



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KAVUNDA (*Cucumis melo* L.) SICAKLIK
STRESİNE CEVABIN TRANSKRİPTOM
DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Şule ŞİRİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Ocak-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Şule ŞİRİN tarafından hazırlanan “KAVUNDA (*Cucumis melo* L.) SICAKLIK STRESİNE CEVABIN TRANSKRİPTOM DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması 20/01/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

.....

Danışman

Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU

.....

Üye

Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

.....

Üye

Prof. Dr. Emrah TORLAK

.....

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

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışmasında ikinci tez danışmanı Dr. Öğr.Üyesi Necibe KAYAK’tır

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.

Şule ŞİRİN

Tarih:20.01.2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAVUNDA (*CUCUMİS MELO L.*) SICAKLIK STRESİNE CEVABIN TRANSKRİPTOM DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Şule ŞİRİN

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Ali Tevfik UNCU

2025, 63 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Ali Tevfik UNCU
Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
Prof. Dr. Emrah Torlak

Kavun (*Cucumis melo L.*) bitkisi ekonomik açıdan önemli bir bitkidir. Ülkemiz dünya genelinde kavun üretiminde ikinci sırada yer almaktadır. Kavunla ilgili birçok transkriptomik çalışma raporu farklı abiyotik stres koşullarında incelenmiştir. Fakat kavunda sıcaklık stresinin transkriptomik analizi ilişkin rapor eksikliği devam etmektedir. Bu nedenle, sıcaklık stresi altında kavun transkriptomunda meydana gelen değişiklikleri incelemek amacıyla mevcut araştırma yürütülmüştür. Transkriptomik çalışmalar bitkilerin karmaşık birçok özelliğinin ve işlevinin moleküler açıdan alt yapısının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Tez çalışması kapsamında kavun kısa okuma platformu kullanılarak sekanslanmıştır. Sekans sonucunda elde edilen çift yönlü okumaları Galaxy platformu içerisinde bulunan çeşitli algoritmalar kullanarak kavun genomuna haritalanmış, sayılmış ve diferansiyel ekspresyonu değişen genler tespit edilmiştir. Analiz sonucunda sıcaklık stresine cevaben istatistiksel olarak anlamlı olarak 788 genin ifade düzeyi artış gösterdiği, 134 genin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ekspresyon değişimi tespit edilen genler literatürde incelendiğinde abiyotik stres altında benzer yanıtlar verdiği gözlenmiştir. Gen ontoloji ve KEGG analizi yapılmış genlerin fonksiyonel anotasyonu yapılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçların yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacak ve literatüre özgün katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Abiyotik stres, biyoinformatik, kavun, sıcaklık stresi, transkriptom analiz

ABSTRACT

MS THESIS

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF MELON (*CUCUMIS MELO L.*) UNDER HEAT STRESS

Şule ŞİRİN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Advisor: Doç. Dr. Ali Tevfik UNCU

2025, 63 Pages

Jury

Doç.Dr. Ali Tevfik UNCU
Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
Prof. Dr. Emrah TORLAK

Melon (*Cucumis melo L.*) is an economically important plant, and our country ranks second in melon production globally. Numerous transcriptomic studies have examined melon under different abiotic stress conditions. However, there is still a lack of reports on the transcriptomic analysis of melon under heat stress. Therefore, this study was conducted to investigate the transcriptomic changes in melon under heat stress. Transcriptomic studies enable a better understanding of the molecular basis of many complex traits and functions in plants. In the context of this thesis, melon was sequenced using the Illumina HiSeq 2000 platform. The resulting paired-end reads were mapped to the melon genome, counted, and differentially expressed genes were identified using various tools available on the Galaxy platform. As a result of the analysis, it was determined that the expression levels of 788 genes increased and the expression of 134 genes decreased under heat stress. Upon reviewing the literature, the differentially expressed genes were found to exhibit similar responses under other abiotic stresses. Gene ontology and KEGG pathway analyses were performed, and the functional annotation of the identified genes was completed. The information obtained from this research will provide valuable insights for future studies.

Keywords: Abiotic Stress, Bionformatic, Heat Stress, Melon, Transcriptome Analyses,

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimi süreci boyunca her türlü çalışmama yardımcı olan ve desteklerini asla esirgemeyen çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU'ya, desteklerinden dolayı Doç.Dr. Ayşe Özgür Uncu'ya ayrıca çalışmalarında değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Prof. Dr. Önder TÜRKMEN ve Prof. Dr. Emrah TORLAK hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimde en stresli günlerimde bana her anlamda destek olup motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan arkadaşım Secde Nur SAFRAN' a, canım oda arkadaşım Yağmur İclal YAĞMUR' a ve her koşulda yanımda olan sabırla dinleyip yol gösteren sevgili dostum Rüveyda BAYRAKÇIOĞLU' na içtenlikle teşekkür ederim.

Öğrenim hayatımın ilk gününden bugüne kadar maddi, manevi destek ve sevgileri ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme, özellikle minik kardeşim EFE' ye sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Şule ŞİRİN
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Kavun (<i>Cucumis melo</i> L.)	3
2.1.1. Kavunun sınıflandırılması.....	3
2.1.2. Kavunun tarihçesi	4
2.1.3. Kavunun ekonomik önemi.....	4
2.1.4. Kavunun besin değeri açısından önemi	6
2.1.5. Kavun yetiştiriciliği	6
2.2. Bitkilerde Stres Kavramı	8
2.2.1. Yapılan çalışmalar	9
2.3. RNA Dizileme (RNA-Seq).....	13
2.4. Veri Analiz Basamakları.....	17
2.4.1. Kalite kontrolü ve trimleme	17
2.4.2. Haritalama.....	18
2.4.3. Sayma.....	19
2.4.4. DESeq	21
2.4.5. BLAST.....	22
2.4.6. Gen ontolojisi (GO)	22
2.4.7. KEGG yolak analizi.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Kavun Bitkisinin Yetiştirilmesi, Stres Uygulaması ve Total RNA İzolasyonu..	25
3.2. RNA Kalite Ölçümü	26
3.3. RNA Sekanslama Analizi	26
3.4. Biyoinformatik Analiz	26
3.5. Dizilerin Filtrelenmesi	26
3.6. Referans Genoma Haritalanması	27
3.7. Gen Ekspresyon Analizi	27
3.8. Diferansiyel Ekspresyon Genlerin (DEG) Tanımlanması	27
3.9. Veri Tabanı Oluşturma	28
3.10. Gen Ontoloji Analizi.....	28

3.11. Genlerin Metabolik Yol Analizi (KEGG analizi).....	28
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	29
4.1. Dizinin Değerlendirilmesi.....	29
4.2. Diferansiyel İfade Analizi Sonuçları	30
4.3. Veri Tabanı Oluşturma	34
4.4. Gen Ontoloji Sonuçları	42
4.6. KEGG Analiz Sonuçları	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	50
5.1. Sonuçlar	50
5.2. Öneriler	51
6. KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: santigrad derece
ml	:Mililitre
µL	: Mikrolitre

Kısaltmalar

AO	: Askorbat Oksidaz
Azot	: A
BLAST	: Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
BP	: Biyolojik Proses
CC	: Hücresel Bileşen (Cellular Component)
DBG	: de Brujin Grafiği
DEG	: Diferansiyel Ekspresyon Genler
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSN	: Dupleks Spesifik Nukleaz
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FAOSTAT	: Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division
FM	: Ferragina-Manzini
FPKM	: Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped (Haritalanmış Milyon Bazda Parça Sayısı)
GLD	: Galaktonolakton Dehidrogenaz
GO	: Gen Ontoloji
HSP	: Heat shock protein (Isı şok protein)
Indel	: İnsersiyon-delesyon
K	: Potasyum
KEGG	: Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
Log ₂ FC	: Log ₂ Fold Change (Log ₂ Kat Değişimi)
MDHAR	: Monodehidroaskorbat Redüktaz
MF	: Moleküler Fonksiyon
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information.
ncRNA	:non-coding Ribo Nükleik Asit
P	: Fosfor
PacBio	: Pacific Biosciences
PCA	: Principal Component Analysis
RIN	: RNA Integrity Number
RNA	: Ribo Nükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribo Nükleik Asit
TF	: Transkripsiyon Faktörü



1. GİRİŞ

Günümüzün en büyük problemlerinden biri olan küresel ısınma, iklim şartlarında değişimlere neden olmaktadır. Bu durum risk grubunda bulunan ülkeler için büyük problemdir. Ülkemiz de bu risk grubuna dahildir (Kaplukan, 2013). İklim değişikliği sebebi ile sıcaklık, tuzluluk, kuraklık gibi abiyotik stresler bitkilerde verimlilik problemine neden olmaktadır. Günümüzde olduğu gibi gelecekte de bitkiler abiyotik streslerle başa çıkmakta zorlanacaktır. Bu problem pek çok kültür bitkisinin verimliliğin düşmesine neden olmaktadır. Bu durumun etkilerini en aza indirebilmek için, bitkilerin abiyotik streslere karşı verdiği tepkilerin moleküler mekanizmalarını anlamak ve ortaya çıkarmak büyük önem taşımaktadır (Kara,2016). Bu bilgiler ışığında abiyotik stres şartlarına tolerant hatlar geliştirmek gelecekte mümkün olabilir.

Abiyotik stresler arasında sıcaklık stresi, bitki büyümesini ve üretkenliğini kısıtlayan birincil faktördür. Bu yüzden bitkilerin sıcaklık stresine tepkisinin moleküler mekanizmalarının daha fazla ortaya çıkarılması gerekmektedir. Her geçen gün sıcaklıklar dengesiz bir şekilde yükselip düşmektedir. Bitkiler hayatta kalmakta ve verimliliği yüksek ürün elde etmekte güçlük çekmektedir. Tez kapsamında araştırılan kavun bitkisi ekonomik açıdan önemli bir bitkidir. Gelecekte sıcaklık stresine dirençli kavunları üretebilmek, günümüzde kavunun sıcaklık stresine verdiği yanıtın moleküler mekanizmasını anlamaktan geçmektedir. Yürütülen çalışmada kavun bitkisinin sıcaklık stresine verdiği yanıt incelenmiştir.

Yürütülen tez çalışması kapsamında kavun bitkisi Illumina HiSeq 2000 platformu kullanılarak transkriptomu sekanslanmıştır. Sekans sonucunda elde edilen çift yönlü okumalar kavun genomuna haritalanmış, sayılmış ve diferansiyel ekspresyonu değişen genler tespit edilmiştir. Analiz sonucunda sıcaklık stresine maruz kalan 788 genin ifadesinin artış gösterdiği, 134 genin ifadesinin azalış gösterdiği tespit edilmiştir. Gen ontoloji ve KEGG analizi yapılarak fonksiyonel anotasyonu tamamlanmıştır.

Yürütülen bu çalışma, sıcaklık stresine karşı kavunun moleküler düzeyde nasıl cevap verir sorusuna yanıt olacaktır. Transkriptomik analizler bitkilerin karmaşık birçok özelliğinin ve işlevinin moleküler açıdan alt yapısının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Sıcaklık stresi başta olmak üzere diğer abiyotik streslerin yol açtığı küresel sorunlara karşı bitkilerin stres mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Stresle ilgili genlerin tespiti sağlanarak sonraki araştırmalar için yol gösterici olmak amaçlanmıştır. Kavunla ilgili birçok transkriptomik çalışma raporu farklı abiyotik stres

koşullarında incelenmiştir. Fakat kavunda sıcaklık stresinin transkriptomik analizi ilişkin rapor eksikliği halen devam etmektedir. Bu nedenle, sıcaklık stresi altında kavun transkriptomunda meydana gelen değişiklikleri incelemek için mevcut araştırma yürütülmüştür.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kavun (*Cucumis melo* L.)

Cucumis melo L.(kavun) bitkisi Cucurbitaceae ailesine ait diploid ($2n=2x=24$), tek yıllık kabakgildir. Kavun genomu 12 adet kromozoma sahiptir. Genomu 454 Mb büyüklüğündedir (Kesh, H. ve ark., 2021). İlk kez kavun genomu 2012 yılında double haploid DHL92 hattından sekanslanmıştır. Kavunu de novo sekanslamak için 454 pyrosequence cihazı kullanılmıştır. Genomun %83,3'lük kısmını temsil eden 375 Mb büyüklüğünde genom birleştirme (assembly) yapılmıştır (Garcia-Mas ve ark., 2012).

Kavun kabakgiller türü içerisinde en yüksek oranda polimorfizm içeren sebzedir. Boyut, şekil, renk, doku ve tat bakımından morfolojik farklılıkları bulunmaktadır (Nuñez-Palenius ve ark., 2008). Diğer kabakgillere göre 8 kat daha büyük mitokondriyal genoma sahiptir (Baktemur ve ark., 2023).

İklim değişikliği her geçen gün gıda güvenliği için bir problemdir. Bu değişimler genetik çeşitliliğin azalmasına ve mahsullerde verim kaybına neden olmaktadır. Bu problemler ilerleyen süreçlerde gıdaya ulaşmada büyük zorluk çıkaracaktır. Çeşitliliğin azalması bitkilerin abiyotik stresle karşılaşma durumunda uyum sağlama yeteneğinin de azalmasına neden olmaktadır.

2.1.1. Kavunun sınıflandırılması

Kavun tek yıllık bir bitkidir ve kabakgiller ailesine aittir. Gövdesi tüylü, kolları sarılıcı ve yaprakları 5 lobludur. Karpuz, hıyar, kabak gibi bitkilerle aynı ailedendir ve bu bitkiler birbirlerine çok yakın akrabadır (Kesh, H. ve ark.,2021). Çizelge 1'de kavunun sınıflandırılması ayrıntılı şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 1. *Cucumis melo* sistematigi

Domain	Eukarya (Ökaryotlar)
Alem	Plantae
Altalem	Tracheobionta
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	Cucurbitales
Familya	Cucurbitaceae (Kabakgiller)
Cins	Cucumis
Tür	Cucumis melo

2.1.2. Kavunun tarihçesi

Kavunun orijini günümüzde kesin bir şekilde bilinmemektedir. Farklı coğrafik orijinlerden tanımlanmış yabani ve kültüre alınan birçok kavun tipi vardır (Ermiş ve Aras, 2017). Arkeolojik kayıtlarda çok az belgelendirilmiştir. Eski Mısır'da yaklaşık MÖ 3700 yıllarına dayandığına dair ipuçları vardır. Çin'de Ch'ian Shan Yang bölgesinde yapılan bir kazıda kavun tohumları bulunmuştur. Bu tohumların kaç yılına ait oldukları belirsizliğini korumaktadır. Bu belirsizliklerin yanında kavun kültürünün her iki kıtada farklı zamanlarda başladığı tespit edilmiştir (Candan ve Kesercioğlu, 2012). Anavatanı diğer Cucumis türlerinin varlığı da göz önüne alındığında Afrika olduğu tahmin edilmektedir. Güneydoğu Afrika'dan İran ve Türkmenistan'a geçtiği, sonrasında dünyanın diğer bölgelerine yayıldığı; gen merkezi içerisinde Anadolu, İran ve Afganistan'ın bulunduğu ileri sürülmüştür (Sarı ve ark., 2000). Amerika'ya ise ilk seyahatinde Kristof Kolomb tarafından götürüldüğü ve yetiştirilmeye başlandığı tespit edilmiştir (Solmaz ve ark., 2021).

2.1.3. Kavunun ekonomik önemi

Kavun dünyada yetiştirilen ekonomik değeri yüksek sebzelerden biridir. Cucurbitaceae familyası, Solanaceae familyasından sonra özellikle Akdeniz ülkelerinde ekonomik açıdan en önemli sebze grubudur (Garcia-Mas ve ark., 2012). Dünya pazarında dördüncü en önemli sebzedir (Lopez-Zaplana ve ark., 2022). Özellikle tatlı kavunlar batıda ekonomik olarak çok önemlidir.

Dünya kavun üretim miktarı yaklaşık 28 milyon tona ulaşmıştır. Ülkemizde ise 62 724 hektar alan üzerinde 1 587 230 ton üretim miktarına ulaşmıştır. Çizelge 2’de yedi farklı ülkenin 2022 yılında üretim miktarı ve üretimdeki payı gösterilmiştir. Çizelgede gösterildiği gibi Çin kavun üretiminde diğer ülkeleri büyük farkla geride bırakarak 14 252 671,65 ton ile birinci sırada yer almaktadır. Dünya kavun üretiminin neredeyse yarısı Çin tarafından karşılanmaktadır. İkinci sırada 1 587 230 ton ile ülkemiz bulunmaktadır. Dünya kavun üretiminin yaklaşık %5’lik kısmı ülkemiz tarafından karşılanmaktadır. Sonrasında ise Hindistan 1 498 000 ton kavun üreterek üçüncü sırada bulunmaktadır. İran, ABD, Mısır, Japonya kavun üretiminde ön plana çıkan diğer ülkelerdir (Faostat, 2022).

Çizelge 2. Dünya kavun üretiminde 7 ülkenin 2022 yılı üretim rakamları ve dünya üretiminden aldıkları pay (FAOSTAT, 2022)

	Ülke	Üretim Miktarı (ton)	Üretimdeki payı (Yüzde)
1	Çin	14 252 671,65	%49,90
2	Türkiye	1 587 230	%5,55
3	Hindistan	1 498 000	%5,24
4	İran	700 000	%2,45
5	ABD	569 871	%1,99
6	Mısır	368 730,5	%1,29
7	Japonya	146 386,81	%0,51
Toplam üretim hacmi		28 558 068,57	%100

Ülkemizde iklim koşulları elverişli olması nedeni ile kavun hemen hemen her yerde yetişmektedir. Genellikle İç Anadolu, Ege, Akdeniz Bölgelerinde üretilmektedir (Seçim, 2019). Adana, Antalya, Konya, Denizli, Manisa illeri üretimde ön plana çıkmaktadır. Türkiye’de yetiştirilen kavun tipleri Kırkağaç, Yuva, Hasanbey, Kışlık Sarı, Topatan, Gönen, Galia kavunudur (Baktemur ve ark., 2023).

Çizelge 3. Ülkemizde yıllara göre kavun üretimi (FAOSTAT)

Üretim yılı	Üretim miktarı (ton)
2017	1 813 422
2018	1 753 942
2019	1 777 059
2020	1 724 856
2021	1 638 638
2022	1 587 230

Çizelge 3'te Türkiye'de belirtilen yıllarda üretilen kavun miktarları verilmiştir. En fazla kavun 1 813 422 ton ile 2017 yılında üretilmiştir. 2018 yılında ise 2017 yılından 59.480 ton daha az olmak üzere 1 753 942 ton; 2019 yılında 1 777 059 ton kavun üretilmiştir. İlerleyen yıllarda kavun üretiminde düşüş yaşanmıştır.

2.1.4. Kavunun besin değeri açısından önemi

Kavun içeriğinde glikoz, fruktoz, sükroz şekerleri sitrik asit, malik asit, süksinik asit ve askorbik asit gibi organik asitler bulunmaktadır. Protein seviyesi düşüktür. Buna rağmen fenilalanin, glutamin, izolösin, serin, tirozin, triptofan aminoasitleri içeriğinde bulunmaktadır (Şığva, 2008). İncelendiğinde A, B1, B2, B3, B6, B9, C, E ve K vitaminlerinin yanı sıra çinko, demir, fosfor, kalsiyum, magnezyum, potasyum ve sodyum mineralleri içerdiği tespit edilmiştir (Baktemur ve ark., 2023).

Kavunun tüketilen kısmında %85-92 oranında su, %8-15 oranında kuru madde bulunmaktadır. Kuru maddenin büyük bir çoğunluğunu karbonhidratlar meydana getirmektedir. Şeker miktarı %4-8 arasındadır. Yağ oranı %0.2-0.6, azotlu madde %0.6 - 1.2 oranında bulunmaktadır (Şığva, 2008).

Karoten, folik asit ve potasyum bakımından zengindir. Yüksek seviyede temel besin maddeleri içermektedir. İnsan sağlığı için önemli bir sebzedir ve bol bol tüketilmesi önerilmektedir. Turuncu kavunlarda ana karotenoid olan β -karoten immün sisteminin güçlenmesinde önemli bir antioksidandır. Cilt sağlığını korur, sinirleri sakinleştirir, böbrek taşı dökülmesinde bolca tüketilmesi tavsiye edilir. Gut hastalığı, romatizma, verem, kansızlık, katarakt, gece körlüğü, kardiyovasküler sistem bozukluklarını ve kanser oluşumunu da azalttığı bildirilmektedir (İncili, 2022).

Kavun taze olarak tüketilmesi dışında reçel ve dondurma yapımında, olgunlaşmamış hali turşu yapımında ve kozmetik sektöründe kullanılmaktadır (Baktemur ve ark., 2023). Kökleri ise tıbbi bileşik olarak kullanılmaktadır (Şığva, 2008).

2.1.5. Kavun yetiştiriciliği

Kavun bitkisini yetiştirmek çok kolay değildir. Sıcaklık, ışık gibi dış faktörlerden çok kolay etkilenmektedir. Dünyanın sıcak bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilen sebze

türlerinden biridir (Paris ve ark., 2012). Işık faktörü kavunun rengini ve meyve aromasını belirlemede etkilidir.

Sıcaklık faktörü kavun için en önemli faktördür. Kavunun tohum ekimi için ideal toprak sıcaklık 15-18 °C'dir. Çimlenmesi için gerekli sıcaklık ise 23-24°C'dir. Çimlenme için minimum sıcaklık aralığı 10-12°C civarında olmalıdır. Kavun sıcak ve kuru iklimde optimum 27-30 °C arasında yetişmektedir. Sıcaklığın 10 °C'nin altına düşmesi veya 30°C'nin üstüne çıkması durumunda bitki gelişimi olumsuz etkilenmekte ve strese girmektedir. Yüksek sıcaklık ve donmaya karşı yüksek hassasiyet göstermektedir. Uygun şartların sağlanması durumunda kavun verimliliği artmaktadır (Seçim, 2019; Wien., 1997; Nuñez-Paleniüs ve ark., 2008).

Aşırı nemli ortamda meyvenin dokusu ve lezzeti olumsuz etkilenmektedir. Kavunun fazla suya ihtiyacı yoktur. Aşırı sulama meyvede şeker içeriği eksikliğine neden olmaktadır. Kavunlar ekimden ilk çiçeklenmeye ve meyvenin irileşmesine kadarki süreçte bolca suya ihtiyaç duymaktadır. Yağmurlama sulama yöntemi bitkinin fungal hastalıklara yakalanma oranını artırır ve bitki gelişimini engelleyebilmektedir. Bu sebeple damla sulama yöntemi genellikle tercih edilmektedir. Meyvenin olgunlaşma döneminde sulama yapılmamaktadır. Doğru zamanlarda sulama kavunun tat aromasının oluşmasında çok önemlidir. Fazla sulama, ürünlerin iri olmasını sağlayabilir ancak bu durum tat, aroma ve besin maddelerinin azalmasına neden olabilmektedir (Ece, 2017).

Kavun asidik ve bazik ortamlarda iyi gelişmemektedir. En optimum toprak pH'ı kavun için 6.0-7.5 arasındadır. En çok üretildiği bölgeler arasında Konya ve çevresi gelmektedir. Bu bölgede pH genelde 8'den büyüktür. Toprağın organik ve besin açısından zengin olması gerekmektedir. Derin, geçirgen, su tutma kapasitesi iyi olan, taban suyu problemi olmayan tınlı toprakları sevmektedir (Baktemur ve ark., 2023). Kısaca kavun için yüksek sıcaklık, düşük atmosferik nem, bol güneş ışığı ve az sulama yaparak verimli kavunlar elde edebilmektedir (Ece, 2017).

Gübreleme aşamalarında azot (N), potasyum (K) ve fosfor (P) kullanılmaktadır. Azot kavunun kök sistemi gelişimini, potasyum meyve olgunlaşması ve lezzet, fosfor ise çiçek ve kök gelişimini sağlamaktadır (Crisostomo ve ark., 2003). Azot eksikliği bitkinin bodurlaşmasına ve sarı bir görünüme sahip olmasına sebep olmaktadır. Fosfor (P) eksikliği ise yaprak renginin koyu yeşilden çok daha mat bir yeşile dönüşmesine ve gövdesinin incelmeye neden olmaktadır (Baktemur ve ark., 2023).

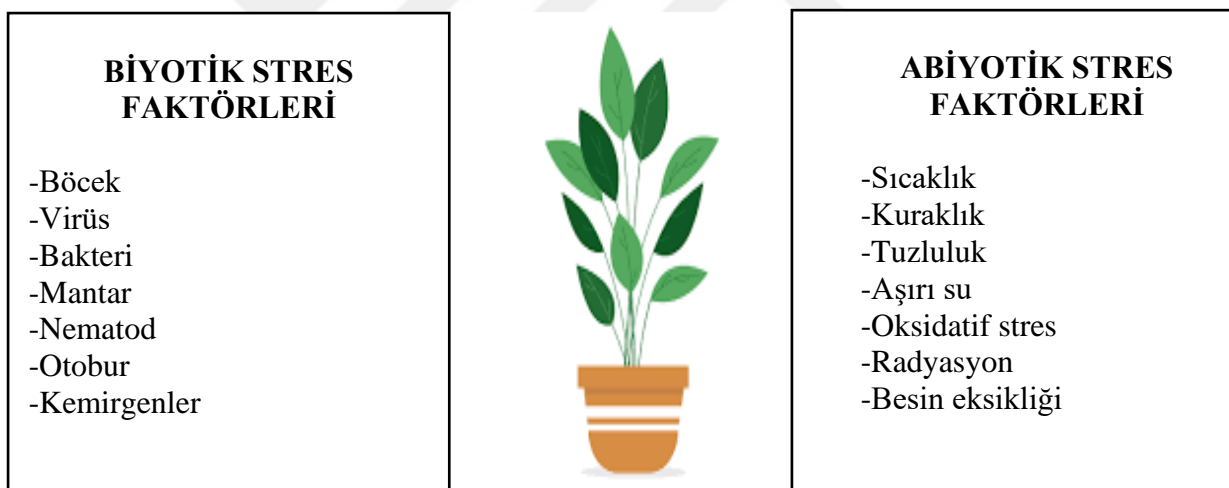
Bitkilerin yüksek sıcaklığa maruz kalma süresi yoğunluğuna bağlı olarak verdiği cevaplar farklılık göstermektedir. Çoğunlukla sıcaklık stresi, su taşınımında düzensizliğe

neden olabilmekte ve akuaporin genlerinin ekspresyonunda değişikliğe neden olabilmektedir (Lopez-Zaplana ve ark., 2022).

2.2. Bitkilerde Stres Kavramı

Bitki stresleri morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere neden olarak bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyen dış faktörler olarak tanımlanmaktadır (Madani ve ark., 2019). Stres faktörleri biyotik ve abiyotik stres olarak iki farklı şekilde sınıflandırılmaktadır.

Biyotik stres faktörleri böcekler, virüsler, bakteriler, mantarlar, nematodlar, otçullar, kemirgenler, örümcekler ve yabancı otlar sonucunda bitkinin strese girmesi ile oluşmaktadır. Biyotik stres faktörleri bitki besin maddelerine saldırarak hastalıklara veya canlılığın azalmasına neden olmakta ve ölüme sonuçlanabilmektedir (Singla ve ark., 2016).



Şekil 1. Biyotik ve abiyotik stresler gösterilmiştir

Abiyotik stres faktörleri ise Şekil 1 gösterildiği gibi aşırı su, sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, ağır metaller, oksidatif stres ve besin eksikliği gibi çevresel etkenlerdir. Abiyotik streslerin başında gelen sıcaklık stresi, bitkinin uygun büyüme sıcaklığından 1,5–6°C daha fazla sıcaklığa maruz kalması olarak açıklanmaktadır. Sıcaklık stresi, bitki büyümesini, metabolizmasını ve verimliliğini sınırlayan önemli çevresel streslerden biridir. Bitki büyümesi ve gelişimi, sıcaklığa duyarlı çok sayıda biyokimyasal reaksiyonu içermektedir (Hasanuzzaman ve ark., 2013). Bitkinin fotosentez yapamamasına, hücre

zarlarının zarar görmesine, yaşlanma nedeniyle hücrenin ölmesine neden olabilmektedir. Sıcaklık stresi her stres faktörü gibi bitki genlerinin ekspresyon seviyelerini etkilemektedir. Hangi genlerin abiyotik stresten etkilendiği, ekspresyonu artan veya azalan genleri tespit etmek çok önemlidir (Houghton ve ark., 2001; Larkindale ve Huang, 2004).

Sıcaklık stresi bitkinin fizyolojik ve biyokimyasal işlevlerine zarar vermektedir. Bu da bitkinin büyüme ve gelişmesini etkilemekte ve bitkinin vereceği ürün miktarını ve kalitesini düşürmektedir (Burke, 1990). Aynı şekilde sıcaklık stresi protein sentezinin ve enzim aktivitesinin durmasına, hücre zarının akışkanlığının artmasına ve hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır (Schöffl ve ark., 1999). Bu durum fotosentezi yavaşlatmakta ve karbonhidrat üretimini düşürmektedir. Bitkiler geceleri yüksek sıcaklık altında kaldıklarında ise daha fazla solunum yaptıkları için bulunan karbonhidrat oranı düşmektedir (Loka ve Oosterhuis, 2010). Bunun sonucunda tohum oluşumu ve tohum sayısı düşmekte, yaprak boyutlarında farklılıklar olabilmekte tüm bunlar ise bitkide büyük bir verim kaybına neden olmaktadır (Lukatkin, 2005). Bitkilerin sıcaklık stresine tepkileri stresin derecesine, süresine ve bitki türüne göre değişiklik göstermektedir (Hedhly ve ark., 2009).

Günümüzde sıcaklık stresi mahsul üretimi için büyük endişe kaynağıdır. Bitkilerin yüksek verimliliğini sürdürülebilmesine yönelik çalışmalar önemli tarımsal hedeflerin başındadır (Hasanuzzaman ve ark., 2013). Biyotik ve abiyotik tüm stres faktörleri, dünya genelinde birçok tarım alanını etkilemekte buna bağlı olarak ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına neden olmaktadır (Wang ve ark., 2023).

2.2.1. Yapılan çalışmalar

2.2.1.1. Kavun dışındaki bitkilerin sıcaklık stresine yanıtı

Yu ve arkadaşları (2022) yaptıkları çalışmada sıcaklığa tolerant hıyar (TT) ile sıcaklığa duyarlı hıyar (TS) bitkilerinin dayanıklılıkları incelemişlerdir. 0-3-6 günlerdeki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Gündüz 16 saat boyunca 43 °C, gece ise 8 saat boyunca 25 °C sıcaklık uygulanmıştır. TT ve TS bitkilerinde yüksek sıcaklığın, 6.826 farklı genin (DEG) ifade seviyesini artırırken, 4.111 genin ifade seviyesini azalttığı belirlenmiştir. Her iki çeşitte ortak 1.140 genin ifadesi artarken, 415 genin ifadesi azalmıştır. Yüksek sıcaklıkta, TT ve TS'de sırasıyla 2.867 ve 923 genin spesifik olarak artış göstermiştir. TT ve TS'de sırasıyla 523 ve 1.888 genin azaldığı tespit edilmiştir.

Hücre bölünmesinden sorumlu olan CsCYCD3 ailesi genlerinin, TT'de ifadesi artarken, TS'de azalmıştır. Gen ontoloji analizi sonucunda, etilen metabolik sürecine dahil olan genlerin TT ve TS bitkilerinde artış gözlenmiştir. Isı stresi GA reseptörü CsGID1'i artış gösterirken, DELLA inhibitörünün azalmıştır. WRKY, MYB, ERF ve NAC transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere çeşitli TF'ler, TT'de artış, TS'de ise azalış gösterdiği tespit edilmiştir (Yu ve ark., 2022).

Wang ve arkadaşları (2020) hıyar bitkisini sıcaklık stresine maruz bırakarak transkriptom analizi gerçekleştirmiştir. Normal ve ısı stresi altında yetiştirilen L-9 (tolerant) ve A-16 (duyarlı) hıyar bitkileri kullanılmıştır. 23.000'den fazla transkript incelenmiştir. L-9 ile A-16 karşılaştırıldığında 1.183 genin artış gösterdiği, 1.595 genin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Sonucun validasyonu için rastgele seçilen 18 gen qRT-PCR ile incelenmiştir. İnceleme sonucunda genler arasında yüksek pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. KEGG analizi sonucunda normal koşullarda “metabolik yol”, “sekonder metabolik yol” genlerin zenginleştirildiği, yüksek sıcaklıkta ise “sekonder metabolit biyosentezi”, “MAPK sinyal yolu”, “bitki hormonu sinyal iletimi” yollarında yer alan genlerin zenginleştiği tespit edilmiştir. WRKY4, WRKY25, WRKY39 genlerinin ifade seviyesi L-9'da A-16'ya göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Reseptör kinaz ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan dokuz genin ekspresyon seviyeleri, qRT-PCR cihazı ile ölçülmüştür. Sonuçlar, ısı stresi altında L-9'a kıyasla A-16'da tüm genlerin ifadesinin belirgin şekilde azaldığını göstermiştir. Normal koşullar altında iki genin (Csa1G601010 ve Csa3G037080) L-9 ve A-16 arasında ekspresyon farklılıkları göstermesine rağmen, diğer yedi genin ekspresyon seviyesi stres öncesi iki hıyar çeşidi arasında herhangi bir farklılık göstermediği raporlanmıştır (Wang ve ark., 2020).

Wang ve arkadaşları (2021) çalışmalarında biberin sıcaklığa tolerant 17-03 ile duyarlı H1023 bitkilerinin transkriptom analizini gerçekleştirmiştir. RNA-seq analizi sonucunda 24.448 eksprese olan gen tanımlanmıştır. 11.633 DEG tanımlanmıştır. DEG içerisinden 5.133 gen ontoloji terimi açıklanmıştır. 17-03 bitkisinde 7.327 gen tanımlanmıştır. Bunlardan 3.435 ekspresyonu artarken, 3.892 gen ekspresyonu azaldığı tespit edilmiştir. H1023 bitkisinde 7.778 genin 4.025 genin ifadesi artmış, 3.753 genin ifadesi azalmıştır. 47 ısı şok proteinin diferansiyel olarak eksprese edildiği tespit edilmiştir. Rastgele seçilmiş 14 DEG'nin transkripsiyonel seviyeleri, qRT-PCR kullanılarak tespit edilmiştir. Küçük ısı şoku proteini, sıcaklık stres transkripsiyon faktörü, *bZIP*, *MYB*, *WRKY* genleri dahil olmak üzere 14 DEG'nin tümü sıcaklık stresi

tepkisi sürecine katılmıştır. 635 TF'den oluşan toplam 49 TF ailesi, HSF, NAC, WRKY, ERF, bHLH, MYB, C2H2, B3, GRAS, bZIP ve HD-ZIP dahil olmak üzere 17-03 ve H1023'te ısıl işlem ve geri kazanım sırasında farklı şekilde ifade edilmiştir. Sıcaklık stresinde 38 ısı şoku faktörü, 17 transkripsiyon faktörü ve 38 NAC proteini ve 35 WRKY proteini belirlenmiştir (Wang ve ark., 2021).

Ara ve arkadaşları (2013) kabak türlerinde yaptıkları çalışmada sıcaklık stresine maruz bırakılan, tolerant "*C. moschata*", duyarlı "*C. maxima*" ve orta derecede toleranslı "*Maxchata*" türlerini incelenmiştir. Sonuçlar, özellikle toleranslı genotiplerdeki SOD, CAT, APX ve POD aktivitelerindeki artışların, düşük ROS üretiminin gösterdiği gibi onları oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermiştir. Ayrıca kökler ve gövdeler arasındaki farklı izoform desenleri, bu genlerin dokuya özgü ekspresyonunu kanıtlamıştır. Bu gözlem, artan ısı toleransı için bitkilerin antioksidan savunma sisteminin altında yatan karmaşık mekanizmayı açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Ara ve ark., 2013).

Tokic ve arkadaşları (2023) domates tohumlarının iki farklı sıcaklıkta fidelerinin ve yetişkin bitkiler üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bitkiler 37 °C ve 45 °C'ye maruz bırakılmıştır. Her iki sıcaklık stresi türü fidelerde prolin, IAA, HSP70 ve HSP90 proteinleri ile *HSFB1*, *DREB1* ve *NAC4* gen ekspresyonunda artışa neden olmuştur. HSP70, 45 °C'de daha belirgin bir şekilde birikirken, HSP90, 37 °C'de daha belirgin bir şekilde biriktiği gözlenmiştir. HSP90'ın tam tersi, yüksek HSP70 seviyesi, fidelerde indüklenen HSFB1 ve HSFA3 ekspresyonu ile doğru orantılıdır. Yetişkin bitkiler ısı stresine karşı daha toleranttır. Her iki sıcaklık yetişkin bitkilerde ACC seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır (Tokic ve ark., 2023).

2.2.1.2. Kavunun abiyotik strese yanıtı

Wang ve arkadaşları (2016) tarafından seçilen kavun çeşitleri tuz stresi altında incelemiştir. Bing XueCui' (BXC) ve 'Yu Lu' (YL) kavun çeşitlerinin transkriptomik analiz gerçekleştirmiştir. Kavun çeşitlerine 150 mM -300 mM NaCl tuz stresi uygulanmıştır. Seçilen 3 farklı zaman aralığında hasat edilmiş ve transkriptom analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. BXC'de 1.171 DEG tespit edilmiştir. 572 genin ifadesinin arttığı, 599 genin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. YL çeşitinde ise 1.487 DEG tespit edilmiştir. Genin yanıt verdiği 538 genin arttığı, 949 genin azaldığı belirlenmiştir. Yanıt

veren 12 genin RT-qPCR analizi, RNA dizileme verilerinin ile pozitif korelasyon gösterdiği görülmüştür (Wang ve ark., 2016).

Ansari ve arkadaşları (2019) kavun genotipi SC-15'i kuraklık stresine maruz bırakarak protein profilindeki değişiklikleri incelemiştir. 0-7-14-21 gün kuraklığa stresi uygulanmıştır. Su eksikliğinin olduğu günlerin artması, kavun yapraklarında SOD ekspresyonunun indüklenmesine neden olmuştur. RT-PCR analizi sonucunda 7-14-21 DWD (su eksikliği günü)'den sonra yaprağında CAT, APX, GR ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. L36 ribozomal proteini, NAC geninin ekspresyonu artmıştır. WRKY transkripsiyon faktörü tespit edilmiştir. Çalışmada WRKY TF ekspresyonu 7-14 günlerinde azalmıştır. Analiz sonucunda 48 proteinin ifade edildiği gösterilmiştir. Bu 48 genin 37 tanesinin ifadesi artarken, 10 genin ifadesinin azaldığı gözlenmiştir (Ansari ve ark., 2019).

Zhang ve arkadaşları (2022) yaptığı çalışmada su basmasına duyarlı L39 ve toleranslı L45 kavun çeşitlerinin fizyolojik ve transkriptomik verileri karşılaştırılmıştır. 4 gün boyunca bu iki tür su basma stresine mazur bırakılmıştır. L45'te 1748 DEG tespit edilmiştir. Bu genlerin 1.289 tanesinin ifadesi artarken 459 genin ifadesi azalmıştır. L39'da ise 3.178 DEG bulunmuştur. 1.991 genin ifadesi artarken 1.187 genin ifade seviyesi azalma göstermiştir. Su basmayı düzenleyen 311 transkripsiyon faktörü (TF) tanımlanmıştır. Her iki 39 TF'ü ortaktır ve 27 tanesinin ifadesi artarken, 12 tanesinin ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. L39'da 155 transkripsiyon faktörü 87 tanesi artmış ve 68 tanesinin ifade düzeyi azalmıştır. L45'te ise 97 transkripsiyon faktörünün 82'si artarken, 15'i azalmıştır. Su basması stresi L39'da nişasta ve şeker bölünmesiyle ilişkili 12 gen artışına neden olurken L45'te 5 genin artışı olmuştur. Su basması stresi ve kontrol koşulları arasındaki karşılaştırmada, her iki varyant da 357 artan DEG ortaktır. Diferansiyel olarak eksprese olan genler bakımından 'glutatyon metabolizması', 'bitki-patojen etkileşimi' ve 'metabolik yollar' oldukça zengindir (Zhang ve ark., 2022).

Erdinç ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan çalışmada üç Türk kavun genotipinin YYU 1 (orta toleranslı), YYU 4 (duyarlı), CU-196 (toleranslı), ANANAS (duyarlı) tuzluluk stresine karşı 6 hafta fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizması incelenmiştir. 50-75 mM NaCl konsantrasyonlarda sulanmıştır. Moleküler açıdan WRKY24, TCP15, CmHD -Zip, mTERF2, Dof3, CmADH2 transkripsiyon faktörü geninin ekspresyon seviyeleri tespit etmek amacıyla qRT-PCR analizi yapılmıştır. Sonuçlarda TCP15 ve WRKY24 ekspresyon seviyesinin 75 mM NaCl şartlarında daha

fazla değişim gösterdiği tespit edilmiştir. CmAHD2 ve Dof3 ekspresyonunun ise 50 M NaCl şartlarında daha fazla değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Erdoğan ve ark., 2021).

Weng ve arkadaşları (2022) sıcaklık ve nem stresine cevap veren, neme duyarlı “JIN TAI LANG” ve neme toleranslı “JIN DI” kavun genotiplerini materyal olarak seçmiştir. RNA-seq analizi için kavun örnekleri uygulamanın 0, 1, 2, 3 ve 4. günlerinde toplanmış ve her indeks en az üç kez tekrarlanmıştır. Sekanslama işlemi yapılmıştır. Elde edilen veriler analiz edilerek diferansiyel olarak eksprese olan genlerin sayısı belirlenmiştir. 'JIN TAI LANG' çeşidi kontrol olarak alındığında, HTH stresi altındaki iki çeşitte toplam 3.390 gen ekspresyonu değişikliği tespit edilmiştir. Bunların arasında 1.646 genin ifadesinin arttığı ve 1.744 genin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. GO zenginleştirme analizi sonucunda HTH stresi ile ilgili 20 zenginleştirme kategorisi belirlenmiştir. Temel olarak “pigment bağlanması”, “fotosistem I'de ışık hasadı”, “birincil metabolik süreç” ve “hücrel protein modifikasyon süreci” açısından zenginleştirilmiştir. DEG'lerin KEGG zenginleştirme yolu ile analiz edilmiştir. Esas olarak "fotosentez-anten proteinleri", "fenilpropanoid biyosentezi", "bitki hormonu sinyal iletimi", "nişasta ve sükröz metabolizması" ve "bitki- patojen etkileşimi" açısından zenginleştirilmiştir. En önemli farkın KEGG zenginleştirme yolu analiz edildiğinde, iki çeşit arasındaki fark olarak 'JIN TAI LANG'da Lhca1, Lhca3, Lhca4 ve Lhcb1-Lhcb6'nın bulunduğu "ışık toplayan protein kompleksinde" olduğu belirlenmiştir. Çeşitliliği ise 'JIN DI' çeşidinden önemli ölçüde düşük çıkmıştır (Weng ve ark., 2022).

2.3. RNA Dizileme (RNA-Seq)

RNA dizileme yöntemi, belli koşullar altında ifade edilen genlerin sekanslanmasıdır. Diğer adıyla transkriptom dizilimi, transkriptomla ilgili benzersiz bilgiler sağlayan yüksek verimli bir teknolojidir. Bir organizmanın transkriptomunun (mRNA, ncRNA) ortaya çıkarılması, genomun işlevsel öğelerinin anlaşılması açısından çok önemlidir (Shumate ve ark., 2022). Transkriptom analiz bir canlının, belli çevresel koşullar altında RNA molekülünün kimliğini ve bolluğunu anlama aşamasıdır (Hrdlickova ve ark., 2017). Genlerin/izoformların miktarının belirlenmesinde, kodlamayan RNA'nın tespitinde ve bilinmeyen genleri ortaya çıkarmak amacıyla kullanılmaktadır (Yalamanchili ve ark., 2017; Withanage ve ark., 2022).

Geçmişten günümüze çeşitli dizileme yöntemleri ve platformları geliştirilmiştir. İlk geliştirilen yöntemler Sanger dideoksi sentez (Sanger ve ark., 1977; Sanger ve ark.,

1975) ve Maxam-Gilbert (Maxam ve Gilbert, 1980) kimyasal bölünme yöntemleridir. Bu birinci nesil yöntemlerden Maxam-Gilbert yönteminde günümüzde toksik reaktif bulunduğu için sık kullanılmamaktadır. Sanger sekanslama ise günümüzde küçük ve karmaşık olmayan genomlarda tercih edilmektedir (Slatko ve ark., 2018). Bu yöntemle yaklaşık 500-1,000 baz çifti DNA fragmentleri halinde parçaları okuyabilmektedir. İnsan genom projesi Sanger sekanslama kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bentley ve ark., 2000). İlerleyen yıllarda düşük maliyetle yüksek verimli sekanslama yöntemlerine gereksinim duyulmuştur. İkinci nesil teknolojilerin gelişmesi bu şekilde başlamıştır. İkinci nesil sekanslama teknolojileri hazırlık aşaması, sekanslama, veri analizi gibi basamaklardan oluşmaktadır. Bu teknoloji sayesinde daha büyük veriler kısa sürede ve ucuz bir şekilde üretilebilir hale gelmiştir (Metzker, 2009). İllumina (Ferrarini ve ark., 2013), 454 pyro-sequencing (Margulies ve ark., 2005), İon Torrent gibi platformlar ikinci nesil sekanslama teknolojisinde geliştirilen cihazlardır. 50-500 baz çifti fragment aralığında okuma yapmaktadır (Merriman ve ark., 2012). Birinci nesil ve ikinci nesil sekanslama yöntemleri kısa okuma temelli çalışmaktadır. Kısa okuma genellikle küçük genoma sahip canlılarda tercih edilmektedir. Transkriptom, metagenom analizleri gibi genomik çalışmalara göre daha küçük veri üreten çalışmalarda tercih edilmektedir. Okuma doğruluğu çok yüksektir. Fakat fragment uzunlukları kısa ve çok sayıda olduğu için veri birleştirme (assembly) aşaması zordur. Kısa okuma teknolojileri tekrar bölgelerini tespit etmekte yetersiz kalmakta, hatalı sonuçlar verebilmekte, mutasyon ve varyasyon tespiti yapmakta güçlük çekmektedir (Shumate ve ark.,2022; Weirather ve ark.,2017).

Son dönemde yeni nesil sekanslama teknolojilerine üçüncü nesil sekanslama yöntemleri eklenmiştir. Üçüncü nesil sekanslama yöntemleri sayesinde uzun DNA ve RNA molekülleri dizilenebilmektedir (Slatko ve ark., 2018). Uzun okuma temelli çalışan bu yöntemlerde yaklaşık 10.000 baz çifti üzerinde okumalar üretilebilmekte, 100.00 baz çifti üzerinde haritalama yapabilmektedir (Lee ve ark., 2016). Bu kadar büyük veri üretilmesi aynı zamanda maliyetin de düşmesi sonucunda genom yapısının anlaşılabilmesi daha kolay olmuştur. Uzun okumaları birleştirmek kısa okumalara kıyasla daha kolay olsa da kısa okumaların birleştirilmesinde hata oranı daha yüksek olmaktadır. Uzun okumalar tekrar bölgelerin daha iyi tespit edilmesini sağlamaktadır. Uzun okuma, kısa okuma sonuçlarına göre daha büyük daha kapsayıcı genom bütünlüğü üretebilmektedir (Roberts ve ark., 2013). Varyasyon tespiti gibi çalışmalarda uzun okuma temelli çalışan cihazlar tercih edilmelidir. Uzun okumalar Indel (İnseriyon-delesyon)

mutasyonlarının daha kolay tespit edilmesini sağlar (Chaisson ve ark., 2014). Üçüncü nesil yöntemlerde sekanslama için kütüphane oluşturma aşamasında amplifikasyon aşaması yoktur. Bu avantajı sayesinde tek molekül sekanslama yapılabilmektedir. Uzun okuma teknolojilerini Pacific Biosciences (PacBio), Oxford Nanopore Technologies, Illumina Truseq Sentetik Uzun Okuma teknolojisi, Tek Molekül Gerçek Zamanlı (SMRT) sekanslama platformları kullanmaktadır (Lee ve ark., 2016). Yapılan çalışmaya uygun kısa veya uzun okuma tercih edilmelidir. Bu tez çalışmasında transkriptom analizi yapıldığından kısa okuma tercih edilmiştir.

Dizileme cihazları genel olarak DNA temelli çalışmaya uygun tasarlanmıştır. Bu sebeple RNA-seq çalışmalarında RNA'dan cDNA kütüphanesi hazırlama aşamasının yapılması gerekmektedir. Ama her şeyden önce izole edilen numunelerin toplam RNA kalitesinin ölçülmesi gerekmektedir. RIN adı verilen RNA bütünlüğünün ölçüsü olan değer 8 veya daha yüksek olması önemlidir. Bu değer altındaki numuneler sekanslamada kullanılmamaktadır (Withanage ve ark., 2022). Çoğu dizileme platformu tespit edebilme kapasitesi limiti nedeniyle, cDNA kitaplıklarının dizilemeden önce PCR ile çoğaltılması gerekmektedir (Heyer ve ark., 2015). Hazırlanan her cDNA kütüphanesinin uçlarına adaptör sekans adı verilen belirli boyutta sekanslar eklenmektedir. Kullanılacak platforma göre sekanslama öncesi hazırlıklar yapılmalıdır. Bu cDNA kütüphanesi hazırlama metodu incelenen RNA türü, boyutu, dizisi ve yapısal özelliklerine göre değişiklikler gösterebilmektedir (Hrdlickova ve ark., 2017).

Eklenen adaptör dizisinin ligasyonunu kolaylaştırmak için çift sarmallı cDNA'nın 3' ucuna bir adenin (A) bazı eklenmelidir (Withanage ve ark., 2022). Diğer adı ile poliadenile edilmiş RNA dizilenmesi yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Protein kodlayan RNA (mRNA) ve uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) (>200 nt) poliA kuyruğu içermektedir. Poli A ve RNA'ları total hücrel RNA'dan zenginleştirilmesi çok daha kolay olmaktadır. Poli(A)+RNA seçimi, oligo-dT molekülleriyle kaplanmış manyetik veya selüloz boncuklarla gerçekleştirilmektedir. Çok düşük miktarda RNA mevcut olmadığı sürece poli(A) saflaştırması, poli(A) + RNA'yı seçmek için tercih edilen bir yöntem olmaktadır (Nam ve ark., 2002).

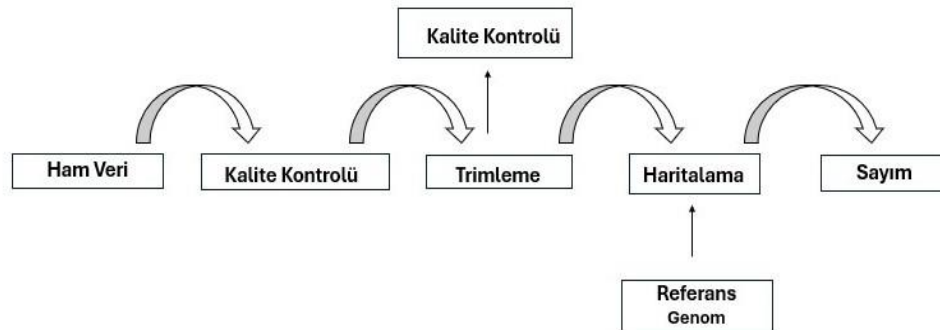
Prokaryotik mRNA'lar gibi poliadenile edilmemiş RNA'ların dizilenmesinde en önemli problemlerin başında ribozomal RNA (rRNA) yer almaktadır. Transkriptomik çalışmalarda rRNA'lar kullanılmaz ve ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Ribozomal RNA'lara hibridize olabilen diziye özgü problemler kullanılarak bu işlem gerçekleştirilebilmektedir. rRNA'lar antisens DNA oligoları tarafından hedeflenir ve

direkt probu bozarak (PDD) RNaz H tarafından sindirilmesi sağlanmaktadır. Bu yöntem hibridizasyona göre daha az iş yüküne sahiptir. Fakat her tür için tasarlanmış farklı prob setlerini ihtiyaç duymaktadır. Çözüm olarak rRNA'lar ve diğer RNA'lar da dahil olmak üzere tüm cDNA'lar dairesel hale getirilerek rRNA problemlerine hibridize edilmektedir. Hibritleştirilmiş diziler daha sonra dubleks spesifik nükleaz (DSN) tarafından sindirilmekte ve bu da onları amplifikasyon için kullanılamaz hale getirmektedir. Böylece rRNA ortadan kaldırılmaktadır (Archer ve ark., 2014; Archer ve ark., 2015).

Bir başka yöntem ise RT sırasında ilgili RNA moleküllerine bağlanan ve böylece rRNA'lardan kaçınan spesifik, çok rastgele olmayan (NSR) primerleri kullanılmasıdır (Armour ve ark., 2009). Bu metot poli (A)'ya sahip olmayan prokaryotik türler için kullanıma çok uygundur (Hrdlickova ve ark., 2017). Bu yöntemler kullanılarak rRNA saf dışı bırakılabilir.

Kodlamayan RNA'lar çalışılacak ise, rRNA'ların PDD veya NSR hazırlama yoluyla çıkarılması gerekmektedir. PDD, yüksek girdili numuneler için daha iyi çalışırken, NSR hazırlama öncelikle düşük RNA girdileri için kullanılmaktadır (Hrdlickova ve ark., 2017).

Poli A seçilimi ve rRNA ayırma işlemi gerçekleştirildikten sonra RNA küçük fragment adı verilen belli boyutlarda parçalara ayrılma işlemi yapılmaktadır. Parçalanmış RNA boyutu dizileme platformuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Hrdlickova ve ark., 2017). Parçalanmış dizileri, tanınmasını kolaylaştırmak amacıyla fragmentin uçlarına adaptör dizileri bağlanmaktadır. Adaptör dizisinin nükleotit dizisi araştırmacı tarafından bilinmektedir. Bu şekilde mRNA sekanslanmaya hazır hale getirilmektedir (Borodina ve ark., 2011).



Şekil 2. Genel RNA-Seq basamakları (Beukers ve ark., 2023)

2.4. Veri Analiz Basamakları

2.4.1. Kalite kontrolü ve trimleme

Yeni nesil teknoloji platformları kullanılarak üretilen sekansları işlenebilir hale getirmek için çeşitli programlar kullanılmalıdır. Sekanslama sonucu üretilen ilk veriye ham veri denilmektedir. Ham verinin içeriğini anlamak ve adaptör sekans içeriyor mu gibi bilgilere ulaşmak için Galaxy platformunda bulunan programlar kullanılır. FastQC programı bunlardan biridir. Dizileme, ham veri veya başlangıç kitaplığı materyalinden kaynaklanan sorunları tespit edebilen bir kalite kontrol (QC) raporu sağlayan hesaplamalı bir araç olarak kullanılmaktadır (Andrews ve ark., 2010). FastQC, Babraham Enstitüsü tarafından geliştirilmiştir. Galaxy aracı kullanılarak HTML formatında bir rapor üretmektedir. Raporda, değerlendirilen her ölçüme başarılı, başarısız veya uyarıyı belirtmek için sırasıyla yeşil bir onay işareti, kırmızı çarpı işareti veya sarı ünlem işareti eklenmektedir. Genellikle okumaların her iki ucundaki okuma dizisinin kalitesi düşüktür, bu durum 3' ucundaki Phred skorundaki düşüşten ve 5' ucundaki rastgele A,C,G,T konsantrasyonundan dolayı olabilmektedir (Yalamanchili ve ark., 2017).

FastQC aracılığıyla;

- Dosya ismi, türü, dizi sayısı, dizilerin uzunluğu ve dizideki GC bazlarının oranı gibi temel istatistikler,
- Dizilerdeki bazların kalite puanları,
- Dizilerin ortalama kalite puanları,
- Dizilerin baz içeriği oranları ve ortalama GC oranları,
- Dizilerdeki tahmin edilemeyen bazların (N) pozisyonları,
- Dizilerin uzunlukları,
- Dizilerdeki duplikasyon miktarı,
- Aşırı tekrarlanan dizilerin baz dizilimleri ve tekrar miktarları
- Adaptör kalıntıları ve k-mer içerikleri, tespit edilmektedir.

Bir başka kalite kontrol programı olan MultiQC, tüm numunelerin tek bir özet raporunu oluşturmak için farklı numunelerdeki birden fazla farklı FastQC raporunu bir araya getirmek ve sonuçları görselleştirmek için kullanılmaktadır. MultiQC, herhangi bir

modern web tarayıcısında paylaşılabilen ve açılabilen tek bir bağımsız HTML raporu oluşturmaktadır (Andrews ve ark., 2010; Ewels ve ark., 2016).

Trimmomatic programı ise, incelenen FastQC raporlarında adaptör varlığı tespit ediliyor ise bunlar haritalamadan önce kaldırılması amacıyla çalıştırılmaktadır. Trimmomatic, Illumina NGS verileri için optimize edilmiş, daha esnek, çift farkındalığına sahip ve verimli bir araçtır. Dizileme verilerinde belirsiz baz içeren (N) okumalar da bulmakta, kalitesi düşük sekansları, adaptör sekansları ortamdaki uzaklaştırmayı ve aşırı kısa okumaların çıkarılmasını sağlamaktadır (Bolger ve ark., 2014). Bu araca alternatif olarak CutAdapt programı önerilmektedir (Martin, 2011).

2.4.2. Haritalama

Kalitesiz sekanstan ve adaptörlerden arındırılan verinin sonraki aşaması haritalamadır. Haritalama, genomdaki okumaların konumlarını gösteren kritik adımdır. Bu adım Galaxy platformunda bulunan HISAT2 (hierarchical indexing for spliced alignment of transcripts) algoritması ile gerçekleştirilmiştir.

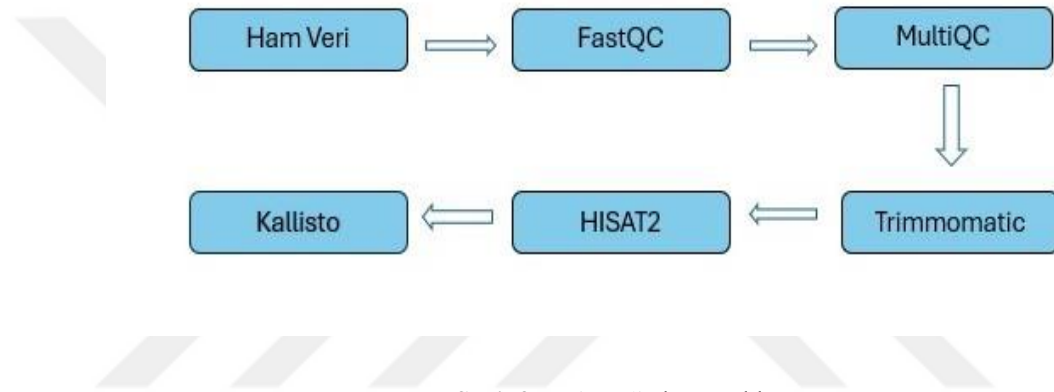
Kısa okuma teknolojisi kullanılarak üretilen kısa fragmentlerin bir araya getirilmesi ve anlamlandırılması gerekmektedir. Bu kısa fragmentlerin bir araya getirilip anlamlı şekilde birleştirilmesine hizalama ya da assembly adı verilir. HISAT2 programı kullanılarak trimlenen veri referans genoma hizalanmaktadır. RNA-seq verilerinin hizalanması ile transkript ekleme bölgeleri tespit edilmektedir. Yeni ekleme bölgeleri, transkripsiyon başlatma bölgeleri ve transkripsiyon sonlandırma bölgeleri bu şekilde bulunmaktadır. Ayrıca, tüm ekson ve intron sınırları da dahil olmak üzere bilinen genlerin konumunu belirten gen açıklamaları da sağlamaktadır (Pertea ve ark., 2016; Yalamanchili ve ark., 2017).

Ökaryotik canlılarda bulunan intronlar, HISAT gibi boşluk temelli hizalama çalışan algoritmaların sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır (Kim ve ark., 2015). Yürütülen çalışmada HISAT2 tercih edilme sebebi budur. BAM (Binary Alignment Map) formatında çıktılar vermektedir (Yalamanchili ve ark., 2017).

Okumalar bir referans genoma karşı haritalanarak genomik konumları belirlemektedir. Bu haritalama bilgisi, her bir gene karşılık gelen okumaların alt kümelerini toplanmasına ve daha sonra bu okumalar tarafından temsil edilen transkriptlerin bir araya getirilip ölçülmesine olanak tanımaktadır (Pertea ve ark., 2016).

HISAT hizalama için iki tür indeks kullanılmaktadır: Burrows Wheeler dönüşümüne ve Ferragina-Manzini (FM) indeksine dayalı bir indeksleme şeması kullanılmaktadır. Her hizalamayı sabitlemek için tam genomlu bir FM indeksi ve bunların çok hızlı bir şekilde genişletilmesi için çok sayıda lokal FM indeksi kullanılmaktadır. Çok sayıda indeks kullanmasına rağmen daha az bilgisayar belleğine ihtiyaç duymaktadır (Kim ve ark., 2015; Pertea ve ark., 2016. Kim ve ark., 2015).

Hız ve doğruluk açısından karşılaştırıldığında HISAT algoritmasının STAR, GSNAP, OLego ve TopHat2 algoritmalarından daha iyi olduğu tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2015).



Şekil 3. Veri analiz basamakları

2.4.3. Sayma

Haritalanan veri sonucunun sayılması gerekmektedir. İfade seviyesi değişen genler nelerdir öğrenilmesi için çeşitli programlar kullanılmaktadır. DEG analizlerinde sayma için kullanılan algoritmalar okumaların bir referans genomla eşleştirilmesine, okumalara genomla pozisyonların atanmasına ve örtüşen okumaların sayısının sayılmasını temeline dayanmaktadır.

2.4.3.1. StringTie

StringTie, HISAT2 programı çıktısı için kullanılan sayma algoritmalarından birisidir. Uzun okumaları veya kısa okumaları bir araya getirebilen referans temelli bir transkriptom birleştirici araç olarak kullanılmaktadır (Kovaka ve ark., 2019; Shumate ve ark., 2022). Hizalamaları tam ve kısmi transkriptler halinde bir araya getirerek gerektiği

şekilde birden fazla izoform oluşturmaktadır. Okumaları farklı gen lokusları halinde gruplandırmaktadır. Ardından her bir lokusu, verileri açıklamak için gereken sayıda izoform halinde birleştirmektedir. StringTie, en yüksek düzeyde ifade edilen transkriptle başlayan ve aynı anda birleştirip niceliğini belirleyen bir ağ akış algoritması kullanmaktadır. Daha sonra transkriptle ilişkili okumaları kaldırmaktadır. Tüm okumalar kullanılıncaya kadar veya kalan okuma sayısı transkripsiyonel gürültü seviyesinin altına düşene kadar daha fazla izoform toplayarak işlemi tekrarlanmaktadır (Pertea ve ark., 2016).

Tüm genlerin ve transkriptlerin ekspresyon seviyelerini tahmin etmektedir (Pertea ve ark., 2016). Her bir transkript için atanan hizalanmış okumaların sayısına göre transkript bolluğunu tahmin etmektedir. Bolluk hesaplanırken aynı zamanda ekzon-intron yapısı da hesaplanmaktadır (Pertea ve ark., 2016). Avantajlı özellikleri doğruluğu ve hassasiyetinin yüksek olmasıdır. Aynı zamanda hızlıdır ve bellek ihtiyacı düşüktür (Kovaka ve ark., 2019).

Stingtie Merge programı kullanılarak StringTie programı sonucu elde edilen verileri birleştirmektedir. (Pertea ve ark., 2016).

2.4.3.2.Kallisto

Haritalama sonucunun sayılması amacı ile kullanılan bir diğer program Kallisto programıdır. Bu programın çalışma prensibi StringTie programından farklıdır. Kallisto, k-mer bolluğuna dayalı izoformları tahmin etmek için kullanılmaktadır (He ve ark., 2013).

Kallisto, haritalanan verinin içindeki konumunu tanımlamak yerine, her okuma için orijinal transkripti potansiyel olarak tanımlamayı amaçlamaktadır. Tüm genom yerine transkriptom dizisiyle pseudo- hizalama kullanmaktadır. Analizi başlatmadan önceki ilk adım, belirli bir transkriptomun k-merlerinden de Bruijin grafiği (DBG) olan bir indeks oluşturmaktır. Bu yöntemde büyük hacimli kısa okumalar için uygun k-merler ile grafikler oluşturulmaktadır. Grafikteki düğümler (node) bir k-mer'e karşılık gelmektedir. Transkriptlerin bilgilerini bir renk bazında tutmaktadır ve aynı renkteki çizgisel uzantılar bitişik veya transkriptlerdir. Grafik oluşturulduktan sonra araç, her k-mer için eşlemeyi, karşılık gelen kaynak transkriptlerdeki konumuyla birlikte saklamaktadır. Kallisto daha sonra okumaları k-merlere ayırıştırmakta ve DBG' de her k-mer için uyumluluk sınıfları üreten bir yol bulmaktadır. Transkript bolluğu kallisto

tarafından milyon birim başına transkript (TPM) olarak çıkarılmaktadır (Bray ve ark., 2016). K-merler okumanın kendisinden daha fazla transkriptle hizalanabilmektedir. Bu sorun önemli miktarda doğruluk kaybına neden olabilmektedir (Bray ve ark., 2016). Referans transkriptomuna göre okumaları ölçmek için kallisto quant programı kullanılmaktadır (Yalamanchili ve ark., 2017).

Kallisto gibi pseudo-hizalama temelli çalışan programlar yeni gen ve izoformları tespit etmekte yetersiz kalmaktadır. Düşük bolluk ve küçük RNA'ların miktarının belirlenmesinde daha düşük performans göstermektedir (Wu ve ark., 2018). Fakat kullanım kolaylığı ve hızları nedeniyle tercih sebebi olmaktadır. Bu durumlar veri analizi yapmadan önce dikkate alınmalıdır (Kovaka ve ark., 2019).

2.4.4. DESeq

Sayma aşamasının devamında örneklerin arasında hangi transkriptin farklı şekilde ifade edildiğini belirlemek için DESeq gibi istatistiksel yöntemlerle çalışan programlar kullanılmaktadır (Pertea ve ark., 2016).

Aynı zamanda FPKM (Haritalanmış Milyon Bazda Parça Sayısı) değerine göre analiz yapmaktadır.

FPKM değeri:

$FPKM = (106 \times C) / (NL/103)$ formülü kullanılarak hesaplanmaktadır.

C: Referans genomuyla eşleşen parçaların sayısı,

N: Tüm genlerle eşleşen parçaların sayısı,

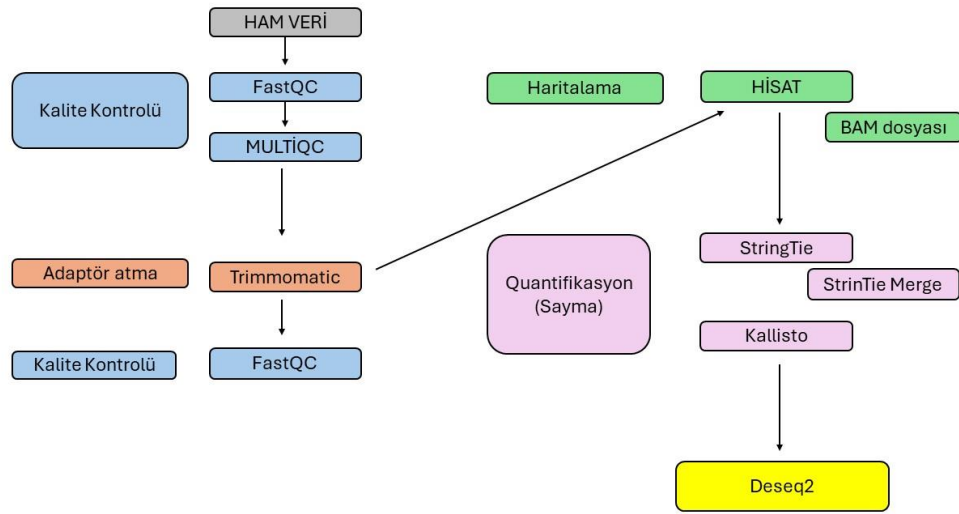
L: Hedef genin baz numarası,

FPKM değeri, mevcut tüm genlerin ekspresyon seviyesinin hesaplanmasını sağlamaktadır.

Örneklerin kendi koşullarına göre kümelenip kümelenmediğini görselleştirmek için PCA grafiği ve korelasyon ısı haritasını kullanılmaktadır. Elde edilen sonuçlar örnekler arasındaki temel ortalamaları, log₂ kat değişikliklerini, standart hataları, test istatistiklerini, p değerlerini ve düzeltilmiş p değerlerini içermektedir (Yalamanchili ve ark., 2017). DESeq2 programı, her bir genin hareket miktarını yönlendirmek için Bayes teoremini kullanmaktadır (Love ve ark., 2014).

Görselleştirmekte ayırt edici olan log₂FoldChange değeri, ifadedeki farkın büyüklüğünü tanımlamaktadır. İki koşuldan biri temel alınarak diğerinin ifadesindeki değişiklik hesaplanmaktadır. Pozitif bir log₂FoldChange değeri, karşılaştırma için temel

olarak kabul edilen koşula göre ekspresyonun arttığını, negatif bir değer ise ekspresyonun azaldığını göstermektedir (Raghavan ve ark., 2022).



Şekil 4. Referans temelli transkriptom analizinde kullanılan araçlar

2.4.5. BLAST

Fonksiyonel anotasyon, temel olarak bir sekansın benzerini tanımladıktan sonra bir genle ilişkilendirilen fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi sürecini içerir, bu da BLAST gibi araçlarla gerçekleştirilebilir. BLAST gibi homoloji tabanlı yöntemler genom anotasyonunda merkezi bir rol oynamaktadır (Mathé ve ark., 2002). Homoloji tabanlı yöntemler DNA, RNA veya protein sekans verilerinin hizalanmasına dayanmaktadır. Bu veriler biyolojik veri tabanlarından kolayca elde edilebilmektedir. Nükleotid ve proteinlerin sekansları ve yapılarına GenBank (Garg ve ark., 2019), European Nucleotide Archive (ENA) (Brooksbank ve ark., 2014), National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Geer ve ark., 2010) gibi kamuya açık veri tabanlarından ulaşılmaktadır.

2.4.6. Gen ontolojisi (GO)

Protein ve RNA gibi gen ürünleri, biyolojik kavramların kapsamlı olarak anlaşılabilmesi için tutarlı bir şekilde tanımlanmalıdır. Diferansiyel olarak eksprese

edildiği tespit edilen bu genlerin fonksiyonel anotasyonları yapılmalıdır. Böylece veri daha anlamlı hale gelmektedir (Harris ve ark., 2004). GO konsorsiyumu bu ihtiyacı karşılamak için *Drosophila Melanogaster*, *Mus musculus* ve *Saccharomyces cerevisiae* olmak üzere üç model organizmanın genom çalışmalarına odaklanarak, 1998 yılında gen ontoloji bilgi tabanı oluşturulmuştur. Günümüzde de geliştirilmeye devam etmektedir. Gen ontoloji analizleri, gen ve gen ürünlerinin bir organizma içinde veya organizmalar arasında en kapsayıcı sınıflandırılmasını ve tanımlanmasını sağlamaktadır (Ye ve ark., 2018).

GO gen fonksiyonu için üç ana başlıkta incelemektedir: genin kullanım fonksiyonunu belirten biyolojik proses (BP), bir gen ürününün moleküler seviyede aktivitesini belirten moleküler fonksiyon (MF), gen ürününün lokasyonunu bildiren hücresel bileşen (CC) olarak ayrılmıştır (Du Plessis ve ark., 2011; Harris ve ark., 2004).




Günümüzde gen ontoloji standartlarını geliştirmekte ve sürdürmekte, bunun için araçlar üretme çabasıdadır (Blake ve ark., 2015; Ye ve ark., 2018).

2.4.7. KEGG yolak analizi

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa ve Goto, 2000) veri tabanı 1995 yılında geliştirilmiştir. İçerisinde çeşitli veri tabanları bulunmaktadır (Şekil 5.). GENES ve PATHWAY veri tabanlarında bulunan fonksiyonel bilgi ile çalışılan veri arasında bağlantılar kurulmaktadır (Şekil 5). Genlerin ve proteinlerin moleküler fonksiyonları ortolog gruplarla ilişkilendirilmektedir. Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade edilen genlerle hangi metabolik yolların ilişkili olduğunu, hangi yolları kullandığını belirlemek amacı ile bu analiz yapılmaktadır. Bu sayede moleküler düzeyde işlevsel olarak genomu daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır (Kanehisa ve ark., 2016).

Her bir GO ID'de gen numarasının bulunması için zenginleştirme analizi (enrichment analysis) ve gen ekspresyon analizi ile birlikte DAG yapısı oluşturulup sıralanması gerekmektedir (Ye ve ark., 2018). Zenginleştirme analizinin amacı, hangi GO terimlerinin fazla veya az temsil edildiğini bulmak için gen setinin ek açıklamalarını kullanmaktır. Bir gen veya protein listesinin, belirli bir biyolojik süreç, fonksiyonel kategori veya yola göre anlamlı bir şekilde zenginleştirilip zenginleştirilmediğini değerlendirmek için kullanılan bir istatistiksel yöntemdir. Bu analiz, transkriptomik veri setlerinin biyolojik anlamlarını anlamak için yaygın olarak kullanılır. DAVID,

agriGO2.0, BiNGO, g:Profiler, Gorilla gibi bazı araçlar bu analizi yapmaktadır (Peng ve ark., 2019; Ye ve ark., 2018).

Category	Database	Content	Color
Systems information	KEGG PATHWAY	KEGG pathway maps	
	KEGG BRITE	BRITE hierarchies and tables	
	KEGG MODULE	KEGG modules and reaction modules	
Genomic information	KEGG ORTHOLOGY (KO)	Functional orthologs	
	KEGG GENES	Genes and proteins	
	KEGG GENOME	KEGG organisms and viruses	
Chemical information	KEGG COMPOUND	Metabolites and other chemical substances	
	KEGG GLYCAN	Glycans	
	KEGG REACTION	Biochemical reactions	
	KEGG RCLASS	Reaction class	
	KEGG ENZYME	Enzyme nomenclature	
Health information	KEGG NETWORK	Disease-related network variations	
	KEGG VARIANT	Human gene variants	
	KEGG DISEASE	Human diseases	
	KEGG DRUG	Drugs	
	KEGG DGROUP	Drug groups	

Şekil 5. KEGG bulunan 16 veritabanı gösterilmiştir (<https://www.genome.jp/kegg/kegg1a.html>)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kavun Bitkisinin Yetiştirilmesi, Stres Uygulaması ve Total RNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan kavun genotipi Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümünden temin edilmiş olup kavun genotipinin farklı abiyotik stres koşullarına tolerant olduğu bildirilmiştir. Kavun örnekleri çimlendikten sonra, büyütme kabininde 30 °C gün, 20 °C gece sıcaklığında 12 saatlik ışıklanma periyodunda %60 nem koşullarında büyütülmüş olup, gerçek üç yaprak aşamasında stres grubu bitkilere 45 °C gün, 35 °C gece sıcaklığında 12 saatlik ışıklanma koşullarında sıcaklık stresi üç gün uygulanmış ve stres uygulanan örneklerden ve kontrol grubu kavun örneklerinden, üç biyolojik tekerrür ve iki teknik tekrar olacak biçimde örnekler toplanmış ve ivedilikle RNA izolasyonuna geçilmiştir. RNA izolasyonu Quick-RNA Plant Miniprep kiti ile yapılmıştır. Protokol aşağıda verilmiştir.

İzolasyon Tampon Hazırlığı

1. RNA Wash Buffer (konsantre) içerisine, kullanım için hazırlık yaparken 96 ml %100 etanol (veya 104 ml %95 etanol) eklenmiş. Daha sonra
 - (Oda sıcaklığında tüm adımları gerçekleştirin ve 10,000-16,000 x g kuvvetle 30 saniye boyunca santrifüj yapılmıştır.)
2. 150 mg'a kadar kavun yaprak dokusunu ZR BashingBead Lysis Tubene aktarılmış ve üzerine 800 µl RNA Lysis Buffer eklenmiştir..
3. Örnekler parçalanmıştır.
4. Doku kalıntılarını ayırmak için tüpü 1 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Elde edilen berrak üst sıvıyı (supernatant) bir Zymo-Spin™ IICG türüne aktarılmıştır ve santrifüj yapılmıştır.
6. Akışkana hacmi kadar %95-100 etanol eklenmiş.
7. Karışımı bir Zymo-Spin™ IICR Sütunu santrifüj yapılmış. Bu sefer, akışkan kısmı atılmıştır.
8. RNA Prep Buffer 400 µl filtreye eklenmiş ve santrifüj yapılmıştır.
9. RNA Wash Buffer 700 µl filtreye eklenmiş ve santrifüj yapılmıştır.
10. Tekrar 400 µl RNA Wash Buffer eklenmiş ve sütunu 1 dakika santrifüj yaparak kalan tamponları tamamen temizlenmiştir. Ardından sütunu nükleaz içermeyen bir tüpe aktarılmıştır.

11. Kolon matriksine doğrudan 50 µl DNase/RNase Free Water eklenmiş ve santrifüj yapılarak işlem tamamlanmıştır.

3.2. RNA Kalite Ölçümü

İzolasyonun kalitesi RIN değerine bakılarak belirlenmiştir. RNA'ların kalitesi Agilent 2100 Bioanalyzer yardımıyla ölçülmüş örneklerin RIN değerleri 6-8 arasında olduğu tespit edilmiş olup bu değerler RNA-Seq analizleri için uygun olduğu tespit edilmiştir. RNA-Seq çalışmaları için örnekler yurtdışından sekanslama hizmeti alınmak üzere gönderilmiş ham sekans verileri tez kapsamında analiz edilmiştir.

3.3. RNA Sekanslama Analizi

RNA-Seq hizmeti BMK-gene firmasından alınmıştır. Total RNA örnekleri illumina kısa okuma platformu ile çift yönden sekanslanmıştır. Total RNA örneklerinden rRNA firma tarafında uzaklaştırılmış daha sonra boyut seleksiyonu gerçekleştirilerek mRNA'ların spesifik fragment aralıklarına sahip olabilmesi için fragmentasyona tabi tutulmuştur. Fragmentasyon prosesi ile elde edilen mRNA fragmanları, cDNA kütüphanelerini oluşturmak için kullanılmıştır. Sekanslama sonucunda 150 baz çifti büyüklüğünde okumalar elde edilmiştir

3.4. Biyoinformatik Analiz

Biyoinformatik araçlarla ilerleyen analizlerin gerçekleştirilebilmesi için Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>) platformu kullanılmıştır. Ham veriler fastasanger.gz formatındadır. Veri sıkıştırılmış halde olduğu için Convert compressed file to uncompressed v1.0 programı kullanılarak açık hale getirilmiştir. FASTQ splitter programı (Blankenberg ve ark., 2010) v1.1.5 kullanılarak veri forward reverse olarak ayrılmıştır. Böylece 3 kontrol, 4 deney grubu analize hazır hale getirilmiştir.

3.5. Dizilerin Filtrelenmesi

Dizileme sonrası kalite kontrolünün yapılması için FastQC (Andrews ve Simon., 2010) v0.74 programı kullanılmıştır. Tüm ham veriler filtrelenmiş ve çeşitli raporlar elde

edilmiştir. Ham veri trimlenmiş halde olduğu için trimleme programlarına ihtiyaç duyulmamıştır.

3.6. Referans Genoma Haritalanması

Elde edilen temiz okumalar kavun (*Cucumis melo*) genomuyla eşlenmiştir. NCBI veri tabanı kullanılarak kavunun genom bilgisine erişim sağlanmıştır. Sekansı genoma haritalamak için HISAT (Kim ve ark., 2015) v2.2.1 programı kullanılmıştır. BAM formatında çıktılar vermiştir.

3.7. Gen Ekspresyon Analizi

Referans genomuna eşlenen temiz okumaların gen ekspresyon düzeyini belirlemek için Kallisto quant (Bray ve ark., 2016) v0.48.0 programı kullanılmıştır. Program ile RNA-Seq verilerinde bulunan genlerin ekspresyon seviyeleri, sekans bolluğu ve izoform genlerin ekspresyon seviyeleri hesaplanmıştır. Bu program okumaların hedeflerle uyumluluğunu hızlı bir şekilde belirlemek için pseudo- hizalama temeline dayanarak çalışmaktadır. Kullanılan paket program ile numuneler arasındaki korelasyonun belirlenmiştir.

3.8. Diferansiyel Eksprese Genlerin (DEG) Tanımlanması

Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade edilen genlerin belirlenmesi ve bu genlerin ifade düzeyinin analiz edilmesi amacıyla DESeq2 (Love ve ark., 2014) v2.11.40.8 programı kullanılmıştır. Bu program ile tüm örneklere ait genlerin ifade düzeyi, örnekler arasındaki ifade düzeylerindeki farklılıklar ve izoform gen ifade düzeylerindeki farklılıklar hesaplanmıştır.

Annotate DESeq2\DEXSeq output tables v1.1.0 kullanılarak DESeq2 çıktıları işlenebilir hale getirilmiştir. Sort v.1.2.0 programı kullanılarak genler log2FC değerine göre artandan azalana göre sıralandırılmıştır. Ekspresyonu değişen genlerin log2FC değeri 3 üstü ve -3 altında bulunan sonuçlardan ayrı dosya oluşturulmuştur.

Ekspresyonu negatif ve pozitif yönde değiştiği tespit edilen genlerin ID alınmıştır. *Cucumis melo* protein sekansı ile karşılaştırılarak bu genlere karşılık gelen protein sekanslarından oluşan FASTA formatında dosya oluşturulmuştur. Bu şekilde artan ve

azalan genlerin ID yardımı ile protein sekanslarından oluşan iki adet FASTA dosya oluşturulmuştur.

3.9. Veri Tabanı Oluşturma

NCBI veri tabanından Cucumis melo ait FASTA formatında bulunan tüm protein dizisi indirilmiştir. Galaxy platformunda bulunan NCBI BLAST+makeblastdb (Cock ve ark., 2015) v2.14.1 programı kullanılarak veri tabanı oluşturulmuştur. NCBI BLAST+blastp (Camacho ve ark., 2009) v2.14.1 programı kullanılarak artan, azalan genlerin bir önceki aşamada hazırlanan FASTA formatındaki dosyaları kullanarak ayrı ayrı blast yapılmıştır.

Artan ve azalan genlerin blast sonuçları ayrı ayrı her bir gen için e değeri sıfıra en yakın olan sonuç seçilerek filtrelenmiştir. Bu sonuçlar OmicBox platformunda GO ve KEGG analizine tabi tutulmuştur.

3.10. Gen Ontoloji Analizi

Kütüphaneler arasında farklı düzeylerde ifade edilen genlerin yer aldığı biyolojik süreç, hücresel bileşen ve moleküler fonksiyon hakkında bilgi edinmek amacıyla gen ontoloji analizleri yapılmıştır. Analiz sonucunda farklı ifade düzeyine sahip genler fonksiyonlarına göre gruplandırılmıştır. KOBAS 2.0 (Xie ve ark., 2011) programı kullanılmıştır

3.11. Genlerin Metabolik Yol Analizi (KEGG analizi)

Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade edilen genlerle hangi metabolik yolların ilişkili olduğunu belirlemek için KOBAS 2.0 (Xie ve ark., 2011) programı kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bir bitkinin abiyotik strese karşı verdiği yanıtın araştırılması ve veri analizinin gerçekleştirilmesi bilimsel açıdan oldukça önemlidir. Kavun bitkisinin sıcaklık stresine karşı verdiği cevabın transkriptom analizi ilk kez bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, sıcaklık stresine karşı kavun bitkisinin transkriptomik cevabını incelemek amacıyla yapılmıştır ve toplamda 7 kavun örneği kullanılmıştır. Çalışmada stres ve kontrol grup olmak üzere iki örnek grubu; 3 kontrol ve 4 deney grubu oluşturulmuştur.

Ham RNA-seq verileri Galaxy biyoinformatik platformu içerisinde bulunan araçlar kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda sıcaklık stresine cevapta görev alan genler setleri belirlenmiştir.

4.1. Dizin Değerlendirilmesi

Ham veri büyüklükleri ortalama 4 ila 6 Gb arasında değişkenlik göstermiştir. Ham veri trimlenmiş halde gelmiştir. Trimlenme aşamasının gerçekleştiğinden emin olmak ve diğer kalite kontrol şartlarını incelemek amacı ile FastQC aracı kullanılmıştır.

Çizelge 4. FastQC aracı kalite sonuçları

Örnek adı	Okuma uzunluğu	Q30	% GC
C1	150	%95,2	46
C2	150	%92,4	45
C3	150	%90,6	44
T1	150	%91,4	46
T2	150	%97,2	45
T3	150	%93,9	45
T4	150	%96,2	44

FASTQC yapılan kalite kontrolü sonuçlarında verinin analiz için yeterli düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Kalite kontrolü yapıldıktan sonra veriler HISAT2 programı kullanılarak haritalanmıştır. Programın kendi veri tabanında bulunan kavun referans genomu ile çalışmada elde edilen veri karşılaştırılmıştır. Haritalama sonucunda BAM formatında bir çıktı elde edilmiştir. Haritalanan okuma miktarı %88-92 arasında bulunmuştur. Kallisto

quant programı kullanılarak haritalanan veri saydırılmıştır. Sayma işlemi sonucunda 36.030 gen modeli tespit edilmiştir.

4.2. Diferansiyel İfade Analizi Sonuçları

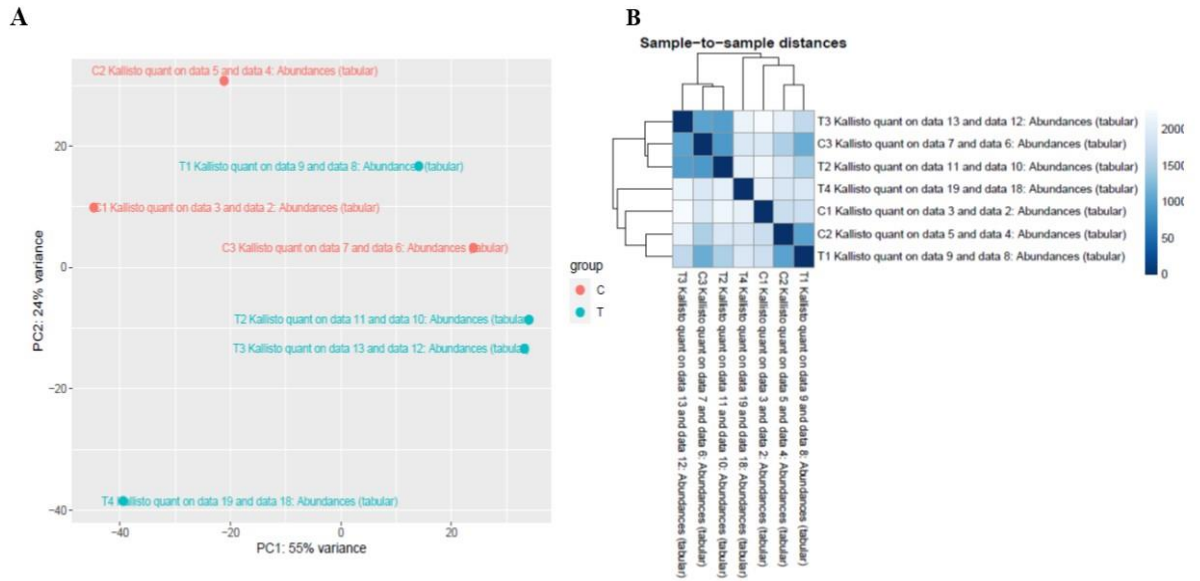
Kontrol ve deney grupları arasındaki diferansiyel olarak ifade edilen genleri tespit etmek için Deseq2 aracı kullanılmış, karşılaştırma sonuçları ve tespit edilen genlere ait DE_result dosyasındaki veriler Çizelge 5 ve Çizelge 6'da tablo olarak gösterilmiştir. Bu veriler her bir gene özel olarak logaritmik kat değişikliği (\log_2FC), P-Değeri, standart hata gibi istatistiksel değerleri de barındırmaktadır.

Çizelge 5. Deseq2 programı ifadesi artan yönde olan genler

Gene ID	Base mean	$\log_2(FC)$	StdErr	Wald-Stats
MELO3C023903	151.648269033204	10.0313053559294	2.61557032170886	3.83522678502312
MELO3C025027	43.5825272100692	9.44438873067349	3.67978946145651	2.56655681788253
MELO3C000260	43.5663073672402	8.95492435799467	3.6797721009648	2.43355406592891
MELO3C026657	15.8895559438334	7.98083422131473	3.68285264392282	2.16702512778624
MELO3C001488	93.9277595641271	7.8565371571041	3.57258072474035	2.1991209611296
MELO3C005540	154.077599122871	7.74781817567762	1.94420317614144	3.98508667754279
MELO3C021987	24.6011462198226	7.4890380323263	2.14105787814818	3.49782138482106
MELO3C001496	9.19528169026819	7.21863548354555	1.54516587224836	4.67175441368102
MELO3C000991	9.14584072134254	7.20788449811115	2.4045837139447	2.99756022479529
MELO3C018536	70.2045846561329	7.19285962531953	3.21020762266684	2.24062131512358
MELO3C011620	84.4361463413534	7.1805788124386	2.05976549338353	3.48611472301307
MELO3C021150	33.7658268576957	6.92185691208057	2.13320173460427	3.24482059047483
MELO3C000668	47.088713950514	6.8043857271718	1.94197507768515	3.50384812110086
MELO3C000941	6.31698327559943	6.68782303616257	1.98371901892814	3.37135600977209

Çizelge 6. Deseq2 programı ifadesi azalan yönde olan genler

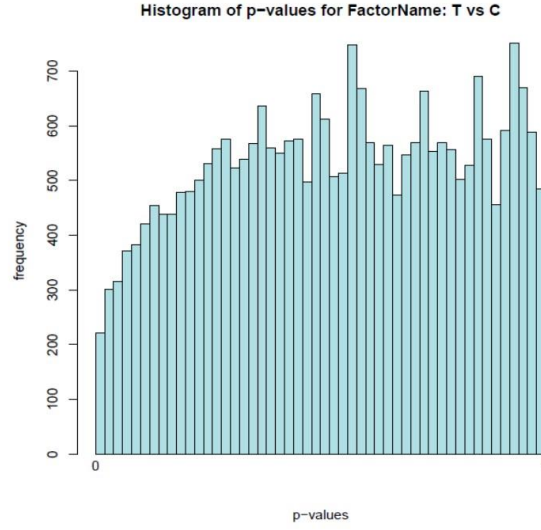
Gene ID	Base mean	$\log_2(FC)$	StdErr	Wald-Stats
MELO3C015515	249.325909345295	-8.02166716346078	1.61811725041138	-4.95740785250351
MELO3C010312	224.413856349688	-7.05427270030884	2.64155819901295	-2.67049679350042
MELO3C011610	48.5473644886192	-7.05175988491391	2.04662392719014	-3.44555723756999
MELO3C011302	10.5962054056828	-6.50664437896196	3.63309123790911	-1.79093888726742
MELO3C024163	351.662744234641	-6.0855829375367	1.73399580589658	-3.50957188987553
MELO3C024356	101.233795432442	-5.68513696326913	1.63213047856094	-3.48326131883878
MELO3C002128	105.59713483249	-5.64194873702209	1.75334975895094	-3.21781133981948
MELO3C002961	30.4321121720887	-5.63994188572304	1.89178068696968	-2.98128737890717
MELO3C000087	17.7876591917917	-5.63482031236721	1.68396025435618	-3.34617179817082
MELO3C026601	18.6360271853278	-5.58515469395068	3.48779472891379	-1.60134271883887
MELO3C018785	90.7969692946179	-5.58483241230799	1.87057006724802	-2.98563123087091
MELO3C024490	23.8562913704895	-5.55125643313693	1.70396805999113	-3.25784066232194
MELO3C019689	165.911129474842	-5.48995529055332	1.85361444683806	-2.96175685289797
MELO3C014160	31.3882549072936	-5.38296549673834	1.80396005754823	-2.98397155425622



Şekil 6. Deseq2 aracının iki boyutlu PCA analizini göstermektedir. PCA analizi, gen ekspresyon verilerinde varyansın en yüksek olduğu iki bileşen boyunca örnekleri konumlandırır (A). Grafikte, gen ekspresyonu profillerine dayalı olarak örnekler arasındaki mesafeleri görselleştirmektedir. Renk skalası, örnekler arasındaki benzerlik ve farklılıkları temsil eder; açık mavi tonlar örnekler arasındaki küçük mesafeleri (benzer gen ekspresyonu), koyu mavi tonlar ise büyük mesafeleri (farklı gen ekspresyonu) göstermektedir (B).

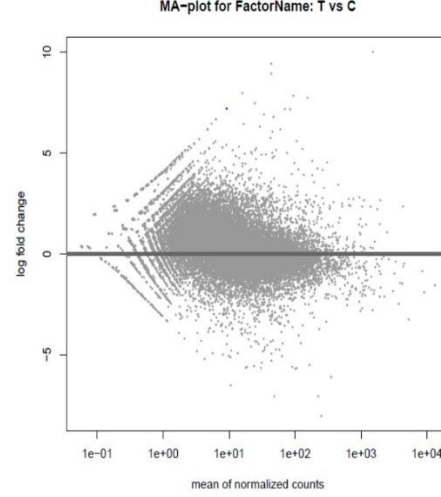
Şekil 6-A'da örneklerin birbirlerine olan benzerliklerini veya farklılıklarını görselleştirmiştir. PC1, varyansın %55'ini, PC2, varyansın %24'ünü açıklamaktadır. Bu iki bileşen toplamda veri setindeki varyansın %79'unu açıklamaktadır, yani gen ekspresyonundaki en önemli farklılıklar bu iki bileşenle yakalanmaktadır. Grafikte kırmızı noktalar kontrol grubunu (C), mavi noktalar ise sıcaklık stresine maruz kalan grubu (T) temsil etmektedir. Sıcaklık stresine maruz kalan örnekler (T) ve kontrol örnekleri (C) farklı kümeler halinde ayrılmıştır. Özellikle PC1 boyunca gruplar birbirinden belirgin şekilde ayrılmıştır. Bu, sıcaklık stresine maruz kalan örneklerin gen ekspresyon profillerinde kontrol grubuna göre önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir. T grubu örnekleri birbirine daha yakınken, C grubu örneklerinin daha dağınık olduğu görülmektedir. Bu stres uygulanan örneklerde gen ekspresyonun daha tutarlı olduğunu, kontrol grubunda ise daha fazla varyasyon olduğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak, PCA analizi, sıcaklık stresinin *Cucumis melo*'daki gen ekspresyonuna önemli bir etkisi olduğunu ve stres uygulanan örneklerin gen ekspresyon profillerinin kontrol grubuna göre oldukça farklılaştığını göstermektedir.

Şekil 6-B’de görüldüğü üzere, C1 ve C2 kontrol grubu örnekleri, gen ekspresyonu açısından birbirine yakın konumlanmıştır. Bu, aynı koşullarda yapılan tekrarların tutarlı olduğunu ve deneyin biyolojik tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Sıcaklık stresi uygulanan örnekler arasında T1 ve T2 de birbirine yakın kümelenmiştir. Bu durum, bu örneklerin benzer bir biyolojik tepki verdiğini göstermektedir. Ancak, T3 örneği diğer stres örneklerinden daha uzak bir konumda yer almış, bu durum örnekte daha farklı bir gen ekspresyonu yanıtı olduğuna işaret etmektedir. Stres altındaki bazı örnekler (T3 ve C3) gen ekspresyon profilleri açısından diğerlerinden uzaklaşmıştır, bu da farklı biyolojik tepkiler veya deneysel varyasyonların etkili olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, örneklerin gruplar arasında tutarlı bir şekilde kümelenmesi, deneysel tekrarlamaların başarılı olduğunu ve sıcaklık stresinin gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin örneklere göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır.



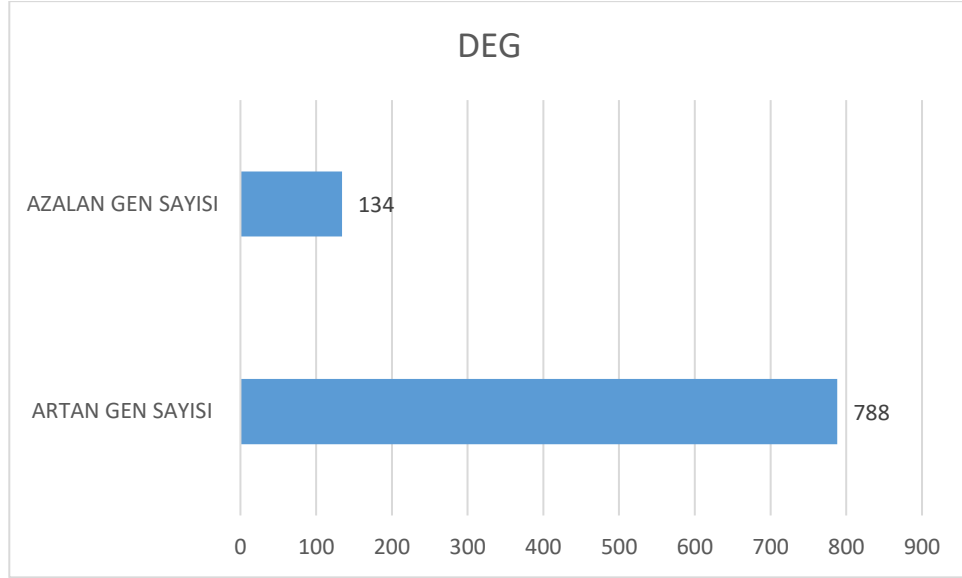
Şekil 7. Grafikte, T (sıcaklık stresi) ve C (kontrol) grupları arasında yapılan diferansiyel gen ekspresyonu analizinde elde edilen p-değerlerinin dağılımını göstermektedir.

Şekil 7’de gösterilen histogram, T (sıcaklık stresi) ve C (kontrol) grupları arasında diferansiyel ekspresyon gösteren genlerin sayısının p-değerine göre dağılımını temsil etmektedir. Grafikte p-değeri düşük olan (0’a yakın) genlerin varlığı, bu genlerin sıcaklık stresi altında farklılık gösterdiğini, potansiyel olarak anlamlı diferansiyel ekspresyon gösteren genlerin varlığını işaret etmekte ve daha detaylı analiz edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 8. Bu grafik, T (sıcaklık stresi) ve C (kontrol) grupları arasında diferansiyel gen ekspresyonunu göstermektedir. Her bir nokta bir geni temsil eder ve genlerin logaritmik katlanma değişimi (log fold change) ile normalize edilmiş ortalama gen sayıları karşılaştırılmıştır.

Şekil 8’de X eksenini normalize edilmiş ortalama gen sayılarını göstermektedir. Ayrıca her bir genin ortalama ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. Genler, düşükten yükseğe doğru normalize edilmiş gen sayıları ile sıralanmıştır. Y eksenini ise LogFC T ve C grupları arasındaki ekspresyon farklarını logaritmik ölçekte göstermektedir. Sıfıra yakın değerler iki grup arasında anlamlı değişim olmadığını göstermektedir. Pozitif değerler, genin sıcaklık stresi altında yukarı regüle olduğunu, yani T grubunda daha yüksek ekspresyon gösterdiğini belirtmektedir. Negatif değerler, genin sıcaklık stresi altında aşağı regüle olduğunu, yani T grubunda daha düşük ekspresyon gösterdiğini ifade etmektedir. Grafiğin üst tarafta yer alan noktalar, sıcaklık stresine maruz kaldığında yüksek ekspresyon gösteren genleri, alt tarafta yer alan noktalar ise, sıcaklık stresine maruz kaldığında düşük ekspresyon gösteren genleri temsil etmektedir. Bu genler, sıcaklık stresine yanıt olarak diferansiyel ekspresyon sergileyen potansiyel aday genler olarak değerlendirilmeye uygundur.



Şekil 9. Diferansiyel olarak ifade olan genlerin sayısı

Deseq2 programı sonucunda toplam 26.977 genin diferansiyel olarak ifade edildiği tespit edilmiştir. Tespit edilen 9.559 genin ekspresyonunun azaldığı, 17.418 genin ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Tanımlanan bu genler artan genler için $\log_2FC > 3$, azalan genler için $\log_2FC < -3$ ölçüleri arasında filtrelenmiştir. Filtrelemekte amaç gen ifade düzeyi en fazla değişen genlerin seçilerek çalışmanın doğruluğu arttırmaktır. Bunun sonucunda ifade düzeyi artan 788 gen, ifade düzeyi azalan 134 gen olduğu belirlenmiştir.

4.3. Veri Tabanı Oluşturma

NCBI veri tabanından kavuna ait tüm genom protein verisi FASTA formatında indirilmiştir. İndirilen dosya NCBI BLAST+makeblastdb kullanarak veri tabanı haline getirilmiş ve ifade seviyesi arttığı ve azaldığı tespit edilen genler ile ayrı ayrı NCBI BLAST+blastp yapılmıştır. BLAST sonucunda her gen için birden fazla izoform ataması yapıldığı için en iyi BLAST sonucunu e değeri sıfıra en yakın olan seçilerek belirlenmiştir.

Çizelge 7. MELO3C022507P1 geni blast sonucunda 11 adet izoform tespit edilmiştir. E değeri bakılarak kalın harflerle belirtilen sonucun en doğru sonuç olduğu gözlenmiştir. Belirlenen gen seçilerek analize devam edilmiştir.

GEN ID	E değeri	Tanım
MELO3C022507	0	XP_008460132.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 10
MELO3C022507	2.40E-94	XP_008462050.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 2
MELO3C022507	8.10E-94	XP_008463001.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 1
MELO3C022507	3.53E-47	XP_008466329.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 14
MELO3C022507	3.56E-43	XP_016902091.2 fasciclin-like arabinogalactan protein 4
MELO3C022507	1.06E-37	XP_008445580.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 14
MELO3C022507	3.03E-24	XP_008449190.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 1
MELO3C022507	2.8E-21	XP_008455511.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 7
MELO3C022507	8.79E-21	XP_016900740.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 11
MELO3C022507	5.85E-16	XP_008463798.2 fasciclin-like arabinogalactan protein 12
MELO3C022507	6.87E-16	XP_008455488.1 fasciclin-like arabinogalactan protein 6

Çizelge 8. İfade düzeyi azalan 50 gen ve tanımları verilmiştir

Gen ID	log ₂ (FC)	Tanımları
MELO3C015515	-8.02166716346078	XP_008453001.1 germin-like protein 5-1
MELO3C010312	-7.05427270030884	XP_008445235.1 pEARLI1-like lipid transfer protein 1
MELO3C011610	-7.05175988491391	XP_008461433.2 uncharacterized protein LOC103500030
MELO3C011302	-6.50664437896196	XP_008457708.2 mavicyanin-like
MELO3C024163	-6.0855829375367	XP_008462124.1 uncharacterized protein LOC103500553
MELO3C024356	-5.68513696326913	XP_008439536.1 germin-like protein 8-2
MELO3C002128	-5.64194873702209	XP_008463807.1 thaumatin-like protein
MELO3C002961	-5.63994188572304	XP_050945981.1 chlorophyllase-1-like
MELO3C000087	-5.63482031236721	XP_050938450.1 axial regulator YABBY 4-like
MELO3C026601	-5.58515469395068	XP_008466485.1 gibberellin-regulated protein 1-like
MELO3C018785	-5.58483241230799	NP_001284442.1 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22-like precursor
MELO3C024490	-5.55125643313693	XP_008448382.1 histone H2B
MELO3C019689	-5.48995529055332	XP_008456355.1 protodermal factor 1-like
MELO3C014160	-5.38296549673834	XP_050941710.1 glycine-rich protein 5-like
MELO3C015618	-5.2212264247775	XP_008460480.2 non-specific lipid transfer protein GPI-anchored 4-like
MELO3C012619	-5.19490862513045	XP_008447121.1 uncharacterized protein LOC103489644
MELO3C008666	-5.06029588132683	XP_008443761.1 GDSL esterase/lipase At5g33370
MELO3C012550	-5.03877922320615	XP_008447045.1 polyol transporter 5-like
MELO3C014104	-4.97836137448717	XP_016900598.2 arabinogalactan protein 1-like
MELO3C013686	-4.93214600947448	XP_008463901.1 histone H4
MELO3C021999	-4.90883157360629	XP_008459328.1 expansin-A5-like
MELO3C010393	-4.90835468042759	XP_008453433.2 uncharacterized protein LOC103494141
MELO3C015882	-4.81388529102925	XP_008461070.2 probable histone H2A variant 3
MELO3C026777	-4.81193755466088	XP_008464491.2 protein SIEVE ELEMENT OCCLUSION B-like isoform X2
MELO3C000583	-4.77674891213278	XP_008445689.1 histone H3.2
MELO3C022433	-4.74100289356654	XP_008463531.1 dirigent protein 10
MELO3C023527	-4.73511891263837	XP_008445689.1 histone H3.2
MELO3C014317	-4.72276360281481	XP_008457544.1 histone H2A
MELO3C024579	-4.65444826554171	XP_050945036.1 transcription factor E2FA-like isoform X1
MELO3C021147	-4.61264379233207	XP_008437113.1 pEARLI1-like lipid transfer protein 1
MELO3C023528	-4.584108100573	XP_008445689.1 histone H3.2
MELO3C014504	-4.50739197454077	XP_008449582.1 uncharacterized protein LOC103491422
MELO3C004822	-4.46695987478266	XP_008462137.2 fatty acyl-CoA reductase 3-like
MELO3C012724	-4.46002243297365	XP_008447695.1 putative lipid-transfer protein DIR1
MELO3C004227	-4.42008063027651	XP_008454292.1 probable histone H2A.5
MELO3C014618	-4.41533453529495	XP_008445689.1 histone H3.2
MELO3C024161	-4.34429640606934	XP_008462124.1 uncharacterized protein LOC103500553
MELO3C014573	-4.32229369129628	XP_050941830.1 SUMO-conjugating enzyme UBC9-like isoform X3
MELO3C000210	-4.2952798982637	XP_050937438.1 uncharacterized protein LOC103504439

MELO3C023962	-4.2761249650413	XP_016902753.2 DNA damage-repair/toleration protein DRT100-like
MELO3C006774	-4.21728497936419	XP_008457052.2 MLP-like protein 34
MELO3C023203	-4.19463055698761	XP_016898837.2 defensin J1-2-like
MELO3C020769	-4.1816045236935	XP_008448010.1 auxin-induced protein 15A-like
MELO3C015016	-4.0336655624893	XP_008465556.1 MLP-like protein 28
MELO3C013347	-4.0276405411161	NP_001380716.1 aquaporin PIP2-10
MELO3C018703	-3.99641555859532	XP_050935647.1 uncharacterized protein LOC103495689
MELO3C002863	-3.95954081023181	XP_008445767.1 patellin-4
MELO3C004868	-3.92036304912214	XP_008448382.1 histone H2B
MELO3C013953	-3.91981782684637	XP_008437110.1 pEARLI1-like lipid transfer protein 1
MELO3C011458	-3.90950349099833	XP_008445504.2 NCT transcriptional regulatory complex subunit A

Sıcaklık stresine maruz kalan kavun bitkisinde ekspresyon seviyesi azalan genlerin başında 8.02 kat azalışla “germin benzeri protein 5-1” gelmektedir. Devamında ise “pEARLI1 benzeri lipit transfer proteini 1” ekspresyonu 7.05 kat, “mavicyanin-benzeri” ekspresyonu 6.5 kat azaldığı tespit edilmiştir. Çok fazla sayıda genin ekspresyonu 5 kat seviyelerinde azalmıştır. Bu genler içerisinde en çok “germin-benzeri protein 8-2” ekspresyonu 5.68 kat, “thaumatin-benzeri protein” ekspresyonu 5.64 kat, “Eksenel düzenleyici YABBY 4-benzeri” ekspresyonu 5.63 kat, “giberellin düzenlemeli protein 1 benzeri” ekspresyonu 5.58 kat azalan genler dikkat çekmiştir.

Deseq2 programı sonucunda azalan yönde diferansiyel eksprese olan genlerin sayısı 134 olarak tespit edilmiştir. İfade seviyesi dikkat çeken bazı genler başka çalışmalarda da tespit edilmiştir. Yürütülen çalışmada “Germin benzeri protein 5.1” ekspresyon seviyesinin 8.2 kat ve “Germin benzeri protein 8.2” ekspresyon seviyesinin 5.6 kat sıcaklık stresinde ifadesinin düştüğü tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *Arabidopsis* bitkisine uygulanan su eksikliği, tuzluluk ve düşük sıcaklık stresine karşı “germin benzeri protein” ifade seviyesinin bu üç strese karşı düştüğünü bildirilmiştir (Bray ve ark., 2004). Yürütülen çalışmada “giberellin düzenlenmiş proteini 1 benzeri” ifade düzeyi 5.5 kat azaldığı tespit edilmiştir. Kısa ve uzun sünger kabakları (*Luffa cylindrica*) karşılaştırmalı transkriptom analizi sonucunda “giberellin düzenleme proteini 1 benzeri” ifadesinin, kısa sünger kabağında düştüğü bildirilmiştir (Qiao ve ark., 2022). Yürütülen çalışmada “ksiloglukan endotransglukozilaz” ekspresyon seviyesinin 5.5 kat azaldığı tespit edilmiştir. *Arabidopsis*’in kuraklık stresine cevabı incelenmiş ve “ksiloglukan endotransglukozilaz” hafif ve şiddetli kuraklık stresinde ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Clauw ve ark., 2015). Yine başka bir çalışmada *Arabidopsis*’e uygulanan su eksikliği, tuzluluk ve düşük sıcaklık stresine karşı “ksiloglukan

endotransglukozilaz” ifade seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir (Bray ve ark., 2004). Yürütülen çalışmada “Dirigent protein 10” ifade seviyesinin sıcaklık stresinde 4.7 kat azaldığı tespit edilmiştir. Şeker pancarı (*Beta vulgaris*) yapraklarının ve köklerinin tuz stresine verdiği tepkiler incelendiğinde ise “Dirigent protein 10” tuz stresi sonrasında köklerde ifade düzeyinin düştüğü tespit edilmiştir (Li ve ark., 2020). Yürütülen çalışmada “MLP benzeri protein 34” ifade seviyesinin sıcaklık stresinde 4.2 kat azaldığı tespit edilmiştir. Yer fıstığının yabani akrabası (*Arachis duranensis*) kuraklık stresi altında köklerde “MLP benzeri protein 34” ifade düzeyi 5.8 kat düştüğü bildirilmiştir (Carmo ve ark., 2019). Yürütülen çalışmada “defensin J1-2-benzeri” ifade seviyesinin sıcaklık stresinde 4.1 kat azaldığı tespit edilmiştir. “Dusa” avokado bitkisi hafif ve şiddetli su stresine maruz bırakıldığında her iki su stresi düzeyinde “defensin J1-2-benzeri” geninin ifade seviyesinin düştüğü gözlenmiştir. Hafif su stresinde 1.9 şiddetli su stresinde ise 2 kat bu geninin ifade seviyesinin düştüğü bildirilmiştir (Guillermo ve ark., 2021). Yürütülen çalışmada “oksin-indüklenen protein 15A benzeri” ifade seviyesinin sıcaklık stresinde 4.1 kat azaldığı tespit edilmiştir. *Quercus acutissima* ve *Quercus palustris* meşe türleri bir ay boyunca kuraklık stresine maruz bırakılmış son altı gün sulanmıştır. *Quercus palustris* türünün kontrol ve kuraklık stresine maruz kalmış gruplar karşılaştırıldığında “oksin-indüklenen protein 15A-like” ifade seviyesinin strese maruz kalanda düştüğü bildirilmiştir (Kim ve ark., 2024). Yürütülen çalışmada “MLP-benzeri protein 28” ifade seviyesinin sıcaklık stresinde 4 kat azaldığı tespit edilmiştir. *Reaumuria soongoricea* bitkisinin yaprağı tuz stresine maruz bırakılmıştır. RNA dizileme sonucunda “MLP-like protein 28” ifade düzeyinin 4 kat azaldığı bildirilmiştir (Liu ve ark., 2023). Yürütülen çalışmada “Patellin-4” ifade seviyesinin sıcaklık stresinde 3.9 kat azaldığı tespit edilmiştir. *Casuarina glauca* bitkisinin fotosentetik organlarının tuz stresinde transkriptom analizi yapılmıştır. Kontrol grubu ile 400 mM tuzla muamele edilmiş grup karşılaştırıldığında “Patellin-4” proteininin ifade düzeyinin 5.1 kat azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada “Histone H3.2” proteininin ifade seviyesinin de 3.9 kat azaldığı bildirilmiştir (Fernandes ve ark., 2022). Yürütülen çalışmada ise “Histone H3.2” ifade seviyesinin sıcaklık stresinde 4.73 kat azaldığı tespit edilmiştir.

Genel anlamda tespit edilen DEG genleri literatür incelendiğinde çeşitli abiyotik strese yanıt vermekte görev aldığı gözlenmiştir. Sonuçlar diğer çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermiştir.

Çizelge 9. İfade düzeyi artan 50 gen ve tanımları verilmiştir

GEN ID	log₂(FC)	Tanımı
MELO3C023903	10.0313053559294	XP_050946895.1 cucumisin-like
MELO3C025027	9.44438873067349	XP_008463082.1 uncharacterized protein LOC103501317
MELO3C000260	8.95492435799467	XP_050936066.1 agamous-like MADS-box protein MADS3 isoform X3
MELO3C026657	7.98083422131473	XP_016903549.2 uncharacterized protein LOC103503496
MELO3C001488	7.8565371571041	XP_050935291.1 ABC transporter B family member 25, mitochondrial
MELO3C005540	7.74781817567762	XP_008448867.1 14 kDa proline-rich protein DC2.15-like
MELO3C021987	7.4890380323263	XP_050938288.1 zinc-finger homeodomain protein 2 isoform X2
MELO3C018536	7.19285962531953	XP_008455064.2 pathogenesis-related protein PRB1-2
MELO3C011620	7.1805788124386	XP_008458115.1 seed lectin-like
MELO3C000668	6.8043857271718	XP_008455433.1 protein DETOXIFICATION 40-like
MELO3C014781	6.517028763.37648	XP_008449996.2 uncharacterized protein LOC103491712
MELO3C000757	6.47433771860717	XP_050946525.1 uncharacterized protein LOC127151151
MELO3C010391	6.46282144760294	XP_008444080.2 non-specific lipid-transfer protein 2-like
MELO3C013954	6.324161290555	XP_008437113.1 pEARLI1-like lipid transfer protcalciumein 1
MELO3C015284	6.18558844398625	XP_008450595.2 uncharacterized protein LOC103492137 isoform X2
MELO3C015405	6.18558844398625	XP_050937271.1 probable RNA-dependent RNA polymerase 3 isoform X2
MELO3C000631	6.18458663304463	XP_050944486.1 ABC transporter C family member 12-like isoform X2
MELO3C002691	6.07174839834683	XP_008443694.1 agamous-like MADS-box protein MADS1
MELO3C012987	5.76300503311599	XP_008458717.1 uncharacterized protein LOC103498040
MELO3C016650	5.70032037159323	XP_008452496.2 uncharacterized protein LOC103493512 isoform X1
MELO3C027158	5.60803406022795	XP_050940270.1 protein LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS 3-like
MELO3C019420	5.59496797474767	XP_008456036.1 DExH-box ATP-dependent RNA helicase DExH7, chloroplastic isoform X1
MELO3C001150	5.48388664930631	XP_008438869.1 protein SRG1
MELO3C018057	5.48388664930631	XP_050944057.1 protein PELPK1-like
MELO3C012973	5.4156473005909	XP_050940310.1 homeobox-leucine zipper protein GLABRA 2-like isoform X2
MELO3C023730	5.34682968356544	XP_008442271.1 uncharacterized protein LOC103486178
MELO3C027001	5.32493791350669	XP_008451048.1 cysteine proteinase inhibitor A-like
MELO3C012327	5.27743887275664	XP_008456626.2 nuclear pore complex protein NUP1-like
MELO3C000189	5.26418496050866	XP_050936922.1 cadmium/zinc-transporting ATPase HMA3-like
MELO3C018700	5.2540634559504	XP_008455273.2 UDP-glycosyltransferase 74F2-like
MELO3C002315	5.21555680890422	XP_016899955.2 cytochrome P450 71AP13-like
MELO3C002394	5.15815386146725	XP_008440273.3 receptor-like protein EIX2
MELO3C012765	5.15261644116214	XP_050941236.1 uncharacterized protein LOC127149515
MELO3C015655	5.14883989096514	XP_050947607.1 callose synthase 5-like
MELO3C003884	5.14854129909125	XP_008439876.1 uncharacterized protein LOC103484532

MELO3C010109	5.08890747911388	XP_050939376.1 LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC127148983
MELO3C018723	5.06962943395886	XP_008448236.2 protein LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS 10-like
MELO3C016771	5.02166416065558	XP_008452576.2 uncharacterized acetyltransferase At3g50280-like
MELO3C022636	4.98801709277234	XP_050937867.1 uncharacterized protein LOC103490375
MELO3C026300	4.98788445101369	XP_008464576.2 agamous-like MADS-box protein MADS2
MELO3C018699	4.9828644240583	XP_050938058.1 mogrosin synthase-like
MELO3C003992	4.94610678631614	XP_008437473.2 ABC transporter A family member 7-like isoform X1
MELO3C026184	4.92972357519842	XP_008464393.1 bidirectional sugar transporter SWEET10-like
MELO3C008196	4.86870441924881	XP_050942769.1 chloride channel protein CLC-c isoform X2
MELO3C004062	4.86062961586383	XP_008451945.3 (R)-mandelonitrile lyase 1-like
MELO3C025677	4.84615762612053	XP_008463796.2 probable 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase isoform X3
MELO3C007860	4.83536622101375	XP_008440760.2 AAA-ATPase At2g18193-like
MELO3C007952	4.82409922718498	XP_008466513.1 putative F-box protein At1g65770 isoform X2
MELO3C000906	4.82121981622114	XP_008454869.1 uncharacterized protein LOC103495178
MELO3C010259	4.81120862331869	XP_008443898.1 uncharacterized protein LOC103487380

Sıcaklık stresine maruz kalan kavun bitkisinde ekspresyon seviyesi artan genlerin başında 10 kat artış ile “cucumis-benzeri” gelmektedir. Devamında ise “agamous benzeri MADS-box proteini MADS3 izoformu X3” ekspresyonu 8.9 kat, “ABC taşıyıcı B ailesi üyesi 25, mitokondriyal” ekspresyonu 7.8 kat, “14 kDa prolin açısından zengin protein DC2.15 benzeri” ekspresyonu 7.7 kat, “çinko-parmak homeodomain protein 2 izoformu X2” ekspresyonu 7.4 kat, “Patogenezle ilişkili protein PRB1-2” ekspresyonu 7.1 kat, “tohum lektin benzeri” ekspresyonu 7.1 kat, “protein protein DETOKSİFİKASYON 40- benzeri” 6.8 kat azaldığı tespit edilmiştir.

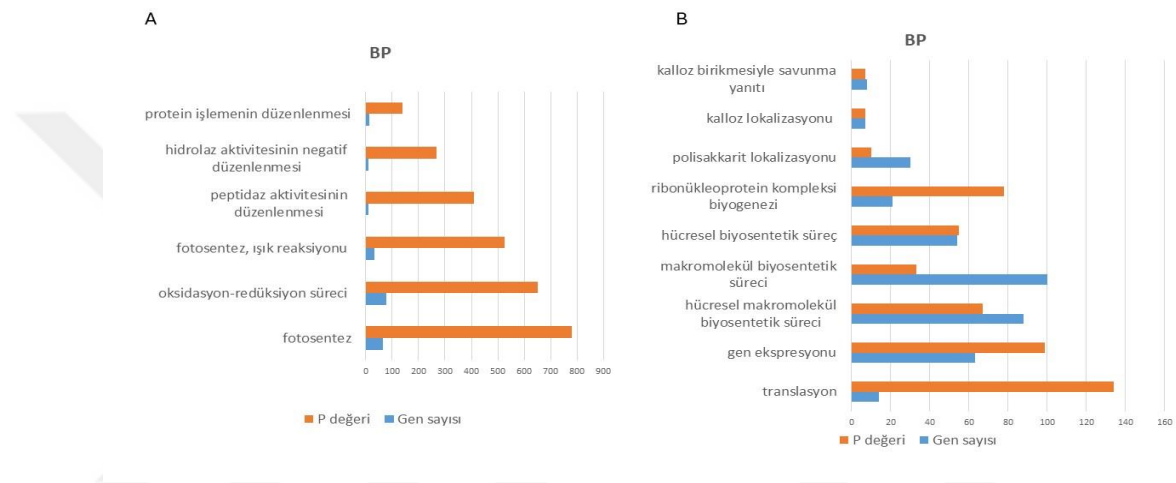
Deseq2 programı sonucunda artan yönde diferansiyel eksprese olan genlerin sayısı 788 olarak tespit edilmiştir. İfade seviyesi dikkat çeken bazı genler başka çalışmalarda da tespit edilmiştir. Yürütülen çalışmada 10 kat arttığı tespit edilen “cucumis-benzeri” proteini, hıyarda (*Cucumis sativus L.*) selenyum aracılı Cd stresine karşı toleransı incelenen çalışmada tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2016). “ABC taşıyıcı B ailesi üyesi 25, mitokondriyal (ABCB25)” proteini, ekspresyonu 7.8 kat arttığı tespit edilmiştir. Limonium türlerinde (*Plumbaginaceae*) ovül transkriptom analizi yapılan bir çalışmada bu proteinin ekspresyonu arttığı bildirilmiştir (Caperta ve ark., 2023). Başka bir çalışmada kanola (*Brassica napus*) bitkisinde Cd duyarlı ABC taşıyıcı genleri tanımlanmıştır. ABCB25 geninin ekspresyon seviyesinin Cd stresi altında arttığı tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2018). Meyan (*Glycyrrhiza glabra L.*) bitkisine uygulanan metil

jasmonat (MeJA) sonucunda ABCB25 geninin ekspresyonu arttığı bildirilmiştir (Devi ve ark., 2024). Yürütülen çalışmada “Çinko parmak homeodomain proteini 2 izoformu” ekspresyonu 7.4 kat artmıştır. Kavun meyvesinin gelişiminde rol alan transkripsiyon faktörlerinin diferansiyel ifadesi incelendiği çalışmada “Çinko parmak homeodomain protein 2 izoform” tespit edilmiştir (Nagashima ve ark., 2022). Kavun ile aynı ailede bulunan karpuzda kuraklık adaptasyonunda görevli aday genlerin belirlendiği çalışmada “Çinko parmak homeodomain protein 2 izoform” tespiti bildirilmiştir (Mahmoud ve ark., 2023). Yürütülen çalışmada “patojenle ilişkili protein PRB1-2” ifadesi 7.19 kat artmıştır. Kış kavunu türü olan Cheieh-Qua kavunu fusarik asit stresine maruz bırakılmıştır. Araştırma sonucunda “PRB1-2” proteinin ekspresyonunun 2.73 kat bildirilmiştir (Wang ve ark., 2021). Yürütülen çalışmada “SRG1” 5.4 kat artmıştır. Mercimek (*Lens culinaris Medikus*) fidesi kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. “SRG1” proteini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ifade seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Singh ve ark., 2017). Hıyarda yapılan çalışmada ise “SRG1” proteini tuz-alkali stresi altında, D1909 (tolerant) çeşitinde ifade seviyesinin 11 kat arttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2024). Yürütülen çalışmada MADS2 4.9 kat, MADS3 geni 8.9 kat arttığı tespit edilmiştir. Koyun otu çeşitli abiyotik streslere maruz bırakılmıştır. MADS2 geninin soğuk stresine karşı ifade seviyesi artmıştır. MADS3 geninin ise ABA uygulanmasında 12. saatte ve mannitol stresinde ise 4. saatte ifade seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Jia ve ark., 2018). Sert buğday yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. Sonu incelendiğinde MADS box ailesinin ifade seviyesi arttığı bildirilmiştir (Vicente ve ark., 2019). Yürütülen çalışmada 4.9 kat arttığı tespit edilmiştir. Şeker kamışı virüsüne enfeksiyonuna yanıtında mısır bitkisinin B73 (duyarlı) hattında “ABC taşıyıcı A aile üyesi 7-benzeri” geninin ifade seviyesinin 3.7 kat arttığı bildirilmiştir (Rodríguez-Gómez ve ark., 2022).

Genel anlamda tespit edilen DEG genleri literatür incelendiğinde çeşitli abiyotik strese yanıt vermekte görev aldığı gözlenmiştir. Sonuçlar diğer çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermiştir.

4.4. Gen Ontoloji Sonuçları

DEG'lerin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamak için gen ontolojisi (GO) ve Kyoto gen ve genom ansiklopedisi (KEGG) bazlı fonksiyonel zenginleştirme gerçekleştirilmiştir. Kavunda sıcaklık stresiyle ilgili GO terimleri Omibox kullanılarak tanımlanmıştır. GO atamalarına göre DEG'ler üç ana kategoriye ayrılmıştır. Bunlar; biyolojik proses, moleküler fonksiyon ve hücrenel bileşendir.

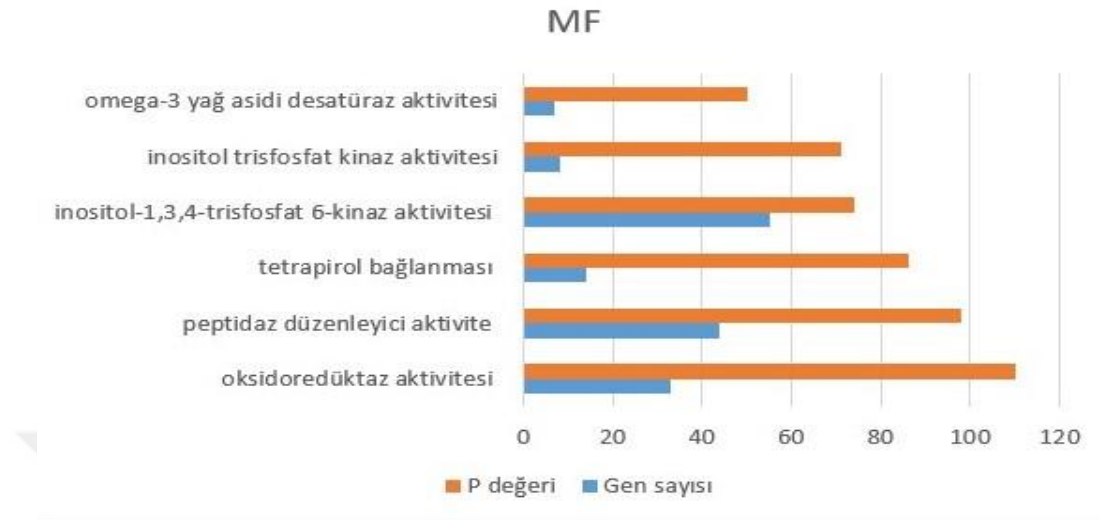


Şekil 10. Gen ontoloji analizinin biyolojik süreç (BP) sonuçları. Ekspresyonu pozitif yönde düzenlenen genlerin gen ontoloji sonuçları (A). Ekspresyonu negatif yönde düzenlenen genlerin gen ontoloji biyolojik proses sonuçları (B).

İfade seviyesi artan genlerin GO analizi yapılmış ve biyolojik proses (BP) alt başlıkları elde edilmiştir. GO sonucunda 6 alt başlık tespit edilmiştir. “Fotosentez” başlığında 66 gen, “oksidasyon redüksiyon işlemi” başlığında 77 gen, “fotosentez ışık reaksiyonu” başlığında 33 gen, “peptidaz aktivitesinin düzenlenmesi” başlığında 11 gen, “hidrolaz aktivitesinin negatif düzenlenmesi” başlığında 9 gen ve “protein işlemenin düzenlenmesi” başlığında 12 genin gruplandırıldığı bulunmuştur (Şekil 10.).

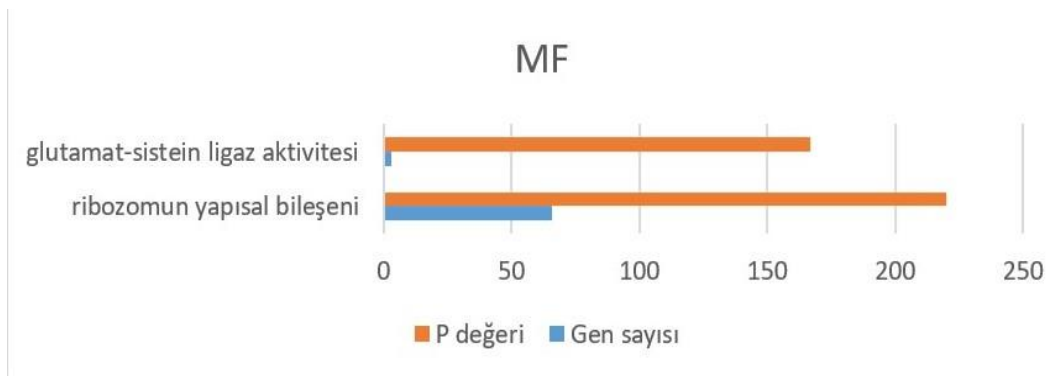
İfade seviyesi azalan genlerin GO analizi yapılmış ve biyolojik proses (BP) alt başlıkları elde edilmiştir. GO sonucunda 9 alt başlık tespit edilmiştir. “Translasyon” başlığında 14 gen, “gen ekspresyonu” başlığında 63 gen, “hücrenel makromolekül biyosentetik süreci” başlığında 88 gen, “makromolekül biyosentetik süreci” başlığında 100 gen, “hücrenel biyosentetik süreç” başlığında 54 gen, “ribonükleoprotein kompleksi biyogenezi” başlığında 21 gen, “polisakkarit lokalizasyonu” başlığı 30 gen, “kallos

lokalisasyonu” başlığı 7 gen ve “kallos birikmesiyle savunma yanıtı” başlığında 8 genin gruplandırıldığı bulunmuştur (Şekil 10).



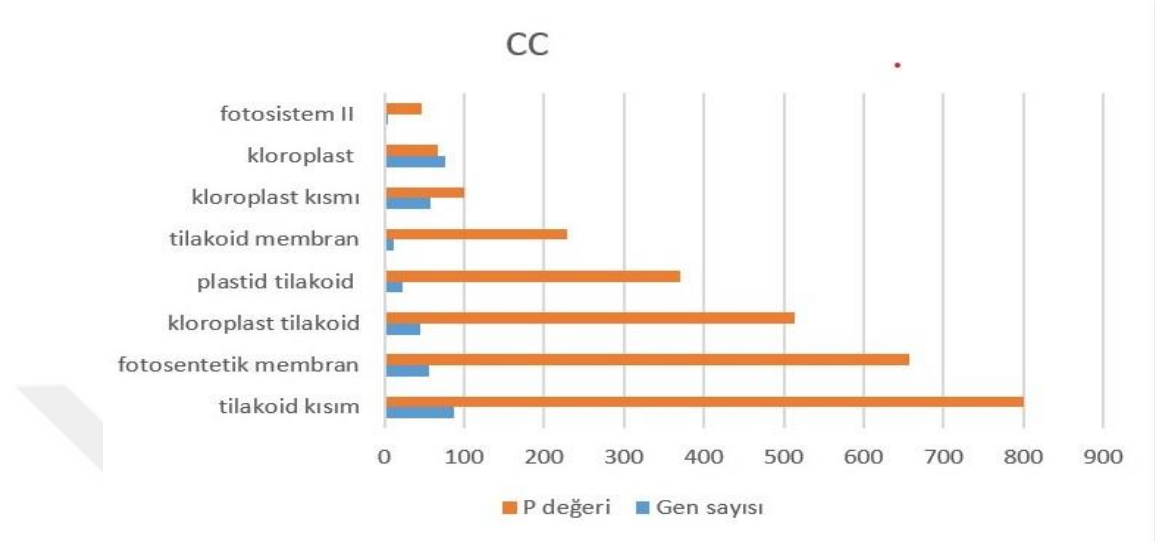
Şekil 11. Gen ontoloji analizinin ekspresyonu artan genlerin moleküler fonksiyon (MF) sonucu

Moleküler fonksiyon (MF) sonuçlarında 6 alt başlık elde edilmiştir. GO analiz sonucunda “inositol-1,3,4-trisfosfat 6-kinaz aktivitesi” başlığında 55 gen, “peptidaz düzenleyici aktivite” başlığında 44 gen, “oksidoredüktaz aktivitesi” başlığında 33 gen, “tetrapirel bağlanması” başlığında 14 gen, “omega-3 yağ asidi desatüraz aktivitesi” başlığında 7 gen ve “inositol trisfosfat kinaz aktivitesi” başlığında 8 genin gruplandırıldığı bulunmuştur (Şekil 11).



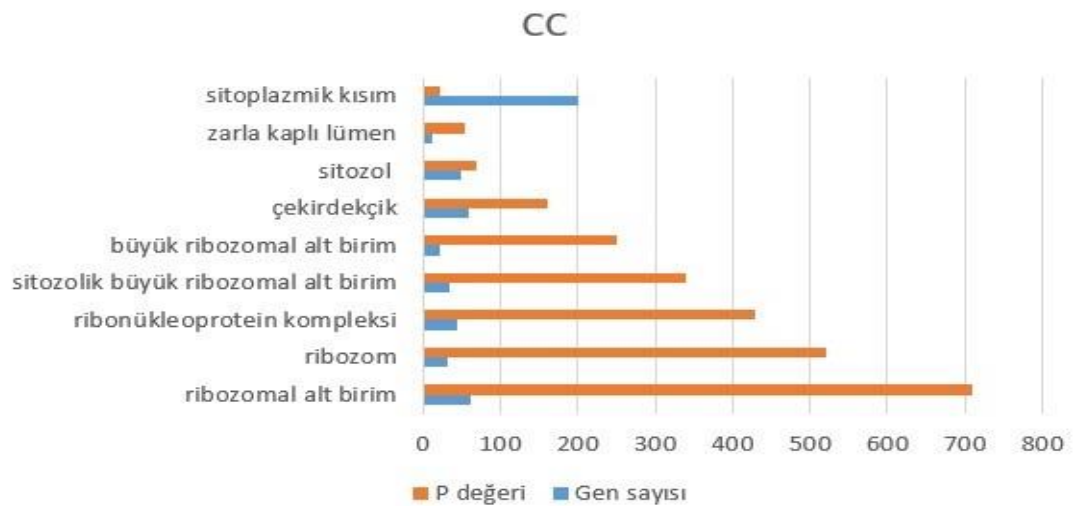
Şekil 12. Gen ontolojisi moleküler fonksiyon (MF) sonuçları

Moleküler fonksiyon (MF) sonuçlarında 2 alt başlık elde edilmiştir. GO analiz sonucunda “ribozomun yapısal bileşenine” sahip 66 gen ve “glutamat-sistein ligaz aktivitesine” sahip 3 gen tespit edilmiştir (Şekil 12).



Şekil 13. Gen ontolojisi analizinin hücresel bileşen (CC) sonuçları

İfade seviyesi artan genlerin hücresel bileşen (CC) sonuçlarına göre 8 farklı lokasyon bulunmuştur. Bu lokasyonlardan “fotosistem II”, “kloroplast” “kloroplast kısmı”, “tilakoid membran”, “plastid tilakoid”, “kloroplast tilakoid”, “fotosentetik membran” ve “tilakoid kısım” sonuçları elde edilmiştir (Şekil 13).



Şekil 14. Gen ontolojisi hücresel bileşen (CC) sonuçları

İfade seviyesi azalan genlerin hücrenel bileşen (CC) sonuçlarına göre 9 farklı lokasyon bulunmuştur. Sonuçta “ribozomal alt birim”, “ribozom”, “ribonükleoprotein kompleksi”, “sitozolik büyük ribozomal alt birim”, “büyük ribozomal alt birim”, “çekirdekçik”, “sitozol”, “zarla kaplı lümen”, “sitoplazmik kısım” lokasyonları tespit edilmiştir (Şekil 14).

Gen ontoloji analizi ile elde edilen sonuçların doğruluğu yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırılmıştır. Shi ve arkadaşlarının sıcaklığa tolerant ve sıcaklığa duyarlı tatlı mısır (*Zea mays L.*) çeşitlerinde ısı stresi altındaki transkripsiyonel değişiklikleri inceledikleri çalışma sonuçları ile yürütülen çalışma karşılaştırıldığında büyük bir paralellik olduğu tespit edilmiştir. Yürütülen tezde ekspresyonu artan genlerin biyolojik proses (BP) sonuçlarının “fotosentez”, “oksidasyon redüksiyon işlemi”, “fotosentez ışık reaksiyonu”, “peptidaz aktivitesinin düzenlenmesi”, “hidrolaz aktivitesinin negatif düzenlenmesi”, “protein işlemenin düzenlenmesi” mısırın sıcaklık stresi incelenen çalışmada tespit edilmiştir. Moleküler fonksiyon (MF) alt ontoloji sonuçları incelendiğinde bulunan “oksidoredüktaz aktivitesi”, “peptidaz düzenleyici aktivite”, “tetrapirel bağlanması”, “inositol-1,3,4-trisfosfat 6-kinaz aktivitesi”, “inositol trifosfat kinaz aktivitesi”, “omega-3 yağ asidi desatüraz aktivitesi” başlıkların hepsi mısırın sıcaklık stresi incelenen çalışmada tespit edilmiştir. Son alt ontoloji başlığı olan hücrenel bileşen (CC) alt ontolojisi incelendiğinde “tilakoid kısmı”, “fotosentetik membran”, “kloroplast tilakoid”, “plastid tilakoid”, “tilakoid membran”, “kloroplast kısmı”, “kloroplast” ve “fotosistem II” lokasyonlarının hepsi mısırın sıcaklık stresi incelenen çalışmada tespit edilmiştir (Shi ve ark., 2017).

Yonca'nın (*Medicago sativa L.*) tuz stresi altında indüklenen ekspresyonu değişen proteinler için gen ontoloji biyolojik proses kategorisinde “oksidasyon-redüksiyon” sürecinin ekspresyonu arttığı tespit edilmiştir. Hücrenel bileşen kategorisinde “kloroplast” tespit edilmiştir (Li ve ark., 2020). Pamuk, sodyum bikarbonat (NaHCO_3) alkali stres altında transkriptom analizinde biyolojik proses kategorisinde “oksidasyon-redüksiyon” süreci tespit edilmiştir (Fan ve ark., 2021). Karşılaştırmalı transkriptom analizi yapılan, ısıya tolerant ve ısıya duyarlı hurma çeşitlerinin incelenmesinde de aynı sonuç gözlenmiştir (Jin ve ark., 2020).

Panax ginseng bitkisi yüksek sıcaklığa maruz bırakıldığında “fotosentez, ışık reaksiyon” arttığı gözlenmiştir (Hong ve ark., 2022). Keten (*Linum usitatissimum L.*) bitkisinde kuraklık stresine maruz kalan yapraklarda farklı şekilde ifade edilen genlerin

değerlendirilmiştir. GO sonucunda “fotosentez” ve “fotosentez, ışık reaksiyonu” biyolojik prosesinde tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2023).

Tibet kabuksuz arpa yapraklarında nitrat stresine yanıt veren genler incelenmiştir. BP kategorisinde “hidrolaz aktivitesinin negatif düzenlenmesi” tespit edilmiştir (Wei ve ark., 2016).

RNA-seq verileri kullanılarak LB'ye toleranslı *C. hystrix* ve HLB'ye duyarlı *C. sinensis* üzerinde CLas ile aşılamaadan üç ay sonra gen ifadesi profili deneyleri gerçekleştirilmiştir. HLB toleranslı *C. hystrix*'te biyolojik süreçte “peptidaz aktivitesinin düzenlenmesi” tespit edilmiştir (Hu ve ark., 2017).

Ekspresyonu artan moleküler fonksiyon (MF) alt ontolojisinde tespit edilen “omega-3 yağ asidi desatüraz” (FAD3/FAD8) aşırı ekspresyonu bütün bitkilerinde kuraklığa karşı toleransı artırdığı tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2005). Başka bir çalışmada semizotu (*Portulaca oleracea*) tuzluluk stresi altında FAD3, tuza tolerant hattında ekspresyonu artmıştır (Du ve ark., 2023). Arabidopsis'te soğuk stresinde FAD2 ve FAD3 genlerinin ekspresyonunu arttırdığı ve bu da linolenik asit içeriğinde artışa yol açtığı bulunmuştur. Bu sonuçta soğuk toleransında FAD genlerinin önemli etkisi olduğunu göstermiştir (Wang ve ark., 2021). Aynı zamanda hücre zarlarının stabilitesini, reaktif oksijen türleri sinyal yollarını düzenlemede rol oynamaktadır. Sıcaklık stresi altında membran akışkanlığının korunmasında önemli görevleri vardır. Bitkilerde genellikle plastidde bulunur. Hücresel bileşen alt ontoloji sonucu ile orantılı bir sonuç bulunmuştur (Xiao ve ark., 2022). Mısırdaki yağ asidi desatüraz genleri soğuk ve sıcaklık stresi altında yanıtları incelemiştir. Sonucunda yağ asidi desatüraz ekspresyonunun sıcaklık stresinde arttığını tespit etmiştir. Yürütülen çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmanın doğruluğu desteklenmiştir (Zhao ve ark., 2019).

Rhazya stricta bitkisine tuz stresine maruz bırakılmıştır. Transkriptom analiz sonucunda “tetrapirel bağlayıcı” proteinin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Hajrah ve ark., 2017). Tütünde yapılan bir çalışmada ise mantarların sebep olduğu hastalıkların transkriptomik profili incelenmiştir. GO sonucunda “tetrapirel bağlayıcı” bulunduğu ortaya çıkmıştır (Duan ve ark., 2016). Çay bitkisi (*Camellia sinensis* L.) büyümesi ve gelişiminde Brassinosteroidler'in moleküler mekanizmasını araştırılan çalışmada, ekzojen BR'de “tetrapirel bağlayıcı” ekspresyonu arttığı tespit edilmiştir (Jin ve ark., 2022).

Kamıştaki (*Phragmites australis*) tuz toleransının altında yatan moleküler mekanizmaları incelenmiştir. Analiz sonucunda “oksidoredüktaz aktivitesi” başlığı ifade seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2020).

Çalışmada Cd stresi altındaki pirinç filizlerinde gen ifadesi incelenmiştir. Pirinç bitkileri 7 gün boyunca Cd stresine maruz bırakılmış ve “oksidoredüktaz aktivitesi” ile ilişkili genler moleküler fonksiyon kategorisinde zenginleştiği tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2019).

Domateste kuraklık stresinde aday düzenleyicileri karşılaştırmalı transkriptom analizi sonucunda gen ontoloji moleküler fonksiyon kategorisinde “peptidaz düzenleyici aktivite” zenginleşmiştir (Liu ve ark., 2023).

Mısırdaki WUS transkriptom faktörü ortologu *ZmWus2*'nin geçici aşırı ifadesinden sonra sağlıklı ve solmuş durumlarda bütün yapraklarında transkriptomik analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz, *ZmWus2* dönüşümünün “inozitol trisfosfat kinaz aktivitesi” ve “inozitol-1,3,4-trisfosfat 6-kinaz aktivitesi” moleküler fonksiyon başlığı altında keşfedilmiştir (Zhang ve ark., 2023). Patateste yapılan çalışmada klon 37 FB su stresinde “inositol 1,3,4- trisfosfat 6-kinaz aktivitesi” arttığı tespit edilmiştir (Barra ve ark., 2019).

Ekspresyonu azalan genlerin hücresel bileşen (CC) alt ontolojisi incelendiğinde “ribozomal alt birim”, “ribozom”, “ribonükleoprotein kompleksi”, “sitozolik büyük ribozomal alt birim”, “büyük ribozomal alt birim”, “çekirdekçik”, “sitozol”, “zarla kaplı lümen”, “sitoplazmik kısım” lokasyonlarının hepsi mısırın sıcaklık stresi karşı cevabı incelenen çalışmada tespit edilmiştir. Moleküler fonksiyon (MF) alt ontoloji sonuçları incelendiğinde “glutamat-sistein ligaz aktivitesi”, “ribozomun yapısal bileşeni” kategorilerinin hepsi mısırın sıcaklık stresi çalışmasında tespit edilmiştir. Son ontoloji başlığı olan biyolojik proses (BP) sonuçlarının “translasyon”, “gen ekspresyonu”, “hücresel makromolekül biosentetik süreci”, “makromolekül biosentetik süreci”, “hücresel biosentetik süreç”, “ribonükleoprotein kompleksi biyogenezi”, “polisakkarit lokalizasyonu”, “kallos lokalizasyonu”, “kallos birikmesiyle savunma yanıtı” hepsi mısırın sıcaklık stresi incelenen çalışmada tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak yürütülen çalışma sonuçları gayet başarılı ve diğer çalışmalarla orantılı olduğu tespit edilmiştir (Shi ve ark., 2017).

Kanola (*Brassica napus*) bitkisinde soğuk stresine maruz bırakılarak incelenmiştir. Gen ontoloji biyolojik proses kategorisinde “translasyon”, moleküler fonksiyon başlığında “ribozomun yapısal bileşeni”, hücresel bileşen kategorisinde ise “sitozolik

büyük ribozomal alt birim”, “sitozol” başlıkları zenginleştiği tespit edilmiştir (Bailey, 2021).

Başka bir çalışmada mini-implant etrafındaki kemik dokusunun gen ekspresyonu incelenmiştir. Ekspresyonu azalan genlerin gen ontoloji analizinde “glutamat sistein ligaz aktivitesi” geni moleküler fonksiyon başlığı altında zenginleştiği tespit edilmiştir (Nahm ve ark., 2015).

Buğday üç haftalık soğuk tedavisine tabi tutulmuş ve histon deasetilaz inhibitörü trikostatin A'ya maruz bırakılmış kültürlenmiş mikrosporlar üzerinde RNA-seq analizi yapılmıştır. Sonucunda BP kategorisinde “ribonükleoprotein kompleks biyogenez” ekspresyonu düştüğü tespit edilmiştir (Jensen, 2021).

Kral ağacı olarak bilinen *Paulownia elongata* bitkisinin transkriptomik çalışması sonucu moleküler fonksiyon kategorisinde “ribozomun yapısal bileşeni” ve hücrel bileşen kategorisinde “ribozom” başlıkları tespit edilmiştir (Katiyar ve ark., 2021).

Lentinula edodes mantar çeşiti soğuk depolama sırasında gama ışınına maruz bırakılmış ve hasat sonrası transkriptom analizi yapılmıştır. Gen ontoloji BP alt başlığında “hücrel biyosentetik süreç”, “translasyon”, “hücrel makromoleküler biyosentetik süreç” azaldığı tespit edilmiştir. Moleküler fonksiyon başlığı altında ise “ribozomun yapısal bileşen” azaldığı gözlenmiştir (Gao ve ark., 2023).

Kırlık kolza tohumu (*Brassica rapa* L.) soğuk stresine verdiği yanıt RNA-seq yapılarak incelenmiştir. GO sonucunda biyolojik proses alt başlığında “makromolekül biyosentetik proses” ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Wu ve ark., 2022).

Deniz çayırı (*Posidonia*) bitkisinin yaprak dokusu yüksek ve düşük tuzluluk stresi altında incelenmiş gen ontoloji analizi yapılmıştır. BP alt başlığı altında “hücrel biyosentetik süreç” ve “kallos birikimi ile savunma yanıtı” azaldığı tespit edilmiştir (Booth ve ark., 2022).

Yapılan bir çalışmada 5 Yak ineğinin kuru dönemi (DP) ile laktatik döneminde (LP) meme dokusu alınmış ve transkriptom analiz yapılmıştır. Gen ontoloji sonucunda “polisakkarit lokalizasyonu” ifadesinin düşük olduğu gözlenmiştir (Jiangfeng ve ark., 2018).

Arabidopsis kök gelişimi hakkında yapılan araştırmada PLSox hattında gen ontoloji sonucunda ifadesi azalan “gen ekspresyonu”, “hücrel makromolekül biyosentetik proses”, “makromolekül biyosentez proses”, “polisakkarit lokalizasyonu” ve “kallos lokalizasyonu” başlıklarının zenginleştiği tespit edilmiştir (Shen ve ark., 2019).

Domates (*Solanum lycopersicum*) bitkisinde askorbat oksidaz (AO), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve galaktonolakton dehidrogenaz (GLD) için RNAi hatlarının transkriptom, proteom ve metabolitlerinin ağ analizini içeren bir sistem biyolojisi yaklaşımı turuncu meyve perikarpında gerçekleştirilmiştir. Yapılan sistem biyoloji çalışmasında moleküler fonksiyon kategorisinde “ribozom yapısal bileşeni” MDHAR ve GLD hatlarında ekspresyonu düştüğü tespit edilmiştir (Stevens ve ark., 2018).

Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) fide aşamasında amonyum toksisitesinin nitrat düzenlenmesinde rol oynayan genleri ortaya çıkarmak amaçlı çalışma yapılmıştır. Yapılan gen ontoloji moleküler fonksiyon kategorisinde “glutamat sistein ligaz aktivitesi” tespit edilmiştir.

4.6. KEGG Analiz Sonuçları

KEGG yolu analizi, DEG'lerin fonksiyonel açıklamalarının moleküler düzeyde anlaşılmasını sağlamaktadır. Hangi genlerin etkileşime girebileceğini ve belirli koşullar altında hangi yolların en çok etkilendiğini ortaya çıkarır. Tez kapsamında elde edilen veriler analiz edildiğinde, sıcaklık stresine cevapta rol oynadığı düşünülen gen setlerinin içerisinde en çok sayıda genin fotosentez yollarında rol aldığı tespit edilmiş olup, sırası ile ikincil metabolitlerin biyosentezi, bitki hormon sinyal yolları, flavonoid biyosentezi, galaktoz metabolizması, pirüvat metabolizması ile yağ-asidi metabolizma yollarında bulunduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yürütülen çalışmada kavun (*Cucumis melo*) bitkisine uygulanan sıcaklık stresine karşı gen ekspresyon değişimleri transkriptom analiz kullanılarak araştırılmıştır. Sıcaklık stresine karşı anlamlı düzeyde farklılık gösteren genler incelenmiştir. logFC değeri 3'ün üstünde ve -3'ün altında olan genler filtrelenmiş ve bu genler üzerinde çalışılmıştır. Bu genlerin potansiyel biyolojik rolleri hakkında literatür taraması yapılmıştır. İfadesi değişen pek çok genin farklı bitki ve abiyotik streslerde benzer şekilde yanıt verdiği gözlenmiştir. Galaxy platformu içerisinde bulunan pek çok program kullanılarak transkriptom analizi gerçekleştirilmiştir. Deseq2 programı kullanılarak 788 ekspresyonu artan DEG, 134 ekspresyonu düşen DEG tespit edilmiştir. Tespit edilen bu genlerin fonksiyonel anotasyonu gerçekleştirilmiştir. Homoloji tabanlı çalışan BLAST programı ile genler anlamlandırılmıştır. Devamında gen ontoloji (GO) ve KEGG analizleri yapılmıştır. GO analizi sonucunda azalan genlerin BP başlığı incelendiğinde “gen ekspresyonu”, “translasyon” ekspresyonunun düştüğü, bitkinin stres altında kaynaklarını korumak amacıyla protein sentezi ve gen ekspresyonunu baskıladığı gözlenmiştir. Stres koşulları altında enerjisini daha çok savunma mekanizmalarına ve hayatta kalmaya yönlendirildiğinden, hücrel büyüme ve biyosentetik süreçler baskılanmıştır. “Kalloz birikmesiyle savunma yanıtı” ve “kallos lokalizasyonu” gibi savunma süreçlerinin de bitkide baskılandığını veya farklı mekanizmalarla yönetildiğini düşündürmektedir. GO analizi sonucunda ekspresyonu artan genlerin BP başlığı incelendiğinde “fotosentez” ve “fotosentez, ışık reaksiyonu” gibi süreçler kavun bitkisinde fotosentez ile ilişkili genlerin strese yanıtta aktif hale geldiği tespit edilmiştir. Stres koşullarında bitkinin fotosentetik süreçlerini koruma ya da uyum sağlama çabasıyla bu genlerin ekspresyonunun artmış olacağı tahmin edilmektedir. Oksidatif stresin sıcaklık stresine yanıt olarak yaygın olduğu bilinmektedir. “Oksidasyon-redüksiyon süreci” ve “protein işlemenin düzenlenmesi” gibi süreçlerde de artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar bitkinin hücrel savunma mekanizmalarının aktive olduğunu işaret etmektedir (Shi ve ark., 2017). Yürütülen çalışma sonucu elde edilen bilgiler, kavun bitkisinin sıcaklık stresine yanıt mekanizmasının anlamlandırılmasında gelecek araştırmalar için çok yol haritası oluşturacaktır.

5.2. Öneriler

Bu çalışmada elde edilen sonuçların ötesine geçmek için, proteomik ve metabolomik analizlerle bu genlerin protein seviyesindeki etkilerinin incelenmesi faydalı olacaktır. Bu, gen seviyesindeki değişimlerin bitki biyolojisindeki nihai etkilerini anlamak açısından kritik olabilir. Sıcaklık stresi haricindeki diğer çevresel stres faktörlerine (kuraklık, tuz stresi vb.) maruz kalan kavun bitkilerinde de benzer transkriptom analizlerinin yapılması önerilmektedir. Böylece farklı stres koşullarına karşı gen ekspresyon yanıtlarının karşılaştırılarak genel stres mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlanabilir. Elde edilen bulgular, stres toleransını artıran genlerin kullanımıyla daha tolerant kavun çeşitlerinin geliştirilmesine olanak tanıyabilir. Bu sayede, ekonomik açıdan ülkemiz için büyük öneme sahip olan kavun bitkisinin üretimi artırılabilir ve çevresel stres koşullarına daha dirençli çeşitler elde edilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Ali, E. C. E. (2017). Çankırı İli Kızılırmak İlçesinde Kavun Yetiştiriciliği. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10(1), 31-34.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Ansari, W. A., Atri, N., Ahmad, J., Qureshi, M. I., Singh, B., Kumar, R., ... & Pandey, S. (2019). Drought mediated physiological and molecular changes in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *PloS one*, 14(9), e0222647.
- Ara, N., Nakkanong, K., Lv, W., Yang, J., Hu, Z., & Zhang, M. (2013). Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two cucurbit species (“*Cucurbita maxima*” and “*Cucurbita moschata*”) and their interspecific inbred line “Maxchata”. *International journal of molecular sciences*, 14(12), 24008-24028.
- Archer, S. K., Shirokikh, N. E., & Preiss, T. (2014). Selective and flexible depletion of problematic sequences from RNA-seq libraries at the cDNA stage. *BMC genomics*, 15, 1
- Archer, S. K., Shirokikh, N. E., & Preiss, T. (2015). Probe-directed degradation (PDD) for flexible removal of unwanted cDNA sequences from RNA-Seq libraries. *Current protocols in human genetics*, 85(1), 11-15.
- Armour, C. D., Castle, J. C., Chen, R., Babak, T., Loerch, P., Jackson, S., ... & Raymond, C. K. (2009). Digital transcriptome profiling using selective hexamer priming for cDNA synthesis. *Nature methods*, 6(9), 647-649.
- Bailey, R. E. (2021). *The effects of abiotic stress on isoform composition in polyploid Brassica napus* (Doctoral dissertation, University of British Columbia).
- BAKTEMUR, Ö. Ü. G., TAŞKIN, H., SOLMAZ, İ., SARI, N., ELLİALTIOĞLU, Ş. Ş., KARAKÖY, T., ... & KARA, A. G. E. SEBZE YETİŞTİRİCİLİĞİ.
- Barra, M., Meneses, C., Riquelme, S., Pinto, M., Lagüe, M., Davidson, C., & Tai, H. H. (2019). Transcriptome profiles of contrasting potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes under water stress. *Agronomy*, 9(12), 848.
- Bentley, D. R. (2000). The human genome project—an overview. *Medicinal research reviews*, 20(3), 189-196.
- Beukers, M., & Allmer, J. (2023). Challenges for the development of automated RNA-seq analyses pipelines. *GMS Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie*, 19, Doc06.

- Blake, J. A., Christie, K. R., Dolan, M. E., Drabkin, H. J., Hill, D. P., Ni, L., Sitnikov, D., Burgess, S., Buza, T., Gresham, C., McCarthy, F., Pillai, L., Wang, H., Carbon, S., Dietze, H., Lewis, S. E., Mungall, C. J., Munoz-Torres, M. C., Feuermann, M., ... Westerfeld, M. (2015). Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D1049-D1056.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Galaxy Team. (2010). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783-1785.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Booth, M. W., Breed, M. F., Kendrick, G. A., Bayer, P. E., Severn-Ellis, A. A., & Sinclair, E. A. (2022). Tissue-specific transcriptome profiles identify functional differences key to understanding whole plant response to life in variable salinity. *Biology Open*, 11(8), bio059147.
- Borodina, T., Adjaye, J., & Sultan, M. (2011). A strand-specific library preparation protocol for RNA sequencing. In *Methods in enzymology* (Vol. 500, pp. 79-98). Academic Press.
- Bray, E. A. (2004). Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 55(407), 2331-2341.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology*, 34(5), 525-527.
- Brooksbank, C., Bergman, M. T., Apweiler, R., Birney, E., & Thornton, J. (2014). The european bioinformatics institute's data resources 2014. *Nucleic acids research*, 42(D1), D18-D25.
- Burke, J. (1990). High temperature stress and adaptations in crops. *Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms*, 295-309.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10, 1-9.
- Candan, F., Kesercioğlu, T. (2012). Kavun (Cucumis melo L.) Türünün Kökeni, Yayılışı ile Batı Anadolu' da Bulunan Doğal Form ve Kültür Varyeteleri Kırkağaç Araştırmaları Sempozyumu. Manisa.
- Caperta, A. D., Fernandes, I., Conceição, S. I., Marques, I., Róis, A. S., & Paulo, O. S. (2023). Ovule transcriptome analysis discloses deregulation of genes and pathways in sexual and apomictic *Limonium* species (Plumbaginaceae). *Genes*, 14(4), 901.
- Carmo, L. S., Martins, A. C., Martins, C. C., Passos, M. A., Silva, L. P., Araujo, A. C., ... & Mehta, A. (2019). Comparative proteomics and gene expression analysis in

- Arachis duranensis* reveal stress response proteins associated to drought tolerance. *Journal of proteomics*, 192, 299-310.
- Chaisson, M. J., Huddleston, J., Dennis, M. Y., Sudmant, P. H., Malig, M., Hormozdiari, F., ... & Eichler, E. E. (2015). Resolving the complexity of the human genome using single-molecule sequencing. *Nature*, 517(7536), 608-611.
- Clauw, P., Coppens, F., De Beuf, K., Dhondt, S., Van Daele, T., Maleux, K., ... & Inzé, D. (2015). Leaf responses to mild drought stress in natural variants of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 167(3), 800-816.
- Cock, P. J., Chilton, J. M., Grüning, B., Johnson, J. E., & Soranzo, N. (2015). NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. *Gigascience*, 4(1), s13742-015.
- Crisóstomo, L. A., dos SANTOS, A. A., Raji, B. V., de FARIA, C. M. B., da SILVA, D. J., FERNANDES, F. M., ... & Costa, N. D. (2003). Adubação, irrigação, híbridos e práticas culturais para o meloeiro no Nordeste.
- Devi, R., Goyal, P., Verma, B., Hussain, S., Chowdhary, F., Arora, P., & Gupta, S. (2024). A transcriptome-wide identification of ATP-binding cassette (ABC) transporters revealed participation of ABCB subfamily in abiotic stress management of *Glycyrrhiza glabra* L. *BMC genomics*, 25(1), 315.
- Dönmez, D., Şimşek Ö., Aka Kaçar, Y. (2015). Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8 (1), 30-37.
- Du Plessis, L., Škunca, N., & Dessimoz, C. (2011). The what, where, how and why of gene ontology—a primer for bioinformaticians. *Briefings in bioinformatics*, 12(6), 723-735.
- Du, H., Zaman, S., Hu, S., & Che, S. (2023). Transcriptome profiling of unigenes participating in salt tolerance in purslane (*Portulaca oleracea*) under salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 45(6), 76.
- Duan, S., Ma, X., Chen, W., Wan, W., He, Y., Ma, X., ... & Dong, Y. (2016). Transcriptomic profile of tobacco in response to *Alternaria longipes* and *Alternaria alternata* infections. *Scientific reports*, 6(1), 25635.
- Ece, A. (2017). Çankırı ili Kızılırmak ilçesinde kavun yetiştiriciliği. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10(1), 31-34.
- Erdinc, C., Inal, B., Erez, E., Ekincialp, A., & Sensoy, S. (2021). Comparative adaptation responses of melon (*Cucumis melo* L.) genotypes to salinity stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 23(2), 403-418.
- ERMİŞ, S., & Veysel, A. R. A. S. (2017). Kavun (*Cucumis melo* L.) çeşitlerinin morfolojik karakterizasyonu ve akrabalık derecelerinin belirlenmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 6, 171-178.

- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048.
- Fan, Y., Lu, X., Chen, X., Wang, J., Wang, D., Wang, S., ... & Ye, W. (2021). Cotton transcriptome analysis reveals novel biological pathways that eliminate reactive oxygen species (ROS) under sodium bicarbonate (NaHCO₃) alkaline stress. *Genomics*, 113(3), 1157-1169.
- Faostat. (2022). From <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> Erişim tarihi: Eylül 2024
- Fernandes, I., Paulo, O. S., Marques, I., Sarjkar, I., Sen, A., Graça, I., ... & Ribeiro-Barros, A. I. (2022). Salt stress tolerance in *Casuarina glauca*: insights from the branchlets transcriptome. *Plants*, 11(21), 2942.
- Ferrarini, M., Moretto, M., Ward, J. A., Šurbanovski, N., Stevanović, V., Giongo, L., ... & Sargent, D. J. (2013). An evaluation of the PacBio RS platform for sequencing and de novo assembly of a chloroplast genome. *BMC genomics*, 14, 1-12.
- Gao, H., Ye, S., Liu, Y., Fan, X., Yin, C., Liu, Y., ... & Shi, D. (2023). Transcriptome analysis provides insight into gamma irradiation delaying quality deterioration of postharvest *Lentinula edodes* during cold storage. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 6, 100172.
- Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., ... & Puigdomènech, P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11872-11877.
- Garg, A., Leipe, D., & Uetz, P. (2019). The disconnect between DNA and species names: lessons from reptile species in the NCBI taxonomy database. *Zootaxa*, 4706(3), 401-407.
- Geer, L. Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R. C., Han, L., He, J., He, S., ... & Bryant, S. H. (2010). The NCBI biosystems database. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1), D492-D496.
- Guillermo, M. O., Adela, Z., Antonio, M., Olivier, N. A., Noëlaní, V. D. B., Palomo-Ríos, E., ... & Clara, P. (2021). Physiological and molecular responses of 'Dusa' avocado rootstock to water stress: Insights for drought adaptation. *Plants*, 10(10), 2077.
- Hajrah, N. H., Obaid, A. Y., Atef, A., Ramadan, A. M., Arasappan, D., Nelson, C. A., ... & Jansen, R. K. (2017). Transcriptomic analysis of salt stress responsive genes in *Rhazya stricta*. *PloS one*, 12(5), e0177589.
- Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M., Foulger, R., & Eilbeck, K. (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource *Nucleic Acids Res* 32. D258-261, 10.

- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9643-9684.
- He, Y., Zhang, Z., Peng, X., Wu, F., & Wang, J. (2013). De novo assembly methods for next generation sequencing data. *Tsinghua Science and Technology*, 18(5), 500-514.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I. ve Herrero, M. (2009). Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Science*, 14(1), 30-36.
- Heyer, E. E., Ozadam, H., Ricci, E. P., Cenik, C., & Moore, M. J. (2015). An optimized kit-free method for making strand-specific deep sequencing libraries from RNA fragments. *Nucleic acids research*, 43(1), e2-e2.
- Hong, J., Geem, K. R., Kim, J., Jo, I. H., Yang, T. J., Shim, D., & Ryu, H. (2022). Prolonged exposure to high temperature inhibits shoot primary and root secondary growth in *Panax ginseng*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11647.
- Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguer, M., van der Linden, P. J., Dai, X., Maskell, K. ve Johnson, C. (2001). Climate change 2001: the scientific basis: contribution of Working Group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change: Cambridge university press.
- Hrdlickova, R., Toloué, M., & Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(1), e1364.
- Hu, Y., Zhong, X., Liu, X., Lou, B., Zhou, C., & Wang, X. (2017). Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of *Citrus hystrix* in response to 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' infection. *PLoS One*, 12(12), e0189229.
- İncili, Ç. Y. (2022). Kavun ve karpuz bitkilerinde ekspansin gen ailesinin incelenmesi ve farklı abiyotik stres şartlarında gen ifade profilleri (Doctoral dissertation, Kastamonu Üniversitesi).
- Jensen, T. (2021). *The impact of cold and Trichostatin A treatment on the transcriptome of wheat microspores*. University of Lethbridge (Canada).
- Jia, J., Zhao, P., Cheng, L., Yuan, G., Yang, W., Liu, S., ... & Li, X. (2018). MADS-box family genes in sheepgrass and their involvement in abiotic stress responses. *BMC plant biology*, 18, 1-11.
- Jiangfeng, F., Yuzhu, L., Sijiu, Y., Yan, C., Gengquan, X., Libin, W., ... & Honghong, H. (2018). Transcriptional profiling of two different physiological states of the yak mammary gland using RNA sequencing. *PLoS One*, 13(7), e0201628.

- Jin, J., Yang, L., Fan, D., Liu, X., & Hao, Q. (2020). Comparative transcriptome analysis uncovers different heat stress responses in heat-resistant and heat-sensitive jujube cultivars. *PLoS One*, 15(9), e0235763.
- Jin, Q., Wang, Z., Chen, Y., Luo, Y., Tian, N., Liu, Z., ... & Liu, S. (2022). Transcriptomics analysis reveals the signal transduction mechanism of brassinolides in tea leaves and its regulation on the growth and development of *Camellia sinensis*. *BMC genomics*, 23(1), 29.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids research*, 45(D1), D353-D361.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic acids research*, 44(D1), D457-D462.
- Kapluhan, E. (2013). Türkiye’de kuraklık ve kuraklığın tarıma etkisi. *Marmara Coğrafya Dergisi*, (27), 487-510.
- Kara, S. LEA (Late embryogenesis abundant) genlerinin kavun (*Cucumis melo* L.) ve karpuz (*Citrullus lanatus*) türlerinde tanımlanması, biyoinformatik analizleri ve kuraklık stresi altında gen ifade analizlerinin incelenmesi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Katiyar, N., Ramadoss, N., Gupta, D., Pakala, S. B., Cooper, K., & Basu, C. (2021). Transcriptomic profiling of *Paulownia elongata* in response to heat stress. *Plant Gene*, 28, 100330.
- Kesh, H., & Kaushik, P. (2021). Advances in melon (*Cucumis melo* L.) breeding: An update. *Scientia Horticulturae*, 282, 110045.
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*, 12(4), 357-360.
- Kim, T. L., Oh, C., Denison, M. I. J., Natarajan, S., Lee, K., & Lim, H. (2024). Transcriptomic and physiological responses of *Quercus acutissima* and *Quercus palustris* to drought stress and rewatering. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1430485.
- Kovaka, S., Zimin, A. V., Pertea, G. M., Razaghi, R., Salzberg, S. L., & Pertea, M. (2019). Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome biology*, 20, 1-13.
- Larkindale, J. ve Huang, B. (2004). Changes of lipid composition and saturation level in leaves and roots for heat-stressed and heat-acclimated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and experimental botany*, 51(1), 57-67.

- Lee, H., Gurtowski, J., Yoo, S., Nattestad, M., Marcus, S., Goodwin, S., ... & Schatz, M. C. (2016). Third-generation sequencing and the future of genomics. *BioRxiv*, 048603.
- Li, J., Cui, J., Cheng, D., Dai, C., Liu, T., Wang, C., & Luo, C. (2020). iTRAQ protein profile analysis of leaves and roots of sugar beet (*Beta vulgaris*) differing in response to salt stress.
- Li, J., Essemine, J., Shang, C., Zhang, H., Zhu, X., Yu, J., ... & Sun, D. (2020). Combined proteomics and metabolism analysis unravels prominent roles of antioxidant system in the prevention of alfalfa (*Medicago sativa* L.) against salt stress. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 909.
- Li, P., Fang, T., Chong, X., Chen, J., Yue, J., & Wang, Z. (2024). CmDOF18 positively regulates salinity tolerance in *Chrysanthemum morifolium* by activating the oxidoreductase system. *BMC Plant Biology*, 24(1), 232.
- Liu, H., Chong, P., Yan, S., Liu, Z., Bao, X., & Tan, B. (2023). Transcriptome and proteome association analysis to screen candidate genes related to salt tolerance in *Reaumuria soongorica* leaves under salt stress. *Plants*, 12(20), 3542.
- Liu, M., Zhao, G., Huang, X., Pan, T., Chen, W., Qu, M., ... & Shabala, S. (2023). Candidate regulators of drought stress in tomato revealed by comparative transcriptomic and proteomic analyses. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1282718.
- Loka, D. ve Oosterhuis, D. (2010). Effect of high night temperatures on cotton respiration, ATP levels and carbohydrate content. *Environmental and experimental botany*, 68(3), 258-263.
- Lopez-Zaplana, A., Martinez-Garcia, N., Carvajal, M., & Bárzana, G. (2022). Relationships between aquaporins gene expression and nutrient concentrations in melon plants (*Cucumis melo* L.) during typical abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 195, 104759.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15, 1-21.
- Lukatkin, A. (2005). Initiation and development of chilling injury in leaves of chillingsensitive plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(4), 542-546.
- Madani, B., Mirshekari, A., & Imahori, Y. (2019). Physiological responses to stress. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 405-423). Woodhead Publishing.
- Mahmoud, A., Qi, R., Chi, X., Liao, N., Malangisha, G. K., Ali, A., ... & Hu, Z. (2023). Integrated Bulk Segregant Analysis, Fine Mapping, and Transcriptome Revealed QTLs and Candidate Genes Associated with Drought Adaptation in Wild Watermelon. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 65.

- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembien, L. A., ... & Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12.
- Mathé, C., Sagot, M. F., Schiex, T., & Rouzé, P. (2002). Current methods of gene prediction, their strengths and weaknesses. *Nucleic acids research*, 30(19), 4103-4117.
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1980). [57] Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. In *Methods in enzymology* (Vol. 65, pp. 499-560). Academic Press.
- Merriman, B., R&D Team, I. T., & Rothberg, J. M. (2012). Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*, 33(23), 3397-3417.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.
- Nagashima, Y., Niyakan, S., He, K., Singh, J., Metrani, R., Crosby, K. M., ... & Koiwa, H. (2022). Differential Expression of Transcription Factors in Developing Melon Fruits. In *Melon Breeding and Genetics: Developments in Food Quality & Safety* (pp. 3-21). American Chemical Society.
- Nahm, K. Y., Heo, J. S., Lee, J. H., Lee, D. Y., Chung, K. R., Ahn, H. W., & Kim, S. H. (2015). Gene Profiling of Bone around Orthodontic Mini-Implants by RNA-Sequencing Analysis. *BioMed Research International*, 2015(1), 538080.
- Nam, D. K., Lee, S., Zhou, G., Cao, X., Wang, C., Clark, T., ... & Wang, S. M. (2002). Oligo (dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly (A) priming during reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6152-6156.
- Nunez-Paleniuss, H. G., Gomez-Lim, M., Ochoa-Alejo, N., Grumet, R., Lester, G., & Cantliffe, D. J. (2008). Melon fruits: genetic diversity, physiology, and biotechnology features. *Critical reviews in biotechnology*, 28(1), 13-55.
- Paris, H. S., Amar, Z., & Lev, E. (2012). Medieval emergence of sweet melons, *Cucumis melo* (Cucurbitaceae). *Annals of Botany*, 110(1), 23-33.
- Peng, J., Lu, G., Xue, H., Wang, T., & Shang, X. (2019). TS-GOEA: a web tool for tissue-specific gene set enrichment analysis based on gene ontology. *BMC bioinformatics*, 20, 1-7.
- Qiao, S., Xu, Y., Hu, Q., Dong, W., He, S., Qi, X., & Sun, Y. (2022). Transcriptome analysis of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) reveals candidate genes associated with fruit size. *Agronomy*, 12(8), 1810.

- Raghavan, V., Kraft, L., Mesny, F., & Rigerte, L. (2022). A simple guide to de novo transcriptome assembly and annotation. *Briefings in bioinformatics*, 23(2), bbab563.
- Raghavan, V., Kraft, L., Mesny, F., & Rigerte, L. (2022). A simple guide to de novo transcriptome assembly and annotation. *Briefings in bioinformatics*, 23(2), bbab563.
- Roberts, R. J., Carneiro, M. O., & Schatz, M. C. (2013). The advantages of SMRT sequencing. *Genome biology*, 14, 1-4.
- Rodríguez-Gómez, G., Vargas-Mejía, P., & Silva-Rosales, L. (2022). Differential expression of genes between a tolerant and a susceptible maize line in response to a Sugarcane Mosaic Virus infection. *Viruses*, 14(8), 1803.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sarı, N., Abak, K., & Daşgan, H. Y. (2000). Güneydoğu Anadolu bölgesinde kavun yetiştiriciliği. TÜBİTAK Türkiye Tarımsal Araştırma Projesi Yayınları.
- Schöffl, F., Prandl, R. ve Reindl, A. (1999). Molecular responses to heat stress. *Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants*, 83(93).
- Seçim, A. (2019). Bazı saf hat kırkağaç kavun (*Cucumis melo* L.) genotipleri ve hibritlerinin *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*'e dayanım, morfolojik karakterizasyon ve raf ömrü bakımından incelenmesi.
- Shen, W. (2019). *Genetic Control of Root Development in Arabidopsis* (Doctoral dissertation, Durham University).
- Shi, J., Yan, B., Lou, X., Ma, H., & Ruan, S. (2017). Comparative transcriptome analysis reveals the transcriptional alterations in heat-resistant and heat-sensitive sweet maize (*Zea mays* L.) varieties under heat stress. *BMC plant biology*, 17, 1-10.
- Shumate, A., Wong, B., Perte, G., & Perte, M. (2022). Improved transcriptome assembly using a hybrid of long and short reads with StringTie. *PLoS computational biology*, 18(6), e1009730.
- Singh, D., Singh, C. K., Taunk, J., Tomar, R. S. S., Chaturvedi, A. K., Gaikwad, K., & Pal, M. (2017). Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. *BMC genomics*, 18, 1-20.
- Singla, J., Krattinger, S. G., Wrigley, C. W., Faubion, J., Corke, H., & Seetharaman, K. (2016). Biotic stress resistance genes in wheat.

- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of next-generation sequencing technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122(1), e59.
- Stevens, R. G., Baldet, P., Bouchet, J. P., Causse, M., Deborde, C., Deschodt, C., ... & Rothan, C. (2018). A systems biology study in tomato fruit reveals correlations between the ascorbate pool and genes involved in ribosome biogenesis, translation, and the heat-shock response. *Frontiers in Plant Science*, 9, 137.
- Sun, H., Dai, H., Wang, X., & Wang, G. (2016). Physiological and proteomic analysis of selenium-mediated tolerance to Cd stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 114-126.
- Sun, L., Wang, J., Song, K., Sun, Y., Qin, Q., & Xue, Y. (2019). Transcriptome analysis of rice (*Oryza sativa* L.) shoots responsive to cadmium stress. *Scientific Reports*, 9(1), 10177.
- Şığva, H. Ö. (2008). Determination of Genetic Diversity and Antioxidant Content of the National Melon (*Cucumis Melo*) Collection (Doctoral dissertation, Izmir Institute of Technology (Turkey)).
- Tokić, M., Leljak Levanić, D., Ludwig-Müller, J., & Bauer, N. (2023). Growth and Molecular Responses of Tomato to Prolonged and Short-Term Heat Exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4456.
- Vicente, R., Bolger, A. M., Martínez-Carrasco, R., Pérez, P., Gutiérrez, E., Usadel, B., & Morcuende, R. (2019). De novo transcriptome analysis of durum wheat flag leaves provides new insights into the regulatory response to elevated CO₂ and high temperature. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1605.
- Wang, F., Yin, Y., Yu, C., Li, N., Shen, S., Liu, Y., ... & Yao, M. (2021). Transcriptomics analysis of heat stress-induced genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings. *Horticulturae*, 7(10), 339.
- Wang, J., Liu, Z., Liu, H., Peng, D., Zhang, J., & Chen, M. (2021). *Linum usitatissimum* FAD2A and FAD3A enhance seed polyunsaturated fatty acid accumulation and seedling cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 311, 111014.
- Wang, L. M., Zhang, L. D., Chen, J. B., Huang, D. F., & Zhang, Y. D. (2016). Physiological analysis and transcriptome comparison of two muskmelon (*Cucumis melo* L.) cultivars in response to salt stress. *Genet. Mol. Res*, 15, 1-18.
- Wang, M., He, X., Peng, Q., Liang, Z., Peng, Q., Liu, W., ... & Lin, Y. E. (2020). Understanding the heat resistance of cucumber through leaf transcriptomics. *Functional Plant Biology*, 47(8), 704-715.
- Wang, M., Liu, W., Yan, J., Sun, P., Chen, F., Jiang, B., ... & He, X. (2021). A transcriptomic analysis of gene expression in chieh-qua in response to fusaric acid stress. *Horticulturae*, 7(4), 88.

- Wang, N., Qi, F., Wang, F., Lin, Y., Xiaoyang, C., Peng, Z., ... & Zhang, J. (2023). Evaluation of differentially expressed genes in leaves vs. roots subjected to drought stress in flax (*Linum usitatissimum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12019.
- Wei, Z., Zeng, X., Qin, C., Wang, Y., Bai, L., Xu, Q., ... & Nyima, T. (2016). Comparative transcriptome analysis revealed genes commonly responsive to varied nitrate stress in leaves of Tibetan hulless barley. *Frontiers in plant science*, 7, 1067.
- Weirather, J. L., de Cesare, M., Wang, Y., Piazza, P., Sebastiano, V., Wang, X. J., ... & Au, K. F. (2017). Comprehensive comparison of Pacific Biosciences and Oxford Nanopore Technologies and their applications to transcriptome analysis. *F1000Research*, 6.
- Weng, J., Rehman, A., Li, P., Chang, L., Zhang, Y., & Niu, Q. (2022). Physiological and transcriptomic analysis reveals the responses and difference to high temperature and humidity stress in two melon genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 734.
- Wien, H. C. (1997). The cucurbits: cucumber, melon, squash and pumpkin. The physiology of vegetable crops.
- Withanage, M. H. H., Liang, H., & Zeng, E. (2022). RNA-Seq experiment and data analysis. In *Estrogen Receptors: Methods and Protocols* (pp. 405-424). New York, NY: Springer US.
- Wu, D. C., Yao, J., Ho, K. S., Lambowitz, A. M., & Wilke, C. O. (2018). Limitations of alignment-free tools in total RNA-seq quantification. *BMC genomics*, 19, 1-14.
- Wu, W., Yang, H., Xing, P., Dong, Y., Shen, J., Wu, G., ... & Wu, Y. (2022). Comparative transcriptome analysis revealed the freezing tolerance signaling events in winter rapeseed (*Brassica rapa* L.). *Frontiers in Genetics*, 13, 871825.
- Xiao, R., Zou, Y., Guo, X., Li, H., & Lu, H. (2022). Fatty acid desaturases (FADs) modulate multiple lipid metabolism pathways to improve plant resistance. *Molecular biology reports*, 49(10), 9997-10011.
- Yalamanchili, H. K., Wan, Y. W., & Liu, Z. (2017). Data analysis pipeline for RNA-seq experiments: from differential expression to cryptic splicing. *Current protocols in bioinformatics*, 59(1), 11-15.
- Ye, J., Zhang, Y., Cui, H., Liu, J., Wu, Y., Cheng, Y., ... & Shi, C. (2018). WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucleic acids research*, 46(W1), W71-W75.
- Yu, B., Ming, F., Liang, Y., Wang, Y., Gan, Y., Qiu, Z., ... & Cao, B. (2022). Heat stress resistance mechanisms of two cucumber varieties from different regions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1817.

- Zhang, F., Zhang, J., Li, Q., Yang, Y., & Sheng, Y. (2024). Exploring Candidate Genes and Regulatory Mechanisms for Salt–Alkali Tolerance in Cucumber. *Agronomy*, 14(3), 543.
- Zhang, H., Li, G., Yan, C., Zhang, X., Cao, N., Le, M., ... & Liu, W. (2022). Elucidating the molecular responses to waterlogging stress in cucumis melo by comparative transcriptome profiling. *Horticulturae*, 8(10), 891.
- Zhang, L., Chen, L., Lu, F., Liu, Z., Lan, S., & Han, G. (2020). Differentially expressed genes related to oxidoreductase activity and glutathione metabolism underlying the adaptation of *Phragmites australis* from the salt marsh in the Yellow River Delta, China. *PeerJ*, 8, e10024.
- Zhang, X. D., Zhao, K. X., & Yang, Z. M. (2018). Identification of genomic ATP binding cassette (ABC) transporter genes and Cd-responsive ABCs in *Brassica napus*. *Gene*, 664, 139-151.
- Zhang, X., Liang, S., Luo, B., Zhou, Z., Bao, J., Fang, R., ... & Lin, F. C. (2023). Transcriptomic and metabolomic investigation on Leaf Necrosis Induced by *ZmWus2* transient overexpression in *nicotiana benthamiana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11190.
- Zhao, X., Wei, J., He, L., Zhang, Y., Zhao, Y., Xu, X., ... & Xu, J. (2019). Identification of fatty acid desaturases in maize and their differential responses to low and high temperature. *Genes*, 10(6), 445.

