



**Türkiye Endemiği *Thermopsis turcica*'da
Farklı Gelişim Evrelerindeki Çiçeklerin
Karşılaştırmalı Proteomik Analizleri**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emre PEHLİVAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
Aralık, 2016

Bu tez çalışması **15.FEN.BİL.20** numaralı proje ile **Afyon Kocatepe Üniversitesi** tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYE ENDEMİĞİ *THERMOPSIS TURCICA*'DA FARKLI GELİŞİM
EVRELERİNDEKİ ÇİÇEKLERİN KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK ANALİZLERİ**

Emre PEHLİVAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
Aralık, 2016

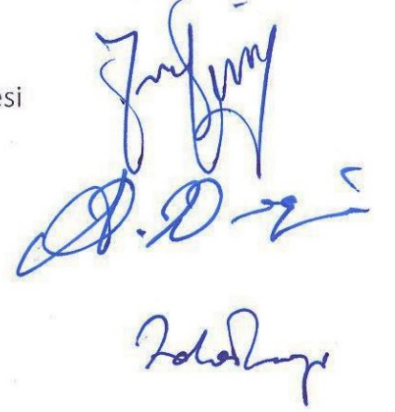
TEZ ONAY SAYFASI

Emre PEHLİVAN tarafından hazırlanan “Türkiye Endemiği *Thermopsis turcica*'da Farklı Gelişim Evrelerindeki Çiçeklerin Karşılaştırmalı Proteomik Analizleri” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 16/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

- Başkan** : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
- Üye** : Yrd. Doç. Dr. Ali DOĞRU
Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
- Üye** : Yrd. Doç. Dr. Hakan TERZİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sultandağı MYO

İmza



Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Hüseyin ENGİNAR
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

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

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

beyan ederim.

16.12.2016

Emre PEHLİVAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE ENDEMIĞI *THERMOPSIS TURCICA*'DA FARKLI GELİŞİM EVRELERİNDEKİ ÇİÇEKLERİN KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK ANALİZLERİ

Emre PEHLİVAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Çiçek gelişimi birçok çevresel uyarıcı ve içsel sinyal tarafından kontrol edilen karmaşık bir fizyolojik olaydır. Şimdiye kadar birkaç moleküler çalışma çiçek gelişimi ile ilgili fizyolojik süreçler hakkında önemli bilgiler sağlamış olmasına karşın çiçek gelişimi sırasında meydana gelen proteom değişimleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada tek bir çiçekte 3-4 serbest karpele sahip sıra dışı legüm türü ve Türkiye endemiği *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüköyük bitkilerinde çiçek gelişimi sırasında gerçekleşen proteom değişimleri araştırılmıştır. Çiçek tomurcukları ve tamamen açmış çiçeklerinden protein ekstraksiyonu yapılmış ve iki-yönlü jel elektroforezi (2-DE) ile bu proteinler ayrıştırılmıştır. Görüntü analizleri çiçek gelişimi sırasında 66 protein benliğinin farklı şekilde ifade olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu proteinlerden 32'si MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser-desorption ionization-time of flight/time of flight) kütle spektrometrisi (MS) ve veri tabanı taraması ile başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Çiçek gelişimi sırasında farklı şekilde ifade olan bu proteinlerin transkripsiyon ve protein metabolizması, enerji ve karbonhidrat metabolizması, bitki savunma sistemi, fotosentez, hücre çeperi, sekonder metabolizma ve amino asit metabolizmasında fonksiyon gördüğü belirlenmiştir. Bununla birlikte, tanımlanan birçok proteinin ifade seviyesinin tamamen açmış çiçeklerde azalan yönde düzenlendiği

bulunmuştur. Protein metabolizması, şeker metabolizması ve stres savunması ile ilişkili birçok proteinin çiçek gelişimi sırasında düzenlenmesi bu proteinlerin gelişimsel regülasyondaki muhtemel rollerini göstermektedir. Bu sonuçlar, çiçek gelişimi sırasında meydana gelen proteom değişimleri hakkında yeni bilgiler sağlamıştır.

2016, xi + 48 sayfa

Anahtar kelimeler: *Thermopsis turcica*, Çiçek gelişimi, Endemik, Proteomik, MALDI-TOF/TOF MS



ABSTRACT

M.Sc Thesis

COMPARATIVE PROTEOMICS ANALYSES OF FLOWERS AT DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES IN *THERMOPSIS TURCICA*, ENDEMIC TO TURKEY

Emre PEHLİVAN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Flower development is a complex physiological phenomenon which is affected by many environmental stimuli and endogenous signals. To date, several molecular approaches have provided a comprehensive view of the physiological processes associated to flower development, but little is known about proteome changes. Therefore, we investigated the proteome alterations during flower development in endemic *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüködük, an unusual legume species with 3-4 free carpels in a single flower. Proteins were extracted from the flower buds and fully opened flowers, and separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Image analysis revealed that 66 protein spots were differentially expressed throughout flower development. Among them, 32 protein spots were successfully identified using MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser-desorption ionization-time of flight/time of flight) mass spectrometry (MS) and database search. Functional annotation of these flower proteins revealed their involvement in transcription and protein metabolism, energy and carbohydrate metabolism, plant defense, photosynthesis, cell wall, secondary metabolism, and amino acid metabolism. Moreover, most of these proteins were down-regulated at the latter stage of flower development. Regulation of many proteins related to protein metabolism, sugar

metabolism and stress defense suggest their possible roles in a developmental manner. These results have given new insights to the proteome alterations during flower development.

2016, xi + 48 pages

Keywords: *Thermopsis turcica*, Flower development, Endemic, Proteomics, MALDI-TOF/TOF MS



TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu önemli katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalar ve tez yazımı süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan TERZİ'ye, laboratuvar çalışmaları sırasında yapmış olduğu yardımlardan dolayı Sayın Nermin AKÇALI ve Ayşen YILDIRIM'a, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince hem maddi hem de manevi desteklerinden dolayı aileme de teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması 15.FEN.BİL.20 numaralı ve "Türkiye Endemiği *Thermopsis turcica*'da Farklı Gelişim Evrelerindeki Çiçeklerin Karşılaştırmalı Proteomik Analizleri" başlıklı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir

Emre PEHLİVAN

AFYONKARAHİSAR, 2016

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 <i>Thermopsis turcica</i> 'nın Sistematığı	3
2.2 Bitki Gelişiminin Proteomik Analizleri	4
2.2.1 Hücresele Seviyede Gelişimsel Süreçler	7
2.2.2 Organ Seviyesinde Gelişimsel Süreçler	10
2.2.2.1 Vejetatif Organların Proteomik Analizleri	11
2.2.2.2 Çiçek ve Çiçek Organlarının Proteomik Analizleri.....	13
3. MATERYAL ve METOT	18
3.1 Bitki Örneklerinin Toplanması	18
3.2 Proteomik Analizler	19
3.2.1 Protein Ekstraksiyonu	19
3.2.2 İki Yönlü Jel Elektrofözezi	20
3.2.3 Görüntü Analizleri.....	21
3.2.4 Jelde Triptik Kesim	21
3.2.5 Kütle Spektrometrisi Analizleri	22

4. BULGULAR.....	23
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	29
KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	48



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Da	Dalton
dH ₂ O	Distile su
HCl	Hidroklorik asit
m	Metre
mA	Miliamper
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
M	Molar
cm	Santimetre
V	Volt

Kisaltmalar

2-DE	İki boyutlu elektroforez
ADF2	Aktin depolimerizasyon faktörü
ADH	Alkol dehidrogenaz
APX	Askorbat peroksidaz
BSA	Bovine Serum Albumin
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
DIGE	Differential In-Gel Electrophoresis
GST	Glutasyon transferaz
GPX	Glutasyon peroksidaz
HSP	Sıcaklık şoku proteini
IEF	İzoelektrik fokuslama
IPG	İmmobilize pH gradiyenti
MDH	Malat dehidrogenaz

MnSOD	Mangan süperoksit dismutaz
MDAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
MS	Kütle spektrometrisi
PAJE	Poliakrilamid jel elektroforez
PR-10	Patojenez ile ilişkili protein 10
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TFA	Trifloroasetik asit



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 <i>Thermopsis turcica</i> 'nın taksonomisi	3
Çizelge 2.2 Farklı bitki türlerinde çiçek biyolojisi üzerine yapılan proteomik çalışmalar .	6
Çizelge 4.1 <i>Thermopsis turcia</i> 'nın çiçek tomurcuğu ve tamamen açmış çiçeklerinde farklı şekilde ifade olan ve tanımlanan proteinler	25



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 <i>Thermopsis turcica</i> 'nın çiçek durumu (A) ve 4 karpelli meyvesi (B).	4
Şekil 2.2 Nohutta çiçek gelişimi sırasında gen ifadesi profili.....	5
Şekil 2.3 Bitki gelişiminin farklı evrelerinde fonksiyon gören bazı önemli proteinler.....	8
Şekil 3.1 <i>T. turcica</i> örnekleme alanı.	18
Şekil 3.2 <i>T. turcica</i> 'nın çiçek durumu, çiçek tomurcuğu ve tamamen açmış çiçeği.....	19
Şekil 4.1 <i>Thermopsis turcica</i> 'nın çiçek tomurcuğu ve tamamen açmış çiçeklerinden ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri.	24

1. GİRİŞ

Bitki gelişimi karmaşık moleküler ağları etkileyen birçok çevresel uyarıcı ve içsel sinyallerin birbiriyle etkileşimi tarafından kontrol edilmektedir. Transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi kantitatif biyolojik yaklaşımlar bitki gelişiminde fonksiyonu olan molekülün araştırılmasına imkan tanımaktadır (Hochholdinger *et al.* 2006).

Genlerdeki bilgilerin fenotipe nasıl yansıdığını anlayabilmek için çiçek gelişimi birçok açıdan çalışılmıştır. *Arabidopsis thaliana* ve diğer angiosperm türlerinde gerçekleştirilen çalışmalar çiçek gelişiminin genetik kontrolü ile ilgili önemli bilgiler sağlamıştır (Ó'Maoiléidigh *et al.* 2014). *Arabidopsis*'te yapılan kapsamlı genetik analizler çiçek gelişiminde fonksiyon gören düzenleyici genlerin çoğunun transkripsiyon faktörleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. *Arabidopsis* ve *Antirrhinum majus* bitkilerinin homeotik mutantlarında yapılan çalışmalar çiçek gelişimi ile ilgili ABCDE modelinin geliştirilmesini sağlamıştır (Theissen and Melzer 2007, Garay-Arroyo *et al.* 2012). Bu modele göre, MADS-kutulu genlerin beş sınıfı birbirleriyle etkileşerek çiçek organlarının gelişimini belirlemektedir (Komeda 2004, Theissen and Melzer 2007).

mRNA ifadesi ve protein bolluğu arasındaki ilişki zayıf olduğundan dolayı, genomun ifade olan bölgelerinin fonksiyonel analizleri için proteomik çalışmalar önemli bir seçenek sağlamaktadır (Komatsu and Hossain 2013). Proteomik, karmaşık gelişimsel süreçler sırasında tek bir hücre içerisinde gerçekleşen protein değişimlerinin çalışılması için fırsat sağlamaktadır (Cánovas *et al.* 2004). Şimdiye kadar birkaç proteomik çalışma bitki gelişiminde fonksiyon gören proteinlerin teşhis edilmesi için kullanılmıştır (Nautrup-Pedersen *et al.* 2010, Palma *et al.* 2011, Deng *et al.* 2015). Bununla birlikte, literatürde çiçek gelişimi ile ilgili sadece birkaç proteomik çalışma bulunmaktadır (Dafny-Yelin *et al.* 2005, Ahsan and Komatsu 2009, Zhang *et al.* 2013). Gül bitkisinin petal gelişiminin proteomik analizleri, çiçek gelişimi sırasında enerji, hücresel savunma ve metabolizma ile ilgili proteinlerin farklı şekilde düzenlendiğini göstermiştir (Dafny-Yelin *et al.* 2005). Ahsan ve Komatsu (2009), soya fasulyesinde enerji metabolizması,

protein metabolizması, sekonder metabolizma ve sinyal iletim yolları ile ilgili farklı şekilde ifade olan proteinlerin çiçek gelişimi sırasındaki protein ağı için iyi bir örnek sağladığını bildirmiştir. Zhang vd. (2013), *Agapanthus praecox* bitkisinin çiçek oluşumu sırasında metabolizma, sinyal iletimi, protein metabolizması, hücresel transport ve biyogenez ile ilgili proteinlerin ifade seviyesindeki farklılıkları ortaya koymuşlardır.

Baklagiller (Fabaceae) familyasına ait *Thermopsis* cinsi Asya ve Kuzey Amerika'nın dağlık bölgelerinde çok yaygın olan yaklaşık 25 türe sahiptir (Wojciechowski 2003). *Thermopsis* cinsinin Türkiye'deki tek temsilcisi "Eber Sarısı, Piyam, Acı Piyam veya Sarı Meyan" olarak adlandırılan ve endemik bir tür olan *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüköyük türüdür (Tan et al. 1983, Davis et al. 1988). Bu endemik tür, Eber Gölü'nün güney kısmında ve Akşehir Gölü'nün güneybatı bölümünde yayılış göstermektedir. Ayrıca, Türkiye Bitkileri Kırmızı Veri Kitabına göre kritik olarak tehlike altındaki bir türüdür (Ekim vd. 2000). *T. turcica*'nın eşsiz özelliği, Papilionoideae alt familyasında ilk kayıt olan üç dört serbest karpelin olmasıdır (Tan vd. 1983, Davis et al. 1988). Bu eşsiz çiçek morfolojisi, *T. turcica*'yı değerli bir gen kaynağı olarak en önemli tür yapmaktadır.

Sıradışı çiçek yapısı ile önemli bir gen kaynağı olarak düşünüldüğünden, bu araştırma kapsamında *Thermopsis turcica*'nın farklı iki çiçek gelişimi evresinde proteom değişikliklerine ilişkin veri tabanının oluşturulması amaçlanmıştır. Doğal yetiştirme ortamlarından çiçeklenme döneminde *T. turcica* çiçek durumu (rasemöz) üzerinde bulunan farklı gelişim evresindeki çiçek tomurcuğu ve tamamen açmış çiçeklerde proteom değişiklikleri hakkında daha fazla bilgi edinmek için, iki boyutlu elektroforez (2-DE) tekniği kullanılarak karşılaştırmalı bir proteomik analiz gerçekleştirilmiştir. Gelişimsel olarak protein profillerinde farklı ifade edilen proteinler, kütle spektrometresi (MALDI-TOF/TOF MS) ve veritabanı taraması kullanılarak çiçek gelişimindeki moleküler mekanizmalar hakkında bazı yeni bilgiler edinmek için tanımlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

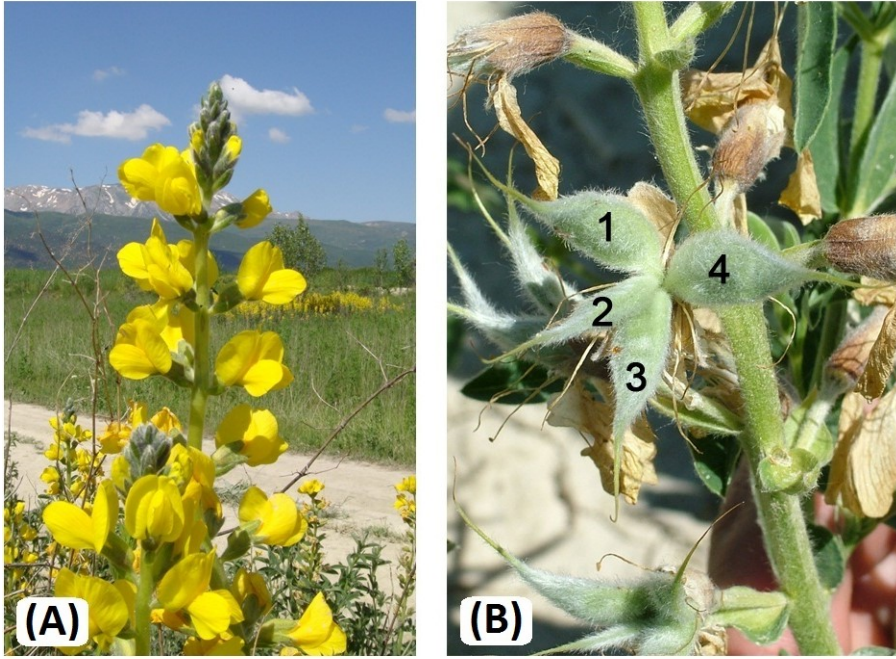
2.1 *Thermopsis turcica*'nın Sistematığı

Fabaceae (Leguminosae=Baklagiller) ailesinin en geniş alt ailesi olan Papilionoideae (Faboideae) yaklaşık 12 000 türle temsil edilmektedir (Tucker 2003). Bu alt ailenin *Thermopsis* R. Br. genusuna ait yaklaşık 25 tür, genellikle Orta Asya ve Kuzey Amerika'nın dağlık bölgelerinde doğal yayılış göstermektedir (Wojciechowski 2003). *Thermopsis* genusunun Türkiye'deki tek temsilcisi endemik "Eber Sarısı, Piyam, Acı Piyam veya Sarı Meyan" olarak adlandırılan endemik *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüköyük türüdür (Çizelge 2.1) (Tan vd. 1983, Davis *et al.* 1988).

Çizelge 2.1 *Thermopsis turcica*'nın taksonomisi.

Alem	Plantae
Altalem	Tracheobionta
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Altsınıf	Rosidae
Ordo	Fabales
Familya	Fabaceae
Genus	<i>Thermopsis</i>
Tür	<i>Thermopsis turcica</i> Kit Tan, Vural & Küçüköyük

Thermopsis turcica Eber Gölü'nün güneyi ve Akşehir Gölü'nün güneybatısında yayılış göstermektedir. Bu tür, tek bir çiçekten 3-4 serbest karpelli meyve oluşturmamasından dolayı önemli bir gen kaynağıdır. *T. turcica* bitkisi yoğun beyaz tüylere ve uzun bir rizoma sahip çok yıllık otsu bir bitkidir. Gövdeleri dik ve 35-80 cm uzunluktadır. Çiçek durumu rasemözdür ve sarı renkli çiçekler zigomorf simetrik ve hermafrodit özelliğe sahiptir. Çiçeklenme Nisan-Mayıs aylarında, meyve gelişimi ise Haziran-Ağustos ayları arasında gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) (Davis *et al.* 1988).

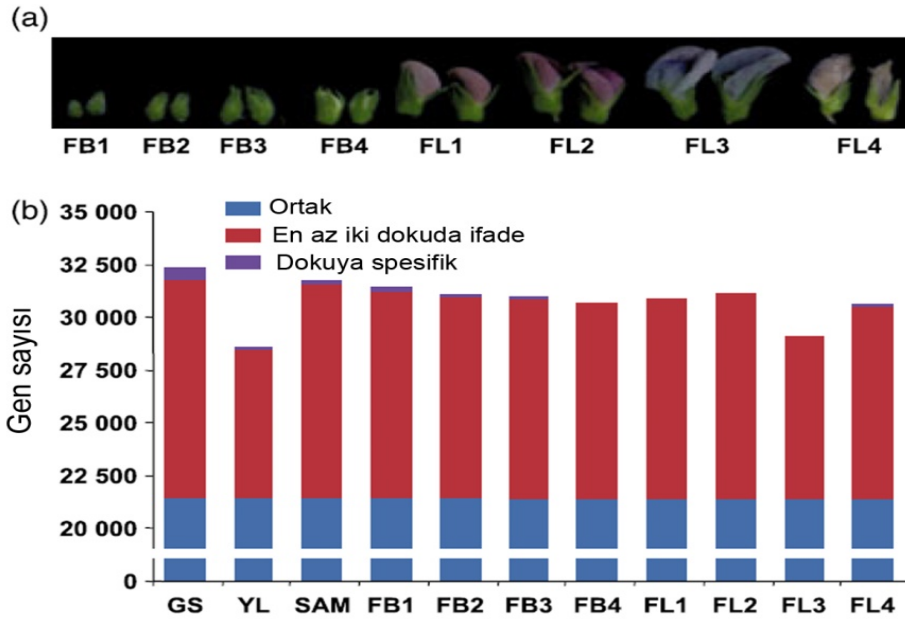


Şekil 2.1 *Thermopsis turcica*'nın çiçek durumu (A) ve 4 karpelli meyvesi (B).

2.2 Bitki Gelişiminin Proteomik Analizleri

Bitki gelişimi oldukça karmaşık moleküler ağların etkileşimleri ile düzenlenmektedir. Birkaç geniş skalalı kantitatif biyolojik yaklaşım çeşitli biyolojik moleküllerin tanımlanması için kullanılmaktadır. Mikroarray çalışmaları aracılığıyla binlerce mRNA molekülünün ifade analizine olanak sağlayan transkriptomik (Schnable *et al.* 2004) ve bir organizmadaki yüzlerce proteinin teşhisine izin veren proteomik (Bertone and Snyder 2005) gelişimsel biyolojide yaygın olarak kullanılan yaklaşımlar arasındadır. RNA-seq (RNA dizileme=RNA sekanslama) gibi yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak tüm transkriptom dizileme çalışmaları ile çiçek gelişimi sırasında ifade olan genlerin fonksiyonları tanımlanabilmektedir. Singh vd. (2013), nohut (*Cicer arietinum*) bitkisinde çiçek gelişimi sırasında global gen ifade profillerini analiz etmişler ve çiçek gelişimi sırasında aktive olan karmaşık düzenleyici ağı ortaya koymuşlardır (Şekil 2.2). Gen ontoloji analizleri artan yönde düzenlenen genlerin korolla, petal, androkeum, ginekeum ve gametofit gelişiminde fonksiyon gördüğü bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar, transport ve hücre çeperi organizasyonu ile ilgili genlerin çiçek gelişimi sırasında

düzenlendiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, çiçek gelişimi sırasında 111 transkripsiyon faktörünün farklı şekilde ifade olduğu da belirlenmiştir. Çiçek gelişimi sırasında MADS-kutusu ailesine ait birçok genin ifade seviyesinde farklılık belirlenmiştir. Çiçek organ gelişiminde fonksiyon gören A, B, C, D ve E sınıfı birkaç gen de tespit edilmiştir (Singh *et al.* 2013).



Şekil 2.2 Nohutta çiçek gelişimi sırasında gen ifadesi profili. GS, çimlenen fide; YL, genç yaprak; SAM, gövde apikal meristem; FB1–FB4, çiçek tomurcuğu evreleri; FL1–FL4, çiçek evreleri (Singh *et al.* 2013'den değiştirilerek)

mRNA'nın alternatif işlenmesi, post-translasyonel modifikasyonlar ve proteinlerin proteolizinden dolayı tek bir genden birçok protein üretilebilmektedir. Bu nedenle, transkripsiyonel seviyede gen ifadesi analizleri birçok biyolojik süreçle ilgili önemli bilgiler sağlamış olmasına karşın, birçok gen için transkripsiyonel ve translasyonel seviyeler arasında tutarsızlıklar bulunmaktadır (Sedeek *et al.* 2013, Zeng *et al.* 2013, Wu *et al.* 2014). Proteinler birçok biyokimyasal süreçte son belirleyici faktörler olarak fonksiyon görmektedir. Bu nedenle, biyokimyasal süreçlerde fonksiyon gören proteinlerin analizi olan proteomik, biyolojik gelişim süreçlerinin anlaşılmasında önemli bilgiler sağlamaktadır (Li *et al.* 2016).

İki yönlü elektroforez (2-DE) çiçek gelişimi ile ilgili proteomik analizlerde kullanılan yaygın metotlardan biridir (Çizelge 2.2). Bu yöntem androkeum (Lopez-Casado *et al.* 2012, Zaidi *et al.* 2012), ginekeum (Wagner *et al.* 2007, Rejon *et al.* 2013) ve petal (Sedeek *et al.* 2013, Li *et al.* 2014, Deng *et al.* 2015) gibi çiçek organlarından izole edilen proteinlerin ayrıştırılmasında kullanılmıştır (Çizelge 2.2). Bununla birlikte, izotopik etiketleme 2-DE jellerde proteinlerin belirlenmesi için hassas bir metottur. DIGE (Differential In-Gel Electrophoresis) ise en çok kullanılan flüoresan etiketleme metotlarından biridir ve gelişimsel süreçlerde fonksiyon gören proteinlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Sheoran *et al.* 2009, Shi *et al.* 2010).

Çizelge 2.2 Farklı bitki türlerinde çiçek biyolojisi üzerine yapılan proteomik çalışmalar (Li *et al.* 2016'dan değiştirilerek)

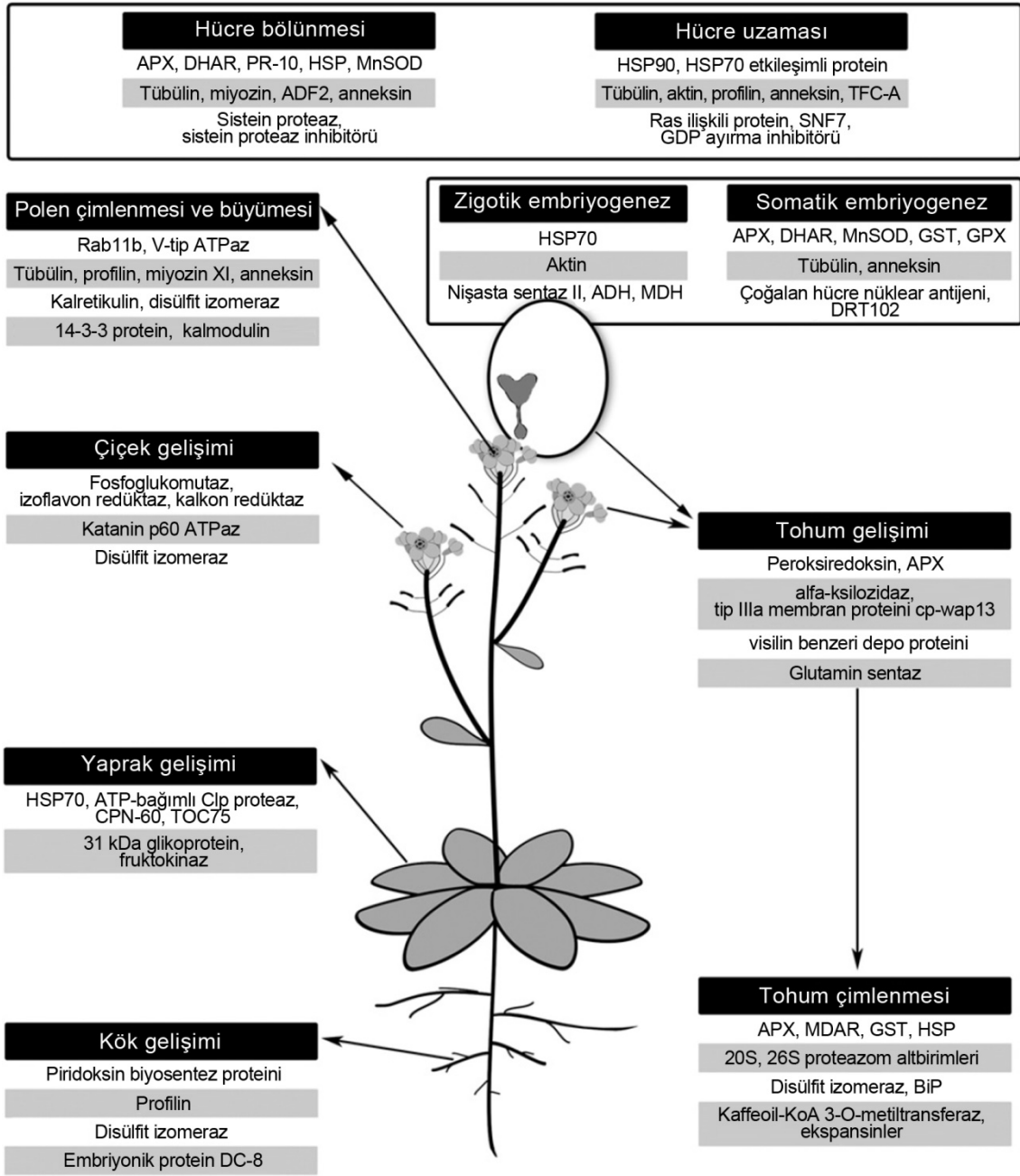
Çiçek kısmı	Tür	Organ/Doku	Ayrıştırma	MS analizi	Kaynak
Korolla	Gül	Çiçek tomurcuğu,	2-DE	MALDI-TOF MS	Dafny-Yelin vd. 2005
	Petunya	Olgun çiçek	2-DE	LC-MS/MS	Bai vd. 2010
	Soya fasulyesi	Tozlaşmamış ve tozlaşmış çiçek	2-DE	MALDI-TOF MS	Ahsan ve Komatsu 2009
	<i>Cymbidium ensifolium</i>	Çiçek tomurcuğu, Açmış çiçekler	2-DE	MALDI-TOF/TOF MS	Deng vd. 2015
Pedisel	Domates	Labellum, iç lateral petaller	2-DE	MALDI-TOF/TOF MS	Deng vd. 2015
Androkeum	Çeltik <i>A. thaliana</i>	Etilen uygulanmış çiçek pediseli	iTRAQ	NanoLC-MS/MS	Zhang vd. 2015
		Anterler	2-DE	MALDI-TOF MS	Kerim vd. 2003
	Kanola	Olgun polen	2-DE	ESI-MS/MS	Holmes-Davis vd. 2005
		Olgun polen taneleri	2-DE	MALDI-TOF MS	Dai vd. 2006
		Olgun ve çimlenen polen	DIGE	MALDI-TOF/TOF MS	Sheoran vd. 2009
Ginekeum	Tritikale	Farklı gelişim evrelerindeki polenler	2-DE	LC-Nanospray-Q-TOF	Zaidi vd. 2012
	Mısır	Yumurta	2-DE	LC-MS/MS	Okamoto vd. 2004
	Soya fasulyesi	Tozlaşmamış ve tozlaşmış pistil	2-DE	MALDI-TOF MS	Li vd. 2012
	Tütün	Kuru ve ıslak stigma	2-DE	MALDI-TOF/TOF MS	Sang vd. 2012

2.2.1 Hücresel Seviyede Gelişimsel Süreçler

Hücre bölünmesi, bitki büyüme ve gelişmesinde çok önemli bir süreçtir (Inzé and De Veylder 2006). Proteomik analizler hücre bölünmesi sırasında metabolizma, enerji ve protein sentezinin kontrolü gibi işlevlerin aktif olduğunu göstermiştir. *Medicago truncatula* bitkisinin kök meristemi ve çoğalan protoplastları gibi bölünen dokularında stresle ilişkili proteinlerin biriktiği bildirilmiştir (Holmes *et al.* 2006, de Jong *et al.* 2007). Her iki doku tipinde de PR-10 ve sıcaklık şoku proteinleri gibi patojen ile ilişkili proteinlerin bölünen dokularda daha yüksek seviyede olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, anneksin proteininin farklı şekilde düzenlenmesinin polen çimlenmesi, pamukta fiber uzaması ve somatik embriyogenez gibi gelişimsel süreçler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.3) (Dai *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2010, Laohavisit and Davies 2011).

Reaktif oksijen türleri (ROT) ve ROT'larla ilişkili proteinler hücredeki redoks sinyalinin önemli bileşenleridir. Fotosentez veya fotosolunum gibi hücresel faaliyetler sonucu oluşan ROT'lar ve ROT metabolizması ile ilişkili proteinler özellikle stres koşullarında bitki gelişiminin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Foyer ve Noctor 2003, Pignocchi *et al.* 2006). Bununla birlikte, ROT'ların hücre döngüsünün düzenlenmesinde de rol oynadığı bildirilmiştir (Foyer ve Noctor 2005, Pasternak *et al.* 2007). Proteomik çalışmalar askorbat peroksidaz, dehidroaskorbat redüktaz, glutatyon transferaz ve süperoksit dismutaz gibi oksidatif stresle ilişkili proteinlerin yüksek hücre bölünmesi aktivitesi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Holmes *et al.* 2006, Lee *et al.* 2008, Shi *et al.* 2008). Bu bulgular, bazı ROT ile ilişkili proteinlerin hücre bölünmesinin kontrolündeki fonksiyonel rollerini göstermektedir.

Mitoz ve sitokinez sırasında aktin filamentleri ve mikrotübül dizileri profaz bandı ve fragmoplast oluşumu sırasında önemli roller oynamaktadır (Petrášek and Schwarzerová 2009). Hücre bölünme aktivitesindeki artışa, aktin-depolimerize edici faktör 2 gibi aktin bağlayıcı proteinlerin bolluğundaki artışın eşlik ettiği bildirilmiştir.



Şekil 2.3 Bitki gelişiminin farklı evrelerinde fonksiyon gören bazı önemli proteinler (Takáč *et al.* 2011'den değiştirilerek). APX = askorbat peroksidaz, DHAR = dehidroaskorbat redüktaz, PR-10 = patojenez ile ilişkili protein 10, MnSOD = mangan süperoksit dismutaz, HSP = sıcaklık şoku proteini, ADF2 = aktin depolimerizasyon faktörü 2, TFC-A = tübülün şekillendirme kofaktörü A, ADH = alkol dehidrogenaz, MDH = malat dehidrogenaz, GST = glutatyon S-transferaz, GPX = glutatyon peroksidaz, MDAR = monodehidroaskorbat redüktaz, CPN-60 = şaperonin 60.

Bununla birlikte, aktin filamentlerine ek olarak alfa-tübülin proteininin bolluğundaki artış *Medicago truncatula*'nın meristematik olmayan dokularına göre meristematik kök hücrelerinde belirlenmiştir (Holmes *et al.* 2006). Ayrıca, enerji üretimi ile ilişkili 76 kDa mitokondriyal kompleks I alt biriminin artan yönde düzenlenmesinin hücre bölünmesi sırasında artan enerji üretimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shi *et al.* 2008).

Hücre bölünmesine benzer olarak hücre uzaması da çevresel uyarıcılar ve brassinosteroid, oksin ve sitokininler gibi bitki büyüme düzenleyicileri tarafından kontrol edilmektedir. Hücre uzaması ve genişlemesinin araştırılması için genellikle pamukta fiber oluşumu ve polen tüpü modelleri kullanılmaktadır (Yang *et al.* 2008, Pang *et al.* 2010). Hücre uzaması aktin ve mikrotübül hücre iskeleti dinamikleri tarafından belirlenmektedir (Chan *et al.* 2007). Uzama inhibisyonu gösteren mutant pamuk fiberlerinde alfa-tübülin, beta-tübülin, tübülün oluşturan kofaktör-A ve profilin proteinlerinin azalan yönde düzenlendiği proteomik çalışmalarla belirlenmiştir (Pang *et al.* 2010, Zhao *et al.* 2010). Bununla birlikte, fiber uzaması sırasında beş aktin ve iki beta-tübülin izoformunun artan yönde düzenlendiği rapor edilmiştir (Yang *et al.* 2008). Ayrıca hücre iskeleti ile etkileşim halinde bulunan beş anneksin izoformunun fiber uzamasında fonksiyon gördüğü bildirilmiştir. Diğer taraftan, vakuolar ayrılma proteini SNF7 ve koatomer benzeri protein gibi veziküler taşıma düzenleyici proteinlerin mutant pamuk fiberlerinde baskılandığı bildirilmiştir (Zhao *et al.* 2010). Redoks homeostazisinin sürdürülmesinin yanı sıra artan translasyonel aktivitenin fiber uzaması ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Yang *et al.* 2008, Zhao *et al.* 2010). Bu proteomik veriler hücre uzamasının sinyal, yapısal ve metabolik seviyedeki hücresel yollarla ilişkili olduğunu göstermektedir (Şekil 2.3) (Takáč *et al.* 2011). Hücre çeperi biyogenezi ve yeniden modellenmesi hücre bölünmesi ve uzamasını düzenleyen primer faktörlerdir. Hücre çeperi biyosentezi ile ilişkili proteinlerin olgun polenlere göre çimlenen polenlerde daha fazla oranda biriktiği rapor edilmiştir (Sheoran *et al.* 2009, Zou *et al.* 2009).

Somatik ve gametik embriyogenez *in vitro* koşullarda gelişimsel çalışmalar için model sistemler olarak kabul edilmektedir. Manyok (Li *et al.* 2010), meře (Gómez *et al.* 2009), portakal (Pan *et al.* 2009), asma (Marsoni *et al.* 2008), siklamen (Bian *et al.* 2010), brlce (Nogueira *et al.* 2007) ve hurma (Sghaier-Hammami *et al.* 2009) gibi bitki türlerinde proteomik yaklaşım kullanılarak somatik embriyogenez sırasında meydana gelen proteom değişimleri araştırılmıştır. Stres koşulları hücrelerin embriyonik duruma geçmelerine neden olabileceğinden, somatik embriyogeneizde stresle ilişkili proteinlerin üzerine durulmuştur. Asmada askorbat peroksidaz ve mangan süperoksit dismutaz ve portakalda glutasyon peroksidaz, glutasyon S-transferaz ve fosfolipid hidroperoksit gibi oksidatif stresle ilişkili proteinlerin somatik embriyogenez sırasında farklı şekilde düzenlendiği bildirilmiştir (Marsoni *et al.* 2008, Pan *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2009). Ayrıca askorbat metabolizmasının mikrospor kaynaklı embriyo gelişiminde fonksiyon gördüğü belirtilmiştir (Joosen *et al.* 2007). Somatik hücreler, somatik embriyo içerisinde gelişmek için hücre bölünmesi aktivitesini yeniden kazanmak zorundadırlar. Bu nedenle, hücre bölünmesi ile ilişkili proteinlerin embriyogenez sırasında aktive olduğu belirtilmiştir (Marsoni *et al.* 2008, Pan *et al.* 2009). Ayrıca hücre bölünmesi ile ilişkili tübülin gibi hücre iskeleti proteinleri farklı şekilde düzenlenmektedir (Baba *et al.* 2008, Li *et al.* 2010). Somatik embriyogeneze ek olarak, proteomik analizler zigotik embriyogeneze ile ilişkili proteinlerin tanımlanması için de kullanılmıştır (Koshino *et al.* 2008, Franco *et al.* 2009, Sghaier-Hammami *et al.* 2009). Zamana bağlı analizler, zigotik embriyogenez sırasında artan enerji gereksinimini göstermiştir (Franco *et al.* 2009, Sghaier-Hammami *et al.* 2009).

2.2.2 Organ Seviyesinde Gelişimsel Süreçler

Bitki gelişimi vejetatif ve generatif gelişim evreleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Vejetatif gelişim tohum ile başlayıp çiçeklenmenin başlaması ile sona ererken, generatif evre iek organlarının oluşumu ile başlayıp tozlaşma ile sona ermektedir (Schnable *et al.* 2004). Bu gelişimsel evreler, içsel genetik program ve dışsal sinyallere cevap ile kontrol edilmektedir (Hochholdinger *et al.* 2006).

2.2.2.1 Vejetatif Organların Proteomik Analizleri

Yüksek bitkilerde tohum gelişimi embriyo ve endosperm gelişiminden oluşmaktadır (Schnable *et al.* 2004). Proteomik analizler tohum gelişiminin erken evrelerinde aktif bir oksidatif metabolizmanın (askorbat peroksidaz ve peroksiredoksin) olduğunu göstermiştir. Hücre çeperi uzaması (alfa-ksilozidaz ve tiplIIIa membran proteini cp-wap13) ile ilgili proteinlerin *Araucaria angustifolia* tohum gelişimi sırasında artan yönde düzenlendiği rapor edilmiştir (Balbuena *et al.* 2009). Tohum gelişiminin son evrelerinde depo proteinleri (visilin benzeri depo proteini) ve solunumla ilgili proteinlerin (triozfosfat izomeraz, fruktoz-bifosfat aldolaz ve izositrat dehidrogenaz) yüksek seviyede biriktiği bildirilmiştir. Erken kotiledon evresinde glutamin sentazın artan yönde düzenlenmesi bu evrede glutaminin glutamik aside dönüşümünün aktif olduğunu göstermektedir (Balbuena *et al.* 2009). Benzer olarak, *Lotus japonicus* bitkisinin beş farklı gelişim evresindeki tohumlarında yapılan proteomik analizler, tohum gelişimi sırasında glutamat metabolizmasının oldukça aktif olduğunu göstermiştir (Nautrup-Pedersen *et al.* 2010). *Jatropha curcas* bitkisinin kuru tohumlarında yapılan proteomik analizler, endosperm ve embriyoda nispeten benzer protein ifade profillerinin olduğunu ortaya koymuştur (Liu *et al.* 2009). *Cunninghamia lanceolata* bitkisinin tohum gelişimi sırasında programlanmış hücre ölümü ile ilgili proteinlerin yanı sıra karbon metabolizması, metiyonin metabolizması, enerji üretimi, protein sentezi ve depolanması, hastalık/savunma, hücre iskeleti ve embriyo gelişimi ile ilgili proteinlerin ifade seviyelerinde farklılıklar belirlenmiştir (Shi *et al.* 2010).

Bitkilerde yapraklar fotosentez ve transpirasyonun gerçekleştiği ana organlardır. Bu nedenle, yaprak gelişimini çeşitli yönlerden ele alan birçok proteomik çalışma gerçekleştirilmiştir. Yaprak proteomunda ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO) en fazla bulunan protein olup; bazı türlerde toplam yaprak proteinin neredeyse yarısını oluşturabilmektedir (Rose *et al.* 2004). Yaprak gelişimi sırasında sıcaklık şoku proteinlerinin (HSP'ler) kloroplast gelişiminde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Jackson-Constan *et al.* 2001, Constan *et al.* 2004). Stromal 70 kDa sıcaklık şokuyla ilgili protein, ATP–bağımlı Clp proteaz ATP–bağlayıcı alt birim clpC

homologu, 70 kDa sıcaklık şoku kökenli protein 2 ve RuBisCO büyük alt birim–bağlayıcı protein alt birimi b (CPN–60) dahil olmak üzere bir grup şaperonun unifoliat ve olgun trifoliat evrelere göre ilk trifoliat yapraklı evrede en az üç kat daha fazla seviyede biriktiği gösterilmiştir (Ahsan ve Komatsu 2009).

Bezelye yaprak proteomu çalışmasında, ekimden 4-24 gün sonra 130 yaprak proteininin tanımlanmasına neden olan bir referans harita oluşturulmuş ve gövde ve yaprak proteinlerinin oldukça benzer bir proteom haritası olduğu ortaya çıkarılmıştır (Schiltz *et al.* 2004). Bu yaprak proteom haritası, azot mobilizasyonu sırasında yaprak proteinlerinin kantitatif varyasyonlarını analiz etmek için kullanılmış ve proteinlerin %40'ının yaprak gelişimi sırasında bolluklarında önemli değişiklikler gösterdiği ortaya konulmuştur (Schiltz *et al.* 2004).

Mısır lateral ve embriyonal kök oluşum mekanizmaları, kök oluşturmamayan rum1 (Saleem *et al.* 2009) ve rtcs (Muthreich *et al.* 2010) mısır mutantları kullanılarak karşılaştırmalı proteomik yaklaşımlarla kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Rum1 mutant hattı, embriyonal ve lateral kök oluşumunda değişirken, rtcs hattı embriyonal kökler oluşturmaz. Rtcs ve yabani tip mısır embriyolarının karşılaştırılması, enerji üretiminde farklılıklar göstermiştir. Üstelik, protein katlanmasında yer alan disülfid izomerazların yanı sıra embriyonik protein DC-8'in farklı kök tiplerinin oluşması için gerekli olan çeşitli yolaklarda genel olarak bir role sahip olduğu görülmüştür (Muthreich *et al.* 2010). Buna ek olarak, rum1 transgenik hat üzerindeki proteomik çalışmada, piridoksin biyosentezi ile ilgili proteinlerin kök oluşumundaki RUM1–bağımlı yolağa dahil olduğu ortaya çıkarılmıştır (Saleem *et al.* 2009). Lateral köklerin oluşması perisıkl hücre tabakasında meydana geldiğinden, perisıkl ve perisıkl olmayan hücreler lazer-yakalama mikrodiseksiyonu kullanılarak hasat edilmiş ve karşılaştırmalı bir proteomik çalışmaya tabi tutulmuştur (Dembinsky *et al.* 2007). Metabolizma, enerji ve savunma-ilişkili proteinlerin, perisıkl olmayan hücrelere göre perisıkl hücrelerinde tercihli olarak biriktiği bulunmuştur. İlginç olarak, bu veri setinin önceki transkriptomik verilerle karşılaştırılması, perisıkl özgülleşmesi ve lateral kök oluşumunun farklı moleküler ağlar

aracılığıyla düzenlendiğini ortaya koymuştur. Kök, gövde ve yaprak proteomlarındaki gelişimsel değişiklikler, tomurcuklanma sonrası ilk 10 hafta boyunca pirinçte takip edilmiştir (Nozu *et al.* 2006). İlginç olarak bu çalışma, tüm dokulardaki tüm gelişim evrelerinde 19 proteinin mevcut olduğunu göstermiştir. Bunlar arasında metabolik proteinlerin yanı sıra katalaz izozim A, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve peroksiredoksin gibi oksidatif strese bağlı proteinlerin de varlığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, özellikle kloroplastlara nükleer kodlanmış kloroplastik proteinin taşınmasında yer alan protein taşınım düzenleyici proteinleri muhtemelen soya fasulyesinde yaprak gelişimi ve olgunlaşmasıyla ilişkilendirilmiştir (Ahsan and Komatsu 2009). *Pinus sylvestris* L. var. *Mongolica*'nın tomurcuk dormansisi teşviki ve serbest bırakılmasının mekanizması çalışmak için tomurcuk gelişimi sırasında proteom değişiklikleri çalışılmıştır (Bi *et al.* 2010). Stres-teşvikli askorbat peroksidaz, patojenez-ilişkili proteinler ve sıcaklık şoku proteinleri tomurcuk dormansisi teşvikinde rol almaktadır. Diğer taraftan, protein sentezi, hücre çeperi biyogenezi ve hücre iskeletinde yer alan proteinler, dormansinin serbest bırakılması sırasında artan yönde düzenlenmiştir. Üstelik, metabolizmadaki değişiklikler dormansi teşviki sırasında karbohidrat ve protein rezervlerinin birikiminin yanı sıra dormant tomurcuk büyüme evresine geçtiğinde karbohidrat ve protein rezervlerinin mobilizasyonunu da göstermiştir (Bi *et al.* 2010).

2.2.2.2 Çiçek ve Çiçek Organlarının Proteomik Analizleri

Gelişimin generatif evresi üreme organlarının oluşumuyla başlar ve tozlaşmayla sonlanır. Bu gelişimsel evrenin çeşitli belirtileri proteomik araştırmalarla incelenmiştir. Yüksek yapılı bitkilerde polen oluşumu, stamende meydana gelen çok iyi programlanmış bir süreç olup; son olarak polen tanelerinde farklılaşan haploid mikrosporların oluşumuna neden olur. Pirinçte, genç mikrospor evresinde anterlerin proteomunun bir referans haritası, 53 anter proteininin tanımlanmasına neden olmuş (Imin *et al.* 2001) ve mikrospor gelişiminin anlaşılması için önemli bir temel oluşturmuştur. Benzer şekilde, *Arabidopsis*'de olgun polen proteomu çalışılmış ve 121 farklı proteini temsil eden 145 en bol protein spotu tanımlanmıştır (Noir *et al.* 2005).

Çiçek ve tomurcuk proteomlarının karşılaştırılması, artan yönde regüle olan fosfoglukomutaz ve azalan yönde regüle olan glikoprotein ile türetilen sukroz oluşumunun, olgun çiçekte petal büyümesi ve renk gelişiminde önemli olan flavonoid ve antosiyanin ile ilişkili genlerin bir uyarıcısı olabileceği ileri sürülmektedir. Katanin p60 ATPaz aracılı aktif organel transportunun yanı sıra protein birliği de çiçek gelişimi için önemlidir (Şekil 2.3). İlginç olarak, kök oluşumuna karıştığı gösterilen disülfid izomeraz (Dembinsky *et al.* 2007, Muthreich *et al.* 2010), çiçeklerde de gelişimsel olarak düzenlenmiştir (Ahsan and Komatsu 2009). Kök ve çiçek gelişimine katılan bu protein, patates yumruları gibi diğer organlarda da önemli rol oynamaktadır (Agrawal *et al.* 2008).

Ben-Meir vd. (2002), çiçek gelişimindeki hücre genişleme fazı sırasında, esas olarak flavonoidler, karotenoidler ve çok sayıda koku bileşiği gibi sekonder metabolitlerin üretiminde rol alan çeşitli metabolik yollar ve ilişkili genlerin aktive edildiğini bildirmiştir. Bununla bağlantılı olarak, lipoksigenaz, S-adenozil metiyonin sentaz, glutamin sentetaz, izoflavon redüktaz homologu 2 ve kalkon redüktazı içeren bazı proteinlerin fonksiyonlarının çiçek ve/veya petal gelişim süreciyle ilişkili olduğu bilinmektedir (Morey *et al.* 2002, Mandaokar *et al.* 2003, Wasternack 2007). Bu proteinlerin diferansiyel regülasyonu, daha önce yayınlanmış transkriptomik ve proteomik analizlerde de kaydedilmiştir (Dafny-Yelin *et al.* 2005, Laitinen *et al.* 2007). Birçok çiçek, tozlaştırıcıları çekmek için kullanılan çok sayıda renkli petal bulunduran büyük bir korollaya sahiptir. Petal gelişimi hücre bölünmesi ve hücre genişlemesini içeren iki faza ayrılabilir. Hücre genişleme fazı sırasında, en belirgin özelliklerden biri, petal boyutunun artmasıdır. Çiçek renginde ve kokusunda yer alan çok sayıda sekonder metabolit (flavonoidler, karotenoidler ve metil benzoat) oluşturulur (Dudareva *et al.* 2004).

Çiçeğin ömrü tam olarak düzenlenir ve programlanır; çünkü korollanın yapısı, rengi ve kokusunun sürdürülmesi metabolik enerji ve suya ihtiyaç duymaktadır. Bitkiler, çiçek

tozlaştıktan sonra veya artık tozlaşma için alıcı olmadığında aktif hale gelen bir korolla yaşlanma mekanizmasını geliştirmişlerdir. Yaşlanma sırasında, çoğu gen, nükleik asitleri, proteinleri, lipitleri, yağ asitlerini, hücre çeperi ve zar bileşenlerini parçalayarak artan yönde düzenlenir. Genlerin küçük bir alt kümesi, karbohidratların taşınması ve petallerden mineral besin maddelerinin kurtarılması gibi besinlerin yeniden harekete geçirilmesinde rol oynamaktadır (Jones 2013). Petunya'da (*Petunia hybrida*) çiçek açılmasından 0, 24, 48 ve 72 saatte ve tozlaşmadan sonra 24, 48 ve 72 saatte tozlaşmamış petunya korollaları arasında iki grup proteomik harita karşılaştırılmıştır (Bai *et al.* 2010). Yüz otuz üç farklı protein tespit edilmiştir. Yaşlanma sürecinde artan proteinlerin çoğu savunma ve stres tepkilerini kapsar. Bu, yaşlanma sırasında dokuyu patojen saldırısı veya reaktif oksijen türü (ROT) hasarından koruyabilir ve besleyici transport için hücresel bileşenleri parçalayabilir (Buchanan-Wollaston *et al.* 2005).

Erkek üreme işlevleri stamende gerçekleşir. Anter, mayoz geçirerek haploid mikrosporlar oluşturan diploid sporojen hücreler içerir. Mikrosporlar, hücre iskeletlerinin aracılık ettiği sitoplazmik yeniden yapılanmaya örneğin, polarlaştırılabilirliğe maruz kalır. Sonunda kutuplaşmış hücreler polen tanelerine dönüşür. Olgun polen taneleri metabolik olarak inaktiftir, ancak stigma üzerinde bir kez tozlaştığında hızla çimlenir ve polen tüpünün büyümesini tetiklenir. Son on yılda, polen gelişimi sürecinin anlaşılmasına yönelik önemli ilerleme kaydedilmiş ve birçok yeni gen tespit edilmiştir (Suzuki *et al.* 2009, Wilson *et al.* 2009). Bu genlere karşılık gelen proteinler polen gelişimi, polen çimlenmesi ve polen tüp büyümesi ile stigma/iletici dokular veya dişi gametofit ile etkileşime girer (Becker *et al.* 2003). Polen gelişimini proteomik bakımdan incelemek için birçok çaba harcanmıştır. Pirinçte, farklı gelişimsel aşamalardaki anter proteomik profilleri karşılaştırılmış ve 150 farklı şekilde ifade edilen protein belirlenmiştir. Tanımlanan otuz üç proteinin büyük çoğunluğunun şeker metabolizması, hücre uzaması ve hücre genişlemesi ile yakından ilişkili olduğu ve bunların hepsinin polen çimlenmesi için önemli olduğu da belirlenmiştir (Kerim *et al.* 2003). *Arabidopsis*'te olgun polenin proteomik referans haritası yapılmıştır (Holmes-Davis *et al.* 2005). Toplam tanımlanan 135 farklı proteinin %50'sinin metabolizma

(%20), enerji üretimi (%17) veya hücre yapısı (%12) ile ilgili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *Arabidopsis*'teki olgun polen ve polen tüplerini karşılaştırmak için de proteomik analiz kullanılmıştır (Zou *et al.* 2009). *Triticale*'de (Triticosecale), olgun polen proteinleri incelenmiştir (Zaidi *et al.* 2012). ekspansinler, profilinler ve birçoğu polen allerjenleri olan çeşitli enzimleri içeren toplam 17 farklı protein ailesi tanımlanmıştır. İlgili genlerin çoğunluğu gelişmekte olan anterler ve polenlerde ifade edilirken, glukanaaz, glutatyon peroksidaz, glutaredoksin ve profilin farklı üreme ve vejetatif dokularda yaygın olarak ifade edilmektedir. Kanola bitkisinde olgun ve çimlenen polenlerin proteomik profilleri karşılaştırılmış ve 130 farklı protein tanımlanmıştır (Sheoran *et al.* 2009). Çimlenen polende artan yönde düzenlenen proteinlerin çoğu, karbohidrat metabolizması, protein metabolizması, hücre çeperinin yeniden biçimlenmesi, hücre iskeleti dinamikleri, nükleotid ve amino asit metabolizması, sinyal iletimi ve stres cevabı ile ilişkili bulunmuştur (Sheoran *et al.* 2009).

Ginekeum bir çiçeğin dişi üreme organlarıdır. Ginekeum bir veya daha fazla pistile sahip olabilir ve her pistil bir veya daha fazla kaynaşmış karpelden oluşur. Karpeller üç bölümden oluşur: polenin gelip yerleştiği stigma, stilus ve ovaryum. Ovaryum, döllenme ve takiben embriyogenez için farklılaşmış ovüller içeren organdır. Dişi organlarda önemli protein bileşenlerinin tanımlanması, dişi gametogenezis, döllenme ve erken embriyogenezin mekanizmalarını analiz etmek için ipuçları sağlamaktadır. Mısırdaki, yumurta hücresi lizatlarından türetilmiş protein bileşenleri tanımlanmıştır (Okamoto *et al.* 2004). Proteinler glikolitik yolağın üç sitozolik enzimini [G3PDH, 3-fosfoglisarat kinaz (PGK) ve TPI] ve iki mitokondriyal proteini [ATP sintaz β -altbirimi ve bir adenin nükleotid taşıyıcısı (ANT) olan annexin p35'i] içermektedir. Bu proteinlerin bolluğu yumurta hücresi, erken embriyo, merkezi hücre ve süspansiyon hücresi arasında karşılaştırılmıştır. Annexin p35, yumurta hücresinde yüksek oranda ve spesifik olarak ifade edilirken, G3PDH, PGK ve ANT, yumurta hücrelerinde merkezi ve kültür hücrelerinden daha yüksek seviyelerde ifade edilmiştir. Yumurta hücresi ve zigotta, anneksin p35 dölleme ile tetiklenen sitosolik Ca^{+2} düzeylerinin artmasıyla teşvik edilen hücre çeperi materyalinin ekzositozuna katılır (Okamoto *et al.* 2004). Pirinçte yumurta

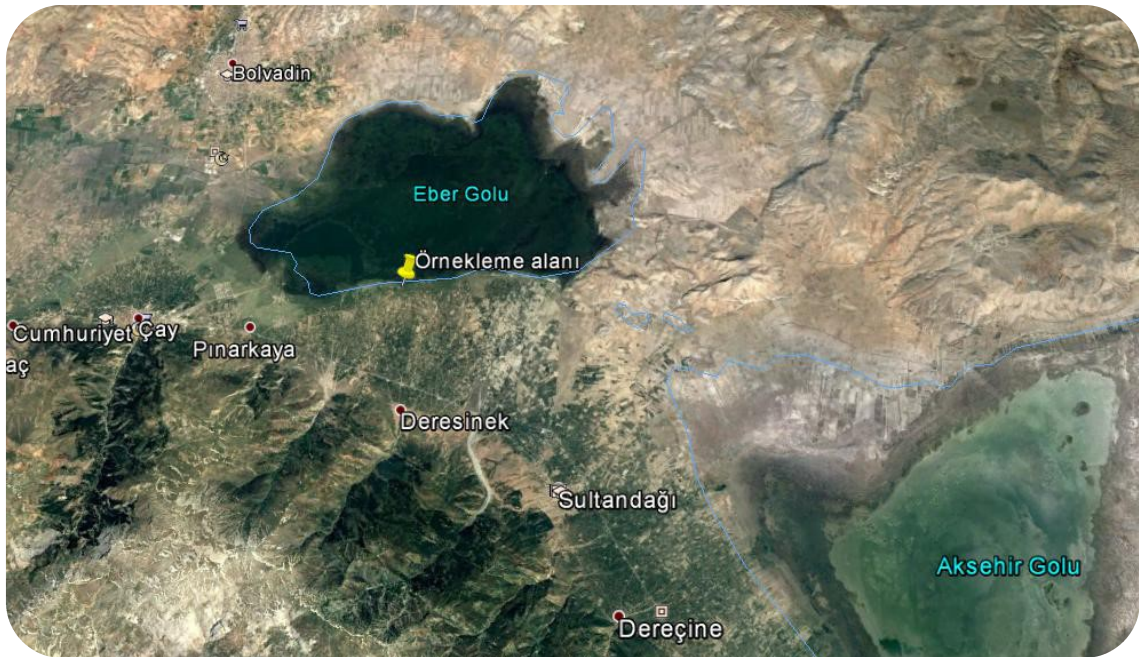
hücreleri izole edilmiş ve lizatları ayrılmıştır (Uchiumi *et al.* 2007). Sitoplazmik glikolitik enzim G3PDH, histone H4, sitoplazmik askorbat peroksidaz (APX) ve moleküler şaperonların (HSP82) HSP90 familyasının bir üyesini içeren proteinler tanımlanmıştır.



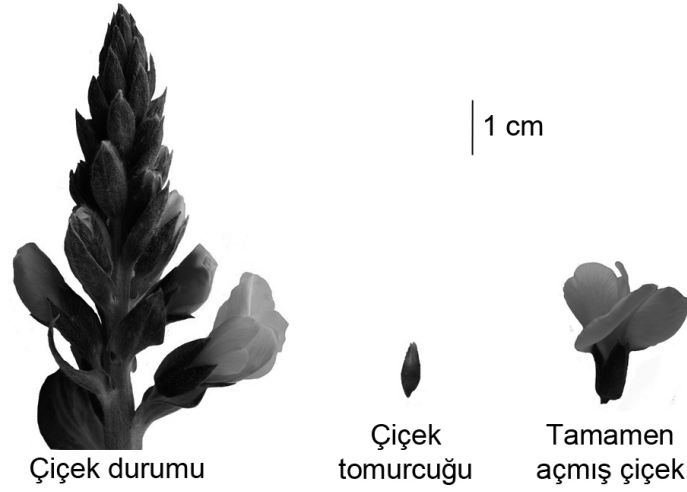
3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Örneklerinin Toplanması

Eber Sarısı (*Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüköyük) bitkisinin çiçek durumları, Eber Gölü'nün güneyindeki (38°36' K, 31°09' D, 968 m rakım) doğal yayılış alanlarından, bitkinin çiçeklenme dönemi olan 2013 yılının Mayıs ayında rastgele örneklenmiştir (Şekil 3.1). Bitkinin sadece rasemöz çiçek durumunu içeren kısımları kesilip, distile su içeren şişelere alındıktan sonra oldukça hızlı bir şekilde laboratuvara transfer edilmiştir. Örnek homojenitesini sağlamak için tomurcuk halindeki (yaklaşık 1 cm) ve tamamen açmış (yaklaşık 2.5 cm) çiçekler en az beş farklı bitkiden olacak şekilde örneklenmiştir (Şekil 3.2). Her iki örneklemede de çiçekler bir bütün olarak kesilip alınmıştır. İkinci ve üçüncü tekrara ait örneklerin her biri farklı beşerli gruplar oluşturulan bitki materyallerinden örneklenmiştir (Şekil 3.2). Bu şekilde üç tekrarlı olarak örneklenen ve alüminyum folyoya sarılan tomurcuk halindeki ve tamamen açmış çiçek örnekleri sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve proteomik analizler yapılncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1 *T. turcica* örnekleme alanı.



Şekil 3.2 *T. turica*'nın çiçek durumu, çiçek tomurcuğu ve tamamen açmış çiçeği.

3.2 Proteomik Analizler

3.2.1 Protein Ekstraksiyonu

Çiçek tomurcukları ve tamamen açmış çiçeklerden proteinlerin ekstraksiyonu fenol metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Hurkman and Tanaka 1986, Ahsan *et al.* 2008). Dokular (1 g) havan ve tokmağı kullanılarak sıvı azot içerisinde toz haline getirilmiş ve 0,5 M Tris-HCl (pH 8.3), %2 v/v NP-40, 20 mM MgCl₂, %2 v/v β-merkaptoetanol, 1 mM fenilmetansülfonilfluorid ve 0,7 M sukroz içeren 10 mL Mg/NP-40 ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir (Kim *et al.* 2001). Daha sonra homojenata eşit hacimde Tris-HCl ile doyurulmuş fenol solüsyonu eklenmiş ve 10 dakika boyunca vortekslelendikten sonra 5500 ×g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyondan sonra üst kısımda kalan fenol faz ayrı bir tüpe alınmış ve tekrar ekstraksiyon tamponu ile karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrası fenol faz yeni bir tüpe alınmış ve proteinlerin çöktürülmesi için üzerine 0,1 M amonyum asetat içeren 4 hacim soğuk metanol ilave edilmiş ve -20°C'de inkübe edilmiştir. Bu periyot sonunda çöktürülmüş proteinler 10 dakika 3,500 ×g'de santrifüj edilmiş ve elde edilen protein peleti 3 kez daha 0,1 M amonyum asetat içeren soğuk metanol ile yıkanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan peletler desikatörde kurutularak

kullanılincaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Peletler rehidrasyon tamponunda (7 M urea, 2 M thiourea, %4 (w/v) CHAPS, 65 mM DTT ve %2,5 Ampholyte pH 3-10) çözünmüş ve peletlerdeki protein miktarları Bradford (1976)'a göre hesaplanmıştır. Protein standardı olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır.

3.2.2 İki Yönlü Jel Elektroforezi

Çözünebilir protein profillerindeki polimorfizmler iki-yönlü (2-D) poliakrilamid jel elektroforezi (izoelektrik Fokuslama/Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, IEF/SDS-PAJE) tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Elektroforezin ilk yönü olan IEF'de, Protean IEF Cell (Bio-Rad) sisteminde IPG (immobilized pH gradient) stripleri (pH 4-7, 17 cm) kullanılarak proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılması sağlanmıştır. Stripler 100 µg protein içeren rehidrasyon tamponuyla muamele edilmiş ve Protean IEF Cell sistemine transfer edilmiştir. Stripler 50 V akımda aktif olarak rehidrate edilmiştir. Rehidrasyon basamağından sonra izoelektrik fokuslama toplam 70.000 V olacak şekilde 20°C'de gerçekleştirilmiştir. IEF'den sonra stripler 15 dakika dengeleme solüsyonu I [6 M urea, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2 (w/v) DTT] ve 15 dakika dengeleme solüsyonu II [6 M urea, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2,5 (w/v) iodoacetamide] ile muamele edilmiştir. Dengeleme basamağından sonra ikinci yön olan SDS-PAGE %12'lik akrilamid jelde (%30 akrilamid/bisakrilamid, 1,5 M Tris-HCl tamponu, pH 8,8, %10 SDS, %10 amonyum persülfat ve TEMED) Laemmli (1970)'ye göre gerçekleştirilmiştir. 2-D elektroforez PROTEAN II XL Cell (Bio-Rad)'de gerçekleştirilmiştir. Protein standardı olarak Sigma moleküler markör (MWSDS-70L, Sigma, St. Louis, MO) kullanılmıştır. Görüntü analizlerinin yapılacağı analitik jellerdeki protein benekleri gümüş boyama (Sinha *et al.* 2001) ile kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılacak jeller ise koloidal Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyama ile görünür hale getirilmiştir (Candiano *et al.* 2004).

3.2.3 Görüntü Analizleri

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

3.2.4 Jelde Triptik Kesim

Seçilmiş protein benekleri CBB boyalı jellerden EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad) cihazı kullanılarak kesilmiş ve 0.6 mL'lik steril tüplere alınmıştır. Protein beneklerinin triptik kesimi için In-Gel Tryptic Digestion Kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Fazla boyanın uzaklaştırılması için kesilen jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37°C'de 30 dakika muamele edilmiştir. Boya uzaklaştırma çözeltisi tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra indirgeme ve alkilasyon basamaklarına geçilmiştir. İndirgeme basamağı için jel parçacıkları 50 mM Tris-(2-karboksietil)-fosfin çözeltisi içeren 2 g/L amonyum bikarbonat çözeltisi ile 60°C'de 10 dakika muamele edilmiştir. Bu periyot sonunda indirgeme çözeltisi uzaklaştırılmış ve alkilasyon için jel parçacıkları 100 mM iyodoasetamid ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Alkilasyon tamponu uzaklaştırıldıktan sonra jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37°C'de 15 dakika muamele edilmiştir. Jel parçalarını dehidrate etmek için örnekler konsantre asetonitril ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Asetonitril çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş jel parçacıkları üzerine aktive edilmiş tripsin (10 ng/μL) eklenmiş ve 30°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüpler içerisindeki çözelti yeni bir tüpe alınmış ve vakum konsantratör (Eppendorf, Germany)

ile kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş örnekler 10 µL %0,1'lik trifloroasetik asit (TFA) ile yeniden süspanse edilmiş ve kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

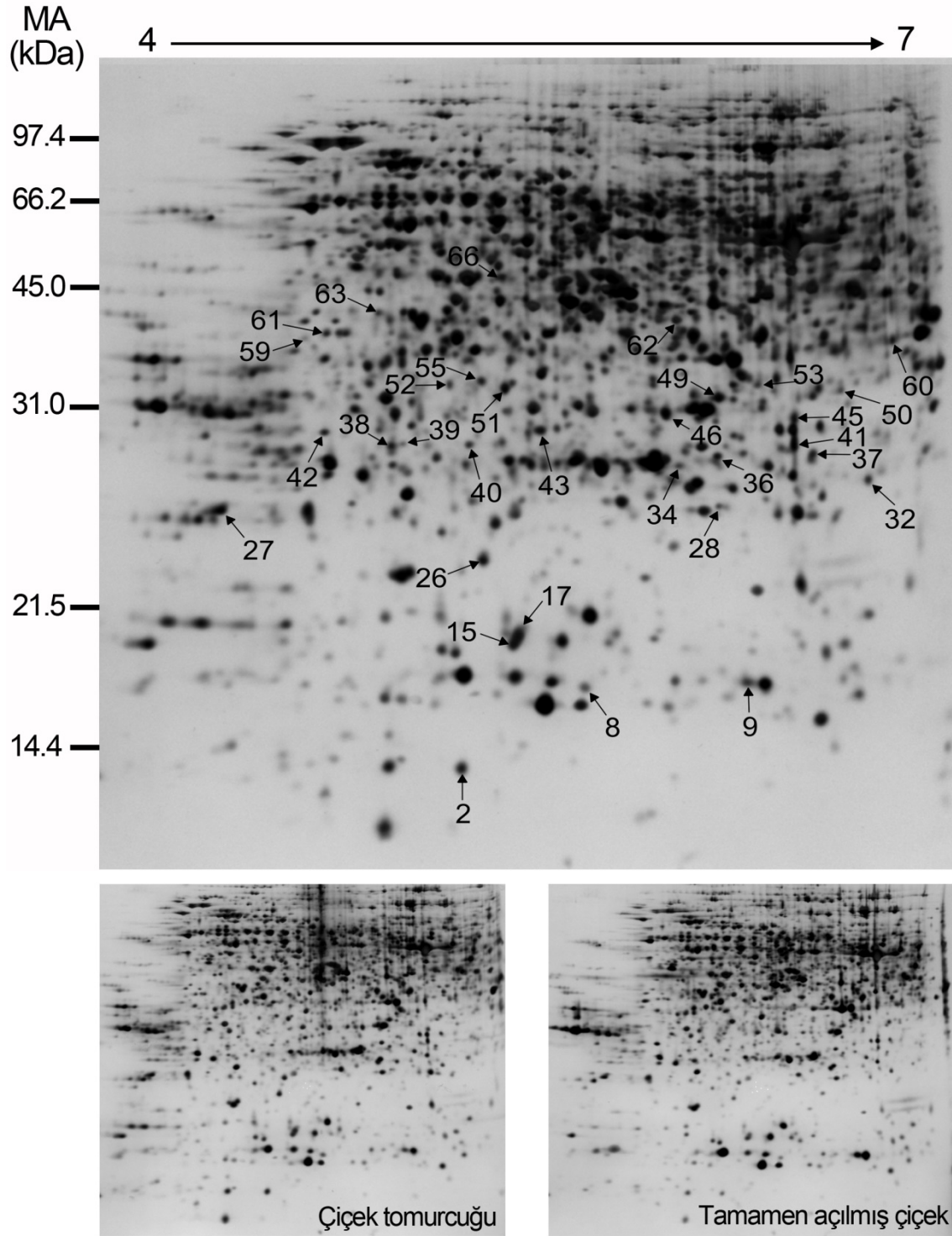
3.2.5 Kütle Spektrometrisi Analizleri

Kütle spektrometrisi analizleri için %0,1'lik TFA'da çözünmüş peptidler ZipTip C₁₈ (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılarak konsantre hale getirilmiştir. Peptid çözeltileri, %50 asetonitril ve %0,1 TFA ile doyurulmuş 10 mg L⁻¹ α-cyano-4-hydroxycinnamic asit (matriks) ile karıştırılmıştır. Daha sonra yaklaşık 1 µL çözelti MALDI plakasına yerleştirilmiş ve kuruması sağlanmıştır. Kütle spektrometrisi analizleri AB Sciex TOF/TOF 5800 kütle spektrometrisi cihazı (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumu (m/z 800–3000) pozitif iyon reflektör modunda elde edilmiştir. Her bir protein beneği için MS modundan elde edilen 10 pik MS/MS fragmentasyonu için seçilmiştir. MS/MS modu 1 kV'lık çarpışma (collision) enerjisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çarpışma teşvikli fragmentasyon için çarpışma gazı olarak hava kullanılmıştır. Öncü MS spektrumları için internal kalibrasyon olarak otolitik tripsin peptidleri kullanılmıştır. Glu-Fib fragmentleri ile elde edilen eksternal kalibrasyon ise MS/MS spektrumlarına uygulanmıştır. MS/MS verileri GPS Explorer (Applied Biosystem) ve MASCOT (Matrix Science, London, UK) yazılımları kullanılarak protein veri tabanlarına karşı taranmıştır. Veri tabanı araması SwissProt protein veri tabanına karşı yapılmıştır. Arama kriterleri olarak; Enzim, tripsin; değişken modifikasyonlar, metiyonin oksidasyonu; sabit modifikasyonlar, sistein karbamidometilasyonu; peptid toleransı, 50 ppm; MS/MS toleransı, 0.4 Da ve taksonomi, Viridiplantae (yeşil bitkiler) kullanılmıştır. MS/MS verileri için %95'den daha büyük olarak belirlenen önemli derecede yüksek MASCOT skorları, güvenilir şekilde tanımlanmış protein olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu araştırmada, *Thermopsis turcica*'nın farklı gelişim evrelerindeki (çiçek tomurcuğu ve tamamen açmış çiçek) çiçek dokularından ekstrakte edilen proteinlerin 3 tekrarlı profilleri 2-D (IEF/SDS-PAGE) yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen 2-D jellerinde, protein profillerindeki değişimler PDQuest programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu programla, çiçek tomurcuklarına göre tamamen açmış çiçeklerde ifade seviyesi 2 kat veya daha fazla (≥ 2) artan veya azalan 66 protein beneği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu protein benekleri MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile analiz edilip, Swiss-Prot veri tabanları tarandığında 32 tane protein başarılı şekilde tanımlanmıştır (Çizelge 4.1). İfade seviyesinde değişiklik gösteren proteinlerden 11'i ifadesi artan yönde düzenlenen (up-regulated) ve 21'si ise ifadesi azalan yönde düzenlenen (down-regulated) protein olarak belirlenmiştir.

Tanımlanan 32 protein fizyolojik fonksiyonlarına göre transkripsiyon ve protein metabolizması, stres savunma, enerji ve karbohidrat metabolizması, fotosentez, hücre çeperi ve hücre iskeleti, sekonder metabolizma ve amino asit metabolizması olmak üzere farklı kategorilere sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.1). Mevcut araştırmada, transkripsiyon ve protein metabolizması ile ilişkili 8 proteinin (9, 15, 17, 32, 36, 37, 38 ve 50 nolu benekler) çiçek tomurcuğuna göre tamamen açmış çiçeklerde farklı şekilde ifade olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1, Çizelge 4.1). Bu proteinlerden B3 domain-containing protein At5g60130 (benek 9) ve Coatomer subunit epsilon-1 (benek 38)'ün ifade seviyesi tamamen açmış çiçeklerde artan yönde düzenlemiştir. Bununla birlikte, ökaryotik translasyon başlama faktörü 5A-2 (benek 15), ökaryotik translasyon başlama faktörü 5A-1 (benek 17), proteazom altbirim beta tip-1, proteazom altbirim beta tip-4 (36 ve 37 nolu benekler) ve 26S proteazom non-ATPaz düzenleyici altbirim 14 (benek 50) proteinlerinin ifade seviyesi tamamen açmış çiçeklerde azalan yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.1, Çizelge 4.1).



Şekil 4.1 *Thermopsis turcica*'nın çiçek tomurcuğu ve tamamen açmış çiçeklerinden ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri. Total proteinler (80 µg) 17 cm'lik IPG striplere (pH 4-7) yüklenmiş ve SDS-PAJE %12'lik jelde gerçekleştirilmiştir. Proteinler gümüş boyama ile görünür hale getirilmiştir. Jel profillerinde oklar ile gösterilmiş ve numaralandırılmış (2-66) proteinler artan ya da azalan şekilde ifade olan proteinlerdir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *Thermopsis turcia*'nın çiçek tomurcuğu ve tamamen açmış çiçeklerinde farklı şekilde ifade olan ve tanımlanan proteinler.

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Teo. MA/pl ^d	Den. MA/pl ^e	Skor ^f	EP ^g	SC ^h	Değişim ⁱ
Transkripsiyon ve protein metabolizması								
9	Y5013_ARATH	B3 domain-containing protein At5g60130, <i>Arabidopsis thaliana</i>	37.2/4.39	15.2/6.37	56	5	9	+2.69
15	IF5A2_SOLL	Ökaryotik translasyon başlama faktörü 5A-2, <i>Solanum lycopersicum</i>	17.5/5.78	18.1/5.59	216	5	24	-2.08
17	IF5A1_SOLL	Ökaryotik translasyon başlama faktörü 5A-1, <i>Solanum lycopersicum</i>	17.3/5.71	18.7/5.75	261	8	23	-2.22
32	PSB1_ARATH	Proteazom altbirim beta tip-1, <i>Arabidopsis thaliana</i>	24.6/6.95	27.1/6.76	258	7	20	-3.70
36	PSA4_PETHY	Proteazom altbirim alfa tip-4, <i>Petunia hybrida</i>	27.2/5.60	28.1/6.27	274	11	14	-2.78
37	PSA4_PETHY	Proteazom altbirim alfa tip-4, <i>Petunia hybrida</i>	27.2/5.60	28.6/6.58	357	12	14	-3.85
38	COPE1_ORYSJ	Coatomer altbirim epsilon-1, <i>Oryza sativa</i>	31.6/5.23	28.9/5.19	108	4	3	+2.22
50	PSDE_ARATH	26S proteazom non-ATPaz düzenleyici altbirim 14, <i>Arabidopsis thaliana</i>	34.3/6.31	33.0/6.67	326	15	24	-3.33
Stres savunma								
2	TRXH_RICCO	Tiyoredoksin H-tip, <i>Ricinus communis</i>	13.0/5.57	14.4//5.42	66	4	15	-3.33
42	PHAL_PHAVU	Leucoagglutinating phytohemagglutinin, <i>Phaseolus vulgaris</i>	29.6/4.90	29.6/4.97	93	3	10	+2.52
46	THI4_CITSI	Tiazol biyosentetik enzim, <i>Citrus sinensis</i>	37.6/5.40	30.7/6.09	353	14	33	-6.67
49	PDX13_ARATH	Piridoksal biyosentez proteini PDX1.3, <i>Arabidopsis thaliana</i>	33.2/5.79	32.4/6.26	144	12	24	-3.57
51	THI4_CITSI	Tiazol biyosentetik enzim, <i>Citrus sinensis</i>	37.6/5.40	33.3/5.57	547	17	28	-5.88
52	THI4_CITSI	Tiazol biyosentetik enzim, <i>Citrus sinensis</i>	37.6/5.40	33.7/5.38	316	12	20	-3.33
53	TRXB1_ARATH	Tiyoredoksin redüktaz 1, <i>Arabidopsis thaliana</i>	35.3/5.82	33.7/6.60	195	6	15	+2.49
Enerji ve karbohidrat metabolizması								
41	G3PC_HORVU	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, <i>Hordeum vulgare</i>	33.2/6.20	29.1/6.52	98	7	25	-2.70
45	VATE_MESCR	V-tip proton ATPaz altbirim E, <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	26.1/6.52	30.5/6.52	124	6	16	-2.17
55	IPYR_ORYSI	Çözünebilir inorganik pirofosfat, <i>Oryza sativa</i>	24.1/5.56	33.9/5.49	350	13	33	+2.78
59	SCRK1_ORYSI	Fruktokinaz-1, <i>Oryza sativa</i>	34.7/5.14	39.5/4.91	190	9	18	+4.88
60	G3PC_ANTMA	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, <i>Antirrhinum majus</i>	36.7/8.30	39.6/6.85	316	13	30	+2.13
61	SCRK1_ORYSI	Fruktokinaz-1, <i>Oryza sativa</i>	34.7/5.14	40.3/4.98	257	11	14	-2.17

Çizelge 4.1 (Devamı) *Thermopsis turcia*'nın çiçek tomurcuğu ve tamamen açmış çiçeklerinde farklı şekilde ifade olan ve tanımlanan proteinler.

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Teo. MA/pI ^d	Den. MA/pI ^e	Skor ^f	EP ^g	SC ^h	Değişim ⁱ
Hücre çeperi ve hücre iskeleti								
8	GRP1_SORBI	Glisince zengin RNA-bağlayıcı protein 1, <i>Sorghum bicolor</i>	13.7/9.34	14.9/5.83	85	4	19	-2.17
27	TCTP_ORYSJ	Translasyonel olarak kontrol edilen tümör proteini homologu, <i>Oryza sativa</i>	18.9/4.51	25.5/4.63	71	7	28	-2.13
43	CAMT2_POPTR	Kaffeoil-KoA O-metiltransferaz, <i>Populus trichocarpa</i>	27.9/5.33	29.7/5.68	235	12	38	-4.00
66	ACT11_SOLTU	Aktin-97, <i>Solanum tuberosum</i>	41.6/5.31	49.1/5.55	188	15	29	+2.04
Fotosentez								
26	PSBP_SOLTU	Oksijen-üretimi arttırıcı protein 2, <i>Solanum tuberosum</i>	27.9/8.27	23.2/5.50	308	9	21	-2.22
34	CB215_PEA	Klorofil a-b bağlayıcı protein 215, <i>Pisum sativum</i>	28.9/5.47	27.7/6.14	146	6	35	+2.76
63	CHLI_TOBAC	Magnezyum-şelataz altbirim chli, <i>Nicotiana tabacum</i>	46.6/6.64	42.9/5.15	181	13	17	-2.17
Sekonder metabolizma								
28	CF1B1_SOYBN	Kalkon-flavonon izomeraz 1B-1, <i>Glycine max</i>	25.0/5.26	25.8/6.26	71	2	4	-2.86
Amino asit metabolizması								
62	GLNA2_HORVU	Glutamin sentetaz, <i>Hordeum vulgare</i>	47.1/5.11	42.2/6.13	161	6	5	-3.03
Bilinmeyen								
39	Y2766_ARATH	Uncharacterized protein At2g37660, <i>Arabidopsis thaliana</i>	34.9/8.37	29.0/5.23	207	6	9	+2.00
40	Y2766_ARATH	Uncharacterized protein At2g37660, <i>Arabidopsis thaliana</i>	34.9/8.37	29.0/5.44	263	6	9	+2.00

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

^b SwissProt veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen aksesyon numarasını ifade eder.

^c SwissProt veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen proteini ifade eder.

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

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

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

^g Eşleşen peptid sayısını ifade eder.

^h Sekans coverage'ı ifade eder.

ⁱ Çiçek tomurcuğuna göre tamamen açmış çiçeklerde artan yönde (+) veya azalan yönde (-) düzenlenen proteinleri ifade eder.

Mevcut araştırmada, stres savunma ile ilgili 2 proteinin (42 ve 53 nolu benekler) ifadesi artan yönde düzenlenirken, 5 proteinin (2, 46, 49, 51 ve 52 nolu benekler) ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (şekil 4.1, izelge 4.1). Stres savunma ile ilişkili olarak leucoagglutinating phytohemagglutinin (benek 42) ve tiyoredoksin redüktaz 1 (benek 53) proteinlerinin ifadesi tamamen açmış çiçeklerde artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, tiyoredoksin H-tip (benek 2), tiazol biyosentetik enzim (46, 51 ve 52 nolu benekler) ve piridoksal biyosentez proteini PDX1.3 (benek 49) proteinlerinin ifadesi tamamen açmış çiçeklerde azalan yönde düzenlenmiştir (şekil 4.1, izelge 4.1).

Enerji ve karbohidrat metabolizması ile ilgili 3 proteinin (55, 59 ve 60 nolu benekler) ifadesi artan yönde düzenlenirken, 3 proteinin (41, 45 ve 61 nolu benekler) ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (şekil 4.1, izelge 4.1). Enerji metabolizması ile ilişkili olarak cznebilir inorganik pirofosfataz (benek 55), fruktokinaz-1 (benek 59) ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (benek 60) proteinlerinin ifadesi tamamen açmış çiçeklerde artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (benek 41), V-tip proton ATPaz altbirim E (benek 45) ve fruktokinaz 1 (benek 61) proteinlerinin ifadesi tamamen açmış çiçeklerde azalan yönde düzenlenmiştir (şekil 4.1, izelge 4.1).

Hücre eperi ve hücre iskeleti ile ilgili 1 proteinin (benek 66) ifadesi artan yönde düzenlenirken, 3 proteinin (8, 27 ve 43 nolu benekler) ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (şekil 4.1, izelge 4.1). Aktin-97 (benek 66) proteininin ifadesi tamamen açmış çiçeklerde artan yönde düzenlenirken, glisince zengin RNA-bağlayıcı protein 1 (benek 8), translasyonel olarak kontrol edilen tümör proteini homologu (benek 27) ve kaffeoil-KoA O-metiltransferaz (benek 43) proteinlerinin ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (şekil 4.1, izelge 4.1).

Fotosentez ile ilgili 1 proteinin (benek 34) ifadesi artan yönde düzenlenirken, 2 proteinin (26 ve 63 nolu benekler) ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (şekil 4.1, izelge 4.1). Klorofil a-b bağlayıcı protein 215 (benek 34) proteininin ifadesi tamamen

açmış çiçeklerde artan yönde düzenlenirken, oksijen-üretimi arttırıcı protein 2 (benek 26) ve magnezyum-şelataz altbirim chli (benek 63) proteinlerinin ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.1, Çizelge 4.1).

Sekonder metabolizma ile ilgili olarak kalkon-flavonon izomeras 1B-1 (benek 28) proteininin ifade seviyesi tamamen açmış çiçeklerde azalan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, amino asit metabolizma ile ilgili olarak glutamin sentetaz (benek 62) proteininin ifade seviyesi tamamen açmış çiçeklerde azalan yönde düzenlenmiştir. Diğer taraftan, fonksiyonu bilinmeyen iki proteinin (39 ve 40 nolu benekler) ifade seviyesi artan yönde düzenlenmiştir.



5. TARTIşMA ve SONUÇ

Çiçek gelişimi, çiçekli bitkilerde oldukça sıkı düzenlenen özgül programlardan biridir (Rolland-Lagan *et al.* 2003). Şimdiye kadar, *Arabidopsis*'de mukayeseli genetik ve moleküler analizler ile çok sayıda çiçeğe ait anahtar düzenleyici genler tanımlanmış ve onların çiçek morfogenezini nasıl kontrol ettiği detaylandırılmıştır (Ó'Maoiléidigh *et al.* 2014). Bu genlerin çoğu, çiçek gelişiminin altında yatan karmaşık bir gen düzenleyici ağının varlığını gösteren transkripsiyon faktörlerini kodlar (Singh *et al.* 2013). Çiçek gelişiminde yer alan transkripsiyonel programların anlaşılmasına yönelik birkaç çalışma yapılmasına rağmen (Nakamura *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014), bu tür birkaç çalışma proteom seviyesinde gerçekleştirilmiştir (Dafny-Yelin *et al.* 2005, Ahsan and Komatsu 2009). Bu çalışmada, farklı gelişim evresindeki çiçeklerin proteomik analizi, çiçek gelişiminde yer alan protein ağlarının daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır.

Çiçek proteomunu karakterize etmek için 2-DE, iki gelişim evresindeki çiçeklerden ekstrakte edilen proteinlerle gerçekleştirilmiştir. Şekil 2'de gösterilen jeller ile 2-DE jellerinde iyi bir tekrarlanabilirlik ile 1,000'den fazla protein beneği tespit edilmiştir. Tekrarlanabilirliği iyi olan ve yoğunluğu > 2.0'den fazla olan protein benekleri, farklı şekilde ifade edilen protein olarak karakterize edilmiştir. Yaygın protein profilleri değişmeden kalırken, 66 protein beneği farklı şekilde ifade olan protein olarak tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Farklı şekilde ifade edilen proteinler jellerden kesilmiş, tripsin ile muamele edilmiş ve proteini tanımlamak için kütle spektrometrisi (MS) analizine tabi tutulmuştur. MALDI-TOF/TOF MS ve MASCOT veri tabanı araştırması kullanılarak toplam 32 protein beneği başarılı bir şekilde tanımlanmıştır (Çizelge 4.1). *T. turcica* genomu için eksik veriler nedeniyle, tüm proteinler farklı bir bitkiden alınan bir ortolog protein olarak tanımlanmıştır. Gen ontolojisi ve literatürden elde edilen bilgiler temelinde, farklı şekilde ifade edilen proteinler farklı fonksiyonel kategorilere ayrılmıştır: transkripsiyon ve protein metabolizması, enerji ve karbohidrat metabolizması, bitki savunması, fotosentez, hücre çeperi ve hücre iskeleti, ikincil metabolizma, amino asit metabolizması (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

B3 işlevsel-bölge içeren protein At5g60130 (benek 9), ökaryotik translasyon başlatma faktörleri eIF5A-2 ve eIF5A1 (15 ve 17 nolu benekler), proteazom altbirim beta tip-1 ve tip-4 (32, 36 ve 37 nolu benekler), protein kaplayıcı (coatomer=koatomer) alt birim epsilon-1 (benek 38) ve 26S proteazom non-ATPaz düzenleyici altbirim 14 (benek 50) gibi transkripsiyon ve protein metabolizmasında yer aldığı bilinen bir grup proteinin *T. turcica* çiçeklerinde farklı şekilde düzenlendiği bulunmuştur. eIF5A1, eIF5A2, proteazom altbirim beta tip-1 ve tip-4 ve 26S proteazom non-ATPaz düzenleyici altbirim 14, tamamen açmış çiçeklerdeki bollukta önemli bir azalma gösterirken, B3 işlevsel-bölge içeren protein At5g60130 ve protein kaplayıcı (coatomer=kaotomer) altbirim epsilon-1 önemli düzeyde artan yönde düzenlenmiştir. Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 5A (eIF5A)'nın daha önce translasyonda peptid bağ oluşumunun ilk basamağında yer aldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, başka bir çalışmada bu proteinin evrensel olarak korunmuş bir translasyon uzama faktörü olduğu ortaya konulmuştur (Saini *et al.* 2009). eIF5A familyası yaygın çeviri için gerekli değildir; fakat spesifik mRNA'ların nukleustan sitoplazmaya geçişinde bazı roller oynamaktadır (Thompson *et al.* 2004).

Proteazlar, ubiquitinlenmiş proteinlerin bozunmasına ve hücre döngüsü ilerlemesi, transkripsiyon ve metabolik regülasyon gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer alan düzenleyici proteinlerin şartlı bozunmasına katılan enzimlerdir (Peters 1994). Koatomer, endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi arasındaki hücre-içi protein trafiğinin düzenlenmesinde yer alan bir sitozolik protein kompleksidir (Shima *et al.* 1999).

Karbohidrat ve enerji metabolizması bitki gelişiminde gereklidir. Tanımlanan proteinler arasında, bir grup proteinin karbohidrat ve enerji metabolizmasında rol oynadığı bilinmektedir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (benek 41), V-tipi proton ATPaz altbirim E (benek 45) ve fruktokinaz-1 (benek 61) proteinleri, tamamen açmış çiçeklerde belirgin bir şekilde azalan yönde regüle edilmiştir. Bununla birlikte, çözünür inorganik pirofosfataz (benek 55), başka bir gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (benek

60) ve bir fruktokinaz-1 (benek 59) olgun çiçeklerde belirgin bir şekilde artan yönde düzenlenmiştir. Bu proteinlerin farklı bir şekilde ifadesi, çiçek ve meyve gelişim süreçleri ile ilgili diğer araştırmalarda gösterilmiştir (Dafny-Yelin *et al.* 2005, Rocco *et al.* 2006, Faurobert *et al.* 2007). Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, glikoliz ve glikoneogenez ile ilgili her yerde bulunan bir enzimdir. Fruktokinaz, fruktozun fruktoz-6-fosfata fosforilasyonunu katalize etmektedir. Glikoliz, nişasta biyosentezi ve oksidatif pentoz yolağı gibi birçok şeker metabolik yolağı için fruktoz-6-fosfat önemli bir substrattır. ATPaz'lar, membran aracılığı ile protonların taşınması ile ATP sentezi ve/veya hidrolizini birleştiren membrana-bağılı enzim kompleksleri/iyon taşıyıcılarıdır. Vakuolar H⁺-ATPaz, tonoplast Na⁺/H⁺ antiportırı tarafından kullanılan itici güç olan bir proton elektrokimyasal gradienti oluşturabilir (Chinnusamy *et al.* 2005). Bununla birlikte, çiçek gelişiminde V-H⁺-ATPaz proteinlerinin ayrıntılı moleküler mekanizması büyük ölçüde belirsiz olup; daha ileri çalışmaları gerektirmektedir.

Mevcut çalışmamızda, yedi stres savunması ile ilişkili protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerin çoğunun çiçek gelişimi sırasında bolluğunda azalma gösterdiği belirlenmiştir. Tioredoksin H-tipi (benek 2), üç tiazol biyosentetik enzim (46, 51 ve 52 nolu benekler) ve piridoksal biyosentez proteini PDX1.3 (benek 49), tamamen açmış çiçeklerde azalmıştır. Diğer taraftan, diğer stres savunma-ilişkili proteinler olan lökoaglutine edici fitohemaglutinin (benek 42) ve tioredoksin redüktaz 1 (benek 53) proteinlerinin artan yönde düzenlendiği gözlenmiştir. Stresle ilgili birçok genin çiçek gelişimi sırasında aktif olması nedeniyle, bu düzenlemelerin olmasının şaşırtıcı olmadığı bildirilmiştir (Dafny-Yelin *et al.* 2005). Redoks homeostazisinin sıkı kontrolü hücre metabolizmasında temel bir rol oynar; çünkü reaktif oksijen türleri, gelişme ve stres algılaması gibi biyolojik süreçlerde sinyal molekülleri olarak ince düzeylerde etki etmektedir (Mittler *et al.* 2004). Tioredoksin H, disülfid köprülerini indirgeyerek redoks regülasyonunda rol oynayan bir proteindir (Gelhay *et al.* 2004). Tioredoksin H'nin oksidatif stres koşulları altında teşvik edildiği bilinmektedir (Serrato and Cejudo 2003). Buğdayda tioredoksin H ifadesinin analizi, bileşiklerin bitkiden gelişmekte olan tohumlara transferinde rol oynadığı gösterilmiştir (Serrato and Cejudo 2003).

Lökoaglutinasyon edici fitohemaglutinin, kırmızı böbrek fasulye tohumlarının önemli bir kısmı olan ve alerjik reaksiyonlardan sorumlu olan fitohemaglutininlerin alt birimlerinden biridir (Fitches *et al.* 2001).

Araştırmamızda, fotosentezle ilişkili üç protein tanımlanmıştır (Çizelge 4.1). Işık reaksiyonu ile ilişkili proteinler için tamamen açmış çiçeklerde oksijen-çıkışı arttırıcı protein 2 (benek 26) ve magnezyum-şelataz altbirim chli (benek 63) azalan yönde düzenlenirken, klorofil a/b bağlama proteini 215 (benek 34) artan yönde düzenlenmiştir. Soya fasulyesinde çiçek gelişiminin geç evrelerinde düşük fotosentetik aktivitenin muhtemel nedeninin fotosentezle ilgili proteinlerin daha düşük bollukta olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Ahsan and Komatsu 2009).

Ayrıca, araştırmamızda hücre iskeleti ve hücre çeperi, sekonder metabolizma, amino asit metabolizmasında fonksiyon gören ve fonksiyonu bilinmeyen bazı proteinler de belirlenmiştir. Bu dört proteinin üçü çiçek gelişimi sırasında bolluğunda azalma göstermiştir (Çizelge 4.1). Glisince-zengin RNA-bağlayıcı protein 1 (benek 8), translasyonel olarak kontrol edilen tümör proteini (TCTP) homologu (benek 27) ve kafeoil-CoA O-metil transferaz (benek 43) ifadesi çiçek gelişimi sırasında azalmıştır. Bazı hücre iskeleti ve hücre çeperi ile ilişkili proteinlerin zamansal düzenlenme profilleri, çiçek gelişimi evrelerinin geç dönemlerinde hücre genişleme aktivitesinin azaldığını açıkça göstermektedir. TCTP, mitotik hücre bölünmesinde önemli bir rol oynamakta, kalsiyumu bağlayabilmekte ve özellikle kalsiyum taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır (Nie *et al.* 2010). Bitkilerde, TCTP, bitkilerdeki çevresel streslere ya da değişen koşullara verilen cevap ve büyüme arasında önemli bağlantı sağlamaktadır (Berkowitz *et al.* 2008). Bununla birlikte, aktin-97 (benek 66) proteini, tamamen açmış çiçeklerde artış göstermiştir. Aktinin sitoplazmik akış, hücre şekli belirlenmesi, organel hareketi ve uzama büyümesi gibi birçok hücresel işlevlere katıldığı bildirilmiştir (McDowell *et al.* 1996). Hücre genişlemesi çoğunlukla kuvvetli aktin ve mikrotübül hücre iskelet dinamikleriyle belirlenmektedir (Dong *et al.* 2001). *Agapanthus praecox*'daki çiçek tomurcuğunun farklılaşması sürecinde aktin, α -tübülin ve β -tübülin

proteinlerinin bolluğu vejetatifden teşvik edilen evreye kadar stabildir ve bunu reproduktif tomurcuk evresinde önemli bir artış izlemektedir (Zhang *et al.* 2013).

Esas olarak sekonder metabolitlerin üretiminde rol alan çeşitli metabolik yolların çiçek gelişimi sırasında aktive olduğu gösterilmiştir (Ahsan and Komatsu 2009). Bunun aksine, kalkon-flavonon izomeraz 1B-1 (benek 28) çiçek gelişimi sırasında önemli bir azalma göstermiştir. Kalkon flavonon izomeraz, kalkonların flavononlara dönüştürülmesini katalizleyen flavonoid biyosentez yolundaki anahtar enzimlerden biridir (Druka *et al.* 2003). Çiçek organlarında sekonder metabolitlerin biyosentezinde yer alan yollar birçok bitki türünde gözlemlenmiştir (Laitinen *et al.* 2005, Sharma *et al.* 2012). Bununla birlikte, *Citrus* bitkisinin meyve veren çiçekleri ile mukayese edildiğinde meyve vermeyen çiçeklerinde bu proteinin ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (Muñoz-Fambuena *et al.* 2013).

Sonuç olarak, bu çalışma *T. turcica*'nın çiçek gelişimi sırasındaki çiçek proteom değişikliklerine genel bir bakış sağlamaktadır. Proteomik sonuçlarımız protein ve şeker metabolizmasının çiçek gelişimi için ön koşul olduğunu göstermektedir. Dahası, stres savunmasına katılan birçok proteinin seviyeleri, dikkate alınan gelişim evreleri ile dikkat çekici şekilde düzenlenmiş ve böylece bunların ifadelerinin gelişimsel olarak düzenlenebileceğini ileri sürülebilir. Bununla birlikte, çiçek gelişimi sırasında çok önemli düzenleyici roller oynayabilen bazı düşük-bolluktaki proteinler 2-DE jellerinde belirlenmemiş ve dolayısıyla çalışmamıza dahil edilmemiştir. Bu nedenle, çiçek gelişiminde çiçek metabolizması ve onun kontrolünün karmaşıklığını anlamak için genomik, metabolomik ve transkriptomik gibi diğer omik teknolojileri ile proteomiği birleştirmenin gerekli olduğu kaçınılmazdır.

KAYNAKLAR

- Ahsan, N., Lee D.G., Alam, I., Kim, P., Lee, J., Ahn, Y.O., Kwak, S.S., Lee, I.J., Bahk, J.D., Kang, K.Y., Renaut, J., Komatsu, S. and Lee, B.H. (2008). Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, **8**: 3561-3576.
- Ahsan, N. and Komatsu, S. (2009). Comparative analyses of the proteomes of leaves and flowers at various stages of development reveal organ-specific functional differentiation of proteins in soybean. *Proteomics*, **9**: 4889-4907.
- Baba, A., Nogueira, F., Pinheiro, C., Brasil, J., Jereissati, E., Jucá, T., Soares, A., Santos, M., Domont, G. and Campos, F. (2008). Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Science*, **175**: 717–723.
- Bai, S., Willard, B., Chapin, L.J., Kinter, M.T., Francis, D.M., Stead, A.D. and Jones, M.L. (2010). Proteomic analysis of pollination-induced corolla senescence in petunia. *Journal of Experimental Botany*, **61**: 1089–1109.
- Balbuena, T.S., Silveira, V., Junqueira, M., Dias, L.L., Santa-Catarina, C., Shevchenko, A. and Floh, E.I. (2009). Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *Journal of Proteomics*, **72**: 337–352.
- Becker, J.D., Boavida, L.C., Carneiro, J., Haury, M. and Feijo, J.A. (2003). Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiology*, **133**: 713–725.
- Ben-Meir, H., Zuker, A., Weiss, D. and Vainstein, A. (2002). Molecular Control of Floral Pigmentation: Anthocyanins. Kluwer, Dordrecht 2002, pp. 253–272.
- Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S. and Masle, J. (2008). Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **20**: 3430–3447.
- Bertone, P. and Snyder, M. (2005). Prospects and challenges in proteomics. *Plant Physiology*, **138**: 560–562.

- Bi, Y., Wei, Z., Shen, Z., Lu, T., Cheng, Y., Wang, B. and Yang, C. (2010). Comparative temporal analyses of the *Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* litv. apical bud proteome from dormancy to growth. *Molecular Biology Reports*, **38**: 721–729.
- Bian, F., Zheng, C., Qu, F., Gong, X. and You, C. (2010). Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Molecular Biology Reports*, **28**: 22–31.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. and Leaver, C.J. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **42**: 567–585.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, **25**: 1327–1333.
- Chan, J., Calder, G., Fox, S. and Lloyd, C. (2007). Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells. *Nature Cell Biology*, **9**: 171–175.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J.-K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, **45**: 437–448.
- Chen, S., Liu, H., Chen, W., Xie, D. and Zheng, S. (2009). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in longan flowering reversion buds. *Scientia Horticulturae*, **122**: 275–280.
- Constan, D., Froehlich, J. E., Rangarajan, S. and Keegstra, K. (2004). A stromal Hsp100 protein is required for normal chloroplast development and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **136**: 3605–3615.

- Dafny-Yelin, M., Guterman, I., Menda, N., Ovadis, M., Shalit, M., Pichersky, E., Zamir, D., Lewinsohn, E., Adam, Z., Weiss, D. and Vainstein, A. (2005). Flower proteome: changes in protein spectrum during the advanced stages of rose petal development. *Planta*, **222**: 37-46.
- Dai, S., Li, L., Chen, T., Chong, K., Xue, Y. and Wang, T. (2006). Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth. *Proteomics*, **6**: 2504–2529.
- Dai, S., Wang, T., Yan, X. and Chen, S. (2007). Proteomics of pollen development and germination. *Journal of Proteome Research* **6**: 4556–4563.
- Davis, P.H., Mill, R.R. and Kit, T. (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh.
- de Jong, F., Mathesius, U., Imin, N. and Rolfe, B.G. (2007). A proteome study of the proliferation of cultured *Medicago truncatula* protoplasts. *Proteomics*, **7**: 722–736.
- Dembinsky, D., Woll, K., Saleem, M., Liu, Y., Fu, Y., Borsuk, L.A., Lamkemeyer, O., Fladerer, C., Madlung, J., Barbazuk, B., Nordheim, A., Nettleton, D., Schnable, P.S. and Hochholdinger, F. (2007). Transcriptomic and proteomic analyses of pericycle cells of the maize primary root. *Plant Physiology*, **145**: 575–588.
- Deng, J., Fu, Z., Chen, S., Damaris, R.N., Wang, K., Li, T. and Yang, P. (2015). Proteomic and epigenetic analyses of lotus (*Nelumbo nucifera*) petals between red and white cultivars. *Plant Cell Physiology*, **56**: 1546–1555.
- Dettmer, J., Schubert, D., Calvo-Weimar, O., Stierhof, Y.-D., Schmidt, R. and Schumacher, K. (2005). Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development. *The Plant Journal*, **41**: 117-124.
- Dong, C., Xia, G., Hong, Y., Ramachandran, S., Kost, B. and Chua, N. (2001). ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate β -actin organization, cell expansion, and organ growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**: 1333–1346.

- Druka, A., Kudrna, D., Rostoks, N., Brueggeman, R., von Wettstein, D. and Kleinhofs, A. (2003). Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): physical, genetic and mutation mapping. *Gene*, **302**: 171–178.
- Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles, *Plant Physiology*, **135**: 1893–1902
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. and Adıgüzel, N. (2000). Red data book of Turkish plants (*Pteridophyta and Spermatophyta*). *TDKA and Van Centennial University Press, Ankara*.
- Faurobert, M., Mihr, C., Bertin, N., Pawlowski, T., Negroni, L., Sommerer, N. and Causse, M. (2007). Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiology*, **143**: 1327–1346.
- Fitches, E., C Ilett, C., Gatehouse, A.M., Gatehouse, L.N., Greene, R., Edwards, J.P. and Gatehouse, J.A. (2001). The effects of *Phaseolus vulgaris* erythro- and leucoagglutinating isolectins (PHA-E and PHA-L) delivered via artificial diet and transgenic plants on the growth and development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; lectin binding to gut glycoproteins in vitro and in vivo. *Journal of Insect Physiology*, **47**: 1389–1398.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, **119**: 355–364.
- Foyer, C. and Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment*, **28**: 1056–1071.
- Franco, O.L., Pelegri, P.B., Gomes, C.P.C., Souza, A., Costa, F.T., Domont, G., Quirino, B.F., Eira, M.T. and Mehta, Â. (2009). Proteomic evaluation of coffee zygotic embryos in two different stages of seed development. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**: 1046–1050.
- Garay-Arroyo, A., Pineyro-Nelson, A., Garcia-Ponce, B., Sanchez, M.D. and Alvarez-Buylla E.R. (2012). When ABC becomes ACB. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 2377–2395.

- Gelhaye, E., Rouhier, N. and Jacquot, J.P. (2004). The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **42**: 265–271.
- Gómez, A., López, J.A., Pintos, B., Camafeita, E. and Bueno, M.A. (2009). Proteomic analysis from haploid and diploid embryos of *Quercus suber* L. identifies qualitative and quantitative differential expression patterns. *Proteomics*, **9**: 4355–4367.
- Hochholdinger, F., Sauer, M., Dembinsky, D., Hoecker, N., Muthreich, N., Saleem, M. and Liu, Y. (2006). Proteomic dissection of plant development. *Proteomics*, **6**: 4076–4083.
- Holmes-Davis, R., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman, W.J. and McCormick, S. (2005). Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, **5**: 4864–4884.
- Holmes, P., Farquharson, R., Hall, P.J. and Rolfe, B.G. Proteomic analysis of root meristems and the effects of acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicides in the root of *Medicago truncatula*. *Journal of Proteome Research*, **5**: 2309–2316.
- Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, **81**: 802–806.
- Imin, N., Kermin, T., Weinman, J.J. and Rolfe, B.G. (2001). Characterisation of rice anther proteins expressed at the young microspore stage. *Proteomics*, **1**: 1149–1161.
- Inzé, D. and De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, **40**: 77–105.
- Jackson-Constan, D., Akita, M. and Keegstra, K. (2001). Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1541**: 102–113.
- Jones, M.L. (2013). Mineral nutrient remobilization during corolla senescence in ethylene- sensitive and -insensitive flowers. *AoB PLANTS*, **5**: plt023.
- Joosen, R., Cordewener, J., Supena, E.D.J., Vorst, O., Lammers, M., Maliepaard, C., Zeilmaker, T., Miki, B., America, T., Custers, J. and Boutilier K. (2007). Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers

- associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiology*, **144**:155–172.
- Kerim, T., Imin, N., Weinman, J.J. and Rolfe, B.G. (2003). Proteome analysis of male gametophyte development in rice anthers. *Proteomics*, **3**: 738–751.
- Kim, S.T., Cho, K.S., Jang, Y.S. and Kang, K.Y. (2001). Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*, **22**: 2103-2109.
- Komatsu, S. and Hossain, Z. (2013). Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 71.
- Koshino, L.L., Gomes, C.P., Silva, L.P., Eira, M.T.S., Bloch, C., Franco, O.L. and Mehta, A. (2008). Comparative proteomical analysis of zygotic embryo and endosperm from *Coffea arabica* seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56**: 10922– 10926.
- Laitinen, R.A., Immanen, J., Auvinen, P., Rudd, S., Alatalo, E., Paulin, L., Ainasoja, M., Kotilainen, M., Koskela, S., Teeri, T.H. and Elomaa, P. (2005). Analysis of the floral transcriptome uncovers new regulators of organ determination and gene families related to flower organ differentiation in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Genome Research*, **15**: 475-486.
- Laitinen, R.A.E., Pöllänen, E., Teeri, T. H., Elomaa, P. and Kotilainen, M. (2007). Transcriptional analysis of petal organogenesis in *Gerbera hybrida*. *Planta*, **226**: 347–360.
- Laohavisit, A. and Davies, J.M. (2011). Annexins. *New Phytologist*, **189**: 40–53.
- Lee, K.H., Kim, Y., Park, C. and Kim, H. (2008). Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* mutant ntm1-D with disturbed cell division. *Molecules & Cells*, **25**: 70–77.
- Li, K., Zhu, W., Zeng, K., Zhang, Z., Ye, J., Ou, W., Rehman, S., Heuer, B. and Chen, S. (2010). Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. *Proteome Science*, **8**: 10–21.

- Li, M., Sha, A., Zhou, X. and Yang, P. (2012). Comparative proteomic analyses reveal the changes of metabolic features in soybean (*Glycine max*) pistils upon pollination. *Sexual Plant Reproduction*, **25**: 281–291.
- Li, X., Xu, W., Chowdhury, M.R. and Jin, F. (2014). Comparative proteomic analysis of labellum and inner lateral petals in *Cymbidium ensifolium* flowers. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**: 19877–19897.
- Li, X., Jackson, A., Xie, M., Wu, D., Tsai, W., & Zhang, S. (2016). Proteomic insights into floral biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1864**: 1050–1060.
- Liu, H., Liu, Y., Yang, M. and Shen, S. (2009). A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas*. *Journal of Integrative Plant Biology*, **51**: 850–857.
- Lopez-Casado, G., Covey, P.A., Bedinger, P.A., Mueller, L.A., Thannhauser, T.W., Zhang, S., Fei, Z., Giovannoni, J.J. and Rose, J.K. (2012). Enabling proteomic studies with RNA-seq: the proteome of tomato pollen as a test case. *Proteomics*, **12**: 761–774.
- Mandaokar, A., Kumar, V. D., Amway, M. and Browse, J. (2003). Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development. *Plant Molecular Biology*, **52**: 775–786.
- Marsoni, M., Bracale, M., Espen, L., Prinsi, B., Negri, A.S. and Vannini, C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Reports*, **27**: 347–356.
- McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., An, Y.Q. and Meagher, R.B. (1996). Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **142**: 587–602.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*, **9**: 490-498.
- Morey, K.J., Ortega, J.L. and Sengupta-Gopalan, C. (2002). Cytosolic glutamine synthetase in soybean is encoded by a multigene family, and the members are regulated in an organ- specific and developmental manner. *Plant Physiology*, **128**: 182–193.

- Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., Reig, C., Agustí, M., Tárraga, S., Lisón, P., Iglesias, D.J., Primo-Millo, E. and González-Mas, M.C. (2013). Proteomic study of 'Moncada' mandarin buds from on- versus off-crop trees. *Plant Physiology and Biochemistry*, **73**: 41-55.
- Muthreich, N., Schützenmeister, A., Schütz, W., Madlung, J., Krug, K., Nordheim, A., Piepho, H-P. and Hochholdinger, F. (2010). Regulation of the maize (*Zea mays* L.) embryo proteome by RTCS which controls seminal root initiation. *European Journal of Cell Biology*, **89**: 242–249.
- Nakamura, Y., Teo, N.Z.W., Shui, G., Chua, C.H.L., Cheong, W.F., Parameswaran, S., Koizumi, R., Ohta, H., Wenk, M.R. and Ito, T. (2014). Transcriptomic and lipidomic profiles of glycerolipids during *Arabidopsis* flower development. *New Phytologist*, **203**: 310-322.
- Nautrup-Pedersen, G., Dam, S., Laursen, B. S., Siegumfeldt, A.L., Nielsen, K., Goffard, N., Stærfeldt, H.H., Friis, C., Sato, S., Tabata, S., Lorentzen, A., Roepstorff, P. and Stougaard, J. (2010). Proteome analysis of pod and seed development in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Proteome Research*, **9**: 5715–5726.
- Nie, Z.M., Lv, Z.B., Qian, J.W., Chen, J., Li, S.S., Sheng, Q., Wang, D., Shen, H., Yu, W., Wu, X. and Zhang, Y. (2010). Molecular cloning and expression characterization of translationally controlled tumor protein in silk worm pupae. *Molecular Biology Reports*, **37**: 2621–2628.
- Nogueira, F., Goncalves, E., Jereissati, E., Santos, M., Costa, J., Oliveira-Neto, O., Soares, A.A., Domont, G.B., Campos, F.A.P. (2007). Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Cell Report*, **26**: 1333–1343.
- Noir, S., Bräutigam, A., Colby, T., Schmidt, J. and Panstruga, R. (2005) A reference map of the *Arabidopsis thaliana* mature pollen proteome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **337**: 1257–1266.
- Nozu, Y., Tsugita, A. and Kamijo, K. (2006) Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course. *Proteomics*, **6**: 3665–3670

- Okamoto, T., Higuchi, K., Shinkawa, T., Isobe, T., Lorz, H., Koshiba, T. and Kranz, E. (2004) Identification of major proteins in maize egg cells. *Plant Cell Physiology*, **45**: 1406–1412.
- O'Maoiléidigh, D.S., Graciet, E. and Wellmer, F. (2014). Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytologist*, **201**: 16-30.
- Palma, J.M., Corpas, F.J. and del Río, L.A. (2011). Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *Journal of Proteomics*, **74(8)**: 1230–1243.
- Pan, Z., Guan, R., Zhu, S. and Deng, X. (2009). Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Reports*, **28**: 281–289.
- Pang, C., Wang, H., Pang, Y., Xu, C., Jiao, Y., Qin, Y., Western, T.L., ShuXun, Y. and YuXian, Z. (2010). Comparative proteomics indicate that biosynthesis of pectic precursors is important for cotton fiber and *Arabidopsis* root hair elongation. *Molecular & Cellular Proteomics*, **9**: 2019–2033.
- Pasternak, T., Ötvös, K., Domoki, M. and Fehér, A. (2007). Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin. *Plant Growth Regulation*, **51**: 109–117.
- Peters, J.M. (1994). Proteasomes: protein degradation machines of the cells. *Trends in Biochemical Sciences*, **19**: 377–382.
- Petrášek, J. and Schwarzerová, K. (2009). Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**: 728–734.
- Pignocchi, C., Kiddle, G., Hernández, I., Foster, S.J., Asensi, A., Taybi, T., Barnes, J. and Foyer, C.H. (2006). Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiology*, **141**: 423–435.
- Rejon, J.D., Delalande, F., Schaeffer-Reiss, C., Carapito, C., Zienkiewicz, K., de Dios Alche, J., Rodriguez-Garcia, M.I., Van Dorsselaer, A. and Castro, A.J. (2013).

- Proteomics profiling reveals novel proteins and functions of the plant stigma exudate. *Journal Experimental Botany*, **64**: 5695–5705.
- Rocco, M., D'Ambrosio, C., Arena, S., Faurobert, M., Scaloni, A. and Marra, M. (2006). Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. *Proteomics*, **6**: 3781-3791.
- Rolland-Lagan, A.G., Bangham, J.A. and Coen, E. (2003). Growth dynamics underlying petal shape and asymmetry. *Nature*, **422**: 161-163.
- Rose, J.K.C., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M. and Saravanan, R.S. (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *The Plant Journal*, **39**: 715–733.
- Saini, P., Eyler, D.E., Green, R. and Dever, T.E. (2009). Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature*, **459**: 118–121.
- Saleem, M., Lamkemeyer, T., Schützenmeister, A., Fladerer, C., Piepho, H., Nordheim, A. and Hochholdinger, F. (2009). Tissue specific control of the maize (*Zea mays* L.) embryo, cortical parenchyma, and stele proteomes by RUM1 which regulates seminal and lateral root initiation. *Journal of Proteome Research*, **8**: 2285–2297.
- Sang, Y.L., Xu, M., Ma, F.F., Chen, H., Xu, X.H., Gao, X.Q. and Zhang, X.S. (2012). Comparative proteomic analysis reveals similar and distinct features of proteins in dry and wet stigmas. *Proteomics*, **12**: 1983–1998.
- Schiltz, S., Gallardo, K., Huart, M., Negroni, L., Sommerer, N. and Burstin, J. (2004). Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. *Plant Physiology*, **135**: 2241–2260.
- Schnable, P.S., Hochholdinger, F. and Nakazono, M. (2004). Global expression profiling applied to plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 50–56.
- Sedeek, K.E., Qi, W., Schauer, M.A., Gupta, A.K., Poveda, L., Xu, S., Liu, Z.J., Grossniklaus, U., Schiestl, F.P. and Schluter, P.M. (2013). Transcriptome and proteome data reveal candidate genes for pollinator attraction in sexually deceptive orchids. *PLoS One*, **8**: e64621.

- Serrato, A.J. and Cejudo, F.J. (2003). Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*, **217**: 392–399.
- Sghaier-Hammami, B., Drira, N. and Jorrín-Novo, J.V. (2009). Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. *Journal of Proteomics*, **73**: 161–177.
- Sharma, R., Agarwal, P., Ray, S., Deveshwar, P., Sharma, P., Sharma, N., Nijhawan, A., Jain, M., Singh, A.K., Singh, V.P., Khurana, J.P., Tyagi, A.K. and Kapoor, S. (2012). Expression dynamics of metabolic and regulatory components across stages of panicle and seed development in indica rice. *Functional & Integrative Genomics*, **12**: 229-248.
- Sheoran, I.S., Pedersen, E.J., Ross, A.R. and Sawhney, V.K. (2009). Dynamics of protein expression during pollen germination in canola (*Brassica napus*). *Planta*, **230**: 779–793.
- Shi, F., Takasaki, H. and Komatsu, S. (2008). Quantitative analysis of auxin-regulated proteins from basal part of leaf sheaths in rice by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Phytochemistry*, **69**: 637–646.
- Shi, J., Zhen, Y. and Zheng, R.-H. (2010). Proteome profiling of early seed development in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *Journal of Experimental Botany*, **61(9)**: 2367–2381.
- Shima, D.T., Scales, S.J., Kreis, T.E. and Pepperkok, R. (1999). Segregation of COPI-rich domains in endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport complexes. *Current Biology*, **9**: 821-824.
- Singh, V.K., Garg, R. and Jain, M. (2013). A global view of transcriptome dynamics during flower development in chickpea by deep sequencing. *Plant Biotechnology Journal*, **11**: 691-701.
- Sinha, P., Poland, J., Schnölzer, M. and Rabilloud, T. (2001). A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **1**: 835-840.

- Strompen, G., Dettmer, J., Stierhof, Y.-D., Schumacher, K., Jürgens, G. and Mayer, U. (2005). *Arabidopsis* vacuolar H⁺-ATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis. *The Plant Journal*, **41**: 125–132.
- Suzuki, Y., Ohta, N., Sakurai, S., Aoyagi, M. and Fukase, S. (2009). Examination about positive ratio of pollen antigens by scratch test. *Arerugi=[Allergy]*, **58**: 1619–1628.
- Takáč, T., Pechan, T., and Samaj, J. (2011). Differential proteomics of plant development. *Journal of Proteomics*, **74(5)**: 577–588.
- Tan, K., Vural, M. and Küçüködük, M. (1983). An unusual new *Thermopsis* from Turkey. *Notes RBG Edinburgh*, **40**: 515–518.
- Theissen, G. and Melzer, R. (2007). Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. *Annals of Botany*, **100**: 603–619.
- Thompson, J.E., Hopkins, M.T., Taylor, C. and Wang, T.W. (2004). Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implications for plant growth and development. *Trends in Plant Science*, **9**: 174–179.
- Tucker, S.C. (2003). Floral development in legumes. *Plant Physiology*, **131**: 911–926.
- Uchiumi, T., Shinkawa, T., Isobe, T. and Okamoto, T. (2007). Identification of the major protein components of rice egg cells. *Journal of Plant Research*, **120**: 575–579.
- Wagner, R.E., Mugnaini, S., Sniezko, R., Hardie, D., Poulis, B., Nepi, M., Pacini, E. and Aderkas, P. (2007). Proteomic evaluation of gymnosperm pollination drop proteins indicates highly conserved and complex biological functions. *Sexual Plant Reproduction*, **20**: 181–189.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, **100**: 681–697.
- Wilson, Z.A. and Zhang, D.B. (2009). From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 1479–1492.
- Wojciechowski, M.F. (2003). Reconstructing the phylogeny of legumes (*Leguminosa*): an early 21st century perspective. In: Klitgaard, B.B., Bruneau, A., editors.

- Advances in Legume Systematics, Part 10, Higher Level Systematics, Wojciechowski, M.F. (2003). Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosa): an early 21st century perspective. In: Klitgaard, B.B., Bruneau, A., editors. Advances in Legume Systematics, Part 10, Higher Level Systematics, *Royal Botanic Gardens, Kew*, pp. 5-35.
- Wu, J.X., Xu, Z.L., Zhang, Y.J., Chai, L.J., Yi, H.L. and Deng, X.X. (2014). An integrative analysis of the transcriptome and proteome of the pulp of a spontaneous late-ripening sweet orange mutant and its wild type improves our understanding of fruit ripening in citrus. *Journal of Experimental Botany*, **65**: 1651–1671.
- Yang, Y., Bian, S., Yao, Y. and Liu, J. (2008). Comparative proteomic analysis provides new insights into the fiber elongating process in cotton. *Journal of Proteome Research*, **7**: 4623–4637.
- Yang, M., Zhu, L., Xu, L., Pan, C. and Liu, Y. (2014). Comparative transcriptomic analysis of the regulation of flowering in temperate and tropical lotus (*Nelumbo nucifera*) by RNA-Seq. *Annals of Applied Biology*, **165**: 73-95.
- Zaidi, M.A., O' Leary, S., Wu, S., Gleddie, S., Eudes, F., Laroche, A. and Robert, L.S. A molecular and proteomic investigation of proteins rapidly released from triticale pollen upon hydration. *Plant Molecular Biology*, **79**: 101–121.
- Zeng, J.G., Liu, Y.S., Liu, W., Liu, X.B., Liu, F.Q., Huang, P., Zhu, P.C., Chen, J.J., Shi, M.M., Guo, F., Cheng, P., Zeng, J., Liao, Y.F., Gong, J., Zhang, H.M., Wang, D.P., Guo, A.Y. and Xiong, X.Y. (2013). Integration of transcriptome, proteome and metabolism data reveals the alkaloids biosynthesis in *Macleaya cordata* and *Macleaya microcarpa*. *PLoS One*, **8(1)**: e53409.
- Zhang, J., Ma, H., Chen, S., Ji, M., Perl, A., Kovacs, L. and Chen, S. Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon—a proteomic approach. *Plant Science*, **177**: 103–113.
- Zhang, D., Ren, L. and Yue, J.H. (2013). A comprehensive analysis of flowering transition in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton by using transcriptomic and proteomic techniques. *Journal of Proteomics*, **80**: 1-25.

- Zhang, X.L., Qi, M.F., Xu, T., Lu, X.J. and Li, T.L. (2015). Proteomics profiling of ethylene-induced tomato flower pedicel abscission. *Journal of Proteomics*, **121**: 67–87.
- Zhao, P., Wang, L., Han, L., Wang, J., Yao, Y., Wang, H., Du, X.-M., Luo, Y.-M. and Xia, G.-X. (2010). Proteomic identification of differentially expressed proteins in the Ligon lintless mutant of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Proteome Research*, **9**: 1076–1087.
- Zou, J., Song, L., Zhang, W., Wang, Y., Ruan, S. and Wu, W. (2009). Comparative proteomic analysis of *Arabidopsis* mature pollen and germinated pollen. *Journal of Integrative Plant Biology*, **51**: 438–55.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emre PEHLİVAN
Doğum Yeri ve Tarihi : 28.03.1990, Afyonkarahisar
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : e.pehhlivan@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Afyon Cumhuriyet Lisesi, 2008
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2013
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2016

Yayınları (SCI ve diğer) :

- 1) Yıldız, M., **Pehlivan, E.** ve Terzi, H., Türkiye Endemiği *Thermopsis turcica* (Fabaceae)'da Çiçek Gelişiminin Karşılaştırmalı Proteomik Analizleri, 2. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, 45, 31 Ağustos-03 Eylül 2016, MERSİN.
- 2) Yıldız, M., Terzi, H., Sakartepe, E., **Pehlivan, E.** ve Kaya, F., Mısır Fidelerinde Kadmiyum Stresinin Oksidatif Etkilerinin Araştırılması, 2. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, 101, 31 Ağustos-03 Eylül 2016, MERSİN.