel on climate change.
709. Strickler, S. R., Bombarely, A., & Mueller, L. A. (2012). Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species1. *American journal of botany*, 99(2), 257-266.
710. Sun, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1577(1), 1-9.
711. Sun, Z., Li, S., Chen, W., Zhang, J., Zhang, L., Sun, W., & Wang, Z. (2021). Plant dehydrins: Expression, regulatory networks, and protective roles in plants challenged by abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12619.
712. Sung, P. H., Huang, F. C., Do, Y. Y., & Huang, P. L. (2011). Functional expression of geraniol 10-hydroxylase reveals its dual function in the biosynthesis of terpenoid and phenylpropanoid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 4637-4643.
713. Šurbanovski, N., Sargent, D. J., Else, M. A., Simpson, D. W., Zhang, H., & Grant, O. M. (2013). Expression of *Fragaria vesca* PIP aquaporins in response to drought stress: PIP down-regulation correlates with the decline in substrate moisture content. *PloS one*, 8(9), e74945.

714. Suzuki, A., & Knaff, D. B. (2005). Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. *Photosynthesis Research*, 83, 191-217.
715. Sweetlove, L. J., Mowday, B., Hebestreit, H. F., Leaver, C. J., & Millar, A. H. (2001). Nucleoside diphosphate kinase III is localized to the inter-membrane space in plant mitochondria. *FEBS letters*, 508(2), 272-276.
716. Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barraón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., ... & Fernández-Gutiérrez, A. (2012). Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food and chemical toxicology*, 50(6), 1817-1825.
717. Tabuchi, A., Li, L. C., & Cosgrove, D. J. (2011). Matrix solubilization and cell wall weakening by β -expansin (group-1 allergen) from maize pollen. *The Plant Journal*, 68(3), 546-559.
718. Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Responses and adaptations to abiotic stress. *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc, 755-778.
719. Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., ... & Shinozaki, K. (2002). Important roles of drought-and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 29(4), 417-426.
720. Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2020). Drought stress responses and resistance in plants: from cellular responses to long-distance intercellular communication. *Frontiers in plant science*, 11, 556972.
721. Tan, L., Qu, M., Zhu, Y., Peng, C., Wang, J., Gao, D., & Chen, C. (2020). ZINC TRANSPORTER5 and ZINC TRANSPORTER9 function synergistically in zinc/cadmium uptake. *Plant Physiology*, 183(3), 1235-1249.
722. Tan, Q. K. G., & Irish, V. F. (2006). The Arabidopsis zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development. *Plant physiology*, 140(3), 1095-1108.

723. Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., & Hasezawa, S. (2005). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 138(4), 2337-2343.
724. Tang, R. J., Wang, C., Li, K., & Luan, S. (2020). The CBL–CIPK calcium signaling network: Unified paradigm from 20 years of discoveries. *Trends in Plant Science*, 25(6), 604-617.
725. Tang, T., Yang, L., Cao, Y., Wang, M., Zhang, S., Gong, Z., ... & Zeng, Z. (2020). LncRNA AATBC regulates Pinin to promote metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Molecular oncology*, 14(9), 2251-2270.
726. Tantamacharik, T., Carne, A., Shavandi, A., & Bekhit, A. E. D. A. (2022). Keratin as an alternative protein in food and nutrition. In *Alternative proteins* (pp. 173-214). CRC Press.
727. Tavafi, M., Ahmadvand, H., & Toolabi, P. (2012). Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats.
728. Tercé-Laforgue, T., Bedu, M., Dargel-Grafin, C., Dubois, F., Gibon, Y., Restivo, F. M., & Hirel, B. (2013). Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase: II. Physiological characterization of plants overexpressing the two enzyme subunits individually or simultaneously. *Plant and Cell Physiology*, 54(10), 1635-1647.
729. Tercé-Laforgue, T., Clément, G., Marchi, L., Restivo, F. M., Lea, P. J., & Hirel, B. (2015). Resolving the role of plant NAD-glutamate dehydrogenase: III. Overexpressing individually or simultaneously the two enzyme subunits under salt stress induces changes in the leaf metabolic profile and increases plant biomass production. *Plant and Cell Physiology*, 56(10), 1918-1929.
730. Terral, J. F., Bonhomme, V., Pagnoux, C., Ivorra, S., Newton, C., Paradis, L., ... & Galili, E. (2021). The shape diversity of olive stones resulting from domestication and diversification unveils traits of the oldest known 6500-years-old table olives from Hishuley Carmel site (Israel). *Agronomy*, 11(11), 2187.
731. Terral, J. F., Bonhomme, V., Pagnoux, C., Ivorra, S., Newton, C., Paradis, L., ... & Galili, E. (2021). The shape diversity of olive stones resulting from domestication and diversification unveils traits of the oldest known 6500-years-old table olives from Hishuley Carmel site (Israel). *Agronomy*, 11(11), 2187.

732. Tesfa, M., (2022). Significance of Transcription Factors in Drought Stress Tolerance of Cereal Crops. *Journal of Plant Genetics and Breeding* 6: 111
733. Teuling, A. J., Van Loon, A. F., Seneviratne, S. I., Lehner, I., Aubinet, M., Heinesch, B., ... & Spang, U. (2013). Evapotranspiration amplifies European summer drought. *Geophysical Research Letters*, 40(10), 2071-2075.
734. Thalhammer, A., Hundertmark, M., Popova, A. V., Seckler, R., & Hinch, D. K. (2010). Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798(9), 1812-1820.
735. Thalmann, M., & Santelia, D. (2017). Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New phytologist*, 214(3), 943-951.
736. The Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC, <https://www.ipcc.ch/report/ar5/syr/ar5-syr-glossary-english/>, 24.02.2025
737. Therios, I. (2009). CROP PRODUCTION SCIENCE IN HORTICULTURE 18, OLIVES.
738. Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Biotechnology of isoprenoids*, 63-106.
739. Thu Hoai, N. T., Shim, I. S., Kobayashi, K., & Kenji, U. (2003). Accumulation of some nitrogen compounds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, 41, 159-164.
740. TOB, (2017). T. C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Türkiye Tarımsal Kuraklıkla Mücadele Stratejisi Ve Eylem Planı.
741. TOB, (2020) T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarım Ürünleri Piyasaları Zeytinyağı Raporu.
742. Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Frontiers in plant science*, 6, 84.
743. Tombesi, A., & Tombesi, S. (2007). Orchard planning and planting. In *Production Techniques in olive growing*.-International Olive Council Madrid,

- published in English, French, Spanish and Italian.* (pp. 17-40). International Olive Council.
744. Torić, J., Karković Marković, A., Jakobušić Brala, C., & Barbarić, M. (2019). Anticancer effects of olive oil polyphenols and their combinations with anticancer drugs. *Acta Pharmaceutica*, 69(4), 461-482.
 745. Townley, H. E., & Knight, M. R. (2002). Calmodulin as a potential negative regulator of Arabidopsis COR gene expression. *Plant physiology*, 128(4), 1169-1172.
 746. Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S. D., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49(1), 46-63.
 747. Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell*, 16(9), 2481-2498.
 748. Tripathi, G., & Singh, H. (2013). Impact of alphamethrin on biochemical parameters of *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology*, 34(2), 227-230.
 749. Trivedi, I., Ranjan, A., Sharma, Y. K., & Sawant, S. (2012). The histone H1 variant accumulates in response to water stress in the drought tolerant genotype of *Gossypium herbaceum* L. *The Protein Journal*, 31, 477-486.
 750. Tsamir-Rimon, M., Ben-Dor, S., Feldmesser, E., Oppenhimer-Shaanan, Y., David-Schwartz, R., Samach, A., & Klein, T. (2021). Rapid starch degradation in the wood of olive trees under heat and drought is permitted by three stress-specific beta amylases. *New Phytologist*, 229(3), 1398-1414.
 751. Tsimidou, M. Z., & Papoti, V. T. (2010). Bioactive ingredients in olive leaves. In *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 349-356). Academic Press.
 752. TTO (2020). Torbalı Ticaret Odası 2020 Zeytinyağı Sektör Raporu.

753. Tunnacliffe, A., & Wise, M. J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94(10), 791-812.
754. Turan, E. S. (2018). Türkiye'nin iklim değişikliğine bağlı kuraklık durumu.
755. Turan, E. S. (2018). Türkiye'nin iklim değişikliğine bağlı kuraklık durumu. *Doğal Afetler ve Çevre Dergisi*, 4(1), 63-69.
756. Turktas, M., Inal, B., Okay, S., Erkilic, E. G., Dundar, E., Hernandez, P., ... & Unver, T. (2013). Nutrition metabolism plays an important role in the alternate bearing of the olive tree (*Olea europaea* L.). *PloS one*, 8(3), e59876.
757. Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F., & Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant science*, 168(1), 223-231.
758. Tyagi, P., Singh, D., Mathur, S., Singh, A., & Ranjan, R. (2022). Upcoming progress of transcriptomics studies on plants: An overview. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1030890.
759. Tyanova, S., Temu, T., & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols*, 11(12), 2301-2319.
760. Uluslararası Zeytin Konseyi (International Olive Council), IOC, <https://www.internationaloliveoil.org/>, 25.08.2023
761. Tyerman, S. D., Niemietz, C. M., & Bramley, H. (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, cell & environment*, 25(2), 173-194.
762. Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current opinion in biotechnology*, 17(2), 113-122.
763. Ünsal, A.(2019).*Ölmez Ağacın Peşinde – Türkiye’de Zeytin ve Zeytinyağı*. Yapı Kredi Yayınları.
764. Vaidya, A. S., Helander, J. D., Peterson, F. C., Elzinga, D., Dejonghe, W., Kaundal, A., ... & Cutler, S. R. (2019). Dynamic control of plant water use using designed ABA receptor agonists. *Science*, 366(6464), eaaw8848.

765. Vâlcu, C. M., & Schlink, K. (2006). Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 6(14), 4166-4175.
766. Valpuesta, J. M., Martín-Benito, J., Gómez-Puertas, P., Carrascosa, J. L., & Willison, K. R. (2002). Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS letters*, 529(1), 11-16.
767. Valvez, S., Maceiras, A., Santos, P., & Reis, P. N. (2021). Olive stones as filler for polymer-based composites: A review. *Materials*, 14(4), 845.
768. Van Loon, L. C., et al. (2006). "PR proteins and their role in plant defense." *European Journal of Plant Pathology*, 116, 3-10.
769. Vandeleur, R. K., Mayo, G., Shelden, M. C., Gilliam, M., Kaiser, B. N., & Tyerman, S. D. (2009). The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant physiology*, 149(1), 445-460.
770. Vargas, P., Muñoz Garmendia, F., Hess, J., & Kadereit, J. (2000). *Olea europaea* subsp. guanchica and subsp. maroccana (Oleaceae), two new names for olive tree relatives. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 58, No. 2, pp. 360-361). Instituto Botánico, Real Jardín de Botánico CSIC.
771. Vasquez-Robinet, C., Mane, S. P., Ulanov, A. V., Watkinson, J. I., Stromberg, V. K., De Koeyer, D., ... & Grene, R. (2008). Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of experimental botany*, 59(8), 2109-2123.
772. Vaucheret, H. (2008). Plant argonauts. *Trends in plant science*, 13(7), 350-358.
773. Veeranagamallaiah, G., Prasanthi, J., Reddy, K. E., Pandurangaiah, M., Babu, O. S., & Sudhakar, C. (2011). Group 1 and 2 LEA protein expression correlates with a decrease in water stress induced protein aggregation in horsegram during germination and seedling growth. *Journal of plant physiology*, 168(7), 671-677.
774. Verma, R. K., Santosh Kumar, V. V., Yadav, S. K., Pushkar, S., Rao, M. V., & Chinnusamy, V. (2019). Overexpression of ABA receptor PYL10 gene

- confers drought and cold tolerance to indica rice. *Frontiers in plant science*, 10, 1488.
775. Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., ... & Richaud, P. (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS letters*, 576(3), 306-312.
 776. Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523-539.
 777. Victoria, D., Alik, K., Venetia, K., Georgios, M., & Zoe, H. (2018). Spatial and temporal expression of cytosine-5 DNA methyltransferase and DNA demethylase gene families of the *Ricinus communis* during seed development and drought stress. *Plant Growth Regulation*, 84, 81-94.
 778. Vijay, N., Poelstra, J. W., Künstner, A., & Wolf, J. B. (2013). Challenges and strategies in transcriptome assembly and differential gene expression quantification. A comprehensive in silico assessment of RNA-seq experiments. *Molecular ecology*, 22(3), 620-634.
 779. Vranová, E., Coman, D., & Grisse, W. (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology*, 64(1), 665-700.
 780. Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.
 781. Wallander, E., & Albert, V. A. (2000). Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. *American Journal of botany*, 87(12), 1827-1841.
 782. Wan, J., Zhang, J., Zan, X., Zhu, J., Chen, H., Li, X., ... & Li, L. (2023). Overexpression of rice histone H1 gene reduces tolerance to cold and heat stress. *Plants*, 12(13), 2408.
 783. Wang, C., Yang, A., Yin, H., & Zhang, J. (2008). Influence of water stress on endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings. *Journal of integrative plant biology*, 50(4), 427-434.

784. Wang, H., Mu, K., Liu, C., Guo, Y., & Deng, X. (2020). Gene expression profiling of *Rhododendron pulchrum* leaves under drought stress. *Tree Genetics & Genomes*, 16, 1-12.
785. Wang, K., Guo, H., & Yin, Y. (2024). AP2/ERF transcription factors and their functions in *Arabidopsis* responses to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 105763.
786. Wang, L., Li, X., Chen, S., & Liu, G. (2009). Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* plants with constitutively expressed wheat TaLEA 3. *Biotechnology letters*, 31, 313-319.
787. Wang, M., Zhang, Y., Zhu, C., Yao, X., Zheng, Z., Tian, Z., & Cai, X. (2021). EkFLS overexpression promotes flavonoid accumulation and abiotic stress tolerance in plant. *Physiologia Plantarum*, 172(4), 1966-1982.
788. Wang, R., Qin, Z., Luo, H., Pan, M., Liu, M., Yang, P., & Shi, T. (2022). Prognostic value of PNN in prostate cancer and its correlation with therapeutic significance. *Frontiers in Genetics*, 13, 1056224.
789. Wang, S., Zhang, C., Chen, R., Cheng, K., Ma, L., Wang, W., & Yang, N. (2024). H₂S is involved in drought-mediated stomatal closure through PLD α 1 in *Arabidopsis*. *Planta*, 259(6), 142.
790. Wang, W. H., Yi, X. Q., Han, A. D., Liu, T. W., Chen, J., Wu, F. H., ... & Zheng, H. L. (2012). Calcium-sensing receptor regulates stomatal closure through hydrogen peroxide and nitric oxide in response to extracellular calcium in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 177-190.
791. Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., & Cresti, M. (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 24(14), 2369-2375.
792. Wang, W., Vignani, R., Scali, M., & Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(13), 2782-2786.
793. Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1-14.

794. Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9(5), 244-252.
795. Wang, X. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant physiology*, 139(2), 566-573.
796. Wang, X., & Komatsu, S. (2018). Proteomic approaches to uncover the flooding and drought stress response mechanisms in soybean. *Journal of Proteomics*, 172, 201-215.
797. Wang, X., Cai, X., Xu, C., Wang, Q., & Dai, S. (2016). Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1706.
798. Wang, X., Li, Y., Wang, X., Li, X., & Dong, S. (2022). Physiology and metabonomics reveal differences in drought resistance among soybean varieties. *Botanical Studies*, 63(1), 8.
799. Wang, Y., Fan, K., Wang, J., Ding, Z. T., Wang, H., Bi, C. H., ... & Sun, H. W. (2017). Proteomic analysis of *Camellia sinensis* (L.) reveals a synergistic network in the response to drought stress and recovery. *Journal of plant physiology*, 219, 91-99.
800. Wang, Y., Li, T., John, S. J., Chen, M., Chang, J., Yang, G., & He, G. (2018). A CBL-interacting protein kinase TaCIPK27 confers drought tolerance and exogenous ABA sensitivity in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123, 103-113.
801. Wang, Y., Stevanato, P., Lv, C., Li, R., & Geng, G. (2019). Comparative physiological and proteomic analysis of two sugar beet genotypes with contrasting salt tolerance. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(21), 6056-6073.
802. Wang, Y., Tao, X., Tang, X. M., Xiao, L., Sun, J. L., Yan, X. F., ... & Ma, X. R. (2013). Comparative transcriptome analysis of tomato (*Solanum lycopersicum*) in response to exogenous abscisic acid. *BMC genomics*, 14, 1-14.
803. Wang, Z., & Dane, F. (2013). NAC (NAM/ATAF/CUC) transcription factors in different stresses and their signaling pathway. *Acta physiologiae plantarum*, 35, 1397-1408.

804. Wang, Z., Yu, Q., Shen, W., El Mohtar, C. A., Zhao, X., & Gmitter, F. G. (2018). Functional study of CHS gene family members in citrus revealed a novel CHS gene affecting the production of flavonoids. *BMC Plant Biology*, 18, 1-13.
805. Waters, E. R. (2013). The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *Journal of experimental botany*, 64(2), 391-403.
806. Wei, N., Zhang, Z., Yang, H., Hu, D., Wu, Y., Xue, J., ... & Xu, S. (2023). Characterization of the isocitrate dehydrogenase gene family and their response to drought stress in maize. *Plants*, 12(19), 3466.
807. Wei, W., Huang, J., Hao, Y. J., Zou, H. F., Wang, H. W., Zhao, J. Y., ... & Chen, S. Y. (2009). Soybean GmPHD-type transcription regulators improve stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *PLoS One*, 4(9), e7209.
808. Wei, Z., Ma, W., Qi, X., Zhu, X., Wang, Y., Xu, Z., ... & Li, G. (2016). Pinin facilitated proliferation and metastasis of colorectal cancer through activating EGFR/ERK signaling pathway. *Oncotarget*, 7(20), 29429.
809. Wery, J., Silim, S. N., Knights, E. J., Malhotra, R. S., & Cousin, R. (1994). Screening techniques and sources of tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. In *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes* (pp. 439-456). Springer, Dordrecht.
810. Whitley, D., Goldberg, S. P., & Jordan, W. D. (1999). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *Journal of vascular surgery*, 29(4), 748-751.
811. Widhalm, J. R., & Dudareva, N. (2015). A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. *Molecular plant*, 8(1), 83-97.
812. Wilkinson, S., Kudoyarova, G. R., Veselov, D. S., Arkhipova, T. N., & Davies, W. J. (2012). Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of experimental botany*, 63(9), 3499-3509.
813. Wise, M. J., & Tunnacliffe, A. (2004). POPP the question: what do LEA proteins do?. *Trends in plant science*, 9(1), 13-17.
814. Wong, C. K. E., Jarvis, R. S., Sherson, S. M., & Cobbett, C. S. (2009). Functional analysis of the heavy metal binding domains of the Zn/Cd-transporting ATPase, HMA2, in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 181(1), 79-88.

815. Wu, J., Zhang, J., Li, X., Xu, J., & Wang, L. (2016). Identification and characterization of a PutCu/Zn-SOD gene from *Puccinellia tenuiflora* (Turcz.) Scribn. et Merr. *Plant Growth Regulation*, 79, 55-64.
816. Wu, S., Hu, C., Tan, Q., Nie, Z., & Sun, X. (2014). Effects of molybdenum on water utilization, antioxidative defense system and osmotic-adjustment ability in winter wheat (*Triticum aestivum*) under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 365-374.
817. Wu, W., Jiang, C., Wei, Q., He, L., Jin, G., Zheng, Y., ... & Lv, J. (2024). Comparative transcriptome provides new insights into the molecular regulation of olive trees to chilling stress. *Tree Physiology*, 44(8), tpae075.
818. Wu, X., Qiao, Z., Liu, H., Acharya, B. R., Li, C., & Zhang, W. (2017). CML20, an Arabidopsis calmodulin-like protein, negatively regulates guard cell ABA signaling and drought stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 8, 824.
819. Wu, Y., Li, X., Zhang, J., Zhao, H., Tan, S., Xu, W., ... & Pi, E. (2022). ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in plant science*, 13, 1042084.
820. Wu, Z., Zhao, X., Sun, X., Tan, Q., Tang, Y., Nie, Z., & Hu, C. (2015). Xylem transport and gene expression play decisive roles in cadmium accumulation in shoots of two oilseed rape cultivars (*Brassica napus*). *Chemosphere*, 119, 1217-1223.
821. Wudick, M. M., Luu, D. T., & Maurel, C. (2009). A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist*, 184(2), 289-302.
822. Xiao, X. U., Bing-ru, H. U. A. N. G., & Ji-chen, X. U. (2010). Analysis of AsEXP1 gene related to drought tolerance in creeping bentgrass. *Journal of Beijing Forestry University*, 32(5), 126-131.
823. Xie, Z., Yang, L., Fan, M., Xuan, S., Jia, X., Zhang, Z., ... & Li, J. (2025). Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the chalcone synthase gene family in Chinese cabbage. *BMC genomics*, 26(1), 168.
824. Xin, L., Zheng, H., Yang, Z., Guo, J., Liu, T., Sun, L., ... & Guo, L. (2018). Physiological and proteomic analysis of maize seedling response to water deficiency stress. *Journal of plant physiology*, 228, 29-38.

825. Xing, M. Q., Zhang, Y. J., Zhou, S. R., Hu, W. Y., Wu, X. T., Ye, Y. J., ... & Xue, H. W. (2015). Global analysis reveals the crucial roles of DNA methylation during rice seed development. *Plant Physiology*, 168(4), 1417-1432.
826. Xiong, L. (2007). Absciscic acid in plant response and adaptation to drought and salt stress. *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*, 193-221.
827. Xiong, Y., Contento, A. L., & Bassham, D. C. (2005). AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 42(4), 535-546.
828. Xu, J., Du, N., Dong, T., Zhang, H., Xue, T., Zhao, F., ... & Xue, J. (2023). A novel *Pinellia ternata* catalase gene PtCAT2 regulates drought tolerance in *Arabidopsis* by modulating ROS balance. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1206798.
829. Yam, A. Y., Xia, Y., Lin, H. T. J., Burlingame, A., Gerstein, M., & Frydman, J. (2008). Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. *Nature structural & molecular biology*, 15(12), 1255-1262.
830. Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W. B., Michalowski, C. B., & Bohnert, H. J. (1995). A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *The Plant Cell*, 7(8), 1129-1142.
831. Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1993). The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG*, 238, 17-25.
832. Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., & Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant and Cell Physiology*, 33(3), 217-224.
833. Yamori, W., & Shikanai, T. (2016). Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annual review of plant biology*, 67(1), 81-106.

834. Yamori, W., Makino, A., & Shikanai, T. (2016). A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. *Scientific reports*, 6(1), 20147.
835. Yan, L. U., Gong, Y., Luo, Q., Dai, G. X., Teng, Z., He, Y., ... & Liu, X. (2021). Heterologous expression of fungal AcGDH alleviates ammonium toxicity and suppresses photorespiration, thereby improving drought tolerance in rice. *Plant Science*, 305, 110769.
836. Yang, J., Zhang, G., An, J., Li, Q., Chen, Y., Zhao, X., ... & Wang, W. (2020). Expansin gene TaEXPA2 positively regulates drought tolerance in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 298, 110596.
837. Yang, L., Tan, Z., Wang, D., Xue, L., Guan, M. X., Huang, T., & Li, R. (2014). Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific reports*, 4(1), 4089.
838. Yang, M., Geng, M., Shen, P., Chen, X., Li, Y., & Wen, X. (2019). Effect of post-silking drought stress on the expression profiles of genes involved in carbon and nitrogen metabolism during leaf senescence in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 304-309.
839. Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3), 50.
840. Yang, X., Sun, D., Dong, C., Tian, Y., Gao, Z., & Wang, L. (2016). Pinin associates with prognosis of hepatocellular carcinoma through promoting cell proliferation and suppressing glucose deprivation-induced apoptosis. *Oncotarget*, 7(26), 39694.
841. Yang, Y., He, M., Zhu, Z., Li, S., Xu, Y., Zhang, C., ... & Wang, Y. (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC plant biology*, 12, 1-17.
842. Yang, Z., Liu, J., Poree, F., Schaeufele, R., Helmke, H., Frackenpohl, J., ... & Grill, E. (2019). Absciscic acid receptors and coreceptors modulate plant water use efficiency and water productivity. *Plant Physiology*, 180(2), 1066-1080.

843. Yang, Z., Xiao, Y., Jiao, T., Zhang, Y., Chen, J., & Gao, Y. (2020). Effects of copper oxide nanoparticles on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings and the relevant physiological responses. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1260.
844. Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhao Feng, G., ... & Li-Jia, Q. (2006). The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant molecular biology*, 60, 107-124.
845. Yao, P., Zhang, C., Sun, C., Liu, Y., Liu, Z., Wei, J., ... & Bi, Z. (2024). The Absciscic Acid Receptor Gene StPYL8-like from *Solanum tuberosum* Confers Tolerance to Drought Stress in Transgenic Plants. *Antioxidants*, 13(9), 1088.
846. Ye, B. B., Shang, G. D., Pan, Y., Xu, Z. G., Zhou, C. M., Mao, Y. B., ... & Wang, J. W. (2020). AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration. *The Plant Cell*, 32(1), 226-241.
847. YILDIZ, M., Fadimana, K. A. Y. A., & TERZİ, H. (2020). Kuraklık Stresi ve Bitki Proteomiği. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(1), 286-297.
848. Yıldız, M., Kaya, F., & Terzi, H. (2020). Kuraklık Stresi ve Bitki Proteomiği. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 10(1), 286-297.
849. Yigit, N., Sevik, H., Cetin, M., & Kaya, N. (2016). Determination of the effect of drought stress on the seed germination in some plant species. *Water stress in plants*, 43-62.
850. Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., ... & Yan, N. (2009). Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nature structural & molecular biology*, 16(12), 1230-1236.
851. Yoo, J. H., Park, C. Y., Kim, J. C., Do Heo, W., Cheong, M. S., Park, H. C., ... & Cho, M. J. (2005). Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3697-3706.
852. Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian journal of plant physiology*, 17, 145-156.

853. Yu, L. H., Wu, S. J., Peng, Y. S., Liu, R. N., Chen, X., Zhao, P., ... & Xiang, C. B. (2016). Arabidopsis EDT 1/HDG 11 improves drought and salt tolerance in cotton and poplar and increases cotton yield in the field. *Plant biotechnology journal*, 14(1), 72-84.
854. Yu, T. F., Hou, Z. H., Wang, H. L., Chang, S. Y., Song, X. Y., Zheng, W. J., ... & Xu, Z. S. (2024). Soybean steroids improve crop abiotic stress tolerance and increase yield. *Plant Biotechnology Journal*, 22(8), 2333-2347.
855. Yu, Y., Yu, M., Zhang, S., Song, T., Zhang, M., Zhou, H., ... & Zhang, X. (2022). Transcriptomic identification of wheat AP2/ERF transcription factors and functional characterization of TaERF-6-3A in response to drought and salinity stresses. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 3272.
856. Yu, Z., Wang, X., & Zhang, L. (2018). Structural and functional dynamics of dehydrins: a plant protector protein under abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3420.
857. Yuan, D., Guo, Y., Pu, F., Yang, C., Xiao, X., Du, H., ... & Lu, S. (2024). Opportunities and challenges in enhancing the bioavailability and bioactivity of dietary flavonoids: A novel delivery system perspective. *Food Chemistry*, 430, 137115.
858. Yuan, Y., Sheng, C. L., Pang, L. H., & Lu, B. R. (2024). Bifunctional Phenylalanine/Tyrosine Ammonia-Lyase (PTAL) Enhances Lignin Biosynthesis: Implications in Carbon Fixation in Plants by Genetic Engineering. *Biology*, 13(9), 742.
859. Zafar-ul-Hye, M., Akbar, M. N., Iftikhar, Y., Abbas, M., Zahid, A., Fahad, S., ... & Danish, S. (2021). Rhizobacteria inoculation and caffeic acid alleviated drought stress in lentil plants. *Sustainability*, 13(17), 9603.
860. Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2017). Modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. *Frontiers in Plant Science*, 8, 953.
861. Zandkarimi, H., Ebadi, A., Salami, S. A., Alizade, H., & Baisakh, N. (2015). Analyzing the expression profile of AREB/ABF and DREB/CBF genes under drought and salinity stresses in grape (*Vitis vinifera* L.). *PloS one*, 10(7), e0134288.

862. Zeng, X., Bai, L., Wei, Z., Yuan, H., Wang, Y., Xu, Q., ... & Nyima, T. (2016). Transcriptome analysis revealed the drought-responsive genes in Tibetan hulless barley. *BMC genomics*, 17, 1-12.
863. Zhang, B., Su, L., Hu, B., & Li, L. (2018). Expression of AhDREB1, an AP2/ERF transcription factor gene from peanut, is affected by histone acetylation and increases abscisic acid sensitivity and tolerance to osmotic stress in *Arabidopsis*. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1441.
864. Zhang, F., Kong, C., Ma, Z., Chen, W., Li, Y., Lou, H., & Wu, J. (2023). Molecular characterization and transcriptional regulation analysis of the *Torreya grandis* squalene synthase gene involved in sitosterol biosynthesis and drought response. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1136643.
865. Zhang, H. N., Wang, Z. Q., Cui, G. J., & Lin, T. B. (2009). Difference in seedlings ammonium assimilation of wheat cultivars with different drought resistance under osmotic stress. *Ying Yong Sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology*, 20(10), 2406-2410.
866. Zhang, H., Zheng, J., Su, H., Xia, K., Jian, S., & Zhang, M. (2018). Molecular cloning and functional characterization of the dehydrin (IpDHN) gene from *Ipomoea pes-caprae*. *Frontiers in plant science*, 9, 1454.
867. Zhang, H., Zheng, J., Su, H., Xia, K., Jian, S., & Zhang, M. (2018). Molecular cloning and functional characterization of the dehydrin (IpDHN) gene from *Ipomoea pes-caprae*. *Frontiers in plant science*, 9, 1454.
868. Zhang, J., Li, B., Yang, Y., Hu, W., Chen, F., Xie, L., & Fan, L. (2016). Genome-Wide Characterization and Expression Profiles of the Superoxide Dismutase Gene Family in *Gossypium*. *International Journal of Genomics*, 2016(1), 8740901.
869. Zhang, L., Xie, J., Wang, L., Si, L., Zheng, S., Yang, Y., ... & Tian, S. (2020). Wheat TabZIP8, 9, 13 participate in ABA biosynthesis in NaCl-stressed roots regulated by TaCDPK9-1. *Plant physiology and biochemistry*, 151, 650-658.
870. Zhang, L., Xu, Y., Liu, X., Qin, M., Li, S., Jiang, T., ... & Ma, C. (2022). The chrysanthemum DEAD-box RNA helicase CmRH56 regulates rhizome

- outgrowth in response to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 73(16), 5671-5681.
871. Zhang, L., Zhang, L., Xia, C., Zhao, G., Liu, J., Jia, J., & Kong, X. (2015). A novel wheat bZIP transcription factor, TabZIP60, confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic Arabidopsis. *Physiologia plantarum*, 153(4), 538-554.
 872. Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., & Wang, X. (2004). Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(25), 9508-9513.
 873. Zhang, W., Yu, L., Zhang, Y., & Wang, X. (2005). Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1736(1), 1-9.
 874. Zhang, Y., Kwok, J. S. L., Choi, P. W., Liu, M., Yang, J., Singh, M., ... & Ng, S. W. (2016). Pinin interacts with C-terminal binding proteins for RNA alternative splicing and epithelial cell identity of human ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 7(10), 11397.
 875. Zhang, Y., Zhao, Y., Li, T., Ni, C., Han, L., Du, P., & Xiao, K. (2022). TaPYL4, an ABA receptor gene of wheat, positively regulates plant drought adaptation through modulating the osmotic stress-associated processes. *BMC Plant Biology*, 22(1), 423.
 876. Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., ... & Wang, X. (2009). Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(8), 2357-2377.
 877. Zhang, Z., Li, F., Li, D., Zhang, H., & Huang, R. (2010). Expression of ethylene response factor JERF1 in rice improves tolerance to drought. *Planta*, 232, 765-774.
 878. Zhang, Z., Luo, S., Liu, Z., Wan, Z., Gao, X., Qiao, Y., ... & Zhang, G. (2022). Genome-wide identification and expression analysis of the cucumber PYL gene family. *PeerJ*, 10, e12786.

879. Zhang, Z., Wang, M., Zhang, X., Wang, W., He, X., Wang, R., ... & Hu, Z. (2023). Genome-wide identification and expression analysis of the ZIP gene family in *Quercus dentata*. *Current Plant Biology*, 35, 100291.
880. Zhao, C., Xu, T., Liang, Y., Zhao, S., Ren, L., Wang, Q., & Dou, B. (2015). Functional analysis of β -amyrin synthase gene in ginsenoside biosynthesis by RNA interference. *Plant Cell Reports*, 34, 1307-1315.
881. Zhao, J., Huang, M., Liu, J., Cai, J., He, Y., Zhao, W., ... & Wu, Y. (2025). Pepper (*Capsicum annuum* L.) AP2/ERF transcription factor, CaERF2 enhances salt stress tolerance through ROS scavenging. *Theoretical and Applied Genetics*, 138(2), 44.
882. Zhao, L., Gong, X., Gao, J., Dong, H., Zhang, S., Tao, S., & Huang, X. (2019). Transcriptomic and evolutionary analyses of white pear (*Pyrus bretschneideri*) β -amylase genes reveals their importance for cold and drought stress responses. *Gene*, 689, 102-113.
883. Zhao, M. R., Li, F., Fang, Y., Gao, Q., & Wang, W. (2011). Expansin-regulated cell elongation is involved in the drought tolerance in wheat. *Protoplasma*, 248, 313-323.
884. Zhao, Q., Hu, R. S., Liu, D., Liu, X., Wang, J., Xiang, X. H., & Li, Y. Y. (2020). The AP2 transcription factor NtERF172 confers drought resistance by modifying NtCAT. *Plant Biotechnology Journal*, 18(12), 2444-2455.
885. Zhao, Y. J., Zhang, Y. Y., Bai, X. Y., Lin, R. Z., Shi, G. Q., Du, P. P., & Kai, X. I. A. O. (2022). TaNF-YB11, a gene of NF-Y transcription factor family in *Triticumaestivum*, confers drought tolerance on plants via modulating osmolyte accumulation and reactive oxygen species homeostasis. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(11), 3114-3130.
886. Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C., ... & Zhu, J. K. (2016). ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(7), 1949-1954.
887. Zhao, Y., Xing, L., Wang, X., Hou, Y. J., Gao, J., Wang, P., ... & Zhu, J. K. (2014). The ABA receptor PYL8 promotes lateral root growth by enhancing

- MYB77-dependent transcription of auxin-responsive genes. *Science signaling*, 7(328), ra53-ra53.
888. Zhou JiaXing, Z. J., Ma ChaoYing, M. C., Zhen ShouMin, Z. S., Cao Min, C. M., Zeller, F. J., Hsam, S. L. K., & Yan YueMing, Y. Y. (2016). Identification of drought stress related proteins from 1Sl (1B) chromosome substitution line of wheat variety Chinese Spring.
 889. Zhou, J., Qiao, J., Wang, J., Quan, R., Huang, R., & Qin, H. (2022). OsQHB improves salt tolerance by scavenging reactive oxygen species in rice. *Frontiers in Plant Science*, 13, 848891.
 890. Zhou, J., Wang, X., Jiao, Y., Qin, Y., Liu, X., He, K., ... & Deng, X. W. (2007). Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant molecular biology*, 63(5), 591-608.
 891. Zhou, J., Xie, J., Liao, H., & Wang, X. (2014). Overexpression of β -expansin gene GmEXPB2 improves phosphorus efficiency in soybean. *Physiologia plantarum*, 150(2), 194-204.
 892. Zhou, S., Han, Y. Y., Chen, Y., Kong, X., & Wang, W. (2015). The involvement of expansins in response to water stress during leaf development in wheat. *Journal of plant physiology*, 183, 64-74.
 893. Zhou, S., Li, M., Guan, Q., Liu, F., Zhang, S., Chen, W., ... & Ma, F. (2015). Physiological and proteome analysis suggest critical roles for the photosynthetic system for high water-use efficiency under drought stress in *Malus*. *Plant Science*, 236, 44-60.
 894. Zhou, Y., et al. (2020). Proteomic analysis of Olive (*Olea europaea*) fruit during ripening and pathogen infection. *Journal of Proteomics*, 211, 103531.
 895. Zhou, Y., Zhang, C., Lin, J., Yang, Y., Peng, Y., Tang, D., ... & Liu, X. (2015). Over-expression of a glutamate dehydrogenase gene, MgGDH, from *Magnaporthe grisea* confers tolerance to dehydration stress in transgenic rice. *Planta*, 241, 727-740.
 896. Zhu, C., Zhang, S., Zhou, C., Chen, L., Fu, H., Li, X., ... & Guo, Y. (2020). Genome-wide investigation and transcriptional analysis of cytosine-5 DNA

- methyltransferase and DNA demethylase gene families in tea plant (*Camellia sinensis*) under abiotic stress and withering processing. *PeerJ*, 8, e8432.
897. Zhu, C., Zhang, S., Zhou, C., Chen, L., Fu, H., Li, X., ... & Guo, Y. (2020). Genome-wide investigation and transcriptional analysis of cytosine-5 DNA methyltransferase and DNA demethylase gene families in tea plant (*Camellia sinensis*) under abiotic stress and withering processing. *PeerJ*, 8, e8432.
 898. Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.
 899. Zhu, M., Chen, G., Dong, T., Wang, L., Zhang, J., Zhao, Z., & Hu, Z. (2015). *SlDEAD31*, a putative DEAD-box RNA helicase gene, regulates salt and drought tolerance and stress-related genes in tomato. *PLoS One*, 10(8), e0133849.
 900. Zhu, S. Y., Yu, X. C., Wang, X. J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R. C., ... & Zhang, D. P. (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(10), 3019-3036.
 901. Zivy, M., & de Vienne, D. (2000). Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology*, 44(5), 575-580.
 902. Zomeno, S. E., Palazón, B. B. Castellano, M. M. ve Ferrando, A. (2014). Regulation of Translation as Response to Abiotic Stress, *Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress*, Taylor & Francis Group, Florida, 232-247.
 903. Zouari, M., Aydi, S., Ben Abdallah, F., Ben Ahmed, C., Zouari, N., & Ben Rouina, B. (2021). Study of some growth and biochemical parameters of the olive tree (*Olea europaea* L.) fertilized with sewage sludge.
 904. Zupin, M., Sedlar, A., Kidrič, M., & Meglič, V. (2017). Drought-induced expression of aquaporin genes in leaves of two common bean cultivars differing in tolerance to drought stress. *Journal of plant research*, 130, 735-745.
 905. Орлова, Н. Г., & Орлов, Ю. Л. (2022). ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОГРАММЫ БИОИНФОРМАТИКИ И ГЕНОМИКИ НА ОСНОВЕ ОНЛАЙН ИНСТРУМЕНТОВ.

EKLER

EK 1-Tablo 1 Transkriptom datasından elde edilen analiz sonuçlarına göre sentezi gerçekleştirilen ve literatürde kullanılan kuraklık stresi ile ilişkili primerler ve özellikleri.

No	Primer adı	Gen Tanımı	5' – 3' Dizi	Ürün boyutu (bp)
1	alcohol dehydrogenase F alcohol dehydrogenase R	alcohol dehydrogenase-like 3, transcript variant X2	GTGTGATGACAAATGATGGA GCTGAATCAAGCACTGTGTA	112
2	xyloglucan F xyloglucan R	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23	TTGACCCTACTGCAGATTTT GGTACACCAATTTTCTCCAA	118
3	leucine zipper ATHB-12 F leucine zipper ATHB-12 R	homeobox-leucine zipper protein ATHB-12-like, transcript variant X2	CAATTTGGAAACGAGAACAT TGCTAAAATCATTGCACAAG	106
4	galactinol synthase F galactinol synthase R	galactinol synthase 2-like	TGTGAGAAGACATGGAGTCA CCAGCATTGAAATAGAGAGG	119
5	glutathione F glutathione R	probable glutathione S-transferase parC	GTGACTCTTCTGGACCTTTG AAGTGGGCTCTTGTTACTCA	117
6	aquaporin PIP2-2 F aquaporin PIP2-2 R	aquaporin PIP2-2-like	GCTTGATGGAGCTTACAAAG TTGTACCCAATCACAGTCAA	106
7	glutamate receptor F glutamate receptor R	glutamate receptor 1.2-like	CAAGTTGCACAAGATGAGAC ATCTTCAGTGTCTCGTAGA	102
8	abscisic acid receptor PYL4 F abscisic acid receptor PYL4 R	abscisic acid receptor PYL4-like	ACGTTGTTGACATACCTCAA TGTCGGGATAAATTCTCAGC	115
9	phospholipase D alpha F phospholipase D alpha R	phospholipase D alpha 1-like, transcript variant X1	TTCAAAGGAGGACAATGGAG GGCAGAAGAATGTCAGGTAA	102
10	cell death protein F cell death protein R	programmed cell death protein 2-like	CGGCTTGATTATTCAAATTC CCAATCAAGAGAATCCACAT	114
11	acetyl-CoA carboxylase F acetyl-CoA carboxylase R	biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase 2, chloroplastic-like	AAAGTCATCACATCCTCCAG CATACTACCTGCCCTTTTTG	120
12	beta-amyrin F	beta-amyrin 28-oxidase-like	GCAAATGGAAATAGCAGCAT	108

	beta-amyrin R		ACCAGTCTCATTGTTTCACA	
13	squalene monooxygenase F squalene monooxygenase R	squalene monooxygenase-like	CTCAGATGTTTCAGGACGAA ATGTTACTGTCCCTTGTTC	107
14	zinc transporter variant X2 F zinc transporter variant X2 R	zinc transporter 5-like, transcript variant X2	AGAGTACCCACCATTCTGAT CATCTTGCAAATCCATCCAC	114
15	expansin F expansin R	expansin-B3-like	GAGTGCGATTTTAAGTGTGG CCACATCAGCAAACAACATT	103
16	endoglucanase F endoglucanase R	endoglucanase 6-like	GCAAAATCTCAGGTGGACTA GAGACGATTGAAGATGCTCT	116
17	ETHYLENE INSENSITIVE F ETHYLENE INSENSITIVE R	putative ETHYLENE INSENSITIVE 3-like 4 protein	CCTCCAAAGAAGAAGAACGA AGAAGCATAGAGAGTAGCCA	119
18	protein DETOXIFICATION F protein DETOXIFICATION R	protein DETOXIFICATION 33-like	TCCTAGTAATGGCTGTGGTA ATTAAGAGTGACTGCTGCTC	113
19	peroxidase 12 F peroxidase 12 R	peroxidase 12-like	CCGAATTTGACATTAAGGGC CGATATCAGCACAAGAGACA	100
20	DEAD-box RNA helicase F DEAD-box RNA helicase R	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7-like	TAGTACCAGTGTGAGGCATA GTGAAAATAATAGTGCGGCC	111
21	histone H1 F histone H1 R	histone H1-like	CGAAAGCGTAATCCTCCTTA CTGCTTCTCCTCAATGAACT	111
22	glutamate dehydrogenase F glutamate dehydrogenase R	glutamate dehydrogenase B, transcript variant X2	AGCTAATCATCCAACCGATC GACAGTAACACCACCTGAAT	100
23	germacrene D synthase F germacrene D synthase R	(-)-germacrene D synthase-like	TGATATATTGCCCCACGAAG GCATCGATGAGGTCTAGTTT	111
24	auxin response factor F auxin response factor R	auxin response factor 9-like	GATTTC AAGTCAGAGCATGC TGAATTGACTTGTTCTCGGT	107
25	ECERIFERUM F ECERIFERUM R	protein ECERIFERUM 1-like	GTCCTGTCTAAAAGCAATGC CGGTGGAAATTGTGAGAATG	117
26	DNA methyltransferase CMT2 DNA methyltransferase CMT2	DNA (cytosine-5)-methyltransferase CMT2-like	ACACATGATGTCGTTGTCAG AGAAATTGCATCCTGAAGAA	120

27	hydroxybenzoate F	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase, mitochondrial-like, transcript variant X1	GTCGTGGATCGATGTTTATT	120
	hydroxybenzoate R		GCCATCGTTATAGACCACAT	
28	kinesin NACK1 F	kinesin-like protein NACK1, transcript variant X1	TAAACTGTGGACCAATCCTC	115
	kinesin NACK1 R		AAGCTCAAACATTTCTTTTCG	
29	endochitinase F	basic endochitinase-like	AACATCATCAATGGTGGAAT	103
	endochitinase R		AGCCAACTCCAAGTAAGTCA	
30	zinc transporter 5 F	zinc transporter 5-like	ATAATGGCCCTCTTCTTCTC	108
	zinc transporter 5 R		TCCCTCAACAATAAGAGCAT	
31	copper-transporting HMA4 F	copper-transporting ATPase HMA4-like	CAGTCCCATTGAAAACAGAT	111
	copper-transporting HMA4 R		TCAACTCCACACATCAAGAA	
32	ethylene-responsive F	ethylene-responsive transcription factor 5-like	AATCCAGATTTTCTGCTTTGA	120
	ethylene-responsive R		TTGTTTTACAGGCTTCGTTT	
33	pinin-like F	pinin-like	GCAATTTTATAAGGACCAAG	119
	pinin-like R		AGCTTTCCATTCTTGAAACA	
34	aquaporin TIP1-1 F	aquaporin TIP1-1-like	CTTCTTCGTCAACCATTCTC	101
	aquaporin TIP1-1 R		AGCAGCAAAAATACAAAAGC	
35	peroxidase 40 F	peroxidase 40	TAAGTGCTAGCAAAACAGCA	108
	peroxidase 40 R		CCATATCTTCGAGTGAGAGC	
36	oxygen-evolving F	oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic-like	TTGCTTAAGATGGGGATATG	101
	oxygen-evolving R		ATTTTATGCAAAAACCTCCA	
37	autophagy-related F	autophagy-related protein 13a-like	ATTCCCTGCTACTTTGTCTG	115
	autophagy-related R		GATCCCATTTGTCCAGCTAT	
38	NAD(P)H dehydrogenase F	probable NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like 1	CTTTCTGACGAGATTCTTGC	103
	NAD(P)H dehydrogenase R		AACCAAATATGATTCCATCG	
39	peroxidase 12-like F	peroxidase 12-like	CTTGCTTCGACTCCATTTTC	120
	peroxidase 12-like R		GCCCTTAATGTCAAATTCGG	
40	peroxidase 40 F	peroxidase 40	CAGAGGCAGAACCTATCATC	115
	peroxidase 40 R		TCACATCCATTAACAAAGCA	
41	APX F	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic-like	GTTGCTGTTGAAGTTACTGG	114

	APX R		GTGGTCTGATCCCTTTGTAG	
42	GPX F	probable glutathione peroxidase 8	AGGATGCTAACGGAAACAAT	109
	GPX R		AGCTCGGTGTAATTTGAGTT	
43	peroxidase 7 F	peroxidase 7-like	GATCCAAGCATCAACCCTAA	116
	peroxidase 7 R		TTGTAGTATTGCACGTCGAA	
44	CAT F	catalase	GTGACAAGTGCATCATTGAG	117
	CAT R		CAGATAAAGCCTCAACCCAT	
45	SOD Fe F	superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like	CTTTAACAATGCTGCTCAGG	116
	SOD Fe R		AACCAAAGTCCCTGTTGATT	
46	OeAPXF	ascorbate peroxidase	CAAAAAGTGCGCCCTATAA	
	OeAPXR		ACAGCAACAACACCAGCAAG	
47	OeCATF	catalase	GGATCCAGCCAGACAAGAGA	
	OeCATR		TTGGCCTTACATTGAGACGA	
48	OeMnSODF	manganese superoxide dismutase	CTCCTGTTCGTGAAGGTGGT	
	OeMnSODR		GTGTCCAGACCAAGCCAAAT	
49	OeCu/ZnSODF	Copper/zinc superoxide dismutase	CCATGCTGGTGATCTTGGA	
	OeCu/ZnSODR		CAGTTCATGACCACCCCTTC	
50	FAD synthetase F	FAD synthetase 1, chloroplastic-like, transcript variant X1	TAGAAAGAGGTTGTGAGCAC	114
	FAD synthetase R		ATTCTGCATGGTACCACATT	
51	flavonol F	anthocyanidin 3-O-glucoside 2"-O-glucosyltransferase-like, transcript variant X3	AGTGAAAAGGAAGTAGGCAG	106
	flavonol R		GCCCTTCAGTTTCTCTACAA	
52	caffeic acid F	caffeic acid 3-O-methyltransferase 2	GCTTATGAACCAGGACAAGA	103
	caffeic acid R		TGCTGTCATTCCATATGCTT	
53	polyphenol oxidase F	polyphenol oxidase I, chloroplastic-like	CACTGTCAACATTGAAAGG	101
	polyphenol oxidase R		ACAGAGCAAGGTTCTTCATT	
54	glutathione gamma F	glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase 1-like, transcript variant X7	AAGAGACTGGCCTTTACAAG	106
	glutathione gamma R		GCAATGTGAGGCCAACTATC	
55	lactate dehydrogenase F	D-lactate dehydrogenase [cytochrome], mitochondrial-like, transcript variant X2	TTGTTCTAGCCAATGGAGAC	100
	lactate dehydrogenase R		GTCCCTTCACTTCCAATCAT	

56	DOWNY MILDEW F DOWNY MILDEW R	Protein DOWNY MILDEW RESISTANCE 6-like	GATTACCGGCACATACAGAT ACTGATAACCATTTGCCATC	100
57	ATP-dependent zinc F ATP-dependent zinc R	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 6, chloroplastic	GTAGCTGGAATTGATGAAGC CACTCCTTTTGGGAATTCTTG	105
58	chalcone synthase F chalcone synthase R	chalcone synthase J-like	GATATTGTGGTGGTGAAGT GCAGAAGACTAAATGGGTGA	105
59	copper chaperone F copper chaperone R	copper chaperone for superoxide dismutase, chloroplastic/cytosolic-like, transcript variant X2	GACGGAATTTATGGTGGATA ACTTGATTGCTCAAGTCCAC	111
60	aldehyde dehydrogenase F aldehyde dehydrogenase R	aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial	TTTGAGAAGGTTCTTCGGTA ACAGTGGGCTGAATAAAGAA	107
61	G-box F G-box R	G-box-binding factor 4-like, transcript variant X2	AATCGACACGTTTACAGACA ATCAGAAACATAGTGGGACG	102
62	glutamate receptor F glutamate receptor R	glutamate receptor 1.2-like	TCTACGAGGACACTGAAGAT TCATCTGTAGCCTTGAGAGT	115
63	acetyl-CoA carboxylase F acetyl-CoA carboxylase R	biotin carboxyl carrier protein of acetyl- CoA carboxylase 2, chloroplastic-like	GCTTCTCACATTCTTCAAC GAAGCACGATAAAATGTTCC	116
64	ethylene-responsive F ethylene-responsive R	ethylene-responsive transcription factor 5- like	ACGATTACTCGGAATTTGAA TTCCACTCCATTTTCTTCAC	106
65	oxygen-evolving F oxygen-evolving R	oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic-like	CAATGTCGTTGTTATGGTCA TTGTTTTCCCAGCAGATAGT	103
66	autophagy-related F autophagy-related R	autophagy-related protein 13a-like	ATCAAGTAGTTCTCCACGTG AGGAGGGTCGATATCATCAA	118
67	Flavonol F Flavonol R	anthocyanidin 3-O-glucoside 2"-O- glucosyltransferase-like, transcript variant X3	ATAAACATGTCATCCGCAGA ATGGCATCACTCTCACAAAT	109
68	caffeic acid F caffeic acid R	caffeic acid 3-O-methyltransferase 2	CTCGACCTTCTTGAAGTAT GAATCCTATCCAGCAGGATT	118
69	glutathione gamma F glutathione gamma R	glutathione gamma- glutamylcysteinyltransferase 1-like, transcript variant X7	GGAGGTGGTTTGATGAATCT CAATGAGCCAAACATACCAC	100
70	ECERIFERUM F	protein ECERIFERUM 1-like	GCCTTGGTCTACTGAATCAA	103

	ECERIFERUM R		AAACTGCTTCCATCTACCAG	
71	Peroxidase 10 F	putative peroxidase (POX) mRNA	AGACTCCACAACCTTCAACTC	117
	Peroxidase 10 R		GTTGGTACCAGCATTCTTTG	
72	Peroxidase 64 F	<i>Olea europaea</i> var. sylvestris peroxidase 64-like (LOC111399405)	AGCAGCTAGAGATTCTGTTG	108
	Peroxidase 64 R		GCTGGCAATTGTCTAGTTTC	
73	OePRX55 F	Peroxidase 55	GCTTCAGTTCTTATAGCTTCACCA	156
	OePRX55 R		GGTTAAACGTCTGCACATGATAC	
74	ferritin F	ferritin-1, chloroplastic-like	AACCTCCATGTATTTGTTGC	110
	ferritin R		TGAACTTCATCGAACATTGA	
75	inositol oxygenase F	inositol oxygenase 1-like	CAACGTTGTTGATGAGAGTG	111
	inositol oxygenase R		AAGTGTAGCCAATCTTCGTT	
76	auxin response factor F	auxin response factor 9-like	GATTTCAAGTCAGAGCATGC	107
	auxin response factor R		TGAATTGACTTGTTCTCGGT	
77	heat shock 17.3 kDa F	17.3 kDa class I heat shock protein-like	AGATGGATCAGATCAAAGCC	118
	heat shock 17.3 kDa R		TACAAACACTTTTCAGCCAGA	
78	heat shock 70 kDa F	heat shock 70 kDa protein	GGTTAAGGACAGCTTGTGAG	108
	heat shock 70 kDa R		TGATTGTGGCATAGAAATCA	
79	transcription factor MYB44 F	transcription factor MYB44-like	GATAGGATTAAGGGGCCATG	107
	transcription factor MYB44 R		CCAGGAATCGATCTGCTTAT	
80	GAPDH F	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CCTTCCGTGTGCCTACTGTT	92
	GAPDH R		GATGGCTGCCTTGATTTTCA	
81	PP2A1 F	serine/threonine-protein phosphatase 2A	TGCAGTGGCTACAGGACAAG	83
	PP2A1 R		TGGACCAAATTCTTCAGCAA	
82	ATPsyn F	ATP-synthase subunit	CACTGCTCAAATTGTTCTCCAATAG	91
	ATPsyn R		GGAGACTTTCGGAATTGAAGACTA	
83	SOS1 F	salt overly sensitive 1	GGATAAGCTAACAGCGGCTAAGA	90
	SOS1 R		CCAAGATCACCAAATGCCTCTA	
84	ProDH F	proline dehydrogenase	GGCCTATTCAGGGAGTGGTAAA	107
	ProDH R		CTACTGAGATGGCAAT	

85	JERF F	ethylene response factor	GGTGGAGTTTACTGAGCACCATT	109
	JERF R		TGTCTTCTACAGCACCAAAGCAT	
86	HMG F	high mobility group transcription factor	CAAGTCCAAAATCCGAAGTGAATG	87
	HMG R		CTCTCTACTCGTCGTCGTCATCT	
87	GRAS F	GRAS transcription factor	GGTCATGGTGGTTACTGAACAAG	108
	GRAS R		GACTCCAAACTGTCAAACAATGC	



ÖZGEÇMİŞ

BİHTER UÇAR



Istanbul, Turkey



<https://orcid.org/0000-0001-6947-0500>



EDUCATION

PhD in Biology (100/100)

Marmara University - Biology, 2019 - Present

- Identification of Drought Stress Tolerance Mechanism in *Olea europaea* L. by Comparative Transcriptome and Proteome Approaches

Masters in Biology (100/100)

Marmara University - Biology, 2017 – 2019

- Investigation of Heavy Metal Accumulation Genetic Diversity and Phylogenetic Relations of *Astropecten irregularis* (Pennant, 1777) Populations Obtained from the Sea of Marmara

BS in Biology (83.3/100)

Marmara University - Biology, 2012 – 2016

BS in Sociology (.../100)

Istanbul University - Sociology, 2023 - Present



WORK EXPERIENCES

1. TUBITAK Marmara Research Center - Genetic Engineering and Biotechnology Institute, Genome Research Center (GENAM), Project Assistant, (2019-Present).

- NGS applications; transcriptome (RNA-Seq), exome sequencing, metagenome, epigenetic studies (methyl-Seq, chip-Seq) with animal, plant, bacterial and viral organisms.
- Antioxidant enzyme studies
- Gene expression profiling (qRT-PCR)
- Vaccination studies in BSL3 (COVID-19)
- Organism and stress specific primer design
- Plant stress studies; epigenetic regulation of abiotic stress mechanism, comparative analysis of proteome and transcriptome variation in abiotic stress
- Genetic diversity and phylogenetic studies
- Proteomics studies (LCMS-MS)

2. TUBITAK Marmara Research Center - Genetic Engineering and Biotechnology Institute, Plant Molecular Biology and Genetics Laboratory, Project Assistant, (2019-Present).

- Characterization of national plant genetic resources,
 - Productivity and quality improvement in plants by molecular approaches,
 - Elucidation of molecular mechanisms related to biotic/abiotic stresses in plants,
 - Molecular marker assisted breeding programs in plants,
 - Transcriptomic and proteomic analyses under varying stress conditions on plants,
 - Plant tissue culture and genetic manipulation,
 - Epigenetic regulation of abiotic stress mechanism in plants.
3. **Marmara University, Faculty of Science and Letters, Department of Biology, Plant Molecular Biology and Biotechnology Laboratory, MSc - Student Lab Supervisor , (2017 – 2019).**
- Investigation of heavy metal accumulation of plant (*Borago officinalis*, *Tussilago farfara*, *Hygrophila difformis*, *Populus nigra*, *Perovskia abrotanoides*, *Mentha longifoliai*, *Myriophyllum spicatum*, *Anubias barteri* var. *Barteri*, *Alternanthera reineckii*, *Bacopa monnieri*, *Gossypium hirsutum*, *Trifolium* sp., *Isoetes* sp.) and animal (*Parapenaeus longirostris*, *Serranus hepatus*, *Astropecten irregularis*, *Aurelia aurita*, *Macropipus depurator*) populations.
 - Genetic diversity and phylogenetic relations studies.
 - Organism-specific primer design (RAPD, ISSR, ITS, *trnL-trnF*, 16S rRNA, 18srRNA, COI)
4. **Marmara University, Faculty of Science and Letters, Department of Biology, Entomology Laboratory, Research Assistant, (2013 – 2016).**
- *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) and *Pimpla turionellae* (L.) insect culture production.
 - Investigation of the effects of heavy metals (AlCl₃ and TiO₂) and some toxic substances (Azadirachtin) on insect immunology (hemocyte types and total and differential hemocyte numbers).
5. **Marmara University, Faculty of Science and Letters, Department of Biology, Animal Physiology Laboratory, Research Assistant, (2013 – 2016).**
- Investigation of the effects of heavy metals (AlCl₃ and TiO₂) and some toxic substances (Azadirachtin) on insect physiology (morphometric properties).



PROJECTS

1. Development of Drought Tolerant Parent Lines Using Advanced Molecular Approaches in Sunflower, Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policies (TAGEM). *TUBITAK Marmara Research Center – Researcher (2021 - 2025).*
2. 117H001, SAVH001, 1009 - Strategic R&D Projects Support Program, ARDEB, SAVTAG - Defense and Security Technologies Research Support Group, National Secret Project. *TUBITAK Marmara Research Center – Scholarship PhD Student (2021 - 2022).*

3. COVID-19 in Turkey: SARS-CoV-2 Genome Analysis and Mutation Screening, Detection of Genetic Variation in COVID-19 Patients, Correlation Analysis on Outcomes and Effect on Prognosis of the Disease, University of Health Sciences Scientific Research Project. *TUBITAK Marmara Research Center – Researcher (2020 - 2022).*
4. Development of Neutralizing Antibodies Against COVID-19, 2247-C Intern Researcher Scholarship Program (STAR), TÜBİTAK Directorate of Science Fellowships and Grant Programmes (BİDEB). *TUBITAK Marmara Research Center – Scholarship PhD Student (2020 - 2021).*
5. Epigenetic Regulation in Drought Stress Response in Olive Plant (*Olea europaea* L), 217O401, COST (European Cooperation in Science and Technology), ARDEB, TOVAG - Agriculture, Forestry and Veterinary Research Support Group. *TUBITAK Marmara Research Center – Scholarship PhD Student (2019 - 2021).*
6. Investigation of Heavy Metal Accumulations, Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships of Populations of Some Animal Organisms Taken from Different Regions of the Marmara Sea, Marmara Municipalities Union Graduate Thesis Support Program. *Marmara University - Researcher (2019 - 2019).*
7. The use of plant species *Artemisia dracunculus*, *Ephedra intermedia* and *Perovskia abrotanoides* to determine the extent of environmental pollution caused by the old uranium storage facility in Kacı Say Village., BAP Proje No: KTMU-BAP-2018.FBE.01 . *Kyrgyzstan Türkiye Manas University - Researcher (2018 - 2019).*
8. Changing Oceanographic Conditions in the Sea of Marmara Project ‘Marmara Environmental Monitoring’ (MAREM) - Researcher (2017).



SCHOLARSHIPS

1. 2250 - Performance-Based Scholarships Programme (2025/1), The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK), Postgraduate Degree Education Scholarship Programs, Event Supports and Educational Scholarships Directorate.
2. 2250 - Performance-Based Scholarships Programme (2024/2), The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK), Postgraduate Degree Education Scholarship Programs, Event Supports and Educational Scholarships Directorate.
3. 2250 - Performance-Based Scholarships Programme (2024/1), The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK), Postgraduate Degree Education Scholarship Programs, Event Supports and Educational Scholarships Directorate.
4. 2211-A National PhD Scholarship Program, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK), Directorate of Science Fellowships and Grant Programmes (BİDEB), Event Supports and Educational Scholarships Directorate, 03.2022 / 09.2025.
5. 1009 - Strategic R&D Projects Support Program, 117H001, SAVH001, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK), Research Support Programs (ARDEB), SAVTAG - Defense and Security Technologies Research Support Group, National Secret Project, 08.2021 / 07.2022.
6. 2250 - Performance-Based Scholarships Programme (2022/1), The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK), Postgraduate Degree Education Scholarship Programs, Event Supports and Educational Scholarships Directorate.

7. 2247-C Intern Researcher Scholarship Program (STAR), The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Directorate of Science Fellowships and Grant Programmes (BİDEB), Research Grants and Supports Directorate, 05.2020 / 04.2021.
8. European Cooperation in Science and Technology (COST), Epigenetic Regulation in Drought Stress Response in Olive Plant (*Olea europaea* L.), 217O401, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK), Research Support Programs (ARDEB), TOVAG - Agriculture, Forestry and Veterinary Research Support Group, 09. 2019 / 08.2021.

PUBLICATIONS

1. Uçar, B., Öztuğ, M., Tör, M., Çelik-Öztürk, N., Vardar, F., & Cevher-Keskin, B. (2025). Comparative Analysis of Protein Extraction Protocols for Olive Leaf Proteomics: Insights into Differential Protein Abundance and Isoelectric Point Distribution. *ACS Agricultural Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.4c00642>
2. Akçeşme, F. B., Kul Köprülü, T., Erkal Çam, B., İş, Ş., Cevher Keskin, B., Akçeşme, B., Baydili, K. N., Gezer, B., Balkan, J., Uçar, B., Gürsoy, O., Yıldız, M. T., Kurt, H., Ünal, N., Korkmaz, C., Bayraktar Saral, Ö., Demirkol, B., Çağ, Y., Abakay, H., Köse, Ş., Türkez, H., Çadırcı, K., Altındış, M., Gülseren, Y. D., Aslan, N., Özel, A., Karagöl, M. A., Mutluay, N., Tekin, Ş. (2024). Genomic Surveillance and Molecular Characterization of SARS-CoV-2 Variants During the Peak of the Pandemic in Türkiye. *Biochemical Genetics*. (Science Citation Index Expanded) <https://doi.org/10.1007/s10528-024-10962-8>
3. Yazicioglu, H., Hocaoglu-Ozyigit, A., Ucar, B., Yolcu, S., Yalcin, I. E., Suner, S., & Ozyigit, I. I. (2024). Physiological alterations and genotoxic damage under combined aluminum and cadmium treatments in Bryophyllum daigremontianum clones. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 1-21.
4. Akçeşme, F. B., Kul Köprülü, T., Erkal, B., İş, Ş., Cevher Keskin, B., Akçeşme, B., ... & Tekin, Ş. (2022). Tracking the circulating SARS-CoV-2 variants in Turkey: complete genome sequencing and molecular characterization of 1000 SARS-CoV-2 samples. *BioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.19.488722>
5. Dogan, I., Ozyigit, I. I., Kidiraliyeva, B., Cekirov, K., Kurmanbekova, G., Ucar, B., ... & Solak, A. O. (2021). Assessment of pollution at the former uranium waste dumpsite near kaji-Say Village/Kyrgyzstan: a genetic and physiological investigation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 14(1), 280-294. (Science Citation Index Expanded - Q3) <https://doi.org/10.1080/16878507.2021.1957397>
6. Ozyigit, I. I., Arda, L., Yalcin, B., Yalcin, I. E., Ucar, B., & Hocaoglu-Ozyigit, A. (2021). *Lemna minor*, a hyperaccumulator shows elevated levels of Cd accumulation and genomic template stability in binary application of Cd and Ni: a physiological and genetic approach. *International Journal of Phytoremediation*, 1-15. (Science Citation Index Expanded - Q2) <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1892586>
7. Hocaoglu-Ozyigit, A., Ucar, B., Altay, V., & Ozyigit, I. I. (2020). Genetic diversity and phylogenetic analyses of Turkish cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) lines using ISSR markers and chloroplast trnL-F regions. *Journal of Natural Fibers*, 1-14. (Science Citation Index Expanded - Q1) <https://doi.org/10.1080/15440478.2020.1788493>



BOOK CHAPTER

1. Changing Oceanographic Conditions in the Sea of Marmara Project 2017 Study Data, January 2018, Publisher: Union of Turkish Bar Associations, Editor: M. Levent Artüz, ISBN: 978-605-9446-69-3.



NATIONAL CONGRESSES

- E. Yılmaz, Z.U. Nurulloğlu, B. Uçar, Effects of Aluminum Chloride on Postpupal Development of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), 21st National Biology Student Congress, Trabzon, September 1-5, 2014 (Poster Presentation).



INTERNATIONAL CONGRESSES

- **B. Uçar**, B. Cevher-Keskin, M. Oztug Kılinc, Comparative proteomic analyses revealed the response mechanism of drought-tolerant and susceptible olive cultivars (*Olea europaea* L.) under drought stress and recovery. 1st International Congress on Biotech Solutions for Sustainability, Gebze, Kocaeli, Turkey, 07-10 May 2024 (Oral Presentation).
- B. Cevher-Keskin, A. H. Sekmen-Çetinel, A. N. Cil, A. Gokce, **B. Uçar**, Z. Akba, U. Bağcı, N. Celik-Ozturk, A. Cil, T. Ograj, M.C. AIdentification of Phenotypic, Biochemical and Transcriptomic Responses of Sunflower Seedlings (*Helianthus annuus* L.) to Drought Stress for the Development of Tolerant Parental Lines (Poster Presentation)..
- **B. Uçar**, A. H. Sekmen-Çetinel, N. Uluçay, K. Şanlı, E. Erdik, A. Gökçe, Ü. Kaya, B. Cevher-Keskin, Gene Expression Patterns and Activities of Antioxidant Enzymes in Olive Leaves in Response to Drought Stress and Recovery, IV. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 29-31 August 2022, (Oral Presentation).
- **B. Uçar**, A. Hocaoglu-Özyiğit, İ. Özyiğit ve İ. Doğan, Investigation on Genetic Diversity and Phylogenetic Relations of *Astropecten irregularis* (Pennant, 1777) Populations Obtained from The Sea Of Marmara, II International Biology Congress, Kyrgyzstan, Bishkek, 18 - 20 May 2022, (Oral Presentation).
- H. Yazicioglu, **B. Uçar**, A. Hocaoglu-Özyiğit, İ. Özyiğit ve İ. Doğan, Screening of Genotoxic Damage in Clones of *Bryophyllum daigremontianum* (Raym.-Hamet & H. Perrier) A. Berger Following Binary Application of Aluminum and Cadmium, II International Biology Congress, Kyrgyzstan, Bishkek, 18 - 20 May 2022, (Oral Presentation).
- **B. Uçar**, A. H. Sekmen Cetinel, K. Şanlı, N. Uluçay, E. Erdik, A. Gökçe, Ü. Kaya & B. Cevher-Keskin, Proteomic and Transcriptomic Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) in The Response to Drought Stress and Recovery, III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 1-3 September 2021 (Poster Presentation).
- Hocaoglu Ozyigit, **B. Ucar**, V. Altay, I. I. Ozyigit, M. E. Uras, Genetic diversity and phylogenetic analysis in Turkish cotton (*Gossypium hirsutum* L.) varieties revealed by ISSR markers and trnL-trnF intergenic spacer sequences, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara, Turkey, March 19-20, 2020, (Oral Presentation).
- **B. Ucar**, I. I. Ozyigit, I. E. Yalcin, A. Hocaoglu Ozyigit, C. Tetik, G. Lokumcu, Investigation of Heavy Metal Concentrations in Starfish (*Astropecten spinulosus*) populations and their habitats from the Sea of Marmara, International Marmara Science and Social Sciences Congress, Kocaeli, Turkey, April 26-28, 2019, (Oral Presentation).
- G. Lokumcu, I. I. Ozyigit, Z. Severoglu, C. Tetik, N.K. Karahan, **B. Ucar**, B. Yalcin, Investigation of Mineral Nutrient and Heavy Metal Levels of *Borago officinalis* L. Populations Collected from Different Habitats of Istanbul, International Marmara Science and Social Sciences Congress, Kocaeli, Turkey, April 26-28, 2019, (Poster Presentation).
- Tetik, I. I. Ozyigit, Z. Severoglu, G. Lokumcu, N.K. Karahan, **B. Ucar**, B. Yalcin, Investigation of Mineral Nutrient and Heavy Metal Accumulation Status of Coltsfoot (*Tussilago farfara* L.) Populations Collected From Different Habitats of Istanbul, International Marmara Science and Social Sciences Congress, Kocaeli, Turkey, April 26-28, 2019, (Poster Presentation).
- Sehirli, I. I. Ozyigit, Z. Severoglu, **B. Ucar**, I. E. Yalcin, The Effects of some Heavy Metals (Cd, Ni, Pb and Zn) on Mineral Nutrient Status of *Hygrophila difformis* Blume in an

- Artificially polluted tank, International Marmara Science and Social Sciences Congress, Kocaeli, Turkey, April 26-28, 2019, (Poster Presentation).
- T. Abdikaimova, I. Dogan, K. Cekirov, I. I. Ozyigit, **B. Ucar**, A. Hocaoglu Ozyigit, Z. Severoglu, I. E. Yalcin, Heavy Metal and Mineral Nutrient Statues of Populus nigra used for the Evaluation of Environmental Pollution in Bishkek-Kyrgyzstan, II. International Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress, Baku, Azerbaijan, September 11-15, 2018, (Oral Presentation).
 - B. Kidiraliyeva, I. Dogan, I. I. Ozyigit, K. Cekirov, **B. Ucar**, N. Saykiewa, A. O. Solak, G. Kurmanbekova, Assessment of Radiation Induced Genotoxic Damage in Perovskia abrotanoides Kar. Grown in the Area of Former Mine Tailings Located near Kaji-Sai Village in Kyrgyzstan using ISSR-PCR Analysis, II. International Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress, Baku, Azerbaijan, September 11-15, 2018, (Oral Presentation).
 - M. N. Bozkurt, B. Cekic, S. Ayhan, **B. Ucar**, I. E. Yalcin, M. Keskin, M. E. Uras, I. I. Ozyigit, Investigation of Phylogenetic Relationship in Some Trifolium Species from Istanbul/Turkey by Using cpDNA Regions, International Symposium Ecology, Kastamonu, Turkey, June 19-23, 2018 (Oral Presentation).
 - Altin, N. I. Oktar, H. Metin, **B. Ucar**, I. E. Yalcin, M. E. Uras, I. I. Ozyigit, Molecular Fingerprinting of Some Isoetes members using ITS and trnL-trnF sequences; a case study from Istanbul/Turkey, International Symposium Ecology, Kastamonu, Turkey, June 19-23, 2018 (Oral Presentation).
 - T. Abdikaimova, I. Dogan, K. Cekirov, I. I. Ozyigit, Z. Severoglu, **B. Ucar**, F. Tabanli, N. K. Karahan, B. Yalcin, Evaluation of the Heavy Metal Pollution in Bishkek-Kyrgyzstan Using Mentha longifolia As Biomonitor Organism, International Symposium Ecology, Kastamonu, Turkey, June 19-23, 2018 (Oral Presentation).
 - Z.U. Nurullahoglu, G.G. Durular, **B. Ucar**, Morphological Abnormalities in Galleria mellonella Force-fed with Aluminium Chloride, International Symposium Ecology, Kastamonu, Turkey, June 19-23, 2018 (Poster Presentation).
 - Z.U. Nurullahoglu, **B. Ucar**, G.G. Durular, M. Şahin, Effects of Aluminium Chloride on Development Time and Adult Longevity of Galleria mellonella. International Scientific Researchers Congress, Mardin, Turkey, May 09-13, 2018 (Poster Presentation).
 - Z.U. Nurullahoglu, G.G. Durular, **B. Ucar**, Effects of Aluminium Chloride on Weight of Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae), International Scientific Researchers Congress, Mardin, Turkey, May 09-13, 2018 (Poster Presentation).
 - Z.U. Nurullahoglu, G.G. Durular, **B. Ucar**, Changes in Haemocyte Counts in Force-fed Galleria mellonella Larvae with Azadirachtin, VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems, Canakkale, October 4-7, 2017 (Poster Presentation).
 - Hocaoglu, I. I. Ozyigit, B. Yalcin, E. G. Atasoy, **B. Ucar**, G. Lokumcu, T. Durmus, Determination of Mineral Nutrient and Heavy Metal Accumulations in Parapenaeus longirostris Samples Collected from The Sea of Marmara (Turkey) in 2016 Summer Period, The Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress, Kyrgyzstan, Bishkek, September 20-23, 2017, (Oral Presentation).
 - G. Atasoy, I. I. Ozyigit, B. Yalcin, A. Hocaoglu, **B. Ucar**, E. Balci, T. Durmus, Heavy Metal and Mineral Nutrient Status of Some Serranus hepatus Tissues (Muscle, Gill and Liver) from The Sea of Marmara in 2016 Summer Period, The Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress, Kyrgyzstan, Bishkek, September 20-23, 2017, (Oral Presentation).
 - Tabanli, I. I. Ozyigit, **B. Ucar**, E. Balci, M. E. Uras, The Effects of Some Heavy Metals Mixture (Cd, Cu, Ni and Pb) on Physiology and Genotoxicity of Aquatic Plant Myriophyllum spicatum L., The Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress, Kyrgyzstan, Bishkek, September 20-23, 2017, (Oral Presentation).
 - Yilmaz, I. I. Ozyigit, G. M. Aygun, O. Yildirimer, **B. Ucar**, E. Balci, F. Tabanli, The Effects of Cadmium on Mineral Nutrient Uptake and Accumulation of Aquatic Plant Alternanthera reineckii Griseb., The Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress, Kyrgyzstan, Bishkek, September 20-23, 2017, (Oral Presentation).
 - F. Tabanli, I. I. Ozyigit, M. E. Uras, E. Balci, **B. Ucar**, A. N Atalay, Screening of Damage

Induced by some Heavy Metals (Cd, Cu, Ni and Pb) in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell: A Genetic and Physiological Approach, Ecology 2017, International Symposium, Kayseri, Turkey, May 11-13, 2017, (Oral Presentation).

- I. Ozyigit, F. Tabanlı, **B. Ucar**, E. Balci, Screening of Genotoxic Damage in Cadmium Induced *Alternanthera reineckii* Griseb. by using RAPD Markers, Ecology 2017, International Symposium, Kayseri, Turkey, May 11-13, 2017, (Poster Presentation).

RESEARCH AREAS

- NGS applications; transcriptome (RNA-Seq), exome sequencing, metagenome, epigenetic studies (methyl-Seq, chip-Seq) with animal, plant, bacterial and viral organisms.
- Antioxidant enzyme studies
- Gene expression profiling (qRT-PCR)
- Vaccination studies in BSL3 (COVID-19)
- Organism and stress specific primer design
- Plant stress studies; epigenetic regulation of abiotic stress mechanism, comparative analysis of proteome and transcriptome variation in abiotic stress
- Genetic diversity and phylogenetic studies
- Proteomics studies (LCMS-MS)
- Marine biology

VOLUNTARY WORK

- **DEKAMER** (Sea Turtle Rescue Centre) Jun - Jul 2024

CERTIFICATES

- Applied LC-MS/MS Course, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Environment and Cleaner Production Institute. April, 2022.
- Micropollutant Analysis (GC-MSMS) Course, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Environment and Cleaner Production Institute. April, 2022.
- Pre-Processing Training of Seawater, Sediment and Biota Samples Before

analysis, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Environment and Cleaner Production Institute. April, 2022.

- Ion chromatography Device Basic User Training, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Climate Change and Sustainability Institute. March, 2022.
- Monoclonal Antibody Production Training with Hybridoma Technology, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Genetic Engineering and Biotechnology Institute. March, 2022.
- Chlorophyll-A Analysis Education, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Environment and Cleaner Production Institute. April, 2021.
- Caffeine Analysis in Food Training (HPLC), The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Food Institute. April, 2021.
- Mycotoxin Analysis Training in Foods (HPLC), The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Food Institute. April, 2021.
- Ecological Quality (Macroalgae, Plankton, Zoobenthos) Evaluation Method Training, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Environment and Cleaner Production Institute. April, 2021.
- Toxicity Analysis Training, The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) Environment and Cleaner Production Institute. March, 2021.

REFERENCES

- Prof. Dr. Filiz VARDAR - Marmara University
- Assoc. Dr. Birsen CEVHER KESKİN - TUBİTAK Marmara Research Center

