



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MAYDANOZDA (*Petroselinum crispum* (Mill.)
Nym. ex A.W. Hill) HASAT SONRASI
BOZULMANIN GEN EKSPRESYONU
DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Günel KÜÇÜKTUNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

**2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Günel KÜÇÜKTUNÇ tarafından hazırlanan “MAYDANOZDA (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A.W. Hill) HASAT SONRASI BOZULMANIN GEN EKSPRESYONU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması 16/06/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç. Dr. Fatih ERCİ

.....

Danışman

Doç. Dr. Ayşe Özgür UNCU

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Necibe KAYAK

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Günel KÜÇÜKTUNÇ

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYDANOZDA (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A.W. Hill) HASAT SONRASI BOZULMANIN GEN EKSPRESYONU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Günel KÜÇÜKTUNÇ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Özgür UNCU

2025, 60+x Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Ayşe Özgür UNCU

Doç. Dr. Fatih ERCİ

Dr. Öğr. Üyesi Necibe KAYAK

Apiaceae familyasına ait Maydanoz (*Petroselinum crispum*) çok eski tarihlerden bu dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilen ve tüketilen bir sebzedir. Maydanoz, lezzeti, aroması ve besleyiciliği ile dünya genelinde tüm mutfaklarda, içerisindeki aktif biyomoleküller açısından da tıbbi olarak büyük önem taşır. Maydanoz'un geniş kullanım alanı ve tarımsal değeri göz önüne alındığında raf ömrünün kısalığı hem üretici hem de tüketiciye yansımaktadır. Üstelik maydanoz gibi taze sebzelerin raf ömürleri, iyi saklama koşulları altında ve uygun tedbirlerle dahi birkaç haftadan daha uzun değildir.

Dünya çapında 1,2 milyon hektardan fazla alanda yetiştirilen Apiaceae familyası hakkında, yaygın kullanım alanı ve tıbbi önemi de göz önüne alındığında, yürütülen çalışmalar oldukça önem arz etmektedir, maydanoz dahil birçok önemli türde genomik veriler ise halen yeterli değildir. Bu tez çalışması kapsamında maydanozda hasat sonrası bozulma, diğer adıyla pörsüme ya da kalite kaybı araştırılacaktır. Bozulma, sebzenin zaman içinde kalitesinin, durumunun veya değerinin giderek kötüleşme sürecini ifade eder ve renk değişikliği, artan incelik, hoş olmayan kokular, solma veya küflenme olarak görülebilir. Çalışma maydanoz üretimi sonrası tazeliğin uzun süre korunmasına hizmet edecek nitelikte bilgi üretilmesi amacını taşıırken aynı zamanda maydanozun transkriptom profilinin çıkarılmasıyla birlikte literatür katkı sağlaması ve potansiyel pratik tarımsal uygulamalara da yol göstermesi amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyoinformatik, gen ekspresyonu, hasat sonrası bozulma, *Petroselinum crispum*

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF POST-HARVEST DETERIORATION IN PARSLEY (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A.W. Hill) AT THE GENE EXPRESSION LEVEL

Günel KÜÇÜKTUNÇ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

Advisor: Doç. Dr. Ayşe Özgür UNCU

2025, 60+x Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Ayşe Özgür UNCU

Assoc. Prof. Dr. Fatih ERCİ

Asst. Prof. Dr. Necibe KAYAK

Parsley (*Petroselinum crispum*), which belongs to the Apiaceae family, is a vegetable that has been widely cultivated and consumed around the world since ancient times. Parsley is of great importance in all cuisines globally due to its flavor, aroma, and nutritional value, and it also holds significant medicinal value because of the active biomolecules. Given the wide range of uses and agricultural value of parsley, its short shelf life affects both producers and consumers. Moreover, the shelf life of fresh vegetables like parsley, even under good storage conditions and appropriate measures, is not longer than a few weeks.

Considering that the Apiaceae family is cultivated on more than 1.2 million hectares worldwide, and given its widespread use and medicinal importance, the studies carried out are of great importance, and genomic data are still insufficient for many important species, including parsley. Furthermore, genomic data for many important species, including parsley, are still not available. This thesis aims to investigate post-harvest deterioration in parsley, also known as wilting or quality loss. Deterioration refers to the process of gradual decline in quality, condition, or value of the vegetable over time, which can manifest as color changes, increased limpness, unpleasant odors, wilting, or mold. While the study aims to produce knowledge that would facilitate maintaining the freshness of parsley for a longer post-harvest period, it also intends to contribute to the literature by producing the transcriptome profile of parsley to provide guidance for potential practical agricultural applications.

Keywords: Bioinformatics, gene expression, *Petroselinum crispum*, post harvest deterioration.

ÖNSÖZ

Bu akademik çalışmanın ortaya çıkış süreci yalnızca bireysel bir çabanın değil; bilgiye duyulan saygının, emeğin ve yol göstericiliğin bir bileşkesidir. Emek veren, katkı sunan ve manevi desteğiyle yanımda olan tüm kıymetli insanlara teşekkürü bir borç bilirim. Her şeyden önce, bilgiye olan bağlılığı, akademik disiplini ve yönlendirici yaklaşımıyla bu sürecin sağlıklı ilerlemesinde çok önemli bir rol oynayan değerli danışmanım Doç. Dr. Ayşe Özgür Uncu'ya ve çalışmalarım boyunca yardım ve desteğini esirgemeyen çok kıymetli hocam Doç. Dr. Ali Tevfik Uncu'ya desteklerinden dolayı en içten şükranlarımı sunarım.

Bu süreçte her adımda yanımda olan, anlayışı ve desteğiyle bana güç veren eşim Süleyman Küçüktunç'a gönülden teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca gösterdiği içten destek ve sağladığı denge, bu süreci benim için daha huzurlu ve anlamlı hâle getirdi. Varlığını hissetmek, bu süreci sadece bir akademik zorunluluk olmaktan çıkarıp, birlikte paylaştığımız anlamlı bir emek haline getirdi.

Ve en büyük teşekkürü, bu satırları özgürce yazabilmemi, bilim üretebilmemi ve bir kadın olarak eğitim hakkımı özgürce kullanabilmemi mümkün kılan Türkiye Cumhuriyeti'nin kurucusu Gazi Mustafa Kemal Atatürk'e borç bilirim. Fikirleriyle, devrimleriyle ve öngörüsüyle hâlâ yolumuzu aydınlatan Ulu Önder Mustafa Kemal Atatürk'e minnetlerimi sunuyor ve "Hayatta en hakiki mürşit ilimdir" diyerek bize çizdiği yolda yürümekten onur duyuyorum.

Günel KÜÇÜKTUNÇ
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Maydanoz (<i>Petroselinum crispum</i>).....	1
1.1.1. Morfoloji, Anatomi ve Fizyoloji.....	1
1.1.2. Genetik ve Taksonomi	3
1.2. Apiaceae Familyası.....	5
1.2.1 Genetik Altyapı ve Yapılan Çalışmalar	6
1.3 Omiks Teknolojileri.....	7
1.3.1 Yeni Nesil Sekanslama	8
1.3.1.1 Birinci Nesil Sekanslama.....	9
1.3.1.2 İkinci Nesil Sekanslama.....	10
1.3.1.3 Üçüncü Nesil Sekanslama	13
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Gen Ekspresyonu RNA-seq Çalışmaları İçin Kullanılan Total RNA'nın İzolasyonu.....	19
3.2. RNA-seq Çalışması ve Biyoinformatik RNA-seq Veri Analizleri	19
3.3. Ham Sekans Verilerinin Kalite Analizleri ve Transkriptom Birleştirme (Assembly) Çalışması	20
3.4. Birleştirilmiş Tüm Transkriptomun Anotasyonu.....	21
3.5. Gen Ekspresyonu Değişimlerinin Belirlenmesi Analizleri.....	21
3.6. Diferansiyel Ekspresyon Analiz Sonuçlarının Yolak Zenginleştirme Analizi	22
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI	23
4.1. RNA-seq Veri Seti ve Biyoinformatik RNA-seq Analiz Sonuçları	23
4.2. Ham Sekans Verilerinin Kalite Analiz Değerleri	23
4.3 Transkriptom Birleştirme (Assembly) Sonuç Verisi	26
4.4. Birleştirilmiş Tüm Transkriptomun Anotasyon Verileri	30
4.5. Gen Ekspresyon Değişim Verileri	34
4.6. Diferansiyel Ekspresyon Analiz Sonuçlarının Yolak Zenginleştirme Analiz Sonuçları	40

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	51
5.1 Sonuçlar	51
5.2 Öneriler	52
6. KAYNAKLAR	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C: Santigrad Derece
pA: Pikoamper
mV: Milivolt
α: Alfa
kD: Kilodalton

Kısaltmalar

AP2: APETALA2
ERF: Ethylene Responsive Factor
PCR: Polymerase Chain Reaction
RLFP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
SSR: Simple Sequence Repeat
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
ISSR: Inter Simple Sequence Repeat
BS: Bootstrap
dsDNA: Çift sarmallı DNA
ssDNA: İki tek sarmallı DNA
DMS: Dimetilsülfat
dNTP: Deoksinükleotid trifosfat
ddNTP: Didesoksinükleotid trifosfat
emPCR: Emilsüyon PCR
PPi: Pirofosfat
ATP: Adenozin Trifosfat
A: Adenin
T: Timin
C: Sitozin
G: Guanin
PacBio: Pacific Biosciences
SMRT: Single Molecule Real-Time sequencing
ZMW: Sıfır Modlu Dalga Kılavuzu
αHL: Alfa hemolizin
ONT: Oxford Nanopore Technologies
SA: Salisilik asit
GA3: Giberellik asit
1-MCP: 1-Metilsiklopropen
6-BA: 6- Benzilaminopurin
CAB: Klorofil a/b bağlayıcı proteinleri
lncRNA: Uzun kodlamayan RNA
ATG: Otofaji ile ilişkili genler
VPE: Vakuolar işleme enzimleri
ROS: Reaktif oksijen türleri

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinazlar
Ca²⁺: Kalsiyum iyonu
SAG: Yaşlanma ile ilgili genler
HS: Hasat Sonrası
HÖ: Hasat Öncesi
NGS: Next Generation Sequencing
TPM: Transcripts Per Million
FPKM: Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads
BUSCO: benchmarking universal single copy orthologs
ORF: open reading frame
CDS: coding sequences
NCBI NT: NCBI nucleotide sequences
NCBI NR: NCBI non-redundant protein sequences
COG: Clusters of Orthologous Genes
GO: Gen Ontolojisi
DEGs: Differentially expressed genes
CC: cellular component
BP: biological process
MF: molecular function
OLC: Overlap Layout Consensus
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
PCA: Principal component analysis
UDEG: Upregulated differentially expressed genes
DDEGS: Downregulated differentially expressed genes

1. GİRİŞ

1.1. Maydanoz (*Petroselinum crispum*)

Petroselinum crispum (*P. crispum*), bilinen adıyla maydanoz, Apiaceae familyasının bir üyesidir. *P. crispum* kökeninin Doğu Akdeniz, Türkiye ve Lübnan olabileceğini belirten çalışmalar mevcuttur. Eski tarihlerde görünüşü çok benzeyen fakat zehirli olan baldıran (*Conium maculatum* L.) ve köpek maydanozu (*Aethusa cynapium*) gibi türler ile karıştırıldığı için yenilmekten kaçınılmış olsa da zamanla hem sofralarda yer almış hem de tıbbi amaçlarda sıklıkla kullanılan bir sebze olmuştur. Günümüzde ise yaygın olarak yemeklerin içerisinde ve çeşni olarak tüm dünya mutfaklarında kullanılmakta ve kurutulmuş baharat şeklinde depolanmaktadır (Agyare, 2017; Sayed-Ahmad vd., 2017; X.-J. Wang, 2022). Yemeklerin içinde, salatalarda, çorba ve soslarda çeşni olarak kullanımının yanı sıra tıbbi olarak çok eski çağlardan beri mide-bağırsak sistemi, böbrek ve alt idrar yolu rahatsızlıkları ve şikayetleri için sıklıkla kullanılmıştır. Ayrıca adet bozuklukları, diyabet ve dermatit gibi daha birçok tedavilerde kullanıldığı da rapor edilmiştir. Yapraklar ayrıca Türkiye'de kanama, hipertansiyon, hiperlipidemi, karaciğer bozuklukları ve diyabet tedavisinde, Çin ve Irak'ta gıda aroması olarak ve cilt hastalıklarının tedavisinde, Fas geleneksel şifa sisteminde yapraklar arteriyel hipertansiyon, diyabet, kalp hastalığı, böbrek hastalığı, lumbago, egzama ve burun kanamasında, İspanya'da amenore, dismenore, böbrek taşları, prostatit, diyabet, ağız kokusu, anemi, hipertansiyon, hiperürisemi, kabızlık, diş hekimliği, ağrı, kellik ve kürtaajın tedavisinde, Sırbistan'da idrar yolu hastalıkları ve sıvı tutulumunun tedavisinde ve İtalya'da kürtaaj yapmak için kullanıldığı rapor edilmiştir. *P. crispum* üzerinde ağız kokusunu giderme amacıyla geliştirilen ilaç ve koku giderici sprey, bitki çayı, böbrek ve safra taşı rahatsızlıklarında belirtilerin hafifletilmesinde kullanılan formülasyonda, kanser ve karaciğer hastalıklarını önlemek için geliştirilen bitkisel takviye ve çeşitli cilt bakım ürünleri üzerinde alınmış patentleri mevcuttur (Agyare, 2017).

1.1.1. Morfoloji, Anatomi ve Fizyoloji

P. crispum, biennial yani iki yıllık kültür sebzesidir. İlk yıl çok yapraklı bir rozet yapısıyla beraber besin depolamak için kullandığı ana kök gelişimi görülür. Maydanoz kök yapısı, yaprak maydanozlarda ince ve uzun, kök maydanozlarda ise havuç benzeri kazık kök yapısı gösterir. Kökler 20-50 cm arası derinliğe ulaşabilir (Agyare, 2017; Çiftçi ve Köy Dünyası, 2010; Özer, 2020). Kökleri toprak içinde uzun seneler kalabilir ve bu

yüzden yılın her mevsiminde pazarda yer bulabilmektedir. Gövdesi rozet benzeri bir yapıda olup genelde 50-150 cm arası boy yapabilir. Yan dallanma az sayıdadır ve gövdede yukarı doğru dallanma giderek azalır. İlk yıl gövde üzerinde yapraklar gelişir. Yaprakları düz yapraklı veya kıvrıkcık olabilir.

Maydanozun yetiştirilen üç ana türü, yaprakları için yetiştirilen düz yapraklı maydanoz (*P. crispum* var. *neapolitanum*) ve kıvrıkcık yapraklı maydanoz (*P. crispum* var. *crispum*) ve kökleri için yetiştirilen kök maydanozu (*P. crispum* var. *Tuberosum*)'dur. Düz yapraklı çeşitlerde parçalı bir yapı gözlenir. Renk ise açık yeşil ve koyu yeşil arasında değişkenlik gösterir. Pratikte maydanoz genellikle tek yıllık bir bitki olarak yetiştirilir, bitkinin ikinci yıl çiçeklenme dönemine ulaşmasına izin verilmez ve ilk yıl hasat edilir. Çiçeklenme iklime ve yetiştirilme şartlarına göre ikinci yıl gerçekleşir, bu aşamada yapraklar seyrek olur. Çiçekler erselik (hermafrodit) yapı gösterir. Şemsiye şeklinde ve yeşil ya da beyaz renklere çiçekler meydana gelir. Çiçeklenme sonucu tohumlar oluşur. Tohum, gri ya da yeşil olabilir. Oval ve tüylü bir yapısı vardır. Maydanoz tohumları önemli oranda eterik yağ içerir (Uncu vd., 2024; Agyare, 2017; Çiftçi ve Köy Dünyası, 2010). *P. crispum*, Akdeniz, Ege ve Marmara gibi ılıman bir iklimde, nemli bir bölgelerde yıl boyu yetiştirilebilir. Taze ve nemli, derin bünyeli toprakta optimum büyüme gösterir. Hafif bünyeli topraktaki, düşük su tutma kapasitesi, yaprak kalitesini olumsuz etkiler. 5.8 ile 7.3 arası bir pH değerindeki toprak ise iyi bir yetiştirme ortamı sağlar (Çiftçi ve Köy Dünyası, 2010; Özer, 2020). Maydanoz tohumu zor ve uzun süren bir çimlenme sürecine sahiptir. Tohumların çimlenebilmesi için optimum sıcaklık 20°C'dir. Maydanoz çimlenme dönemi boyunca toprakta yeterli miktarda nem olmasını ister, sulama işlemi kontrollü ve düzenli olarak yapılmalıdır. Yetiştirilen bölge özelliklerine ve mahsul durumuna göre maydanoz 15-20 cm arası boy aldığı anda ise hasat edilmeye hazır olduğu kabul edilir (Çiftçi ve Köy Dünyası, 2010; Özer, 2020).

P. crispum'un geniş tıbbi kullanımlarının nedeni bitkide bulunan iyileştirici özellikleri olan çeşitli aktif biyomoleküllerdir. Tohumlarından yüksek miktarda uçucu yağ üretilir ve bu uçucu yağın başlıca bileşenleri aktioksidan aktiviteden sorumludur. Maydanozdan elde edilen uçucu yağların incelendiği bir çalışmada ana bileşenlerin miristisin, β -phellandrene ve 1,3,8-pmenthatriene olduğu rapor edilmiştir (Craft & Setzer, 2017). Maydanoz esansiyel yağlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri araştırıldığı bir çalışmada, geniş bir kontrol grubu kullanılarak, bakterisidal ve fungisidal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Linde vd., 2016). Bunun yanı sıra *P. crispum*'un,

antioksidan, antidiyabetik, hipotansif, hepatoprotektif, nöroprotektif, analjezik, spazmolitik, immünosupresan, antikoagulan, antiülser ve östrojenik özellikler gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur (Agyare, 2017). Maydanozun tüm bu özellikleriyle geniş bir farmakolojik aktiviteye sahip olduğu söylenilebilir. Klinik çalışmada, maydanozun içerdiği apigenin ile antioksidan enzim aktiviteleri arasındaki ilişki incelenerek, maydanozun oksidatif stres üzerinde olumlu etkileri olabileceği de belirtilmektedir (Agyare, 2017; Sayed-Ahmad vd., 2017).

P. crispum'un en baskın bileşeni ise flavonoidler olup en çok bulunanın ise apigenin olduğu, özellikle flavonlar, flavonoller ile bunların glikozitleri ve kumarinleri de içerdiği rapor edilmiştir. İçeriğinde ayrıca fenolik bileşikler, organik asitler, karotenoidler, karbonhidratlar, fenilpropanoidler ve yağ asitleri gibi bileşikler olduğu da belirtilmektedir. Yaprak ve köklerinin vitamin (A, B, C, K, tiamin, folat) ve mineraller (Fe, Mg, Na, K, Zn) açısından zengin olduğu da rapor edilmiştir (Bahramsoltani vd., 2024; Subaş vd., 2024).

1.1.2. Genetik ve Taksonomi

Maydanozun kromozom sayısı $2n = 2x = 22$ 'dir. Almanya Leibniz Bitki Genetiği ve Mahsul Bitki Araştırma Enstitüsü'ndeki 50 maydanoz aksasyonu içeren bir koleksiyonunda ploidi düzeyi araştırıldığında hepsinde diploid durum tespit edilmiştir (Marthe, 2020). Apiaceae üyesinin en bilinen ve yaygın kullanılan üyesi maydanozun genom verileri yakın zamanda HiFi dizileme yöntemi ile çalışılmış olup maydanoz genomunun %80,9'unu kapsadığı belirtilen 1.57 Gb büyüklüğünde taslak genom verisi elde edilmiş ve genomun %81 oranında tekrarlardan meydana geldiği rapor edilmiştir (Uncu vd., 2024). Moleküler belirteçler kullanılarak yapılan çalışmalar nispeten az olup türe özgü belirteçler ise geliştirilmemiş, günümüzde rastgele markörler kullanılmaktadır (Boutsika vd., 2021; Domblides vd., 2010). *P. crispum* transkriptom analizlerinin çalışılması, bitkinin mahsul verimi, tarımsal özelliklerin geliştirilmesi, stres toleransının artırılması ve hasat sonrası raf ömrünün uzatılması gibi daha nice çalışmalara öncülük edecektir. Maydanozun transkriptomu hakkında şu ana kadar az sayıda çalışma yürütülmüştür. Bu kısıtlı çalışmalardan birinde maydanozun abiyotik stres toleransı konu alınmış ve AP2(APETALA2)/ERF(Ethylene Responsive Factor) ailesindeki bazı genler izole edilerek abiyotik stres tepkisi ile ilişkileri tespit edilmiştir (M. Y. Li vd., 2014). Maydanoz üzerine yürütülen çalışmalar esas olarak esansiyel yağ ve flavonoidler üzerine olmuştur.

Maydanozun genetik çeşitliliği global ve hatta yerel olarak yüksektir (Marthe, 2020). Maydanozda yapılan bir araştırmada, büyüme karakteri ve esansiyel yağ bileşenlerinde genetik çeşitliliğin esas etken olduğu, genotip ve hasat zamanının bu özellikleri belirlediği rapor edilmiştir (Said-Al Ahl vd., 2016). Bitkinin genetik çeşitliliğinin korunması, değişen çevre koşullarına, hastalıklara ve zararlılara karşı adaptasyonu için gereklidir. Tarımda ürün çeşitliliği ve verim için önemi büyüktür fakat asıl önemi üretimin sürdürülebilirliği için gerekliliğidir. Ayrıca tür içindeki genetik çeşitlilik, ıslah yönteminin belirlenmesi için de oldukça önemlidir. Bitkilerdeki genetik çeşitliliğin belirlenmesi, ıslah programında kullanılacak genotipin istenen karakterleri taşımasını sağlayabilir. Bu karakterler verimlilik ve ürün kalitesi olabileceği gibi bölgesel olarak belirli koşullara karşı dayanıklı genotipler de olabilir. Genetik çeşitliliğin belirlenmesi için PCR (Polymerase Chain Reaction), moleküler markörler ve genom dizileme gibi birçok yöntem geliştirilmiştir. Moleküler markör teknikler, DNA seviyesindeki varyasyonları tespit edebilir. RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markörleri, genetik çeşitlilik çalışmalarında rutin olarak kullanılan bir araçtır. Analizlerinde genellikle birbirini tamamlayan birkaç yöntem birlikte kullanılır.

Almanya, Fransa, Birleşik Milletler ve İtalya gibi farklı coğrafi kökenlerden toplamda 32 maydanoz genotipi ile yapılan, RAPD ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markörlerinin tek tek ve bileşik olarak kullanıldığı bir genetik çeşitlilik analiz çalışmasında yapılan sonuçlar bu 32 genotip arasındaki ortalama polimorfizmin %95 olduğunu rapor etmiştir (Domblides vd., 2010). Başka bir çalışmada Yunanistan orijinli 15 farklı maydanoz genotipinin, ISSR ve AFLP markörleri kullanılarak genetik çeşitlilik analizi yapılmıştır. Ortalama polimorfizm %63.83 olarak belirlenmiştir (Boutsika vd., 2021). Türkiye’de yapılan ilk maydanoz genetik çeşitlilik analizi araştırmasında, 12 maydanoz genotip arasın 16 adet ISSR primeri kullanarak ortalama polimorfizmin %31.5 olduğu ve genetik varyasyonun olduğu rapor edilmiştir (Coşkun vd., 2023). Çalışmalarda yola çıkarak coğrafi olarak birbirlerine uzak bölgelerden alınan genotipler arasındaki genetik polimorfizm oranının, birbirlerine yakın bölgelerde lokalize olan genotiplere nazaran çok daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir. Maydanozun genetik çeşitliliğinin korunması, bitkinin hastalık ve iklimsel değişikliğe direnç geliştirmesi ve adaptasyonu için, aynı zamanda tarımsal üretimim sürdürülebilirliği için gerekmektedir.

Maydanozun yapraklarına yönelik yerel talebin neredeyse tamamı düz yapraklı türün yetiştirilmesiyle karşılanırken, kıvrıkcık yaprak türü yalnızca küçük ölçekte yetiştirilir (Boutsika vd., 2021). Volza'nın Güncel Küresel İhracat verilerine göre, maydanoz ihracat sevkiyatları Dünya'dan 27,8 bin seviyesinde gerçekleşmiş ve 3.330 Dünya İhracatçısı tarafından 4.147 alıcıya ihraç edilmiştir. Dünya maydanoz ihracatı yapan ülkeler arasında 4.007 sevkiyatla Türkiye ilk sırayı alırken daha sonra sırasıyla 3.297 ihracatla Özbekistan ve 2.988 ihracatla Hindistan gelmektedir. Dünya maydanozun çoğunu ise ABD, Kazakistan ve Hindistan'a ihraç etmektedir (Volza, 2023).

1.2 Apiaceae Familyası

Apiaceae (eski adıyla Umbelliferae), dünya çapında bilinen ve yaygın kullanım alanı olan geniş bir familyadır. Apiaceae familyası, pek çok iyi bilinen ürünü içeren 466 cins ve 3820 türden oluşur. Familyanın bilinen dört alt familyası mevcuttur. Bunlar; Apioideae, Azorelloideae, Mackinlayoideae ve Saniculoideae. Apioideae bunların arasındaki en büyük alt familyadır ve havuç (*Daucus carota*), maydanoz (*Petroselinum crispum*), kereviz (*Apium graveolens*), dereotu (*Anethum graveolens*) gibi bilinen türlerin yaklaşık %90'ını içermektedir. Azorelloideae, genellikle soğuk iklim bölgelerinde bulunan *Azorella*, *Bolax* ve *Eremocharis* gibi türleri içerir. Mackinlayoideae, genellikle Avustralya'ya endemik olan *Centella* ve *Xanthosia* gibi türleri içerir. Saniculoideae, Apioideae alt familyası ile ilintili olarak kabul edilir ve *Sanicula*, *Steganotaenia* ve *Polemanniopsis* gibi türleri içerir. Familyanın üyeleri küçük bitkilerden ağaçlara kadar yüksek çeşitlilik gösterir (Clarkson vd., 2021). Apiaceae familyası dünya genelinde yaygındır, özellikle ılıman ve subtropikal bölgelerde bol miktarda bulunur. Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da geniş bir dağılıma sahiptir. Çoğunlukla kuzeydeki ılıman bölgelerde ve tropik bölgelerdeki yüksek rakımlarda olmak üzere dünya çapında dağılım göstermektedir. Bazı türler, belirli coğrafi bölgelere özgü olabilir. Örneğin, Akdeniz bölgesi, bazı Apiaceae türlerinin doğal yaşam alanıdır.

Familya karakteristik “Şemsiye” yapısına benzeyen çiçeklenme düzeniyle bilinir (X.-J. Wang, 2022). Apiaceae familyası, esansiyel yağ kaynağı olarak çok değerlidir. Anason (*Pimpinella anisum*), kimyon (*Cuminum cyminum*), dereotu (*Anethum graveolens*) gibi ve dahası esansiyel yağ üretiminde kullanılmaktadır. Çalışmalarda, Apiaceae familyasındaki en önemli yağ asitlerinden biri olarak kabul edilen, nadir görülen, bitkilerde doğal olarak bulunan tek oleik asit izomeri olan petroselinik yağ (PeFA) asit kaynağının, Apiaceae familyasındaki türlerin tohumlarında yüksek oranda

(yaklaşık %80) mevcut olduğu rapor edilmiştir. Fetroselinik yağ, tek başına veya diğer aktif bileşiklerle birlikte cilt, saç ve tırnak bozukluklarının tedavisinde anti-inflamatuvar olarak kullanılmaktadır (Hajib vd., 2023).

Maydanoz (*Petroselinum crispum*), rezene (*Foeniculum vulgare*), havuç (*Daucus carota*) gibi familyaya ait birçok türün flavonoidler, kumarinler, fenolik bileşikler, organik asitler, vitamin ve mineraller açısından zengin olduğu bilinmektedir. Tüm bu özelliklerden dolayı eski tarihlerde gelenekler tedavi yöntemlerinde yaygın olarak kullanılmıştır. Günümüzde kimyon (*Carum carvi*) ve rezene (*Foeniculum vulgare*), kalp-damar hastalıkları ve ilişkili risk faktörlerinin, özellikle de diyabetin yönetiminde kullanılmaktadır. Apiaceae familyasından khella (*Ammi visnaga*) bitkisinden elde edilen amiodaron ve nifedipin, sırasıyla antiaritmik ve hipotansif olarak yaygın olarak reçeteli olarak kullanılmaktadır (Douglas, 2021). Buna rağmen tür içerisinde, birbirlerine çok benzeyen fakat toksik koniini içeren felce yol açabilen su baldıranı (*Cicuta maculata*), yalancı maydanoz (*Aethusa cynapium*) gibi türler de mevcuttur. Parfümeride taze ve baharatlı kokular için kullanılan Apiaceae türlerindeki, koku ve aromanın içeriğindeki esansiyel yağ ve oleoresin varlığından olduğu belirtilmektedir. Apiaceae familyası, birçok ekonomik açıdan önemli tür içerir. Örneğin, havuç (*Daucus carota*), maydanoz (*Petroselinum crispum*), kişniş (*Coriandrum sativum*) ve rezene (*Foeniculum vulgare*) gibi bitkiler, tarımda ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Apiaceae, yüksek bitkiler arasında en büyük taksonlardan biridir ve dünya çapında 1,2 milyon hektardan fazla alanda yetiştirilen ailenin en çok yetiştirilen üyeleridir ve yıllık üretimleri yaklaşık 25 milyon tondur. Bu yaygın kullanım alanı ve tıbbi önemi göz önüne alındığında hakkında yürütülen çalışmalar son derece kısıtlı olduğu görülmekle birlikte Apiaceae türlerinin genomları üzerinde çok az araştırma yapılmıştır (Sayed-Ahmad vd., 2017)

1.2.1 Genetik Altyapı ve Yapılan Çalışmalar

Apiaceae familyası, fenolik asitlerin ve flavonoidlerin ağırlıklı olduğu fenolik bileşikleri içermesinden dolayı çok çeşitli bir kullanım alanına sahiptir. İçerdiği flavonoid tipine bağlı olarak antiviral, antioksidan olması gibi belli bir biyolojik sürecin içine dahil olur. Bu anlamda incelendiğinde Apiaceae familyasının flavonoid içeriği ile filogenetik ilişkilerin kurulması mantıklı bir yaklaşımdır. Familya içindeki önemli türler dahil olmak üzere Apiaceae'ye ait 13 tür ele alınarak bir filogeni çalışılması yürütülmüştür. Çalışılan türler arasındaki ilişki korunmuşluk düzeyleri ve nispeten kısa diziler olmasından dolayı L-ribozomal 16 (rpl16) kloroplast geni kullanılmıştır. Neighbor joining yöntemi ile elde

edilen fenogramda ise türleri monofiletik bir grup oluşturulmuş ve %100 bootstrap (BS) ile güçlü bir şekilde desteklenen iki kümeye ayrılmıştır. İlk kümede sırasıyla düşük ve yüksek flavonoid gruplarından *D. carota* ve *T. Arvensis*, ikinci kümede ise düşük flavonoid içeriğine sahip *P. anisum*, *C. carvi*, *C. sativum*, *An. graveolens* ve *F. Vulgare*; yüksek flavon içeriğine sahip *Ap. graveolens* ve *D. Tortuosa*; yüksek flavonol ve flavon içeriğine sahip *P. crispum*, *C. cyminum* ve *A. majus*'dan oluşmaktadır (Youssef vd., 2023).

Apiaceae türleri içerisinde havuç, genomik ve transkriptomik veri tabanı kurulmuş ve yüksek kaliteli havuç genom verisi elde edilmiştir. Aynı şekilde kereviz, kişniş, rezene ve *Oenanthe javanica* (Blume) gibi Apiaceae familyasına ait kısıtlı bitki üzerinde genomik çalışmalar yapılmıştır. Buna rağmen Apiaceae familyasına ait birçok önemli türde halen genomik veriler çok kısıtlıdır (Sayed-Ahmad vd., 2017; X.-J. Wang, 2022). Apiaceae familyasına ait kereviz üzerinde birçok transkriptom analizi gerçekleştirilmiş olmasına rağmen halen diğer türler için transkriptom verileri halen yetersiz kalmaktadır (X.-J. Wang, 2022).

1.3 Omiks Teknolojileri

Omiks teknolojileri büyük ölçekli biyolojik verilerin analizi sağlayan yaklaşımı ifade eder. Bütüncül anlamı kazandıran yunanca ~ome eki ile birlikte, kapsadığı biyolojik materyale göre genom, transkriptom, proteom ve metabolom şeklinde ifade edilir. Omiks teknolojileri, büyük ölçekli veri analizi ve biyoinformatik araçlar ile birlikte onkoloji, farmakoloji, immünoloji, biyokimya ve mikrobiyoloji gibi tıbbi bilimlerde ve biyoloji, zooloji, botanik, ziraat, çevre ve gıda güvenliği alanlarında dahi kullanılmaktadır (Bal & Budak, 2012). Bitkilerde omiks çalışmaları, genetik çeşitliliği anlama, verim artırma, stres toleransını iyileştirme, sürdürülebilir tarım ve daha birçok temel olan çalışmalara, tarım sektörüne ve gıda üretimine büyük katkıda bulunmaktadır (Shalini vd., 2018). Omiks çalışmaları genel olarak başta genom, transkriptom ve proteom olmak üzere biyolojik süreçleri aydınlatabilmek için temel kaynaklar üretmeyi hedefler. Bir organizmanın genom ya da belli bir genom parçasını kapsayan, genlerin yapı ve anotasyonunu anlama çalışmaları “genomiks” çalışmalarıdır. Bir organizmada belirli hücrelerde, dokuya özgü veya belirli bir dönem içerisinde ifade edilen genler yani transkripsiyon sonucu üretilen tüm RNA’lar ise “transkriptomiks” çalışmalarının konusudur. Yine belli bir zamanda, belirli bir bölgedeki protein yapılarını, işlevlerini ve diğer moleküllerle etkileşiminin incelendiği çalışmalara ise “proteomiks” adı verilir.

Temel hücrel fonksiyonlardan sorumlu, sürekli ifade edilen “House Keeping” genler dışında, diğer genler her an aktif olarak ifade edilmez. Hücre ihtiyaçları doğrultusunda genlerin ifade edilme sürecini çok sıkı bir şekilde düzenler. Bu süreç hangi genlerin ifade edileceğini, ne kadar, nerede ve ne düzeyde olacağını da içerir. Genel olarak gen ifadesi hücrel, dokuya özgü ve organizmanın yaşam evresi boyunca değişiklik gösterir. Bu nedenle bir organizmada transkriptom analizi yaparak yani anlık olarak hangi genlerin ifade edildiği analiz edilerek organizmanın durumu hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür.

1.3.1 Yeni Nesil Sekanslama

Omiks teknolojileri büyük ölçekli biyolojik verilerin analizi sağlayan yaklaşımı ifade eder. Bütüncül anlamı kazandıran yunanca ~ome eki ile birlikte, kapsadığı biyolojik materyale göre genom, transkriptom, proteom ve metabolom şeklinde ifade edilir. Omiks teknolojileri, büyük ölçekli veri analizi ve biyoinformatik araçlar ile birlikte onkoloji, farmakoloji, immünoloji, biyokimya ve mikrobiyoloji gibi tıbbi bilimlerde ve biyoloji, zooloji, botanik, ziraat, çevre ve gıda güvenliği alanlarında dahi kullanılmaktadır (Bal & Budak, 2012; Haynes vd., 2019).

Sekanslama yöntemleri, restriksiyon enzimlerinin izolasyonu ve fonksiyonel olarak kullanımının keşfi ile başlamıştır. Werner Arber, Hamilton O. Smith ve Daniel Nathans, restriksiyon enzimleri ile ilgili yaptıkları çalışmalarla 1978 Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülüne layık görülmüştür. Tıp II restriksiyon enzimlerinin keşfi ilk genom haritalama çalışmalarının yapılmasını sağlamıştır (Arber, 1965; Danna & Nathans, 1971; Kelly Jr. & Smith, 1970). Genomların dizilenmesi ile ilgili yapılan ve halen günümüzde kullanılmaya devam eden Sanger sekanslama yöntemi ise 1977 yılında Frederick Sanger, Steven Nicklen ve Alan R. Coulson tarafından yayımlanmıştır. Aynı yıl Alan M. Maxam ve Walter Gilbert tarafından da Maxam-Gilbert sekanslama yöntemi yayımlanmıştır. Bu iki çalışmayı yapan tüm bilim insanları da 1980 yılında Nobel Kimya Ödülüne layık görülmüştür. 1990’da insan genomunun haritalanması için başlatılan ilk büyük ölçekli “İnsan Genom Projesi” başlatılmıştır. İnsan genom projesi, o yıllarda restriksiyon enzimleri ile genom kütüphanesi oluşturulup, Sanger sekanslama yöntemi ile insan genomunda belirlenen 50.000-100.000 geni belirlemek ve açıklamasını yapmak amacıyla sekanslaması ile yürütülmüş, 2003 yılında ise tamamlandığı duyurulmuştur (Collins vd., 2003). 2000’lerin başından itibaren sekanslama teknolojilerinde büyük gelişmeler yaşanmıştır. İnsan genomu gibi büyük verilerin Sanger ve Maxam Gilbert metotları ile

sekanslamaya çalışmak oldukça emek ve zaman isteyen ve oldukça masraflı bir yöntemdir. Bu yüzden bilim, daha hızlı, masrafsız ve doğru veri elde etmek yönünde gelişmiştir. Yeni nesil sekanslama olarak adlandırılan sekanslama teknolojileri, birbirlerine göre zaman, maliyet ve doğruluk açısından birbirlerine nispeten değişiklik göstermesine rağmen, tek bir çalışmada milyarlarca nükleotidi dizebilir olmasıyla ve kompleks genom setlerinin bile genom sekansının bir günde çıkarılabilir olması ile çığır açıcudur (Eren vd., 2023; Mandlik vd., 2024).

1.3.1.1 Birinci Nesil Sekanslama

Birinci nesil sekanslama, Sanger ve Maxam Gilbert sekanslama yöntemlerini içermektedir.

Maxam-Gilbert yöntemi, Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından 1977 yılında geliştirilmiştir. Temeli kimyasal bozunmaya dayanır ve yüksek toksik kimyasallarla gerçekleştirildiğinden dolayı günümüzde rutin olarak kullanılmamaktadır, aynı zamanda maliyet ve zaman açısından da dezavantajlıdır (Maxam & Gilbert, 1977). Yöntem temel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir;

- Sekanslamak istenen DNA parçası izole edilir. DNA zincirinden fosfat grubu çıkarılır ve 5'uca radyoaktif bir fosfat grubu (genellikle ^{32}P) eklenir. Çift sarmallı DNA (dsDNA), iki tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) denatüre edilir, sadece tek zincir sekanslanır.
 - Dimetilsülfat (DMS), formik asit, hidrazin, yüksek tuz içeren hidrazin olmak üzere farklı kimyasallar belirli bazları (sırasıyla G, G+A, C+T, C) hedef alarak, piperidin gibi diğer kimyasallarla birlikte reaksiyona sokulur ve bazların ayrışması sağlanır.
 - Baz spesifik ve radyoaktif etiketli ssDNA reaksiyon sonrası sekans okunması için elektroforez ile jel üzerinde yürütülür. Oluşan bantlar radyoaktif etiketlerin de yardımı ile görünür hale getirilir ve bantların dizilimine dayalı olarak sekans çıkarılır.
- Sanger yöntemi, Frederick Sanger tarafından 1977 yılında geliştirilmiştir. Temeli in vitro DNA replikasyonu sırasında, zincir uzamasının işaretli bazlar ile durdurulmasına dayanır (Sanger vd., 1977). Yöntem temel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir;
- İlk olarak ilgilenilen DNA ile PCR yapılır. Çift sarmallı DNA (dsDNA), iki tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) denatüre edilir. Daha sonra sıcaklık düşürülerek tasarlanan primerler (ilgilenilen DNA segmentinin 3' ucundaki bazlar ile komplementer) ile

eşleştirilir. Primerler DNA'ya bağlandığında sıcaklık yeniden arttırılarak reaksiyon başlatılır.

- Reaksiyonlar her baz için bir tüp olmak üzere dört ayrı tüpte gerçekleştirilir. Her çözelti 4 tip baz (dNTP) içerir ancak yalnızca bir tip sonlandırma nükleotidi (ddNTP) içerir.
- DNA polimeraz enzimi ile polimerizasyon, şablon DNA zincirine karşılık dNTP eklenerek devam eder fakat ddNTP'ler eklendiğinde eksik hidroksil grubu nedeniyle zincire eklendiğinde polimerizasyon durur.
- Reaksiyon sonrası dört tüp de elektroforezde yürütülür. Ve bantlar yorumlanarak sekans çıkarılır.

Sanger yönteminde ilk olarak ddNTP'ler radyoaktif ile etiketlenerek, manuel olarak elektroforezde yürütülerek sonrası otoradyografi ile görüntülenmesini sağlanırdı ve sekanslar manuel olarak okunurdu (Mandlik vd., 2024). Günümüzde Sanger yönteminde, ddNTP'ler floresan etiketlenerek tek tüpte reaksiyon gerçekleşmekte olup ardından kapiller elektroforez ile çalışılmaktadır, sonrasında kromatogram ile bilgisayar yazılımları tarafından okunup ve analiz edilmektedir. Ayrıca Sanger yöntemi önceden sadece kısa DNA dizileri (300-500 baz çifti) okuyabilirken günümüzde nispeten daha uzun dizileri okuyabilmesi mümkündür. Modern Sanger yöntemi ile analiz, zaman ve doğruluk açısından çok daha iyi sonuçlar vermektedir ve halen günümüzde "altın yöntem" olarak kullanılmaya devam edilmektedir (Eren vd., 2023).

1.3.1.2 İkinci Nesil Sekanslama

İkinci nesil sekanslama, Roche 454, Illumina, Solid, Ion-torrent gibi yöntemleri içerir. İkinci nesil sekanslamada yöntemlere göre özelleşmiş kitler ve ekipmanlar geliştirilmiştir, bu şekilde maliyet, zaman ve doğruluk büyük oranda iyileştirilmiştir.

Roche 454 yöntemi, 454 Life Sciences adlı biyoteknoloji firması tarafından 2005 yılında geliştirilmiştir. Roche Holding AG tarafından 2007 yılında firmanın satın alınması ile birlikte yöntem Roche 454 Yöntemi olarak adlandırılmıştır. Yöntem pirosekanslama yaklaşımını temel alır ve yöntemin kritik bir adımı emülsiyon PCR kullanımınıdır (L. Liu vd., 2012). Yöntem temel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir;

- İlgilenilen DNA bölgesi önce küçük fragmanlara ayrılır. Elde edilen fragmanlar adaptörler ile işaretlenir ve çift sarmallı DNA (dsDNA), iki tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) denatüre edilir.

- Adaptörleri taşıyan DNA fragmanlar, mikron boyutlu boncuklara yüklenir. PCR reaktifleri (primerler, DNA polimeraz, dNTP'ler) ile karıştırılır ve emülsiyon yağına eklenir.
- Karışım, kuvvetli bir şekilde çalkalanarak su damlacıkları oluşturulur. Bu damlacıklar, su/yağ emülsiyonu içinde izole edilmiş mikro reaktörlerdir.
- Adaptörleri taşıyan DNA fragmanlarının mikro reaktörler içerisinde emülsiyon bazlı klonal amplifikasyonu (em-PCR) gerçekleştirilir, adaptör takılı fragmentler yağın içerisindeki bir su damlasının içinde amplifiye olur.
- Her damlacıkta bulunan DNA parçası, PCR ile çoğaltılır. Bu süreç sonunda, her bir boncuk, binlerce kopya (klon) DNA fragmanı ile kaplanır. Klonal DNA ile kaplanmış boncuklar ve enzimler, Pikotiter plakasına (pirosekanslama platformu) yerleştirilir.
- Sonraki aşama 454 Sekans cihazı ile sekanslamadır. DNA'ya dNTP'ler sırayla eklenir ve hangisi DNA kalıbındakiyle eşleşirse pirofosfatı (PPi) salınır.
- Sülfirilaz enzimi, Pirofosfatı ATP'ye dönüştürür. Lüsiferaz enzimi, oluşan ATP'yi kullanarak lüsiferin adlı bileşiği oksilüsiferin bileşiğine dönüştürür ve oksilüsiferin de ışık yayar. Bu ışığın ölçülmesini temel alarak sentezleme ile sekanslama yöntemidir.

Her seferinde tek dNTP salınır ve picotiter plate üzerinde ışığa gözlenen kuyucuklar kaydedilir. Daha sonra serbest dNTP'ler ortadan kaldırılır ve diğer tip dNTP eklenir ve yine ışımının olduğu kuyucuklar kaydedilir, bu şekilde sekanslama gerçekleşir. Işıma her zaman aynı miktarda kaydedilmemektedir. Pikogram adı verilen tablodaki ışımının seviyesi yorumlanarak ardışık tekrarların belirlenmesi de mümkündür (Ahmadian vd., 2006; L. Liu vd., 2012).

Illumina yöntemi, Illumina Inc. biyoteknoloji şirketi tarafından 2006 yılında geliştirilmiştir. Yöntem sentezleme sırasında sekanslama yaklaşımını temel alır (Mardis, 2008). Yöntem temel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir;

- İlgilenilen DNA bölgesi önce küçük fragmanlara ayrılır. Elde edilen fragmanların iki ucu da adaptörler ile işaretlenir. Adaptörlerin komplementerlerinden oluşan problemlerin yerleştirildiği akış hücresine, adaptör eklenen DNA denatüre edilerek aktarılır.
- Akış hücresinin yüzeyinde bulunan kılcal kapiller içerisinde adaptör-prob birleşmesi gerçekleşir ve bağlanan fragmentlere, DNA polimeraz ile komplementer dizi sentezlenir. İkinci döngüye geçildiğinde tüplerin içine formamid denatüre edici ajan gönderilir ve çift iplikli hale gelen DNA fragmenti denatüre olur. Denatüre olan

fragmentin boşta kalan adaptör ucu cama immobilize edilen diğer bir primere bağlanır ve yine DNA polimeraz ile komplementer dizi sentezlenir.

- Komplementer dizi sentezi sırasında eklenen dNTP'ler 3' ucu bloke edilmiş ve floresan işaretlidir. Nükleotit kovalent olarak bağlanması sağlandığında floresan ışığa verir ve 3' ucu bloklandığı için bağlandıktan sonra ikinci bir nükleotit buraya eklenemez. Buraya tek bağlantı sağlandıktan sonra ortamda kalan serbest nükleotitler uzaklaştırılır ve sinyaller saptanır, makine fotoğraf çeker. Daha sonra yeni bir bağlantı için 3' uçtaki blok molekölü ve floresan işaret koparılıp ortamdan uzaklaştırılır ve ikinci bağlantı için tüm adımlar en baştan uygulanır.
- Köprü amplifikasyon yoluyla yaklaşık 35 kez döngü gerçekleştirilir ve klonal bir küme meydana gelir. Bu kümelerden her biri genomun farklı bir parçasını temsil eder (Illumina, 2010).

SOLiD yöntemi, Applied Biosystems tarafından 2005 yılında geliştirilmiştir. Yöntem ligasyon sırasında sekanslama yaklaşımını temel alır ve yöntemin kritik bir adımı emülsiyon PCR kullanımındır (Mandlik vd., 2024). Yöntem temel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir;

- İlgilenilen DNA bölgesi önce küçük fragmanlara ayrılır. Elde edilen fragmanlar adaptörler ile işaretlenir ve çift sarmallı DNA (dsDNA), iki tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) denatüre edilir.
- Adaptörleri taşıyan DNA fragmanlar, mikron boyutlu boncuklara yüklenir. PCR reaktifleri (primerler, DNA polimeraz, dNTP'ler) ile karıştırılır ve emülsiyon yağına eklenir.
- Karışım, kuvvetli bir şekilde çalkalanarak su damlacıkları oluşturulur. Bu damlacıklar, su/yağ emülsiyonu içinde izole edilmiş mikro reaktörlerdir.
- Adaptörleri taşıyan DNA fragmanlarının mikro reaktörler içerisinde emülsiyon PCR (emPCR) gerçekleştirilir, adaptör takılı fragmentler yağın içerisindeki bir su damlasının içinde amplifiye olur.
- Her damlacıkta bulunan DNA parçası, PCR ile çoğaltılır. Bu süreç sonunda, her bir boncuk, binlerce kopya (klon) DNA fragmanı ile kaplanır. Klonal DNA ile kaplanmış boncuklar ve enzimler, akış hücresine aktarılır.
- Bir prob hedef dizisine hibritleştiğinde, floresanlı etiketli kısa bir oligonükleotid DNA şablonuna bağlanır ve bağlanmamış nükleotitler yıkanır. Her bir oligonükleotid bağlanması sonucunda, ışımının dalga boyu sayesinde bağlanan oligonükleotidin

karşılık geldiği nükleotidler belirlenir. Bu işlem sonrasında floresan etiketler yıkanır ve ligasyon döngüsü yeniden başlatılır, bu şekilde istenen miktarda döngü sürdürülür (Metzker, 2010).

Ion Torrent yöntemi, 454 Life Sciences adlı biyoteknoloji firmasının kurucusu olan Dr. Jonathan Rothberg tarafından 2010 yılında geliştirilmiştir. Yöntem kimyasal bağlanma sırasında açığa çıkan hidrojen iyonlarının ölçülmesini temel alır, diğer yöntemlerden farklı olarak optik algılama yerine iyon sensörleri ile çalışır (Eren vd., 2023). Yöntem temel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir;

- İlgilenilen DNA bölgesi önce küçük fragmanlara ayrılır. Elde edilen fragmanların iki ucu da adaptörler ile işaretlenir.
- Hazırlanan DNA parçaları, bir çipe yüklenir. Bu çip, küçük pH sensörleri içeren mikroskobik alanlardan oluşur.
- Sekanslama sırasında, çipe bir dizi nükleotid (A, T, C, G) eklenir. Nükleotidlerin DNA'ya bağlanması sırasında, bir proton (H^+) salınır. Bu protonlar, çip üzerinde bulunan pH sensörleri tarafından algılanır. Her nükleotid eklemesi, pH'da küçük bir değişikliğe neden olur. Bu pH değişikliği, bir yarı iletken sensör tarafından ölçülür.
- Çip, bu pH değişikliklerini kaydeder ve sinyalleri elektriksel sinyallere dönüştürür. Nükleotidlerin eklenmesi ve pH değişiklikleri kullanılarak DNA dizisi çıkarılır. Her nükleotid, çip üzerindeki belirli bir pH sensörü tarafından algılanır ve bu bilgiler dizinin tam sırasını belirler.

Sistemin birincil dezavantajı, homopolimer uzantılarını ve tekrarlarını okumanın zorluğudur. Başlıca avantajları, diğer platformların sağladıklarına kıyasla nispeten daha uzun okuma uzunlukları, daha esnek iş akışı, daha kısa zaman ve daha uygun fiyat gibi görünmektedir (Gayathiri vd., 2023; Quail vd., 2012).

1.3.1.3 Üçüncü Nesil Sekanslama

Üçüncü nesil sekanslama, Pacific Bioscience ve Oxford Nanopore yöntemlerini içerir.

Pacific Bioscience yöntemi, Pacific Biosciences (PacBio) tarafından 2010 yılında piyasaya duyurulmuştur. Yöntem SMRT dizileme teknolojisini temel alır. SMRT, tek molekül düzeyinde ve gerçek zamanlı DNA sekanslama teknolojisidir. Yöntemin en büyük avantajı uzun okuma uzunlukları ve yüksek çözünürlük sağlamasıdır (Rhoads & Au, 2015). Yöntem temel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir;

- İlgilenilen DNA fragmanı izole edildikten sonra kalite kontrol, boyut ve konsantrasyon ayarlama, DNA hasarı ve uçlarının onarımı gibi rutin işlemler gerçekleştirilir. DNA fragmanının parçalanmasına, denatüre edilmesine ya da amplifikasyona gerek yoktur.
- Elde edilen çift sarmallı DNA örneğinin başına ve sonuna "SMRTbell" olarak bilinen saç tokası adaptörleri kullanılarak küt uçlu ligasyon yapılır ve bu diziler sayesinde DNA dairesel bir dizi haline gelir ve uzun tekrarlı okumalarda baz hatalarını en aza indirir.
- PacBio yönteminin en önemli bileşenlerinden birisi olan ZMW (Sıfır Modlu Dalga Kılavuzu) teknolojisi, ışığı sınırlı bir alanda yoğunlaştırarak sadece tek bir DNA molekülünün dizilenmesini sağlar. Dairesel SMRTbell şablonları ZMW'lere dağılır ve ZMW kuyucuklarının tabanına, DNA polimeraz enzimi sabitlenir. DNA'yı polimerazı DNA'nın etrafına sararak dizgen geleneksel DNA dizileme tekniklerinin aksine, bu teknik polimerazı kuyunun tabanına sabitleyerek DNA'yı diziler. Sekanslamanın gerçekleştiği çip üzerinde binlerce pikolitre ZMW kuyusu vardır ve her kuyuda yalnızca 1 polimeraz bulunur. Böylece, tek bir DNA molekülü yalnızca 1 kuyuya bağlanır ve gerçek zamanlı olarak analiz edilebilir.
- Polimeraz DNA şablonuna floresan etiketlenmiş nükleotitleri ekledikçe nükleotit spesifik ışımalar meydana gelir. Bu sinyaller, nükleotit eklenmesinden sonra pirofosfatının kesilmesiyle sona erer ve görüntüleme sistemi bu sinyalleri sürekli olarak algılar. Bu işlem diğer kuyularda eş zamanlı ve paralel olarak gerçekleşir.

PacBio yöntemi diğer yöntemlere göre farkını göstermiştir. Bu yöntem hızlı sıralama yaparken, yüksek hata oranına sahiptir. Bu sorunun kontrolü aynı dizinin birden fazla okunması ve benzer şablonların değerlendirilmesiyle sağlanır. Okuma süresi DNA uzunluğuna bağlı olarak değişmekle birlikte 0,5 ile 4 saat arasında değişmektedir (Eren vd., 2023; Quail vd., 2012; Rhoads & Au, 2015).

Oxford Nanopore yöntemi, Oxford Nanopore Technologies (ONT) tarafından 2014 yılında piyasaya duyurulmuştur. Yöntem yapay bir polimer membranı içine gömülü modifiye edilmiş transmembran kanal proteinleri kullanımına dayanır. Bu yöntem için, membrana elektrik akımı (100 pA-100 mV) ile gömülmüş yapay bir nanopor gereklidir. Bu nanopor, *Staphylococcus aureus*'tan türetilen 33 kD'lik bir protein olan alfa hemolizin (α HL) tarafından oluşturulur. Bu proteinler, DNA moleküllerinin geçişine izin veren

nanoporları oluşturur (Eren vd., 2023; Gayathiri vd., 2023). Yöntem temel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir;

- İlgilenilen DNA fragmanı izole edildikten sonra kalite kontrol, boyut ve konsantrasyonu ayarlama, DNA hasarı ve uçlarının onarımı gibi rutin işlemler gerçekleştirilir.
- Elde edilen DNA fragmanına adaptörler eklenir. Kütüphane adaptörü, iki ipliği motor proteine ve bir Y-adaptörüne bağlar. Y-adaptörü, kütüphanenin nanopor üzerindeki doğru konumlandırılmasını sağlar, motor protein ise DNA'nın çözülmesini kolaylaştırır ve nanopor üzerinden geçiş hızını düzenler.
- Membranın her iki tarafına uygulanan dışsal bir elektrik alanı, bir voltaj farkı yaratır. Bu voltaj farkı, DNA moleküllerini nanoporlardan geçirecek şekilde yönlendirir.
- DNA dizilenmeden önce, Poly(A) kuyruk içeren adaptör dizisinin DNA'ya sokulması gerekir. Adaptör dizisi tanınır ve bir motor protein tarafından nanopora taşınır. Nanopor adaptör dizisini algıladığında, DNA nanopordan tek bir iplikçik olarak geçmeye başlar
- DNA negatif yüklü olduğundan, DNA membrandan geçen iyonik akımla nanopordan geçer. Genetik materyali oluşturan bazların her biri iyonik akımda farklı bir kesinti yaratacaktır. Nanopordan geçen molekülün akımın kesintisine göre karakterizasyonu algoritma tarafından gerçekleştirilir ve DNA dizisi tespit edilir.
- Membranın yüksek elektrik direnci, iyonik akımın yalnızca nanoporlar aracılığıyla iletilmesini sağlar, bu da DNA'nın pordan geçişi sırasında akım değişikliklerini hassas bir şekilde tespit etmeye olanak tanır (Y. Wang vd., 2021).

ONT'nin diğer yöntemlere göre avantajı, kısa sürede okuyabilmesidir. Yöntem enzim, amplifikasyon veya floresanla etiketlenmiş nükleotidlerin kullanımını içermez. Polimeraz gibi bir enzime ihtiyaç duymadığından, yüksek sıcaklıklara maruz kalmadan dizileme yapabilir. Ayrıca, amplifikasyon gerektirmediğinden uzun bir örnek hazırlama adımı yoktur. ONT'nin dezavantajı, biyoinformatik algoritmasının elde edilen verileri işlemekte zorluk çekmesidir (Eren vd., 2023; Gayathiri vd., 2023).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Hasat sonrası dönemi, ürünün tarladan alınmasıyla tüketim hazırlığına kadar geçen tüm süreyi ifade eder. Hasat sonrası kaybın çeşitli nedenlerden dolayı %25 olduğu tahmin edilmektedir. Bu ürünün dörtte birinin, üretimi için harcanan vaktin ve nakit kaynağının tamamen boşa gitmesi anlamını taşır. Hasat sonrası gıda kaybı çok yönlüdür; hasat ve tarla işlemleri, paketlenme, depolama, zarar verici organizmalar, ürünlerin bozulabilirliği ve dayanıklılığı gibi birçok faktörlere bağlıdır. Kayıplar biyolojik, ekonomik ve zirai teknik nedenlerden dolayı gerçekleşebilir. Gıda kaybı, direkt ya da dolaylı kayıplar olarak sınıflandırılabilir. Direkt kayıp niceliksel, sızıntı ya da haşere gibi zararlıların tüketimi olarak doğrudan ürün kaybını ifade eder. Dolaylı kayıp ise niteliksel yani bozulma, ürünün kalitesindeki düşüşü ifade etmektedir (Grolleaud, 2002).

Çalışmamız kapsamında niteliksel kayıp yani bozulmanın veya kalite kaybının, taze sebzelerde genom düzeyinde nasıl gerçekleştiği, bitkinin bozulmaya karşı gen ekspresyon düzeyinde nasıl tepkiler geliştirdiği, dayanıklılık ve tolerans geliştirme sürecinin incelenmesi ve potansiyel olarak kalite kaybının nasıl korunabileceğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Maydanoz gibi yaprakları tüketilen taze sebzelerde ilk olarak yaprakların solması, kıvrılması, büzülmesi gibi durumlarla kendini göstermeye başlar. Depolama, taşıma, işleme ve tüketim aşamalarında meydana gelen olumsuz etkenler engellendiğinde, iyi saklama koşulları ve uygun tedbirler altında dahi birkaç haftadan daha fazla dayanması mümkün değildir. Yapılan bir çalışmada hasat sonrası ozon ve salisilik asit (SA) uygulamasının, maydanoz raf ömrünü uzatan ve bu süre boyunca kaliteyi en iyi koruyan yöntem olduğu iddia edilmiştir. Bu koşullarda dahi maydanozların kaliteli depolanma süresinin ancak 14+1 gün olduğu belirtilmiştir (Üner, 2018). Maydanoz raf ömrü uzatılması hakkında yapılan bir çalışmada hasat sonrası belirli kimyasallarla muamele edilmiştir ve bu işlemle birlikte 5 °C ve 20 °C'de saklanan maydanozun raf ömrünün uzatıldığı belirtilmiştir. Bu kimyasallar giberellik asit (GA3), 1-Metilsiklopropan (1-MCP), uçucu yağlar ve nano bakır olup, kalite kaybına neden olan incelik, peroksidasyon ve enfeksiyonlara karşı engelleyici olduğu görülmüştür. Fakat belirtildiği üzere maydanozun kalite kaybı süreçlerinde kimyasalların göreceli önemi ve bunların etkileşimleri hakkında bilgiler yetersizdir (Ouzounidou vd., 2013).

Marul hasat sonrasındaki kalite kaybının ana nedeni renk değişimi ya da kahverengileşme olarak kabul edilmektedir. Renk değişimi, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri içeren oldukça karmaşık bir süreçtir ve genel olarak fenolik

ile ilgili metabolitlerin enzimatik oksidasyonundan kaynaklandığı yaygın olarak kabul edilmektedir. Marul üzerinde gerçekleştirilen transkriptom analizi sonucunda kahverengileşmenin 6-Benzilaminopurin (6-BA) hormonu ile önlenebilir olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada metabolom profili de çıkarılarak kahverengileşmenin altında yatan nedeni araştırılmış, beş metabolit sorumlu tutulmuş ve bunun da 6-BA hormonu ile azaltılabilir olduğu görülmüştür (Y. Liu vd., 2022). Marul üzerinde yapılan diğer bir araştırma ise yaralanma, dehidrasyon ve senesensi ve bunların arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Çalışmada soğuk depolamanın senesens mekanizmasını olumlu etkilediği ve katta ortamın karanlık olduğu bir durumun kloroplastları bozulmadan koruyarak ve antioksidatif tepkiyi artırarak yaşlanmayı geciktirdiği düşünülmüş fakat yine de renk değişikliği, glikoliz ve Calvin döngüsü aktivitelerini sınırlamadığı belirtilmiştir. Transkriptom profili ise özellikle dehidrasyon stresi ile ekspresyon düşüşünü göstermiş, erken transkriptom profilinde ise stresle ilişkili (etilen, oksin, ısı şok proteinleri vb.) genlerin yüksek ekspresyonu görülmüştür. 7.gün profilinde dehidrasyon stresiyle ilgili genlerde dramatik ekspresyon artışı görülmüştür. Kloroplastlarda, 7. günde klorofil a/b bağlayıcı proteinlerin (CAB) biyosentezinin azalmadığı görülmüş, bunun sonucu olarak yaşlanmanın hasattan yalnızca 7 gün sonra başlayabileceği belirtilmiştir. Ayrıca erken antioksidan aktivite yaşlanmanın gerçekleşmesini geciktirebileceği, lipid metabolizması hasat sonrası yaşlanmanın iyi bir hedefi veya göstergesi olabileceği belirtilmiştir (Ripoll vd., 2019). Manyok kök sebzesinde yapılan bir çalışmada, hasat sonrası hemen bozulmaya başlayan kök yumrularında bozulmanın kökeni ve spesifik olarak uzun kodlamayan RNA'nın (lncRNA) hasat sonrası bozulmadaki rolü araştırılmıştır. Araştırma sonucunda ekspresyon seviyesi anlamlı bir şekilde artan 288 lncRNA belirlenmiş ve bunların hücresel süreçlerde rol aldığı belirtilmiştir. Ayrıca hasat sonrası bozulma sürecinde, belirlenen lncRNA'ların etilen sinyalleme genlerini regüle ettiği ve kalsiyum sinyallemesinin regülesi ile de hasat sonrası bozulmanın geciktirilebileceği öne sürülmüştür (Zeng vd., 2020).

Hasat sonrası bozulma, aynı tür içerisinde dahi farklılıklar gösterir. Bozulmanın moleküler mekanizmasının belirlenmesi, direnç gösteren bitkilerdeki direnç mekanizmalarının araştırılması ve başarılı genetik ıslah programları ile hasat sonrası bozulmaya karşı dirençli mahsuller elde edilebilir. Taze kesilmiş marul üzerinde yürütülen bir çalışmada hızlı ve yavaş bozulma oranlarına sahip ebeveynler çaprazlanmıştır. Marulun bozulma oranının kalıtsal bir özellik olduğu, bu özellik için geniş bir kalıtım oranının (%61) bulunduğu ve bu özelliğin kalıtım ile aktarıldığı

belirtilmiştir. Ayrıca belirli haplotiplerin, yavaş veya hızlı bozulma oranlarıyla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Simko vd., 2018). Hasat sonrası bozulma, genetik altyapının yanı sıra dış etkenlerden kaynaklanmaktadır. Karpuz üzerinde yapılan bir çalışmada, belirli patojenik mantarların karpuzda hasat sonrası bozulmayla bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *Azadirachta indica* ve *Cassia odorata* bitkilerinden elde edilen yaprak ekstraktlarının, patojenlere karşı önemli ölçüde etkili olduğu belirtilmiştir (Odelade & Oladeji, 2020). Hasat sonrası bozulmanın programlanmış hücre ölümü ile bağlantısının araştırıldığı bir çalışmada, kötü depolama koşulları, fiziksel ya da kimyasal işlemler, yaralanma veya patojen enfeksiyonu gibi faktörlerin neden olduğu programlanmış hücre ölümünün “geri dönüşü olmayan noktaya” kadar geri döndürülebilir olduğu rapor edilmiştir. Bu olumsuz etki eden faktörün elimine edilmesi anlamına gelmekte olup, programlanmış hücre ölümü gelişiminin erken aşamalarında gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Genellikle, farklı mahsuller arasında programlanmış hücre ölümü ile ilişkili olan genler, kaspaz benzeri sistein ve serin proteazlar, metakaspazlar ve diğer hücre ölümü proteazları, hidrolazlar, nükleazlar, otofaji ile ilişkili genler (ATG), vakuolar işleme enzimleri (VPE) ve programlanmış hücre ölümü sinyalleme ile ilgili proteinler (Reaktif Oksijen Türleri, ROS), etilen, mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK), kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) ve lipide bağlı yollar gibi ve çeşitli yaşlanma ile ilgili genler (SAG), kodlayan genleri olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte, mahsul genotipine, yaşlanma evresine ve stresin etkilerine bağlı olarak programlanmış hücre ölümü genlerinin bu enzimlerin farklı izoformlarını ve diğer programlanmış hücre ölümü ile ilişkili sinyal faktörlerinin çeşitli biçimlerini kodlayabileceği unutulmamalıdır (Iakimova vd., 2024).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

İş akışı transkriptom analizi temelli yürütülmüştür. Transkriptom dizileme, genetik materyalin belirli bir zaman ve belirli şartlar altında hangi genlerin ifade edildiği veya edilmediğini belirlemek için kullanılmaktadır.

3.1. Gen Ekspresyonu RNA-seq Çalışmaları İçin Kullanılan Total RNA'nın İzolasyonu

Tez çalışması kapsamında düz yapraklı (*P. crispum* var. *neapolitanum*; geniş yapraklı İtalyan tipi) maydanoz tohumlarının çimlendirilmesi ve yetiştirilmesi, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü seralarında gerçekleştirilmiştir. Hasat aşamasına gelmiş bitkilerden alınan yaprak doku örnekleri hasat öncesi (HÖ) örnekleri oluşturmakta iken, hasat sonrası 3 gün süre ile +4°C'de saklanmış olan yapraklar hasat sonrası (HS) örnekleri oluşturmaktadır. Hasat sonrası ve hasat öncesi doku örneklerinden total RNA izolasyonu için NucleoSpin RNA Plant Mini Kit (Macherey-Nagel), üreticinin protokolü uygulanarak kullanılmıştır. RNA örneklerinin bütünlüğü Bioanalyzer 2100 sistemi (Agilent Technologies, CA, USA) kullanılarak kontrol edilmiştir.

3.2. RNA-seq Çalışması ve Biyoinformatik RNA-seq Veri Analizleri

Total RNA'dan mRNA izolasyonu manyetik parçacıklı Poly(T) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA fragmentasyonu, cDNA sentezi, uç onarımı, A nükleotidi ekleme işlemi, adaptör ligasyonu, boyut seleksiyonu, amplifikasyon ve saflaştırma işlemleri sonucunda RNA-seq kütüphanesi elde edilmiştir. Total RNA örneklerinin (hasat sonrası ve hasat öncesi örneklerden üç biyolojik ve iki teknik replika) NGS (Next Generation Sequencing) sekanslama çalışması için Illumina kısa okuma platformu kullanılmış olup örnek başı okuma derinliği 20 milyon şeklinde düzenlenmiştir. RNA-seq çalışması sonucu oluşturulan büyük veri aşağıda akışı verilen biyoinformatik araçlar ile analiz edilmiştir. RNA-seq analiz verilerinin karşılaştırılmasında ve ekspresyon miktarı anlamlı değişen genlerin belirlenmesinde kullanılan olan yazılımlar, ilgili bilimsel literatürde standart kabul edilen yaklaşımlar dahilinde kullanılan yazılımlardır. Veri analizleri, sekanslama işlemi sonucu elde edilen ham verilerin kalite sınıflandırılması ve buna göre filtrelenmesi ile başlatılmıştır.

3.3. Ham Sekans Verilerinin Kalite Analizleri ve Transkriptom Birleştirme (Assembly) Çalışması

FASTQ formatında elde edilen ham sekans okumalarının FastQC (Read Quality Reports) programı ile kalite kontrolleri yapılmıştır (Andrews, 2010). Ardından Trimmomatic (flexible read trimming tool for Illumina NGS data) yazılımı kullanılarak okumaların başındaki ve sonundaki düşük kaliteli bazların kesilmesi, ortalama kalite eşiğinin altındaki tüm okumaların elimine edilmesi ve belirlenen uzunluk kriterini sağlamayan okumaların atılması koşullarında temizlenmiştir (Bolger vd., 2014). Hata oranının sekans okumalarında konuma bağlı dağılımının görselleştirilmesinde fastp yazılımı kullanılmıştır (Chen vd., 2018). Kırılmış okumalar uygun de novo transkriptom birleştirme, diğer adıyla assembly algoritması kullanılarak montajlanmıştır. De novo birleştirme yaklaşımları için Trinity transkriptom assembler yazılımı kullanılmıştır (Grabherr vd., 2011). Trinity assembler ile üretilen birleştirilmiş sekanslar baz alınarak, Salmon yazılımı temelli Align Reads and Estimate Abundance yazılımı çalıştırılmıştır (Grabherr vd., 2011; Patro vd., 2017). Okumalar, birleştirilen transkriptlere hizalanmış ve TPM (Transcripts Per Million) bazlı transkript bolluk tahmini yapılmıştır; elde edilen çıktılar ile Build expression matrix yazılımı çalıştırılarak TPM değerlerine dayalı ekspresyon matrisi elde edilmiştir (Grabherr vd., 2011). Ekspresyon matrisi kullanılarak, eksprese edilmeyen ve $TPM \leq 1$ değerlere sahip transkriptler, Filter Low Expression Transcripts yazılımı kullanılarak filtrelenmiştir (Grabherr vd., 2011). Filtrelenmiş birleştirilmiş transkriptom verisi içerisinde, yüksek benzerliğe sahip dizileri gruplandırarak, en uzun transkriptin temsilci olarak belirlenmesinde cd-hit yazılımı kullanılmıştır (W. Li & Godzik, 2006). Trinity yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen montaj işleminin ardından düşük ekspresyon seviyesine sahip transkriptler açısından filtrelenen ve cd-hit yazılımı kullanılarak yüksek benzerliğe sahip diziler arasında temsilci seçerek gereğinden fazla transkriptlerden arındırılan birleştirilmiş transkriptom verisinin gen içeriği ve bütünlüğü kriterlerine dayalı kalitesi BUSCO (Benchmarking Universal Single Copy Orthologs) analizleri ile belirlenmiştir (Simão vd., 2015). Trinity assembler ile üretilen birleştirilmiş transkriptom verisinde olası parçalı contiglerin, ve SNP (Tek Nükleotit Polimorfizmi)/INDEL içeren alternatif contiglerin genlere birleştirilmesinde Corset yazılımı kullanılmıştır (Davidson & Oshlack, t.y.). Her bir gen kümesi için en uzun transkript 'Unigene' olarak belirlenmiştir. Trinity yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen montaj işleminin ardından Corset yazılımı ile işlenen birleştirilmiş transkriptom verisini kalite ve bütünlüğünün değerlendirilmesi amacıyla

BUSCO analizleri gerçekleştirilmiştir. Trinity yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen montaj işleminin ardından Corset ve cd-hit yazılımlarıyla ayrı ayrı işlenen birleştirilmiş transkriptom verilerinin BUSCO veri setleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

3.4. Birleştirilmiş Tüm Transkriptomun Anotasyonu

Birleştirilmiş transkriptom verisi, transkriptlerin kodlama potansiyeli açısından değerlendirilmek üzere TransDecoder yazılımı ile analiz edilmiştir (Haas vd., 2013). TransDecoder analizleri sonucu CDS sekanslar (Coding Sequences) ve en uzun potansiyel bütünlükte ORF (Open Reading Frame) sekans verileri oluşturulmuştur. Transkriptom anotasyonu gerçekleştirilirken referans veri tabanı olarak NCBI resmi nükleotit ve peptit veri tabanları olan NT (NCBI Nucleotide Sequences) ve NR (NCBI non-redundant Protein Sequences), COG (Clusters of Orthologous Genes) kullanılmıştır (Tatusov, 2000). Peptit veri tabanına dayalı gerçekleştirilen anotasyon üzerinden gen ontolojisi (GO) anotasyonu analizi için Blast2GO yazılımı kullanılmıştır (Conesa & Götz, 2008).

3.5. Gen Ekspresyonu Değişimlerinin Belirlenmesi Analizleri

Trinity yazılımı ile birleştirilmiş ve Corset yazılımı ile eşdeğer transkriptler genlere birleştirilecek şekilde işlenmiş olan transkriptom, sekans okumalarının haritalanması ve ekspresyon seviyelerinin kuantifikasyonu için referans olarak kullanılmıştır. Hasat sonrası ve hasat öncesi örnekler için RNA sekans okumalarının referans de novo birleştirilmiş transkriptoma haritalanmasında RSEM yazılımı, bowtie2 eşleme hatası tolerans parametresi 0 (default) şekilde kullanılmıştır (B. Li & Dewey, 2011). RSEM yazılımı örneklerin gen ekspresyonu seviyelerini belirlemede bowtie2 ile elde ettiği haritalama sonuçları ve her bir haritalanan gen için okuma sayısını kullanmaktadır. Ayrıca yazılım okuma sayısı değerlerini FPKM (Fragments per Kilobase per Million Mapped Reads) değerlerine çevirmektedir. FPKM değeri gen ekspresyonu düzeyini belirlemede kullanılan en yaygın metot olup, sekanslama derinliği ve gen uzunluğu parametrelerini dikkate alarak gen sayım değerlerinin normalizasyonunu gerçekleştirmektedir (Trapnell vd., 2010). Hasat sonrası ve hasat öncesi örneklerde ekspres edildiği bulunan genlerin her iki grup için karşılaştırılması, bir Venn diyagramı ile gösterilmiştir.

Diferansiyel gen ekspresyonu analizi ile hasat sonrası ve hasat öncesi örnekler arasında ekspresyonu değişen genlerin belirlenmesinde DESeq2 yazılımı kullanılmıştır

(Love vd., 2014). Diferansiyel gen ekspresyonu analizinde girdi olarak okuma sayısı kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı gen ekspresyonu değişimlerinin belirlenmesinde düzeltilmiş P-değeri (Padj) eşik değeri ≤ 0.05 ve log2foldchange eşik değeri ≥ 1 olarak uygulanmıştır. Kümeleme (cluster) analizi, benzer ekspresyon profili gösteren genlerin belirlenmesini sağlar. Diferansiyel ekspresyon analizi sonucunda heatmap (ısı haritası) grafiği, okuma sayılarının normalizasyonu sonucu hesaplanan FPKM değerlerine göre oluşturulmuştur.

3.6. Diferansiyel Ekspresyon Analiz Sonuçlarının Yolak Zenginleştirme Analizi

Ekspresyonu değişen genlerin yolak zenginleştirme analizi sonucunda bu genlerin hangi biyolojik fonksiyonlar yani yolaklar ile ilişkili genler oldukları belirlenebilmektedir. Çalışmada yolak zenginleştirme ile gen anotasyonu analizleri Gene Ontology (GO) veri tabanına dayanarak Blast2GO yazılımı ile gerçekleştirilmiş, gen tanımları Gene Ontology veri tabanından ilgili GO ID tanımının transfer edilmesi ile sağlanmıştır (Conesa & Götz, 2008). Düzeltilmiş p değeri 0.05 ve altında olan GO anotasyonları, ekspresyonu değişen genler (DEG) tarafından anlamlı düzeyde zenginleştirilmiş GO terimleri olarak belirlenmiştir. DEG'lerin anotasyonları, temel GO kategorileri olan CC (Cellular Component - Hücresel Bileşen), BP (Biological Process - Biyolojik Süreç) ve MF (Molecular Function - Moleküler Fonksiyon) kategorilerine göre sınıflandırılmış şekilde elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

Çalışma kapsamında, maydanoz bitkisinde hasat sonrası bozulmanın moleküler mekanizmaları gen ekspresyonu düzeyinde araştırılmıştır. Hasat sonrası bitkinin gen ekspresyonu düzeyinde geçirdiği değişimlerin belirlenmesi, hasat sonrası hangi metabolik yolların aktive ya da inaktive olduğu ve hasat sonrası bitkide görülen bozulma sürecinin açıklamasını yapmaktadır. Bu süreçte gen ekspresyonu düzeyinde meydana gelen değişiklikler, hasat sonrası bozulma süreci hakkında temel bilgileri vermektedir. Bunun için hasat öncesi ve hasat sonrası soğukta depolama koşulları altında muhafaza edilen numuneler arasındaki diferansiyel ekspresyon analizleri yapılmıştır. Hasat öncesi bitkileri, laboratuvar çalışmalarının yapıldığı aşamaya dek gereken optimal ışık ve sulama gibi gereksinimleri karşılanırken, hasat edilen numuneler tüketicilerin genel olarak uyguladığı koşullarda (+4°C'de 3 gün) muhafaza edilmiştir. Total RNA izolasyonu için maydanoz bitkisinin, yaprak dokularından örnek alınmıştır. Yaprak dokularından alınan numunelerin miktar ve kalitesinin total RNA izolasyonu için yeterli ve uygun olduğu görülmüştür. Çalışma kapsamında numunelerden total RNA izolasyonu yapılmış ve ardından gerekli kalite kontrol protokolleri uygulanmıştır. RNA numuneleri, Illumina kısa okuma sekanslama platformu kullanılarak sekanslanmıştır. Sekanslama işlemi sonrası elde edilen RNA-seq veri seti kullanılarak, biyoinformatik veri analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1. RNA-seq Veri Seti ve Biyoinformatik RNA-seq Analiz Sonuçları

Total RNA izolasyonu, çalışmanın temelleri, numunelerin durumu ve izolasyon sonrası devamında gerçekleştirilecek çalışmalar göz önünde bulundurularak uygun bir protokol belirlenerek gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası, RNA saflığının değerlendirmesi için gerekli spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Tam uzunlukta gen ekspresyon profil gerekliliği için RNA bütünlük testleri ve konsantrasyon ölçümleri de gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyon çalışması sonucunda elde edilen veriler, kalite ve bütünlük anlamında yeterli bulunmuştur.

4.2. Ham Sekans Verilerinin Kalite Analiz Değerleri

Çalışma kapsamında RNA numunelerinin sekanslama süreci, diferansiyel ekspresyon analizi gerçekleştirileceğinden ötürü kısa okuma yapan platformlar arasından seçilmiş olup, bunlar arasında yüksek doğruluk ve yüksek verimle çalışan, en önemlisi de

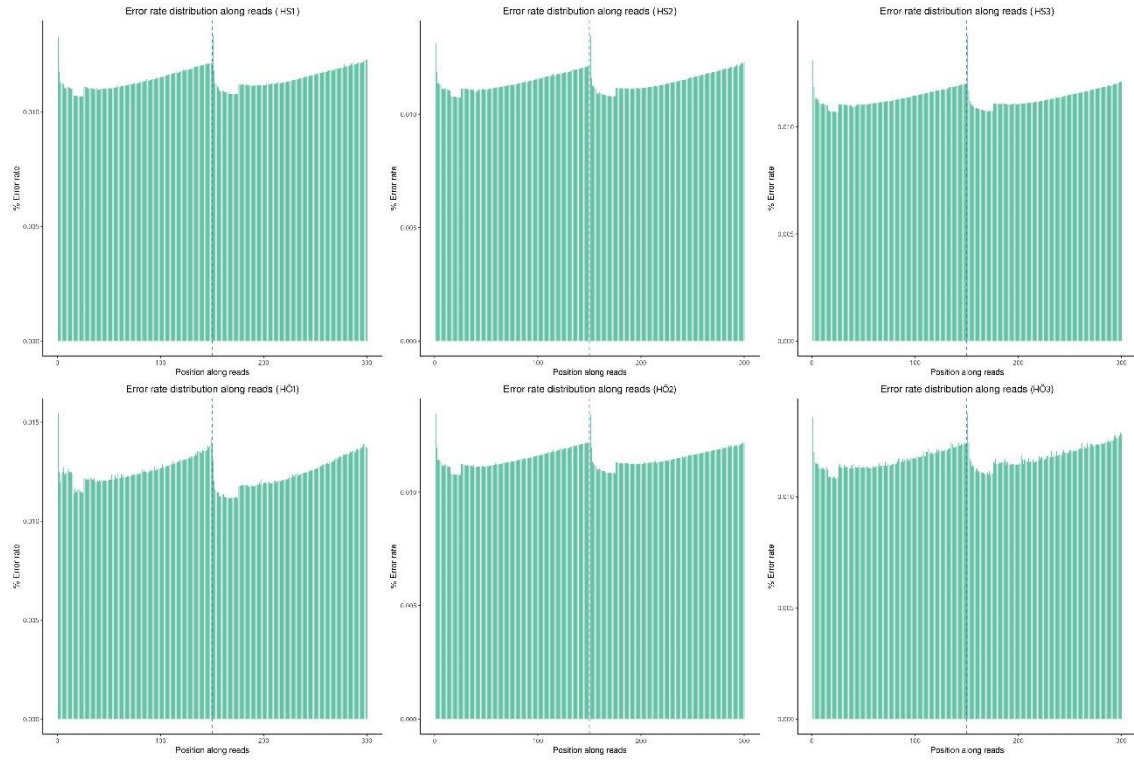
düşük hata oranıyla bilinen ve sentez ile sekanslama yapan (SBS) Illumina sekanslama platformu ile yürütülmüştür. Illumina, çalışma özelinde ve araştırma konusuna dayalı olarak farklı ihtiyaçlara yönelik çeşitli sekanslama platformlarını içinde barındırır. Çalışmamız özelinde yüksek verimli, en esnek ve güçlü platformlarından biri olan Illumina kısa okuma sekanslama platformu tercih edilmiştir. Sekanslama 150 baz çifti uzunluğunda ve çift yönlü okuma ile gerçekleştirilmiştir. Çift yönlü okuma, özellikle referans genomu olmayan organizmalarda de novo assembly çalışması için daha iyi bir örtüşme sağlanması açısından ideal yöntemdir, hizalamadaki belirsizliklerin ortadan kaldırılması için tercih edilir. Sekanslama sonrası elde edilen ham sekans verileri, baz kalitesi dağılımı, GC içeriği, adaptör ve kontaminasyon tespiti gibi birçok kalite kriterleri açısından analiz edilir. Bu amaçla FastQC ve ardından fastp yazılımı birlikte kullanılmıştır. Çift yönlü olarak sekanslanan verilerin, ham okuma sayısı çalışma için yeterli bulunmuştur. Okuma sayısının yüksek olması, analizin yeterli doğruluk ve derinlikte yapıldığını göstermektedir. FastQC analizinde hesaplanan Q-skoru (Kalite skoru) en önemli kalite göstergelerinden biridir, Phred kalite skoru olarak da bilinir. Q-skoru, baz çağırma işlemi sırasında okunan bazın doğruluğunun istatistiksel olarak tahmin edilmesini sağlayan bir ölçüm sonucunda elde edilir. Q-skoru değerleri logaritmik bir ölçekle ifade edilir ve hata oranlarını işaret eden Q20, Q30 gibi bir değerlerle ifade edilir. Phred skoru'nun 20 olması durumu (Q20) sekans okumalarının doğruluk oranının %99 olduğunu, Phred skoru'nun 30 olması durumu (Q30) okuma doğruluk oranının %99.9 olmasını ifade eder. Çalışmamızda yürütülen FastQC analiz sonuç tablosu aşağıda verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *FastQC Analiz Sonuçları*

Örnek	Ham Okumalar	Q20	Q30	GC İçeriği
HS1	53,999,505	99.01	97.15	42.32
HS2	48,718,651	99.02	97.11	42.37
HS3	45,574,243	99.09	97.27	42.92
HÖ1	45,454,602	98.33	95.33	43.87
HÖ2	45,286,038	98.98	97.03	42.34
HÖ3	56,320,168	98.78	96.62	42.30

Sekans okumalarının %98,87'si için Phred kalite skoru değeri 20 ve %96,75'i için ise 30 ve üzeri olarak hesaplanmıştır. Analizde ölçülen 0.01'lik hata oranı ile birlikte sekanslama verilerinin oldukça kaliteli ve güvenilir olduğu görülmektedir. Ortalama yüzde GC oranı ise 42,68 olarak hesaplanmıştır. Oran beklenen sınırlarda olduğu gibi anormal bir sapma da tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar da sekans verilerinin güvenilirliğini

desteklemektedir. Sekans verilerindeki hata oranının konuma bağılı dağılımı fastp yazılımı kullanılarak incelendiğinde, hata oranının Phred kalite skoruna çevrilerek Q20 seviyesinde olduğu belirlenmiştir, bu veri analizi çalışmalarımız için sekans kalitesinin uygun olduğunu göstermektedir. Okumalar 150 baz uzunluğunda yapılmakta ve hata oranı sona dizi etiketi sonunda nispeten artmaktadır, bu durum Illumina tabanlı sekanslama platformunda beklenmektedir.



Şekil 1. *Fastp Analizi Sonuçları*

Ham sekans verilerinde, düşük kaliteli bazların, ortalama kalite eşiğinin altındaki okumaların ve belirlenen uzunluk sağlamayan okumaların kesilmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir, bu şekilde okumaların doğruluk ve güvenilirliğinin artırılması amaçlanmıştır. Bu işlem Trimmomatic yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Trimmomatic raporu aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Trimmomatic Analiz Sonuçları

Örnekler	Okuma Sayısı	Korunan Okuma Sayısı (Çift)	Korunan Okuma Sayısı (Yalnızca İleri Okumalar)	Korunan Okuma Sayısı (Yalnızca Geri Okumalar)	Filtrelenen Toplam Okuma Sayısı
HS1	53,999,505	52,735,514 (97.66%)	673,888 (1.25%)	401,922 (0.74%)	188,181 (0.35%)
HS2	48,718,651	47,588,061 (97.68%)	571,577 (1.17%)	378,507 (0.78%)	180,506 (0.37%)
HS3	45,574,243	44,595,387 (97.85%)	493,716 (1.08%)	332,297 (0.73%)	152,843 (0.34%)
HÖ1	45,454,602	43,579,333 (95.87%)	600,295 (1.32%)	780,348 (1.72%)	494,626 (1.09%)
HÖ2	45,286,038	44,113,074 (97.41%)	595,379 (1.31%)	378,168 (0.84%)	199,417 (0.44%)
HÖ3	56,320,168	54,620,681 (96.98%)	870,120 (1.54%)	520,809 (0.92%)	308,558 (0.55%)

Ham veri 295,353,207 okuma (çift yönlü, 2x150bp) içermekte olup, belirlenen kriterleri taşımayan 1,524,131 okuma veriden çıkarılmıştır. Filtreleme sonrası 293,829,076 okuma (%99,48 korunma oranı) elde edilmiştir. Trimmomatic ile temizlenen sekans verileri, sekanslama sürecinde meydana gelmiş olabilecek hatalardan filtrelenerek ileri analizler için uygun hale getirilmiştir.

4.3 Transkriptom Birleştirme (Assembly) Sonuç Verisi

Transkriptom birleştirme işlemi, kısa okumaların analiz edilerek birleştirilmesi, anlam taşıyan ve tam uzunlukta belirli bir transkripti temsil eden gruplar yani contig'leri meydana getirme işlemidir. Montaj için Trinity yazılımı kullanılmıştır. Trinity, de novo transkriptom montaj için uygun bir yazılım olup hem Overlap Layout Consensus (OLC) hem de de Bruijn grafi tabanlı algoritmaları barındırmaktadır. de Bruijn grafi, okumaların daha kısa parçalara ayırarak bu parçalar arasındaki örtüşmeye dayalı birleştirmeler gerçekleştirir, olası birden çok birleştirme olasılığı doğduğunda ise transkriptin olası izoformları ve alternatif kesilme olayları düşünülerek döngüler çözülür. Kısa okuma sekans platformlarının çıktıları için uygun olan bu yöntem tam uzunlukta transkriptler meydana getirirken, aynı zamanda olası izoformları tanımlamayı sağlar. Transkriptom birleştirme işleminin sonucunda toplam 133,689 transkript elde edilmiştir. Hesaplanan ortalama yüzde GC oranının ise %40,80 olduğu belirlenmiştir, bu sonuç montaj sonuçlarının tutarlı olduğu göstermektedir.

Montaj kalitesinin değerlendirilmesi işlemi için elde edilen birleştirilmiş transkriptlerin N-değerleri hesaplanmıştır. N-değeri, transkriptlerin uzunluk

dağılımlarına dayalı olarak ölçülmektedir. N-değeri, elde edilen tüm birleştirilmiş transkriptler uzunluklarına göre sıralandığında, toplam uzunluğun belirli bir yüzdesini (örneğin N50 değeri için %50'sini) geçen en kısa transkript uzunluğudur. Montaj sırasında elde edilen birleştirilmiş transkriptlerin çoğunlukla kısa olması eksik ya da hatalı montajın gerçekleştiğini göstermektedir. Birleştirilmiş transkriptlerin uzun olması ise montaj kalitesinin başarılı olduğu ve tam uzunluklu transkriptlerin elde edildiği anlamına gelmektedir. Çalışmamız kapsamında elde edilen birleştirilmiş transkriptlerin uzunluk verileri ise aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3. Birleştirilmiş Transkriptlerin Uzunluk Verileri

	Oluşturulan tüm transkriptlere (tüm izoformlar) dayalı istatistikler
N50	1591
Ortalama transkript uzunluğu	1089
En uzun birleştirilmiş transkript	11,967
En kısa birleştirilmiş transkript	301
İşlenen toplam baz sayısı	145,586,598

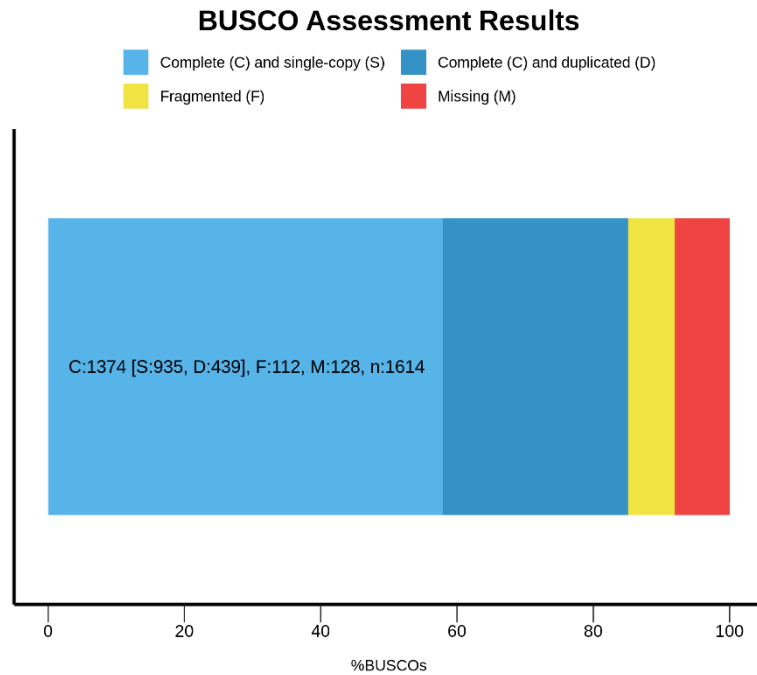
Montaj sonucunda oluşturulan tüm transkriptlere dayalı istatistiklerde N50 değeri 1591 olarak elde edilmiştir. Sonuçlarda dengeli bir transkript uzunluğu dağılımı gözlemlenmiş olup ortalama transkript uzunluğu 1089 baz olarak hesaplanmıştır. Okumaların, birleştirilmiş transkriptlere hizalanması ile TPM bazlı transkript bolluk tahmini yapılmıştır. Yapılan transkript bolluk tahmini ile ekspresyon matrisi elde edilmiştir. Elde edilen veriler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4. Ekspresyon Matrisi Verileri

	HS1	HS2	HS3	HÖ1	HÖ2	HÖ3
Okuma Sayısı (=0)	177,353	118,972	192,964	153,667	147,437	159,914
Okuma Sayısı (0-10)	6,924	61,594	1,727	31,966	36,121	12,06
Okuma Sayısı (≥ 10)	60,208	63,919	49,794	58,852	60,927	72,511
TPM (=0)	177,352	118,972	192,964	153,667	147,436	159,914
TPM (0-1)	11,906	40,104	3,943	24,214	26,031	17,818
TPM (≥ 1)	55,227	85,409	47,578	66,604	71,018	66,753

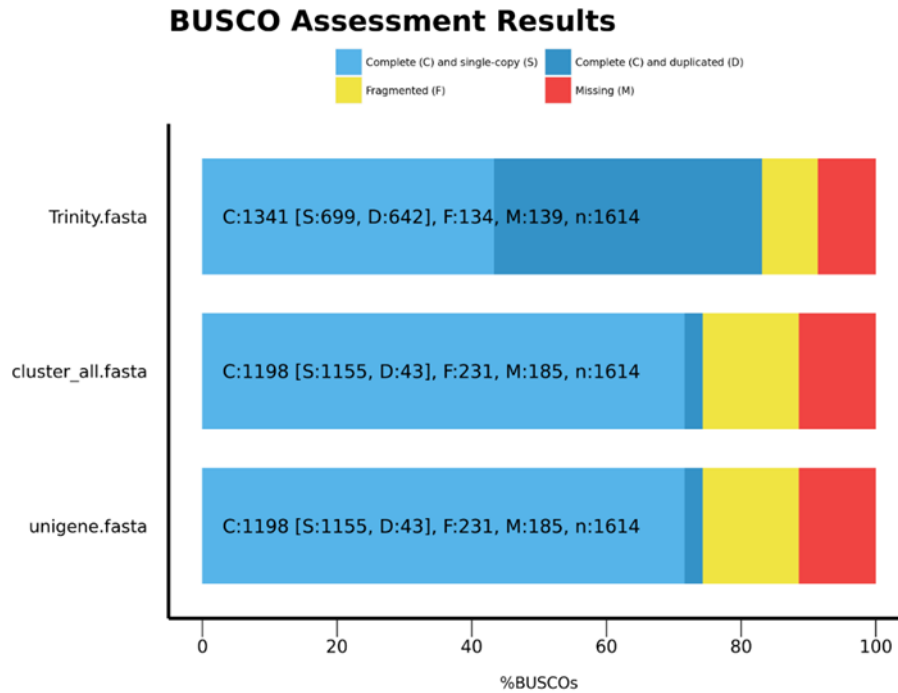
Elde edilen TPM değerlerine dayalı ekspresyon matrisi kullanılarak eksprese edilmeyen ve $TPM \leq 1$ değerlere sahip transkriptler filtrelenmiştir. Yüksek benzerliğe sahip dizileri kendi arasında gruplandırarak temsil dizilerinin seçilmesi ve kümeler

halinde birleştirmesi için cd-hit yazılımı çalıştırılmıştır. Kümeleme, aynı gene ait transkriptlerin tek birim olarak ele alınmasını sağlar ve diferansiyel ekspresyon analizini daha güvenilir bir hale getirir. Montaj kalitesinin ve bütünlüğünü değerlendirmek için BUSCO analizi gerçekleştirilmiştir. Organizmaların temel biyolojik işlevlerinin gerçekleştirilmesinden sorumlu, evrimsel olarak korunmuş, farklı türler arasında dahi çok az değişikliğe sahip, her bireyde mutlaka bulunan ve tek kopya gen olarak bulunan genler kullanılarak, ki bu genler ortolog genler olarak bilinir, genom analizi çalışmalarında bütünlük testi yapılır. Birleştirilmiş transkriptom verisinde ortolog genlerin bulunup bulunmadığı, eksiksiz ve tek kopya olması, parçalı halde bulunması ya da çok kopyalı olarak bulunması gibi tüm veriler BUSCO analizi sonucunda elde edilmektedir. Ortolog genlerin yüksek oranda tek kopya ve eksiksiz halde olması çalışmalarda istenen durumdur. Çalışmamızda BUSCO analizi için Embriyofit veri tabanında bulunan toplam 1614 adet ortolog gen referans olarak kullanılmıştır. Trinity çıktısı birleştirilmiş transkriptomun cd-hit yazılımı ile işlenmesi sonucunda elde edilen veriyle yürütülen BUSCO analiz grafiği aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Trinity Çıktısı Birleştirilmiş Transkriptomun Cd-Hit Yazılımı ile İşlenmesi Sonucunda Elde Edilen Verinin Yürütülen BUSCO Analiz Grafiği

Trinity çıktısı birleştirilmiş transkriptomun cd-hit yazılımı ile işlenmesi sonucunda elde edilen veriyle yürütülen BUSCO analiz sonucunda toplam 1374 tam gen belirlenmiş olup, 935 gen tek kopya ve 439 gen ise çok kopyalı gen olarak görülmektedir. Çok kopyalı gen oranı, alternatif contiglerin ve aynı genin transkriptinin farklı bölümlerini temsil eden birden fazla contig olduğuna işaret etmektedir ve transkriptom birleştirme çalışmalarında beklenen bir durumdur. Sonuçlar 112 genin birleştirilmiş transkriptom verisinde parçalı olarak bulunduğunu göstermektedir. Analizde kullanılan 1614 ortolog gen içinden 128 gen eksik olarak belirlenmiştir. Trinity yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen transkriptom birleştirme işleminin ardından Corset yazılımı kullanılarak, aynı gene ait transkriptlerin farklı bölgelerini temsil eden, transkript varyantı niteliğine olan ya da RNA-seq analizlerinin doğası gereği gözlemlenen alternatif transkriptlerin, aynı gene ait transkriptler olarak kümelenmesi sağlanmıştır. Trinity yazılımı kullanılarak birleştirilen transkriptom, Corset yazılımı kullanılarak eşdeğer contiglerden temizlenmiş ve her bir transkript edilen lokus için en uzun transkriptlerden oluşan unigene dosyası oluşturulmuştur (Davidson ve Oshlack, 2014). Yazılım ile toplam 77,103 adet unigene belirlenmiştir. Trinity çıktısı birleştirilmiş transkriptomun ve bu transkriptomun Corset yazılımı ile işlenmesi sonucunda elde edilen veriyle yürütülen BUSCO analiz grafiği aşağıdaki şekilde birlikte verilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Trinity Çıktısı Birleştirilmiş Transkriptomun ve Bu Transkriptomun Corset Yazılımı ile İşlenmesi Sonucunda Elde Edilen Verinin Yürütülen BUSCO Analiz Grafiği

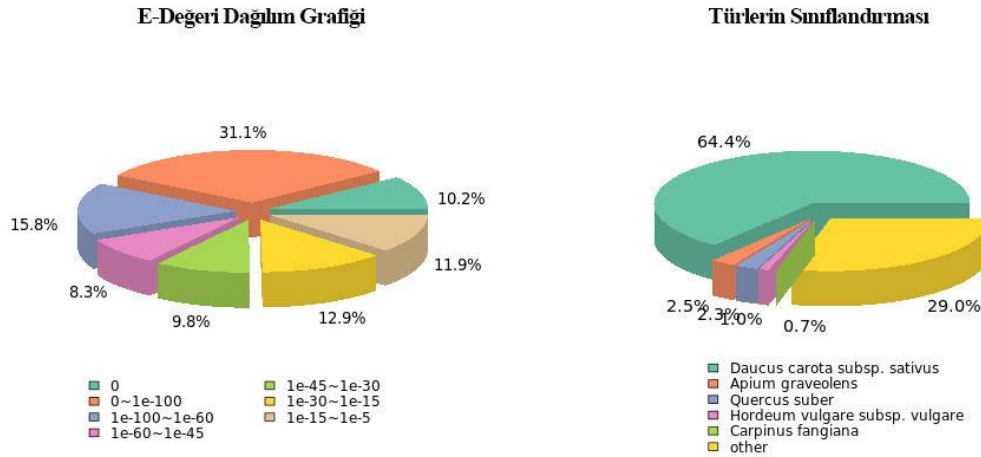
Trinity çıktısı birleştirilmiş transkriptomun filtrelenmeden gerçekleştirilen BUSCO analizi sonuçlarında toplam 1341 tam gen belirlenmiş olup, 699 gen tek kopya ve 642 gen ise çok kopyalı gen olarak görülmektedir. Çok kopyalı gen oranının yüksek olması alternatif contiglerin ve aynı genin transkriptinin farklı bölümlerini temsil eden birden fazla contig olduğuna işaret etmektedir ve transkriptom birleştirme çalışmalarında beklenen bir durumdur. Sonuçlar 134 genin birleştirilmiş transkriptom verisinde parçalı olarak bulunduğunu göstermektedir. Analizde kullanılan 1614 ortolog gen içinden 139 gen eksik olarak belirlenmiştir. Corset yazılımı ile kümeleme yapılan transkriptomun BUSCO analizlerine tabi tutulması sonucunda elde edilen veri incelendiğinde ise toplam 1198 tam gen belirlenmiştir, bunlardan 1155 genin tek kopya, yalnızca 43 genin çok kopyalı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak Corset yazılımının alternatif izoformların güvenilir bir şekilde kümeleme yaptığı görülmektedir. Yüksek sayıda tam ve tek kopyalı genlerin varlığı ile birlikte birleştirilmiş transkriptom verisinin büyük ölçüde eksiksiz olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar diferansiyel ekspresyon analizleri için birleştirilmiş ve kümelmiş transkriptom verisinin yeterli kalitede ve güvenilir olduğunu göstermektedir.

4.4. Birleştirilmiş Tüm Transkriptomun Anotasyon Verileri

Birleştirilmiş transkriptom çeşitli veri tabanları kullanılarak kapsamlı bir şekilde yapısal ve fonksiyonel anotasyon işlemi yürütülmüştür. Bu analizler transkriptlerin olası kodladığı proteinleri ve bunların işlevsel olarak hangi biyolojik süreçlerde yer aldığını belirlemek anlamında büyük önem taşımaktadır. TransDecoder yazılımı kullanılarak yürütülen analizleri sonucu CDS sekanslar ve en uzun potansiyel bütünlükte ORF sekans verileri oluşturulmuştur. En uzun ORF'leri içeren, potansiyel protein kodlama bölgesi olan 124,362 sekans belirlenmiştir. Kodlama potansiyeli taşıdığı doğrulanmış olan ise toplamda 80,939 sekans olduğu belirlenmiştir. Transkriptomun yapısal anotasyon verileri incelendiğinde, transkriptlerin büyük bir bölümünün NCBI resmi nükleotit ve peptid veri tabanları olan NT ve NR üzerinde tanımlı olan gen ve proteinlerle benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. NCBI NR, günümüzde kadar çalışması yapılan tüm protein dizilerini içermektedir ve bunu farklı organizmalarda aynı proteini kodlayan dizileri kümeleyen bir veri tabanıdır. NCBI NT, transkriptom seviyesinde mevcut tüm nükleotit dizilerini içeren geniş kapsamlı bir veri tabanıdır. Veri tabanında tanımlı nükleotit dizilimlerinin fonksiyonel anotasyon verisi mevcuttur, karşılaştırmalı dizi benzerlik analizleriyle elde ettiğimiz birleştirilmiş transkriptom verisinde benzerlik yoluyla anotasyon yoluna

gidilebilir. Bu işlemi yapan yazılım, genel adıyla BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritması belirli bir sorgu dizisini, tanımı bilinen veri tabanındaki dizilerle benzerlik karşılaştırması yaparak sonuç alır. BLASTN, NCBI NT veri tabanını kullanarak nükleotit-nükleotit karşılaştırması yaparken, BLASTP, NCBI NR veri tabanını protein-protein karşılaştırması yapar. BLAST karşılaştırma yürütürken sorgu dizisiyle birebir eşleşme sağlayan bölgeleri belirleyebilir fakat aynı zamanda belirli eksiklik ya da yanlışlık içeren bölgeleri de bu bölgelerin durumunu raporlayarak eşlemeye devam edebilir. Bu yüzden sonuçlar skorlama ve istatistiksel analizlerle desteklenmelidir, BLAST çıktılarında belirtilen E-değeri ve bit skoru gibi sonuçlar değerlendirilerek analiz tamamlanmalıdır. E-değeri, rastgele bir eşleşmenin gerçekleşmesinin olasılığını belirtir. Düşük E-değerleri eşleşmenin anlamlı olduğunu, yüksek değerler ise eşleşmelerin zayıf olduğu anlamına gelmektedir. Çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen BLAST analizi sonuçları incelendiğinde, NCBI NT veri tabanında mevcut nükleotit dizilerine karşılık gelen toplamda 30,387 sorgu dizisinin fonksiyonel anotasyon tanımlaması gerçekleştirilmiştir, bu sorgu dizilerinin tümü benzersizdir. NCBI NR veri tabanında mevcut protein dizilerine karşılık gelen toplamda 39,818 sorgu dizisinin fonksiyonel anotasyon tanımlaması gerçekleştirilmiştir, bu sorgu dizilerinin de tümü benzersizdir.

Çalışma kapsamında yürütülen BLAST analizi sonucu elde edilen eşleşmelerin E-Değeri dağılım grafiğinde, bu eşleşmelerin %10,2'sinin E-Değerinin 0 olduğu görülmektedir. E-Değerinin 0 olması, sorgu dizisi-veri tabanı eşleşmesinin tesadüfi olma olasılığının 0 olduğu, yani elde edilen eşleşmenin kesinlikle sekans homolojisinden kaynaklandığını göstermektedir. Şekil 4'de görüldüğü üzere tüm eşleşmelerin E-değerleri 0'a yakın değerlerdir. Örneğin eşleşmelerin %30'undan fazlası $1e-100$ 'den küçük E-değerine sahiptir. Yaklaşık %15'inden fazlası ise $1e-100 - 1e-60$ arası, son derece düşük E-değeri ile yüksek homolojiye işaret etmektedir. Analizlerde $1e-5$ eşik E-değeri uygulanarak elde edilen homolojiye dayalı anotasyonların yüksek istatistiksel güvenilirlikte olması sağlanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. E-Değeri Dağılım Grafiği ve Türlerin Sınıflandırma Grafiği

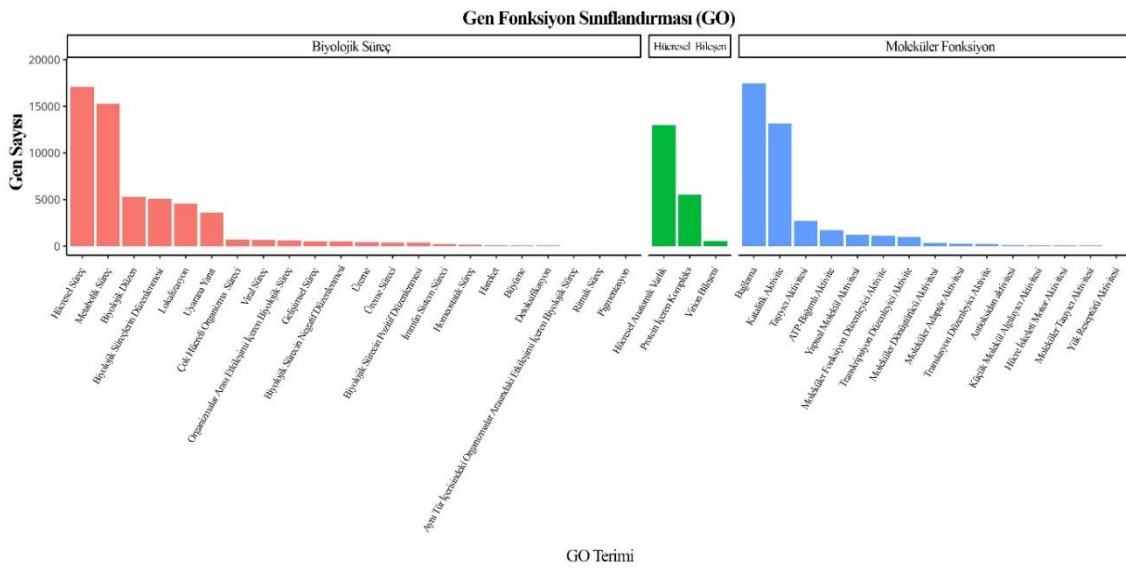
BLAST dizi karşılaştırmalarını yaparken veri tabanında eşleşme sağlayan dizinin ait olduğu organizmaya ait bilgileri vermektedir. Tüm eşleşmelerin hangi türlerle gerçekleştiği, bunların sayısal ve yüzdeler olarak değerlerinin verildiği grafikler oluşturulabilmektedir. Bu verilerde baskın olarak eşleşme gösteren türlerin, birleştirilmiş transkriptom analizlerinin başarılı olarak gerçekleşmesi halinde, çalışılan organizmaya filogenetik olarak yakın bir tür ile gerçekleşmesi beklenmektedir. Çalışmamız kapsamında elde edilen BLAST türlerin sınıflandırma grafiklerine göre transkriptlerin %64,4'lük bir oranının, Apiaceae familyasına ait *Daucus carota subsp. Sativus* yani havuç bitkisi ile eşleşme sağladığı görülmüştür. Bu sonuç transkriptom montajının başarıyla sonuçlandığını göstermektedir, eşleşmelerin yüksek bir kısmının aynı familyadan bir türle olması beklenen bir sonuçtur. Eşleşmelerin yüksek olduğu diğer organizma ise yine Apiaceae familyasına ait olan *Apium graveolens* (kereviz) ile %2,5 oranında gerçekleştiği görülmektedir. Diğer eşleşmeler ise *Quercus suber* (%2,3), *Hordeum vulgare* subsp. vulgare (%1,0), *Carpinus fangiana* ve diğer çeşitli familyalardan çeşitli türler, model organizmalar (%29,0) ile gerçekleşmiştir (Şekil 4).

COG (clusters of orthologous genes) veri tabanı kullanılarak eggNOG yazılımı ile analizler gerçekleştirilmiştir. COG, genleri fonksiyonlarına göre sınıflandıran ve evrimsel olarak korunmuş genlerin tanımlanmasını sağlayan bir veri tabanıdır. Veri tabanında harflerle temsil edilen toplamda 26 farklı kategori mevcuttur ve her kategori belirli bir biyolojik fonksiyonu gerçekleştiren genleri içermektedir. Ortolog genler olarak adlandırılan bu genlerin aynı atasal sekanstan türediği düşünülmektedir. Türleşme olayı sırasında ortak atadan aktarılan, evrimsel bağlamda farklı türlerde aynı biyolojik işlevi gerçekleştiren genlerdir ve ortolog genler olarak adlandırılmaktadır. Genlerin aynı tür

içerisinde gen dublikasyon sonucu birden çok kopya halinde bulunması durumunda genler çeşitlenmiş işlevler kazanabilir, bu durumda ise paralog genler olarak adlandırılırlar. Ortolog genlerin sınıflandırılması yapılırken, bu sınıflandırmalara paralog genlerin dahil edilmemesi gerekir fakat COG veri tabanı, en iyi eşleşmelerin belirlenmesi prensibine dayalı olarak sınıflandırma yaptığından dolayı, aynı fonksiyonu koruyan paralog genleri de ortolog gruplara dahil etmesi mümkündür, bu yüzden pekiştirilmiş diğer analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. COG analizi sonucunda toplamda 14.929 gen, başarılı bir şekilde COG gruplarına atanmıştır. En çok gen içeren kategoriler; 1.629 gen ile R (%10,9), 1.546 gen ile O (%10,3), 1.542 gen ile J (%10,3), 851 gen ile T (%5,7), 839 gen ile S (%5,6), 818 gen ile A (%5,4), 789 gen ile C (%5,2), 781 gen ile U (%5,2) kategorisinden oluşmakta olup toplam genlerin yüzde %58,92'si bu 8 kategori içinde yer almaktadır. Bu kategorilerden R, genel fonksiyonu deneysel olarak kanıtlanmamış fakat hipoetik olarak işlevi tahmin edilen genlerden oluşan bir kategoridir. O kategorisi, translasyon sonrası proteinlerin tüm işleme süreçlerinde yer alan genleri içermektedir. J kategorisi ise translasyon süreci ve ribozomal yapıda yer alan genleri içermektedir (T: Sinyal iletimi mekanizması, S: Fonksiyonu bilinmeyen, A: RNA işleme ve modifikasyonu, C: Enerji üretimi ve dönüşümü, U: hücre içi taşınım, sekresyon ve veziküler taşınım).

Blast2GO aracı kullanılarak GO anotasyonları gerçekleştirilmiştir. GO anotasyonu sırasında, veri tabanı ile karşılaştırmalar sonucu elde edilen eşleşmelerin fonksiyonel olarak sınıflandırmalarını yapmaktadır. Sınıflandırmalar üç temel başlık altında toplanmaktadır, bu başlıklar; biyolojik süreç, hücresel bileşen ve moleküler fonksiyon olarak adlandırılmıştır. Biyolojik süreç, organizmanın mevcut durumunda fizyolojik ihtiyaçlarını karşılamak için birden çok genin aktif bir şekilde birlikte çalışarak yürütülen bir süreçtir. Homeostatik durumun korunmasından, pigmentasyon, detoksifikasyon gibi geniş bir kapsamı vardır. Moleküler fonksiyon, gen veya protein ürünlerinin ne yaptığı ve hangi biyokimyasal aktiviteyi meydana getirdiğine odaklanmaktadır. Çoğu zaman katalitik aktivite, bağlama aktivitesi ya da taşıyıcı protein aktiviteleriyle bağlantılıdır. Hücresel bileşen, hücresel yapı ve fonksiyonlarının mevcudiyeti ve süregelen fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi süreçleri kapsamaktadır. Blast2GO aracı kullanılarak yapılan GO çalışması sonucunda toplamda 32.437 genin anotasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyolojik süreçler sınıflandırmasına ait 17.079 genin hücresel süreçlerde, 15.233 genin ise metabolik süreçlerde rol aldığı görülmektedir. Hücresel ve metabolik süreçler, hücre düzeyinde gerçekleşen gelişme, büyüme bölünme ya da enerji üretimi, molekül sentezi

gibi tüm biyolojik süreçleri kapsamaktadır. Dolayısıyla yüksek sayıda gene ilişkilendirilmesi mümkündür. Moleküler fonksiyon sınıflandırmasına dahil edilen ve bağlama aktivitesinden sorumlu 17.469 gen belirlenmiştir. Bağlanma aktivitesi transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yeteneğinden, enzim-substrat etkileşimlerine, çok genel bir aktiviteyi kapsamakta olduğundan dolayı yüksek sayıda genin bu sınıflandırmaya dahil olması şaşırtıcı değildir. Hücresel bileşen sınıflandırmasına ait 12.983 genin hücresel anatomik varlığını sağlama görevini sürdürdüğü belirlenmiştir. Hücresel anatomik varlık, organelleri, hücre iskeleti yapılarını ve dahasının fiziksel ve yapısal özelliklerinin sürdürülmesidir, bu bağlamda hücre için mutlak önem taşımaktadır.



Şekil 5. Gen Fonksiyon Sınıflandırma Analiz Verileri

Elde edilen sınıflandırma tablosuna göre anotasyonu yapılan genlerin, %48,7'si biyolojik süreçler, %34,6'sı moleküler fonksiyonlar ve %16,7'si hücresel bileşenler ile ilişkilendirilmiştir.

4.5. Gen Ekspresyon Değişim Verileri

Trinity yazılımı ile oluşturulan birleştirilmiş transkriptom verisi, Corset yazılımı ile işlenerek eşdeğer transkriptlerin genlere birleştirilmesi sağlanmıştır. Elde edilen nihai birleştirilmiş transkriptom verisi, sekans okumalarının haritalanması ve ekspresyon kuantifikasyonu için yürütülen RSEM ve bowtie2 analizlerinde referans transkriptom verisi olarak kullanılmıştır. RSEM ve bowtie2 yazılımları birbirleriyle entegre olarak kullanılabilen analiz araçlarıdır. bowtie2 yazılımı, referans transkriptom verisine sekans okuma verilerini hizalama işini yaparken, RSEM yazılımı ise hizalanan okuma verilerinin kuantifikasyonunu gerçekleştirerek gen ekspresyon düzeylerini tahmin etmektedir.

Çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen analizin sonucunda haritalanan okumaların istatistikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 5. Bowtie Hizalama Analizinin Verileri

Örnek Adı	Toplam Okuma sayısı	Haritalanan Okumalar
HS1	53129028	45266712(85.20%)
HS2	47917806	40722373(84.98%)
HS3	44955957	38124527(84.80%)
HÖ1	44706782	38603267(86.35%)
HÖ2	44544597	37657111(84.54%)
HÖ3	55339887	46249268(83.57%)

Bowtie2 yazılımı kullanılarak hizalanan toplamda 290,594,057 okuma, ortalama 84.91%'lik oranda başarıyla referans transkriptoma haritalanmıştır. Bu sonuçlar Trinity yazılımı ile birleştirilmiş ve Corset yazılımı ile eşdeğer transkriptler genlere birleştirilecek şekilde işlenmiş olan transkriptomun, RNA-seq verisini temsil edebilecek kaliteye sahip olduğunu ve diferansiyel ekspresyon analizlerini gerçekleştirmek için uygun bir referans transkriptom verisi olduğunu açıkça göstermektedir. RSEM analizinin hesaplanmış kuantifikasyon büyükverisinin bir kısmı, BLAST analizleri sonucunda elde edilen anotasyon verileriyle birlikte aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 6).

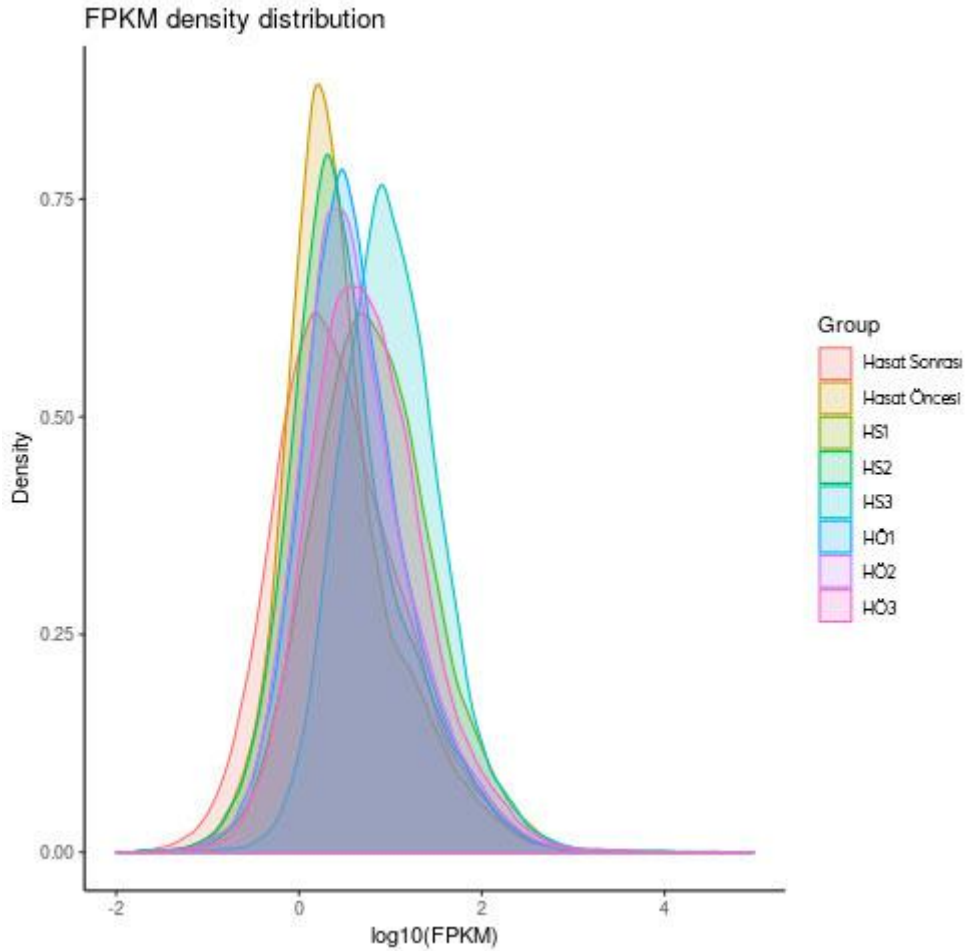
Tablo 6. RSEM Analizi Verileri

gene id	HS1	HS2	HS3	HÖ1	HÖ2	HÖ3	Gene	Gene	Gene
							Ontology	Ontology	Ontology
							BP	MF	CC
Cluster-39552.0	501.0	423.0	395.0	226.0	420.0	645.0	GO:000688		GO:000573
	0	0	0	0	0	0	6	--	9
Cluster-45901.1	70.00	27.00	0.00	0.00	0.00	15.00	GO:000599	GO:000382	
							2	4	--
Cluster-4711.0	0.00	0.00	0.00	15.00	25.00	0.00	GO:000926	GO:000437	
							3	9	--
Cluster-47950.0	584.0	228.0	204.0	389.0	423.0	526.0	GO:005508		GO:001602
	0	0	0	0	0	0	5	--	0
Cluster-54419.0	1145.	1429.	1660.	1125.	928.0	1300.	GO:003114	GO:009760	GO:000568
	00	00	00	00	0	00	5	2	0
Cluster-19188.0	0.00	11.00	67.00	0.00	0.00	15.00		GO:000827	
							--	0	--
Cluster-31308.0	0.00	11.00	0.00	8.00	4.00	0.00	GO:005508		
							5	--	--
Cluster-39040.0	52.00	41.00	0.00	19.00	18.00	52.00	GO:000635	GO:000551	
							5	5	--
Cluster-35319.3201	1567	1345	8263.	8827.	1613	1937		GO:000372	
	5.00	3.00	00	00	5.00	3.00	--	3	--

Cluster-42166.0	1304.00	761.00	668.00	991.00	1392.00	1364.00	GO:001631 0	GO:000467 2	--
Cluster-36825.0	3144.00	1753.99	989.00	246.00	677.00	754.00	GO:000909 4	GO:000466 4	--
Cluster-35319.4725	3158.600	2413.400	1770.400	2756.677	1777.100	2193.900	--	GO:001679 1	--
Cluster-35319.4724	2208.549	1864.369	7311.00	6942.00	1350.200	1829.200	GO:007197 3	GO:000377 4	GO:000942 5
Cluster-35319.4721	8553.45	6769.14	5741.65	6631.01	7480.00	8860.02	--	GO:000367 7	GO:000563 4
Cluster-35319.4720	1543.00	1190.00	753.00	1468.00	1542.00	1593.00	--	GO:004687 2	--
Cluster-35319.4723	868.00	664.00	479.00	302.00	662.00	655.00	GO:000637 8	--	GO:000584 9
Cluster-11350.0	0.00	0.00	0.00	17.00	16.00	0.00	GO:000688 6	GO:005009 7	--
Cluster-35319.3324	3122.00	2003.00	1357.00	1106.00	1520.00	1809.00	GO:000688 6	GO:000486 5	GO:000567 2
Cluster-39160.0	642.00	565.00	194.00	473.00	571.00	766.00	GO:003637 6	GO:001508 1	GO:003196 5
Cluster-35319.4099	6207.00	6384.00	4430.00	2495.00	5626.00	6891.00	GO:190260 0	GO:004696 1	GO:003318 0
Cluster-35319.1877	371.00	199.00	180.00	266.00	522.00	565.00	--	GO:000367 7	--
Cluster-35319.4097	7373.00	1219.93	1732.626	2066.00	3447.74	4403.00	GO:000651 0	GO:000417 6	GO:001602 0
Cluster-35319.4094	2633.774	3171.339	1904.900	1077.166	1438.713	1638.700	GO:000680 4	GO:002003 7	--
Cluster-35319.4093	1650.00	1432.00	1411.00	798.00	1263.00	1079.00	GO:000688 6	GO:000827 0	GO:003012 7
Cluster-35319.4092	2809.00	3091.89	2818.00	3288.76	3377.00	3263.00	GO:000646 8	GO:000467 2	--
Cluster-37402.0	542.00	307.00	339.00	413.00	300.00	576.00	GO:000865 4	GO:000871 5	GO:001602 0
Cluster-39926.0	1073.00	1688.00	350.00	670.00	868.00	731.00	GO:000646 8	GO:000467 2	--
Cluster-39892.0	552.00	312.00	591.00	450.00	599.00	573.00	--	GO:000382 4	--
Cluster-47628.0	412.00	401.00	282.00	265.00	247.00	444.00	--	GO:001674 7	--
Cluster-5580.0	0.00	0.00	0.00	119.00	0.00	0.00	GO:000645 7	GO:000425 2	GO:000578 3
Cluster-52872.0	16.00	58.00	1684.00	445.00	25.00	36.00	GO:001598 6	GO:001507 8	GO:000027 6
Cluster-48983.0	114.00	122.00	134.00	46.00	120.00	131.00	GO:003969 3	GO:001688 4	--
Cluster-35319	1456.00	3574.00	1380.00	7955.00	2176.400	1297.700	GO:000597 5	GO:000455 3	--
Cluster-38273.0	678.00	544.00	532.00	707.00	849.00	837.00	GO:004254 6	GO:000519 9	GO:000561 8
Cluster-54869.0	402.00	64.00	547.00	78.00	160.00	459.00	GO:000681 1	GO:001527 6	GO:001602 0
Cluster-35319	3934.00	2250.82	1860.00	1455.00	1549.00	1857.00	GO:000640 2	GO:004687 2	GO:000563 4
Cluster-42749.0	671.05	560.75	457.00	327.00	445.00	405.00	GO:000646 8	GO:000552 4	GO:001602 0

Not. RSEM analizi verileri, veri büyüklüğü sebebiyle kısmen tabloda gösterilebilmektedir.

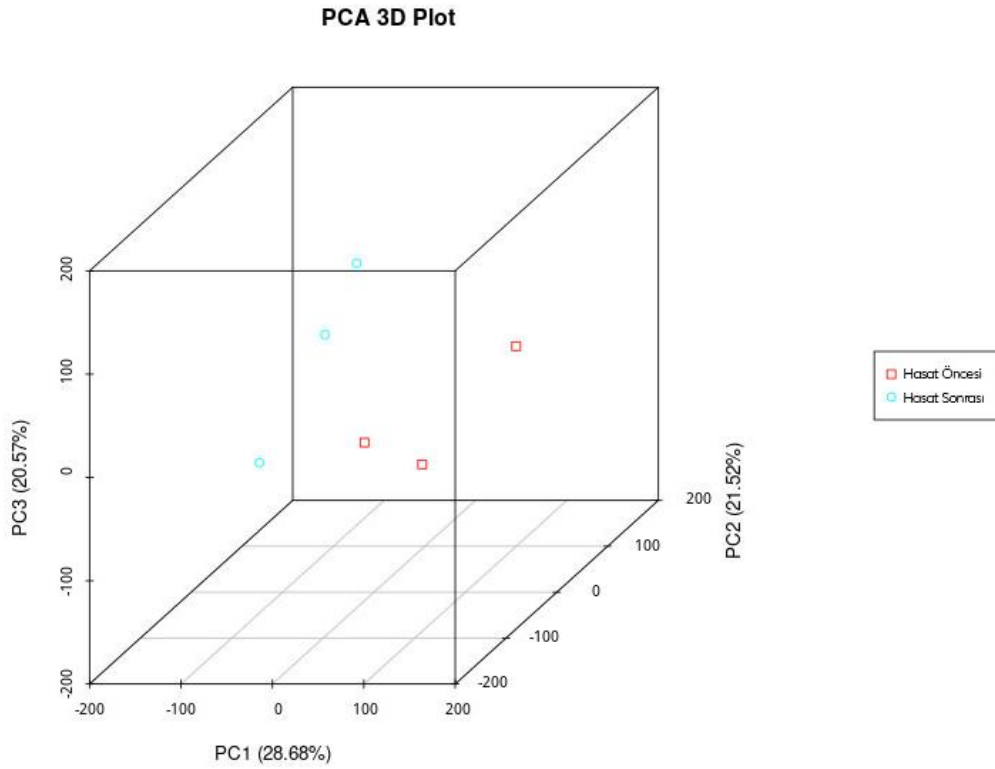
Bowtie2 ile gerçekleştirilen hizalanma verilerini işleyen RSEM yazılımı kuantifikasyon verilerini FPKM değerleriyle sonuçları rapor etmektedir. FPKM, referans transkriptoma hizalanan okumanın uzunluğunu, okuma sayısına oranı şeklinde hesaplanırken, bu yöntemle aynı zamanda normalizasyon gerçekleştirmektedir. RSEM analiz sonucu elde edilen FPKM yoğunluk tablosu aşağıdaki tabloda verilmiştir.



Şekil 6. FPKM Yoğunluk Dağılım Grafiği

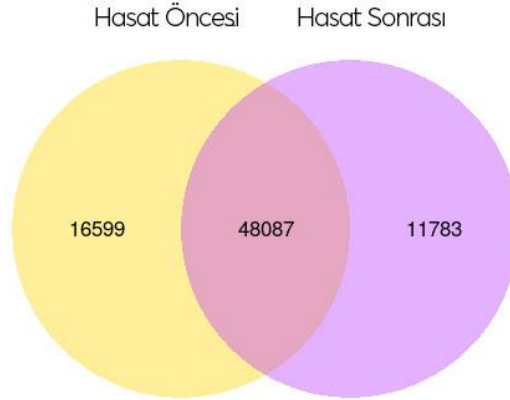
Grafikte yer alan hasat öncesi ve sonrası grupları için oluşturulan eğrilere bakıldığında hasat öncesinde gen ekspresyonunun genel olarak daha yüksek düzeyde gerçekleşmiş olduğu görülmektedir. RSEM analizi sonucu elde edilen gen ekspresyon düzeyleri kullanılarak, örnekler arasındaki varyansın analiz edilmesi için temel bileşenler analizi (PCA) gerçekleştirilmiştir. PCA analizi karmaşık verilerde, temel değişkenleri baz alarak varyans analizi yapan bir yazılımdır. Yazılım değişkenleri, PC1 (birinci ana bileşen), PC2 (ikinci ana bileşen) ve PC3 (üçüncü ana bileşen) olarak isimlendirilir ve her biri için belirlediği değişkeni, veriler arasında analiz eder ve verilerin birbirleri arasındaki değişkenliğini rapor eder. PC1 en derin farklılıkları gösteren değişken olup, PC2 ve PC3

ardından gelmektedir fakat tüm bu bileşenler birbirlerinden bağımsızdır. Örnekler arasındaki değişkenliklerin hesaplanması üzerine, değişkenliklerin veriyi açıklama oranı ise determinasyon katsayısı, diğer bir isimle R2 değeri ile ifade edilmektedir. Gerçekleştirilen PCA sonucu hesaplanan R2 değerine göre oluşturulan üç boyutlu dağılım grafiği aşağıda verilmiştir.



Elde edilen sonuçlara göre örnekler arasındaki değişkenlikleri birinci ana bileşen %28,68 oranında, ikinci ana bileşen %21,52 ve üçüncü ana bileşen %20,57 oranında açıklamaktadır. Örnekler arasındaki hesaplanan değişkenliklerin, %70,77 oranında asıl veriyi temsil ettiği görülmektedir. Ana bileşenlerin hesaplanan değerlerinin birbirlerine yakın olması ve birinci ana bileşenin diğer bileşenlere bariz baskınlığının olmaması, örnekler arasında değişkenliklerin net bir ana faktör ile sınırlandırılmayacağı, karmaşık örnek gruplarının mevcut olduğunu göstermektedir. PCA analizinde karşılaşılan bu sonuç, örnekler arasındaki değişkenliklerin çoklu küçük değişikliklerden meydana geldiğini belirtmektedir.

Analizler sonucu eksprese edildiği belirlenen 76.469 gen, hasat sonrası ve hasat öncesi örneklerinde karşılaştırıldığında yalnızca hasat sonrası örneklerinde eksprese edilen 11.783 gen ve yalnızca hasat öncesi örneklerinde eksprese edilen 16.599 gen belirlenmiştir. Hem hasat öncesi hem de hasat sonrası örneklerinde eksprese edilen ise 48.087 gen belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Venn diyagramı ile özetlenmiştir.



Şekil 8. Eksprese Edildiği Belirlenen Genlerin Örnekler Arası Dağılım Grafiği

Diferansiyel gen ekspresyonu analizi ile hasat sonrası ve hasat öncesi örnekler arasında ekspresyonu değişen genlerin belirlenmesinde DESeq2 yazılımı kullanılmıştır (Love vd., 2014). Gen ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişiklikler, belirli bir koşul altında gerçekleştiği durumda, organizmanın o koşula karşı verdiği tepkileri meydana getirmektedir. DESeq2 gen ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimleri, karşılaştırmalı olarak analiz eden bir yazılımdır. Diferansiyel gen ekspresyonu analizinde girdi olarak okuma sayısı kullanılmıştır. Gen ekspresyon düzeyini, $\log_2\text{FoldChange}$ ve p-değeri gibi değerler ile rapor etmektedir. $\log_2\text{FoldChange}$ değeri, ekspresyon düzeyi farklılığının logaritmik ölçekte ifadesidir. P-değeri ise yanlış anlamlı sonuçların ortaya çıkmasını engellemek amacıyla yapılan bir hesaplamanın istatistiksel sonucudur ve p-değeri 0.05'in altında olduğunda sonuç anlamlı olarak kabul edilmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı gen ekspresyonu değişimlerinin belirlenmesinde düzeltilmiş P-değeri (Padj) eşik değeri ≤ 0.05 ve $\log_2\text{foldchange}$ eşik değeri ≥ 1 olarak uygulanmıştır. Kümeleme analizi, benzer ekspresyon profili gösteren genlerin belirlenmesini sağlar. Diferansiyel ekspresyon analizi sonucunda heatmap (ısı haritası) grafiği, okuma sayılarının normalizasyonu sonucu hesaplanan FPKM değerlerine göre oluşturulmuştur.

4.6. Diferansiyel Ekspresyon Analiz Sonuçlarının Yolak Zenginleştirme Analiz

Sonuçları

Birleştirilmiş transkriptom verisi ile gerçekleştirilen fonksiyonel anotasyon çalışmaları, Gene Ontology veri tabanına dayanarak Blast2GO yazılımı ile gerçekleştirilmiştir (Götz vd., 2008). Diferansiyel ekspresyon analizi, gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerle birlikte, belirlenen genlerin fonksiyonel anotasyon verilerini de rapor etmektedir. Diferansiyel ekspresyon analizi çalışmasında ve sonrasında gerçekleştirilen filtrelemeler sonucunda gen ekspresyon düzeyi en anlamlı ve yüksek düzeyde değişen genler (DEG) belirlenmiştir. DEG'ler ile yolak zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir. Yolak zenginleştirme analizi, DEG'lerin fonksiyonel anotasyonunu göz önünde bulundurarak biyolojik süreçlerde aldığı rollere göre sınıflandırır ve belirli bir biyolojik süreç veya yolaklarda DEG'lerin toplanma, yoğunlaşma durumunu göstermektedir. Bu yöntem DEG'lerin çoğunluğunun kastedilerek biyolojik anlamlarının belirlenmesini sağlamaktadır ve DEG'lerin fonksiyonel anotasyonunun belirli biyolojik süreç veya yolaklarla ilişkili genlerden oluştuğu ya da rastgele dağılım gösterdiği sonuçlarını verebilmektedir. Yolak zenginleştirme analizi ile DEG'lere ait fonksiyonel anotasyon verilerine ait gen tanımları Gene Ontology veri tabanından ilgili GO ID tanımının transfer edilmesi ile sağlanmıştır. Ardından düzeltilmiş p-değeri 0.05 ve altında olan DEG'lerin GO anotasyonları belirlenerek ve anlamlı düzeyde zenginleştirilmiş GO terimleri olarak rapor edilmiştir. DEG'lerin anotasyonları, temel GO kategorileri olan hücresel bileşen, biyolojik süreç ve moleküler fonksiyon kategorilerine göre sınıflandırılmış şekilde elde edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Tablo 7. Yolak Zenginleştirme Analizi Sonuç Tablosu (HÖ yüksek ekspresyon)

Kategori	GO ID	Tanım	Gen Oranı	AP Oranı	Sayım
BP	GO:0006457	protein folding	13 511	199 25980	13
BP	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	51 511	1436 25980	51
MF	GO:0016853	isomerase activity	17 511	366 25980	17
MF	GO:0016829	lyase activity	20 511	464 25980	20
CC	GO:0009579	thylakoid	12 511	254 25980	12
CC	GO:0005768	endosome	4 511	47 25980	4
BP	GO:0030154	cell differentiation	9 511	184 25980	9
BP	GO:0042254	ribosome biogenesis	30 511	1291 25980	30
BP	GO:0015979	photosynthesis	12 511	279 25980	12
BP	GO:0031047	gene silencing by RNA	4 511	44 25980	4
MF	GO:0003824	catalytic activity	315 511	13704 25980	315

MF	GO:0005215	transporter activity	61 511	2387 25980	61
MF	GO:0016491	oxidoreductase activity	65 511	2461 25980	65
MF	GO:0005198	structural molecule activity	33 511	1550 25980	33
CC	GO:0005840	ribosome	26 511	1289 25980	26
CC	GO:0005783	endoplasmic reticulum	16 511	565 25980	16
BP	GO:0006575	cellular modified amino acid metabolic process	8 511	211 25980	8
BP	GO:0030163	protein catabolic process	15 511	437 25980	15
BP	GO:0007005	mitochondrion organization	7 511	205 25980	7
BP	GO:0044782	cilium organization	2 511	32 25980	2
BP	GO:1901135	carbohydrate derivative metabolic process	38 511	1464 25980	38
BP	GO:0006399	tRNA metabolic process	17 511	545 25980	17
BP	GO:0048856	anatomical structure development	12 511	404 25980	12
CC	GO:0000228	nuclear chromosome	7 511	192 25980	7
CC	GO:0009536	plastid	2 511	35 25980	2
CC	GO:0031410	cytoplasmic vesicle	7 511	214 25980	7
BP	GO:0055085	transmembrane transport	50 511	2212 25980	50
CC	GO:0005929	cilium	4 511	138 25980	4
BP	GO:0006629	lipid metabolic process	32 511	1264 25980	32
BP	GO:0006766	vitamin metabolic process	7 511	272 25980	7
CC	GO:0005618	cell wall	3 511	86 25980	3
BP	GO:0051604	protein maturation	7 511	309 25980	7
BP	GO:0050877	nervous system process	2 511	66 25980	2
BP	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	18 511	760 25980	18
BP	GO:0055086	nucleobase-containing small molecule metabolic process	33 511	1480 25980	33
BP	GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	5 511	184 25980	5
CC	GO:0030312	external encapsulating structure	4 511	155 25980	4
BP	GO:0007059	chromosome segregation	5 511	199 25980	5
BP	GO:0006914	autophagy	2 511	71 25980	2
BP	GO:0061024	membrane organization	5 511	207 25980	5
MF	GO:0044183	protein binding involved in protein folding	1 511	30 25980	1
BP	GO:0065003	protein-containing complex assembly	15 511	681 25980	15
BP	GO:0006486	protein glycosylation	4 511	143 25980	4
CC	GO:0005576	extracellular region	22 511	1080 25980	22
MF	GO:0016209	antioxidant activity	6 511	234 25980	6
CC	GO:0005764	lysosome	1 511	30 25980	1
CC	GO:0005829	cytosol	3 511	99 25980	3
BP	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	6 511	237 25980	6
MF	GO:0016787	hydrolase activity	120 511	5720 25980	120
BP	GO:0098542	defense response to other organism	4 511	182 25980	4
CC	GO:0031012	extracellular matrix	1 511	36 25980	1
MF	GO:0098772	molecular function regulator	22 511	1058 25980	22

MF	GO:0060090	molecular adaptor activity	1 511	28 25980	1
MF	GO:0016740	transferase activity	121 511	5324 25980	121
BP	GO:0002376	immune system process	5 511	252 25980	5
BP	GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	3 511	161 25980	3
MF	GO:0060089	molecular transducer activity	5 511	303 25980	5
BP	GO:0140013	meiotic nuclear division	1 511	49 25980	1
MF	GO:0048018	receptor ligand activity	4 511	218 25980	4
BP	GO:0000910	cytokinesis	3 511	157 25980	3
MF	GO:0016874	ligase activity	8 511	392 25980	8
CC	GO:0005615	extracellular space	3 511	198 25980	3
BP	GO:0042060	wound healing	2 511	138 25980	2
BP	GO:0006260	DNA replication	11 511	648 25980	11
MF	GO:0140096	catalytic activity, acting on a protein	83 511	3944 25980	83
CC	GO:0005635	nuclear envelope	1 511	60 25980	1
CC	GO:0005773	vacuole	2 511	95 25980	2
CC	GO:0005694	chromosome	16 511	798 25980	16
CC	GO:0005794	Golgi apparatus	3 511	165 25980	3
CC	GO:0005811	lipid droplet	1 511	58 25980	1
BP	GO:0016071	mRNA metabolic process	7 511	415 25980	7
BP	GO:0006886	intracellular protein transport	14 511	758 25980	14
MF	GO:0140098	catalytic activity, acting on RNA	20 511	1062 25980	20
CC	GO:0005777	peroxisome	1 511	68 25980	1
BP	GO:0007155	cell adhesion	3 511	258 25980	3
BP	GO:0048870	cell motility	2 511	189 25980	2
BP	GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	17 511	970 25980	17
CC	GO:0005654	nucleoplasm	7 511	549 25980	7
BP	GO:0006281	DNA repair	12 511	685 25980	12
CC	GO:0005886	plasma membrane	8 511	557 25980	8
BP	GO:0007010	cytoskeleton organization	3 511	266 25980	3
BP	GO:0022414	reproductive process	6 511	469 25980	6
CC	GO:0043226	organelle	109 511	6378 25980	109
CC	GO:0005730	nucleolus	3 511	298 25980	3
CC	GO:0005739	mitochondrion	10 511	823 25980	10
BP	GO:0016192	vesicle-mediated transport	10 511	687 25980	10
BP	GO:0023052	signaling	26 511	1847 25980	26
CC	GO:0005634	nucleus	38 511	2414 25980	38
BP	GO:0006310	DNA recombination	5 511	378 25980	5
BP	GO:0006325	chromatin organization	2 511	217 25980	2
BP	GO:0000278	mitotic cell cycle	1 511	173 25980	1
MF	GO:0008289	lipid binding	3 511	321 25980	3
BP	GO:0012501	programmed cell death	1 511	180 25980	1
BP	GO:0006351	transcription, DNA-templated	46 511	2844 25980	46
MF	GO:0003723	RNA binding	29 511	1810 25980	29

MF	GO:0140110	transcription regulator activity	13 511	1013 25980	13
MF	GO:0140097	catalytic activity, acting on DNA	9 511	726 25980	9
MF	GO:0003677	DNA binding	51 511	3038 25980	51
BP	GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	34 511	2170 25980	34
MF	GO:0008092	cytoskeletal protein binding	4 511	451 25980	4
MF	GO:0003924	GTPase activity	6 511	616 25980	6
CC	GO:0005856	cytoskeleton	4 511	722 25980	4

Not. Gen Oranı ilgili biyolojik yolak veya süreçte yer alan DEG sayısının, toplam DEG sayısına oranını temsil etmektedir. AP Oranı (Arka Plan Oranı) yolakta yer alan tüm gen sayısının tüm arka plan gen sayısı oranını temsil etmektedir. Sayım ise ilgili GO ID ile eşleşen DEG sayısını ifade etmektedir. İstatistiksel olarak en yüksek seviyede anlamlı bulunan diferansiyel ekspresyona ilişkin yolak zenginleştirme verisi tabloda görülmektedir.

Tablo 8. Yolak Zenginleştirme Analizi Sonuç Tablosu (HS yüksek ekspresyon)

Kategori	GO ID	Tanım	Gen Oranı	AP Oranı	Sayım
BP	GO:0006629	lipid metabolic process	77 623	1264 25980	77
MF	GO:0016740	transferase activity	213 623	5324 25980	213
MF	GO:0003824	catalytic activity	414 623	13704 25980	414
MF	GO:0016491	oxidoreductase activity	88 623	2461 25980	88
MF	GO:0140096	catalytic activity, acting on a protein	132 623	3944 25980	132
MF	GO:0008289	lipid binding	16 623	321 25980	16
CC	GO:0005829	cytosol	8 623	99 25980	8
BP	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	13 623	237 25980	13
BP	GO:0006351	transcription, DNA-templated	84 623	2844 25980	84
CC	GO:0005654	nucleoplasm	17 623	549 25980	17
CC	GO:0005777	peroxisome	4 623	68 25980	4
BP	GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	33 623	970 25980	33
MF	GO:0140110	transcription regulator activity	31 623	1013 25980	31
BP	GO:0055085	transmembrane transport	62 623	2212 25980	62
BP	GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	65 623	2170 25980	65
CC	GO:0009536	plastid	2 623	35 25980	2
CC	GO:0005811	lipid droplet	3 623	58 25980	3
BP	GO:0022414	reproductive process	14 623	469 25980	14
MF	GO:0016829	lyase activity	15 623	464 25980	15
BP	GO:0051604	protein maturation	8 623	309 25980	8
BP	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	44 623	1436 25980	44
BP	GO:0006575	cellular modified amino acid metabolic process	7 623	211 25980	7
CC	GO:0005618	cell wall	3 623	86 25980	3
CC	GO:0005730	nucleolus	8 623	298 25980	8
MF	GO:0003924	GTPase activity	18 623	616 25980	18
BP	GO:0072659	protein localization to plasma membrane	1 623	13 25980	1
BP	GO:0012501	programmed cell death	5 623	180 25980	5

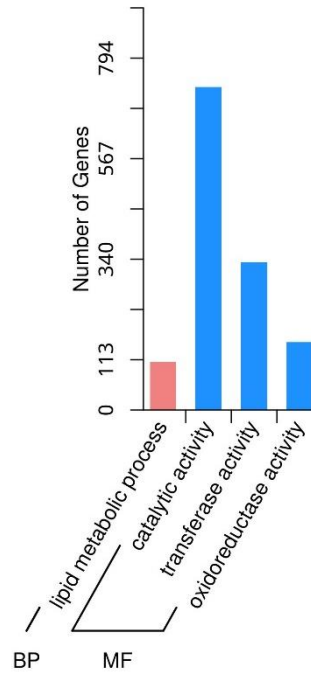
MF	GO:0044183	protein binding involved in protein folding	1 623	30 25980	1
BP	GO:0006310	DNA recombination	13 623	378 25980	13
BP	GO:0030163	protein catabolic process	13 623	437 25980	13
MF	GO:0005215	transporter activity	58 623	2387 25980	58
MF	GO:0060089	molecular transducer activity	6 623	303 25980	6
BP	GO:0006281	DNA repair	21 623	685 25980	21
BP	GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	5 623	184 25980	5
MF	GO:0003677	DNA binding	81 623	3038 25980	81
MF	GO:0140104	molecular carrier activity	1 623	30 25980	1
BP	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	19 623	760 25980	19
MF	GO:0140098	catalytic activity, acting on RNA	28 623	1062 25980	28
CC	GO:0005773	vacuole	3 623	95 25980	3
BP	GO:0140013	meiotic nuclear division	1 623	49 25980	1
BP	GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	3 623	161 25980	3
BP	GO:0007031	peroxisome organization	1 623	43 25980	1
BP	GO:0055086	nucleobase-containing small molecule metabolic process	35 623	1480 25980	35
CC	GO:0030312	external encapsulating structure	3 623	155 25980	3
CC	GO:0005794	Golgi apparatus	4 623	165 25980	4
MF	GO:0003774	motor activity	3 623	143 25980	3
BP	GO:0000910	cytokinesis	3 623	157 25980	3
MF	GO:0090729	toxin activity	1 623	42 25980	1
BP	GO:0006766	vitamin metabolic process	5 623	272 25980	5
BP	GO:0000278	mitotic cell cycle	3 623	173 25980	3
BP	GO:0006914	autophagy	1 623	71 25980	1
BP	GO:0006399	tRNA metabolic process	13 623	545 25980	13
CC	GO:0005929	cilium	2 623	138 25980	2
BP	GO:0007155	cell adhesion	4 623	258 25980	4
BP	GO:0140014	mitotic nuclear division	1 623	61 25980	1
MF	GO:0098772	molecular function regulator	22 623	1058 25980	22
CC	GO:0005886	plasma membrane	11 623	557 25980	11
MF	GO:0140097	catalytic activity, acting on DNA protein-containing complex	16 623	726 25980	16
BP	GO:0065003	assembly	13 623	681 25980	13
CC	GO:0009579	thylakoid	4 623	254 25980	4
MF	GO:0048018	receptor ligand activity	3 623	218 25980	3
CC	GO:0005694	chromosome	18 623	798 25980	18
MF	GO:0016209	antioxidant activity	4 623	234 25980	4
BP	GO:0006325	chromatin organization	4 623	217 25980	4
BP	GO:0007018	microtubule-based movement	1 623	98 25980	1
BP	GO:1901135	carbohydrate derivative metabolic process	31 623	1464 25980	31
BP	GO:0048870	cell motility	2 623	189 25980	2
MF	GO:0016874	ligase activity	7 623	392 25980	7
CC	GO:0031410	cytoplasmic vesicle	3 623	214 25980	3

BP	GO:0015979	photosynthesis	4 623	279 25980	4
BP	GO:0006486	protein glycosylation	2 623	143 25980	2
BP	GO:0030154	cell differentiation	2 623	184 25980	2
BP	GO:0048856	anatomical structure development	6 623	404 25980	6
BP	GO:0098542	defense response to other organism	2 623	182 25980	2
CC	GO:0005576	extracellular region	18 623	1080 25980	18
MF	GO:0016853	isomerase activity	5 623	366 25980	5
BP	GO:0007010	cytoskeleton organization	3 623	266 25980	3
BP	GO:0061024	membrane organization	2 623	207 25980	2
MF	GO:0016787	hydrolase activity	129 623	5720 25980	129
CC	GO:0005634	nucleus	47 623	2414 25980	47
CC	GO:0000228	nuclear chromosome	2 623	192 25980	2
BP	GO:0042254	ribosome biogenesis	14 623	1291 25980	14
BP	GO:0023052	signaling	31 623	1847 25980	31
BP	GO:0016071	mRNA metabolic process	5 623	415 25980	5
BP	GO:0006260	DNA replication	8 623	648 25980	8
BP	GO:0002376	immune system process	2 623	252 25980	2
BP	GO:0007059	chromosome segregation	1 623	199 25980	1
CC	GO:0005856	cytoskeleton	8 623	722 25980	8
CC	GO:0005840	ribosome	10 623	1289 25980	10
MF	GO:0008092	cytoskeletal protein binding	4 623	451 25980	4
MF	GO:0005198	structural molecule activity	15 623	1550 25980	15
CC	GO:0005783	endoplasmic reticulum	4 623	565 25980	4
MF	GO:0003723	RNA binding	31 623	1810 25980	31
BP	GO:0016192	vesicle-mediated transport	8 623	687 25980	8
CC	GO:0005739	mitochondrion	7 623	823 25980	7
BP	GO:0006886	intracellular protein transport	8 623	758 25980	8
CC	GO:0043226	organelle	103 623	6378 25980	103

Not. Gen Oranı ilgili biyolojik yolak veya süreçte yer alan DEG sayısının, toplam DEG sayısına oranını temsil etmektedir. Arka Plan Oran yolakta yer alan tüm gen sayısının tüm arka plan gen sayısı oranını temsil etmektedir. Gen sayısı ise ilgili GO ID ile eşleşen DEG sayısını ifade etmektedir. İstatistiksel olarak en yüksek seviyede anlamlı bulunan diferansiyel ekspresyona ilişkin yolak zenginleştirme verisi tabloda görülmektedir.

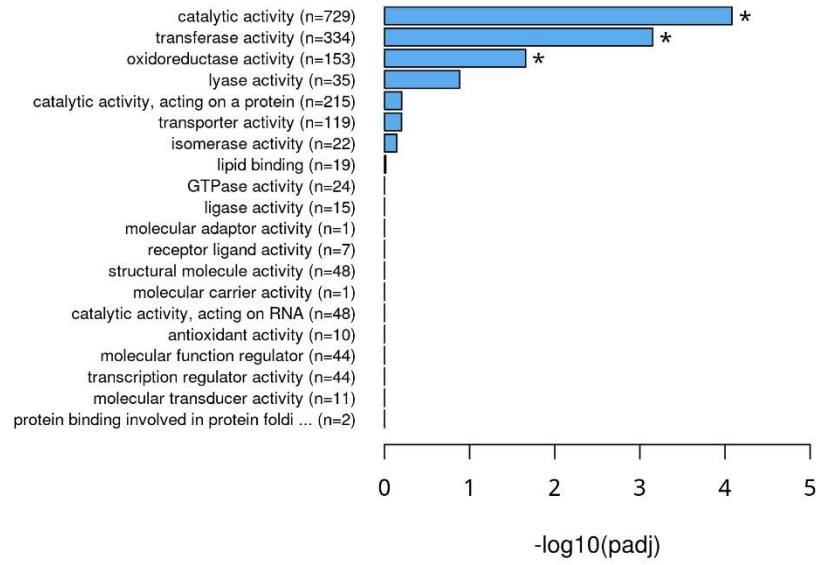
Yolak zenginleştirme analizi sonuçlarına göre biyolojik süreçlere dahil olan 1312 gen sayımı; hücresel bileşenlere dahil olan 610 gen sayımı; moleküler fonksiyonlara dahil olan 2359 gen sayımı rapor edilmiştir. Rapor edilen gen sayımlarından en yüksek seviyede zenginleştirilmiş terimler sırasıyla; 729 gen sayımı ile moleküler fonksiyonlara dahil olan katalitik aktivite tanımıyla GO:0003824, 334 gen sayımı ile moleküler fonksiyonlara dahil olan transferaz aktivitesi tanımıyla GO:0016740, 153 gen sayımı ile moleküler fonksiyonlara dahil olan oksidoredüktaz aktivite tanımıyla GO:0016491 ve 109 gen sayımı ile biyolojik süreçlere dahil olan lipit metabolik süreci tanımıyla

GO:0006629 olmuştur. Rapor edilen gen sayımlarından en yüksek seviyede zenginleştirilmiş terimlere ait grafik aşağıdaki grafikte verilmiştir.

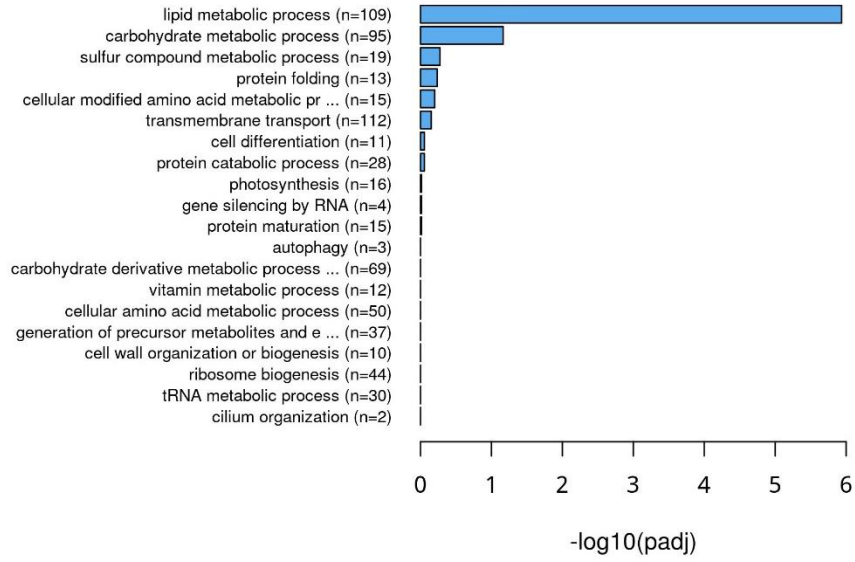


Şekil 9. Tüm DEG'lere Ait Zenginleştirilmiş GO Terim Grafiği

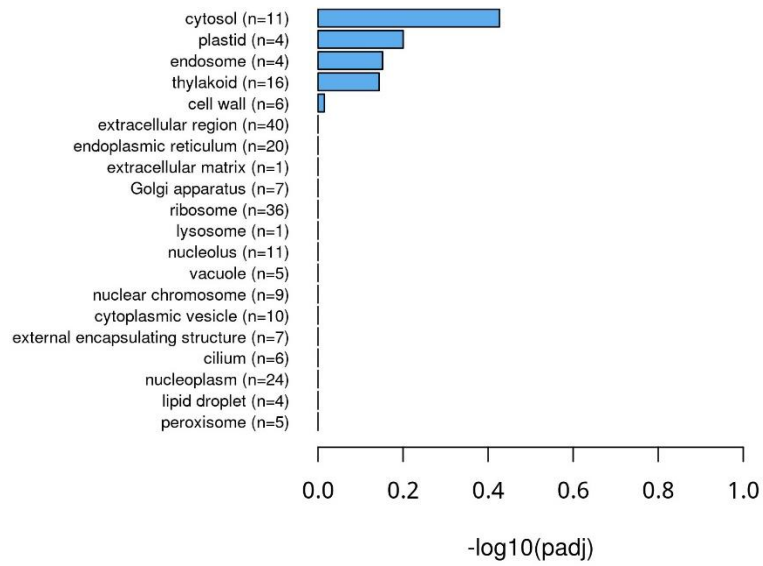
Tüm DEG'ler için belirlenen GO terimlerinin BP, CC ve MF kategorilerine sınıflandırılması yapılırken $-\log_{10}(P_{adj})$ değeri yani düzeltilmiş p-değerinin negatif logaritmik dönüşümü ile birlikte değerlendirilmiştir. Anlamlılık sınırı olarak belirlenmiş olan ≤ 0.05 değeri, $-\log_{10}(P_{adj})$ dönüşümünde $\geq 1,30$ değerine denk gelmektedir. Bu değere dayalı olarak değerlendirme gerçekleştirilmiştir. MF kategorisine ait katalitik aktivite, transferaz aktivitesi ve oksiredüktaz aktivitesi tanımlarıyla görülen GO:0003824, GO:0016740 ve GO:0016491 terimlerinin $-\log_{10}(P_{adj})$ değerleri sırasıyla 4,09, 3,18 ve 1,69 olarak hesaplanmıştır ve bunların en yüksek düzeyde zenginleştirilmiş terimler olduğunu göstermektedir. Bu terimler ardından BP kategorisine ait lipid metabolik süreci tanımlarıyla görülen GO:0006629 teriminin $-\log_{10}(P_{adj})$ değeri ise 5,95 olarak hesaplanmıştır. Yolak zenginleştirme analizinin tüm DEG'ler için gerçekleştirilen ve GO terimlerinin BP, CC ve MF kategorilerine sınıflandırılması sonucu elden edilen tüm kategorilere ait grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12).



Şekil 10. Tüm DEG'ler İçin Belirlenen GO Terimlerinin MF Kategorisine Sınıflandırıldığı Bar Grafiği



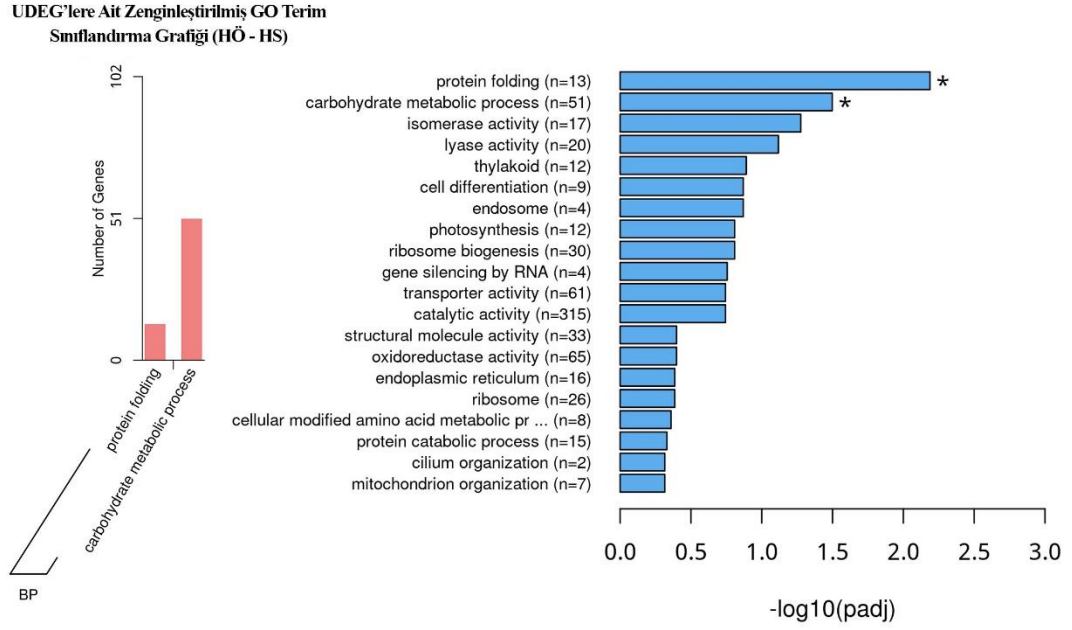
Şekil 11. Tüm DEG'ler İçin Belirlenen GO Terimlerinin BP Kategorisine Sınıflandırıldığı Bar Grafiği



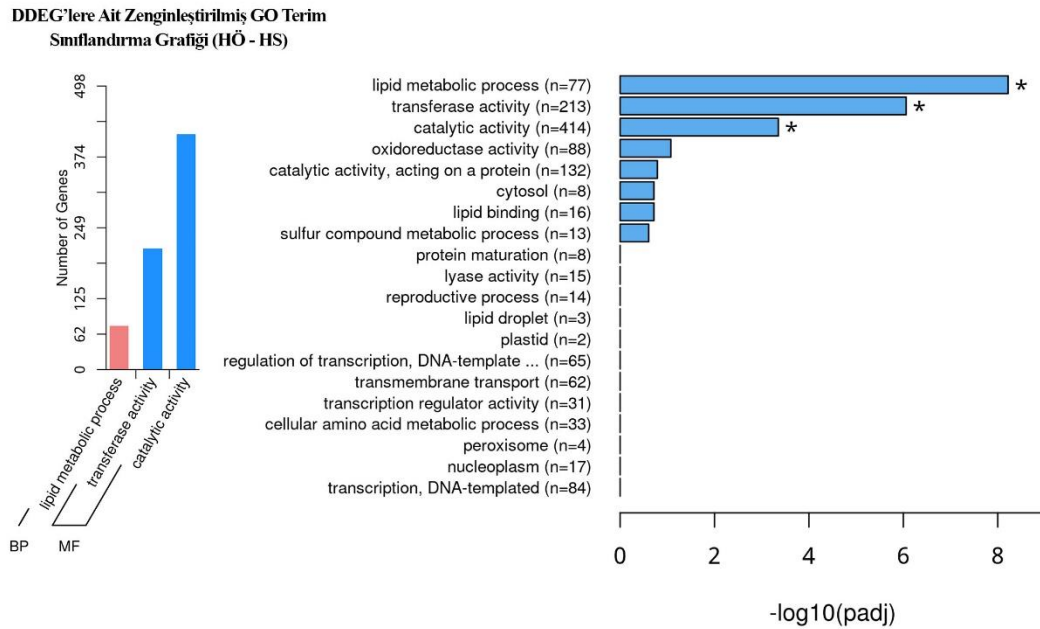
Şekil 12. Tüm DEG'ler İçin Belirlenen GO Terimlerinin CC Kategorisine Sınıflandırıldığı Bar Grafiği

Hasat sonrası örneklere göre hasat öncesi örneklerde gen ekspresyon düzeyi yüksek olan genler (upregulated differentially expressed genes, UDEGs) incelendiğinde en yüksek seviyede zenginleştirilmiş terimler, protein katlama tanımına sahip olan GO:0006457 ve karbonhidrat metabolik süreci tanımına sahip olan GO:0005975 olarak belirlenmiştir. $-\log_{10}(Padj)$ değerleri sırasıyla 2.2 ve 1.5 olarak hesaplanmıştır. Yolak zenginleştirme analizinin UDEG'ler için elde edilen zenginleştirilmiş GO terimleri, gen sayım verileri ve $-\log_{10}(Padj)$ değerleri şekilde gösterilmektedir (Şekil 13).

Hasat sonrası örneklere göre hasat öncesi örneklerde gen ekspresyon düzeyi düşük olan genler (downregulated differentially expressed genes, DDEGs) incelendiğinde en yüksek seviyede zenginleştirilmiş terimler, lipit metabolik süreci tanımıyla GO:0006629, transferaz aktivitesi tanımıyla GO:0016740 ve katalitik aktivite tanımıyla GO:0003824 olmuştur. $-\log_{10}(Padj)$ değerleri sırasıyla 8.2, 6.1 ve 3.4 olarak hesaplanmıştır. Yolak zenginleştirme analizinin DDEG'ler için elde edilen zenginleştirilmiş GO terimleri, gen sayım verileri ve $-\log_{10}(Padj)$ değerleri aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 14).

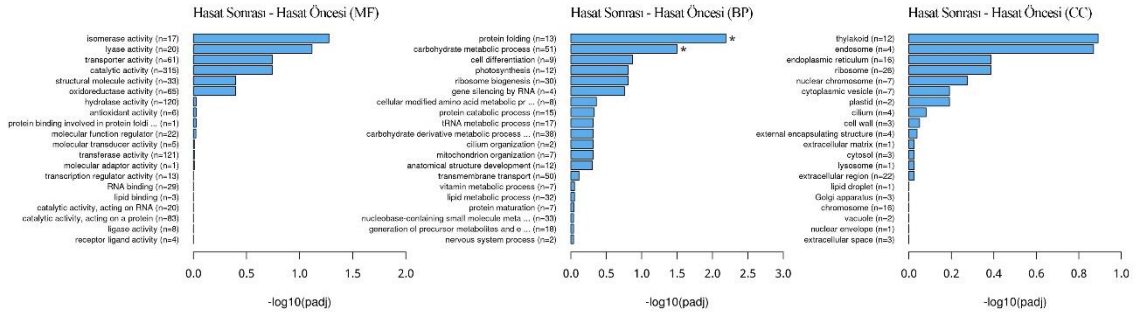


Şekil 13. UDEG'lere Ait Zenginleştirilmiş GO Terimleri ve GO Terimlerine Ait P-Değeri Bar Grafiği

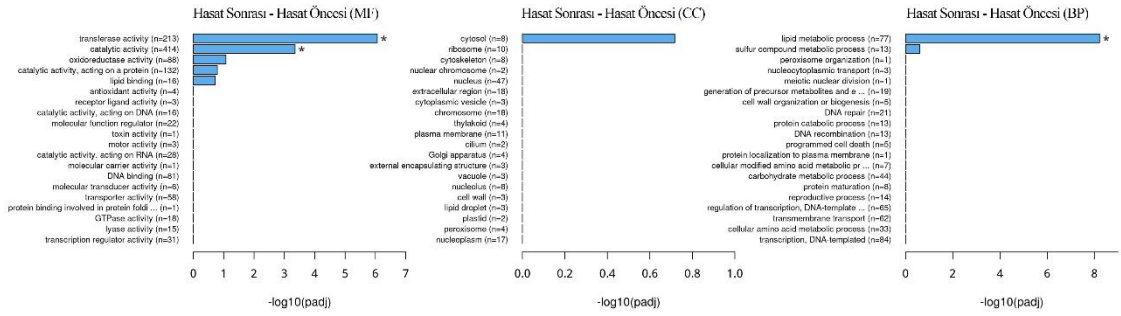


Şekil 14. DDEG'lere Ait Zenginleştirilmiş GO Terimleri ve GO Terimlerine Ait P-Değeri Bar Grafiği

Yolak zenginleştirme analizinin UDEG'ler ve DDEG'ler için gerçekleştirilen ve GO terimlerinin BP, CC ve MF kategorilerine sınıflandırılması sonucu elden edilen tüm kategorilere ait grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 15 ve Şekil 16).



Şekil 15. UDEG'ler İçin Belirlenen GO Terimlerinin Kategorilere Göre Sınıflandırıldığı Bar Grafiği



Şekil 16. DDEG'ler İçin Belirlenen GO Terimlerinin Kategorilere Göre Sınıflandırıldığı Bar Grafiği

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Çalışma kapsamında maydanoz bitkisinde hasat sonrası bozulma, diğer adıyla pörsüme ya da kalite kaybı araştırılmış ve bozulmanın moleküler mekanizmasına ilişkin gen ekspresyonu düzeyinde bilgi elde edilmesi amaçlanmıştır. Hasat aşamasına gelmiş maydanoz bitkisinden hasat öncesi ve hasat sonrası yapraklardan örnekler alınmış ve bu amaç doğrultusunda örnekler üzerinde transkriptom analizi temelli bir iş akışı yürütülmüştür. Araştırma sonuçları hasat öncesi ve hasat sonrası maydanoz transkriptom verilerinin karşılaştırılmasına dayanmaktadır.

Hasat öncesi örneklerden elde edilen sonuçlara göre gen ekspresyon düzeyi en yüksek olduğu belirlenen genlerin, gerçekleştirilen zenginleştirilmiş gen ontoloji analizine göre protein katlama görevleri olan ve karbonhidrat metabolik sürecinde rol alan genler olduğu görülmüştür. Bitkilerde karbonhidrat metabolizması başta fotosentez ve solunum olmak üzere daha birçok biyokimyasal süreçler ile bünyesine gerekli olan enerjiyi üretir. Bitkilerde protein katlanma süreci ise hücrel işlevlerin sürekliliği açısından kritik öneme sahiptir çünkü bitkiler gibi kompleks ökaryotlarda yaklaşık 50.000 gen bireysel hücrelerde seçici olarak eksprese edilebilirken, hücrenin kaderini ve fonksiyonunu belirleyen bu genlerin ürünleri olan proteinlerdir. Doğal olarak normal (stres olmayan) fizyolojik koşullar altındaki bir bitkide, protein katlama görevleri olan ve elbette fotosentez, dolayısı ile karbonhidrat metabolik sürecinde rol alan genlerin, gen ekspresyon düzeyi yüksek olması beklenen bir durumdur. Hasat sonrası örneklerin sonuçlarının anlaşılması için hasat sürecinin incelenmesi gerekmektedir. Hasat sırasında bitkiler doğal olarak bir mekanik hasara maruz kalmaktadırlar ve bu kendi başına bitkide bir stres nedenidir. Mekanik hasara maruz kalmayanlara göre yüksek su kaybına, solunum hızı ve ısı üretiminde artışa, ki bu daha yüksek oranda nişasta ve şekerlerin parçalanmasına yani kalite kaybına neden olmaktadır. Hasat sonrası bitkilerin yüksek ya da düşük sıcaklıktaki depolama koşulları altında kalmaları da bitkilerde ekstra bir strese ya da yaralanmaya neden olmaktadır. Hasat sonrası soğuk depolama koşulları altındaki bitkiler donma yaşayabilir ve çoğu bitki donmaya karşı dayanıksızdır ve donma sonrası ürünler çürümeye çok daha yatkın hale gelir. Donma oluşmasa dahi bazı taze ürünler düşük sıcaklıkta yaralanmaya karşı yatkındır. Yüksek sıcaklıkta ise birçok bitki ciddi su kaybı yaşayacaktır, sıcaklık kaynağının direkt güneş olması durumunda ise güneş radyasyonunun neden olduğu yüksek sıcaklık ile çok hızlı bozulma gerçekleşecektir.

Hasat öncesi durumu iyi olan bitkilerin, hasat süresince küf veya bakterilere, enfeksiyona maruz kalması da mümkündür, çoğunlukla mekanik hasara maruz kalan bitkilerde gerçekleşmektedir. Hasat, hasat sonrası, nakliye ve depolama gibi süreçlerin tümünde bitki daha birçok dış etmene maruz kalmaktadır, ki bu etmenler bitkide kalite kaybına, yaralanmaya ve hızlı bozulmalara neden olabilmektedir. Dolayısıyla hasat edilen bitkiler, doğal olarak abiyotik strese maruz kalan bitkilerdir ve abiyotik strese karşı gelişen gen ekspresyon motiflerinin görülmesi beklenmektedir. Çalışmamız kapsamında hasat sonrası örneklerde gerçekleştirilen zenginleştirilmiş gen ontoloji analizine göre gen ekspresyon düzeyi en yüksek olan genlerin, lipid metabolik sürecinde rol alan, transferaz aktivitesinden ve katalitik aktivitesinden sorumlu olan genlerden oluştuğu görülmektedir. Bitkilerde transferaz aktivitesi ve katalitik aktivite metabolik süreçlerin temelini oluşturan enzimatik faaliyetlerdir. Bu gibi enzimatik faaliyetleri gerçekleştiren genlerin ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğunun görülmesi, yoğun şekilde gerçekleşen bir biyokimyasal dinamiği işaret etmektedir. Bitkilerde lipid metabolizması ise hücre yapı ve metabolizması, enerji üretimi ve depolama gibi birçok hücresel sürece hizmet etmekle birlikte stres adaptasyonunda da rol aldığı bilinmektedir. Yağ asitleri, bitki hücre zarları yani bitkinin dış etmenlere karşı fiziksel bariyerlerini oluşturan yapıların temel bileşenleridir. Bitkilerin abiyotik strese karşı geliştirdiği ilk yanıt, doymuş ve doymamış yağ asidi oranlarında değişiklikler yapmaktır. Bitkilerin hücre yağ asidinin kristalleştiği anda düşük sıcaklık stresinden etkilendiğini rapor eden çalışmalar mevcuttur (Korkmaz & Durmaz, 2017). Düşük sıcaklık stresinin yanında tuz, kuraklık, yüksek sıcaklık ve ağır metaller gibi diğer abiyotik stres koşullarında da spesifik lipid yanıtları ürettiği görülmektedir (Upchurch, 2008). Çalışmamız kapsamında maydanoz bitkisinde hasat sonrası görülen lipid metabolik sürecinde rol alan genlerin yüksek eksprese edilmesi, hasat sırasında (mekanik) ve sonrasındaki saklama koşullarında (düşük sıcaklık ve karanlık ya da ışık yokluğu) bitkinin maruz kaldığı strese karşı verdiği stres cevabı olarak düşünmek mümkündür.

5.2 Öneriler

Tez çalışması kapsamında maydanozda hasat sonrası bozulmanın gen ekspresyonu düzeyinde araştırması gerçekleştirilmiştir. Çalışma maydanoz türünde transkriptom düzeyinde gerçekleştirilen son derece kısıtlı çalışmalar arasında yer almakta olup, öncü bir çalışma niteliğindedir. Diğer bitkilerde de olduğu gibi hasat sonrası kompleks bir süreci kapsamaktadır. Bitkiler hasat dolayısıyla birden fazla farklı stres

altında oldukları gibi, hasat işleminin erken döneminde fiziksel yaralanma kaynaklı stres dahi gen ekspresyonu profili üzerinde etkili olmaktadır. Transkriptom analizinin farklı hasat sonrası koşullar altında (oda sıcaklığında depolama, soğukta depolama, farklı sıcaklıklardaki ortamlarda ışık uygulamaları (aydınlık, karanlık, tekrar eden aydınlık-karanlık döngüleri)) karşılaştırmalı ileri analizleri ile konuya ilişkin çalışılmasının hasat sonrası bozulmanın moleküler mekanizmasının belirlenmesi için faydalı olacağı, direnç gösteren bitkilerdeki direnç gösteren bitkilerde direnç mekanizmalarının araştırılması ve başarılı genetik ıslah programları ile hasat sonrası bozulmaya karşı dirençli mahsuller elde edilebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Agyare, C. (2017). *Chapter 25—Petroselinum crispum: A Review*.
- Ahmadian, A., Ehn, M., & Hober, S. (2006). Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363(1-2), 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.038>
- Andrews, S. (2010). *FastQC a quality control tool for high throughput sequence data*. [Software]. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arber, W. (1965). Host specificity of DNA produced by Escherichia coli: V. The role of methionine in the production of host specificity. *Journal of Molecular Biology*.
- Bahramsoltani, R., Ahmadian, R., Daglia, M., & Rahimi, R. (2024). Petroselinum crispum (Mill.) Fuss (parsley): An updated review of the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(2), 956-972. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c06429>
- Bal, S. H., & Budak, F. (2012). *Genomik, proteomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları*.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Boutsika, A., Sarrou, E., Cook, C. M., Mellidou, I., Avramidou, E., Angeli, A., Martens, S., Ralli, P., Letsiou, S., Selini, A., Grigoriadis, I., Tourvas, N., Kadoglidou, K., Kalivas, A., Maloupa, E., Xanthopoulou, A., & Ganopoulos, I. (2021). Evaluation of parsley (*Petroselinum crispum*) germplasm diversity from the Greek Gene Bank using morphological, molecular and metabolic markers. *Industrial Crops and Products*, 170, 113767. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113767>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). *fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor*. <https://doi.org/10.1101/274100>
- Clarkson, J. J., Zuntini, A. R., Maurin, O., Downie, S. R., Plunkett, G. M., Nicolas, A. N., Smith, J. F., Feist, M. A. E., Gutierrez, K., Malakasi, P., Bailey, P., Brewer, G. E., Epiawalage, N., Zmarzty, S., Forest, F., & Baker, W. J. (2021). *A higher-level nuclear phylogenomic study of the carrot family (Apiaceae)*. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1701>

- Collins, F. S., Morgan, M., & Patrinos, A. (2003). The human genome project: Lessons from large scale biology. *Science*, *300*(5617), 286-290. <https://doi.org/10.1126/science.1084564>
- Conesa, A., & Götz, S. (2008). Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*. <https://doi.org/10.1155/2008/619832>
- Coşkun, Ö. F., Gündüz, Y. F., Toprak, S., & Mavi, K. (2023). Molecular characterization of some parsley (*Petroselinum crispum* Mill.) genotypes. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, *28*(1), 236-244. <https://doi.org/10.37908/mkutbd.1216419>
- Craft, J. D., & Setzer, W. N. (2017). *The volatile components of parsley, Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss.
- Çiftçi ve Köy Dünyası. (2010). *Maydanoz*. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı.
- Danna, K., & Nathans, D. (1971). Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of hemophilus influenzae. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.
- Davidson, N. M., & Oshlack, A. (t.y.). Corset: Enabling differential gene expression analysis for de novoassembled transcriptomes. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0410-6>
- Domblides, A. S., Domblides, E. A., Kharchenko, V. A., & Potekhin, G. A. (2010). Study of genetic variation among parsley (*Petroselinum Crispum* (Mill.) Nym.) samples using RAPD and ISSR markers. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, *65*(4), 152-154. <https://doi.org/10.3103/S0096392510040073>
- Douglas, I. (2021). *Apiaceae: Ecology, uses and toxicity account*.
- Eren, K., Taktakoglu, N., Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetic, Izmir Katip Celebi University, Izmir, Turkey, Pirim, I., & Department of, Medical Biology, Faculty of Medicine, Ataturk University, Erzurum, Turkey. (2023). DNA sequencing methods: From past to present. *The Eurasian Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2022.22280>
- Gayathiri, E., Prakash, P., Kumaravel, P., Jayaprakash, J., Ragunathan, M. G., Sankar, S., Pandiaraj, S., Thirumalaivasan, N., Thiruvengadam, M., & Govindasamy, R. (2023). Computational approaches for modeling and structural design of biological systems: A comprehensive review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2023.08.002>

- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Grolleaud, M. (2002). *Post harvest losses: Discovering the full story* (<https://www.fao.org/4/ac301e/AC301e00.htm>). Food and Agriculture Organization (FAO).
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Hajib, A., El Harkaoui, S., Choukri, H., Khouchlaa, A., Aourabi, S., El Menyiy, N., Bouyahya, A., & Matthaeus, B. (2023). Apiaceae family an important source of petroselinic fatty acid: Abundance, biosynthesis, chemistry, and biological properties. *Biomolecules*. <https://doi.org/10.3390/biom13111675>
- Haynes, E., Jimenez, E., Pardo, M. A., & Helyar, S. J. (2019). The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control*, *101*, 134-143. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.010>
- Iakimova, E. T., Ty, A. J., Hertog, M., L. A. T. M., Nicolai, B. M., & Woltering, E. J. (2024). Programmed cell death and postharvest deterioration of fresh horticultural products. *Postharvest Biology and Technology*, *214*. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.113010>
- Illumina, Inc. (2010). *Illumina, Inc.* Illumina, Inc.
- Kelly Jr., T. J., & Smith, H. O. (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: II. Base sequence of the recognition site. *Journal of Molecular Biology*, *Volume 51, Issue 2*, Pages 393-409.
- Korkmaz, H., & Durmaz, A. (2017). *Bitkilerin Abiyotik Stres Faktörlerine Verdiği Cevaplar*.

- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, M. Y., Tan, H. W., Wang, F., Jiang, Q., Xu, Z.-S., Tian, C., & Xiong, A.-S. (2014). De novo transcriptome sequence assembly and identification of AP2/ERF transcription factor related to abiotic stress in Parsley (*Petroselinum crispum*). *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108977>
- Li, W., & Godzik, A. (2006). cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- Linde, G. A., Gazim, Z. C., Cardoso, B. K., Jorge, L. F., Tešević, V., Glamočlija, J., Soković, M., & Colauto, N. B. (2016). Antifungal and antibacterial activities of *Petroselinum crispum* essential oil. *Genetics and Molecular Research*. <https://doi.org/10.4238/gmr.15038538>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, Y., Liao, L., Yin, F., Song, M., Shang, F., Shuai, L., & Cai, J. (2022). Integration of metabolome and transcriptome profiling reveals the effect of 6-Benzylaminopurine on the browning of fresh-cut lettuce during storage. *Postharvest Biology and Technology*, *192*, 112015. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112015>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Mandlik, J. S., Patil, A. S., & Singh, S. (2024). *Next Generation Sequencing (NGS): Platforms and applications*.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, *24*(3), 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007>
- Marthe, F. (2020). *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman (parsley).
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—The next generation. *Nature Reviews Genetics*, *11*(1), 31-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>

- Odelade, K. A., & Oladeji, O. S. (2020). Isolation of phytopathogenic fungi associated with the post-harvest deterioration of watermelon fruits. *Scientific African*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00366>
- Ouzounidou, G., Papadopoulou, K. K., Asfi, M., Mirtziou, I., & Gaitis, F. (2013). Efficacy of different chemicals on shelf life extension of parsley stored at two temperatures. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(8), 1610-1617. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12131>
- Özer, H. (2020). *Maydanoz Yetiştiriciliği*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Açık Ders Materyalleri.
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4), 417-419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Quail, M., Smith, M. E., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina Miseq sequencers. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>
- Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio sequencing and its applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(5), 278-289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
- Ripoll, J., Charles, F., Vidal, V., Laurent, S., Klopp, C., Lauri, F., Sallanon, H., & Roux, D. (2019). Transcriptomic view of detached lettuce leaves during storage: A crosstalk between wounding, dehydration and senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 152, 73-88. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.02.004>
- Said-Al Ahl, H. A. H., Abou-Ellail, M., & Omer, E. A. (2016). *Harvest date and genotype influences growth characters and essential oil production and composition of Petroselinum crispum plants*.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., & Merah, O. (2017). The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops and Products*, 109, 661-671. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.027>
- Shalini, S., Singla, A., Goyal, M., Kaur, V., & Kumar, P. (2018). *Omics in Agriculture: Applications, Challenges and Future Perspectives*.

- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Simko, I., Hayes, R. J., Truco, M.-J., Michelmore, R. W., Antonise, R., & Massoudi, M. (2018). Molecular markers reliably predict post-harvest deterioration of fresh-cut lettuce in modified atmosphere packaging. *Horticulture Research*, 5(1), 21.
<https://doi.org/10.1038/s41438-018-0022-5>
- Subaş, T., Özgen, U., Gökkaya, İ., & Renda, G. (2024). *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss (parsley), a food and medicinally important plant: A review of recent studies between 2013-2023. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 48(2), 7.
<https://doi.org/10.33483/jfpau.1362626>
- Tatusov, R. L. (2000). The COG database: A tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 33-36.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.33>
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5), 511-515.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- Uncu, A. T., Patat, A. S., & Uncu, A. O. (2024). Whole-genome sequencing and identification of antimicrobial peptide coding genes in parsley (*Petroselinum crispum*), an important culinary and medicinal Apiaceae species. *Functional & Integrative Genomics*, 24(5), 142. <https://doi.org/10.1007/s10142-024-01423-x>
- Upchurch, R. G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*.
<https://doi.org/10.1007/s10529-008-9639-z>
- Üner, K. (2018). *Derim sonrası ozon ve salisilik asit uygulamalarının maydanozun depolanma süresi ve kalitesi üzerine etkisi*.
- Volza. (2023). *Parsley export data of World*. <https://www.volza.com/p/parsley/export/>
- Wang, X.-J. (2022). Origin, evolution, breeding, and omics of Apiaceae: A family of vegetables and medicinal plants. *Horticulture Research*, 9, uhac076.
<https://doi.org/10.1093/hr/uhac076>

- Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., & Au, K. F. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology*, *39*(11), 1348-1365. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>
- Youssef, D., El-Bakatoushi, R., Elframawy, A., El-Sadek, L., & Badan, G. E. (2023). Molecular phylogenetic study of flavonoids in medicinal plants: A case study family Apiaceae. *Journal of Plant Research*, *136*(3), 305-322. <https://doi.org/10.1007/s10265-023-01442-y>
- Zeng, J., Wang, C., Ding, Z., Wang, B., Liu, Y., Guo, J., Chen, J., Wu, C., Tie, W., Yan, Y., Peng, H., & Hu, W. (2020). Identification and functional prediction of lncRNAs during cassava post-harvest physiological deterioration. *Agronomy Journal*. <https://doi.org/10.1002/agj2.20343>