



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SOĞUK STRESİNİN DEREOTU (*Anethum*
Graveolens L.) mRNA TRANSKRİPTOMUNA**
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Secde Nur SAFRAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Haziran-2026
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Secde Nur SAFRAN tarafından hazırlanan “Soğuk Stresinin Dereotu (*Anethum Graveolens* L.) mRNA Transkriptomuna Etkisinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 17/06/2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Emrah TORLAK

Danışman

Doç. Dr. Ali Tefik UNCU

Üye

Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

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

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY

FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Secde Nur SAFRAN

Tarih: 17/06/2026

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SOĞUK STRESİNİN DEREOTU (*Anethum Graveolens* L.) mRNA TRANSKRİPTOMUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Secde Nur SAFRAN

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Ali Tevfik UNCU

2026, 84 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Ali Tevfik UNCU

Prof Dr. Emrah TORLAK

Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

Dereotu (*Anethum graveolens* L.), Apiaceae familyasına ait önemli bir aromatik ve tıbbi bitki olup; gıda, kozmetik ve farmakoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekonomik ve farmakolojik açıdan önemli bir tür olmasına rağmen, dereotunun abiyotik stres koşullarına verdiği moleküler yanıtlar üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Özellikle soğuk stresine karşı gelişen fizyolojik ve genetik mekanizmaları yeterince araştırılmamış olup, dereotunda transkriptom düzeyinde gerçekleştirilen çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu nedenle, dereotu bitkisinde soğuk stresine bağlı transkriptomik değişimlerin belirlenmesi amacıyla mevcut araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda dereotu kısa okuma platformları kullanılarak sekanslanmış ve elde edilen transkriptom verileri biyoinformatik analizlerle değerlendirilmiştir. Deseq2 aracılığıyla diferansiyel ekspresyonu değişen genler tespit edilmiştir. Soğuk stres koşullarında farklı ifade edilen genlerin tanımlanması amacıyla BLAST analizleri uygulanmış, genlerin biyolojik süreçleri, moleküler fonksiyonları ve hücresel bileşenleri Gen Ontolojisi (GO) analizleri ile incelenmiştir. Ayrıca metabolik yollar ve stres yanıt mekanizmalarının belirlenmesi için KEGG yolak analizlerinden yararlanılmıştır. GMATA yazılımı kullanılarak transkriptom verilerinden basit tekrar dizileri (SSR) belirlenmiş ve SSR primer tasarımları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların, dereotunda soğuk strese karşı gelişen moleküler savunma mekanizmalarının anlaşılmasına, gelecekte abiyotik stres toleransına yönelik genetik, moleküler ve markör destekli ıslah çalışmalarına katkı sağlaması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Abiyotik Stres, Biyoinformatik, Dereotu, Soğuk Stresi, SSR, Transkriptom Analizi

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF THE EFFECT OF COLD STRESS ON DILL (*Anethum graveolens* L.) mRNA TRANSCRIPTOME

Secde Nur SAFRAN

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ali Tefvik UNCU

2026, 84 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Ali Tefvik UNCU

Prof. Dr. Emrah TORLAK

Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

Dill (*Anethum graveolens* L.) is an important aromatic and medicinal plant belonging to the Apiaceae family, widely used in food, cosmetics, and pharmacology. Despite its economic and pharmacological importance, studies on the molecular responses of dill to abiotic stress conditions are quite limited. In particular, the physiological and genetic mechanisms that develop in response to cold stress have not been sufficiently investigated, and the number of studies conducted at the transcriptome level in dill is quite small. Therefore, this research was conducted to determine the transcriptomic changes in dill plants due to cold stress. In this context, dill was sequenced using short-read platforms, and the obtained transcriptome data were evaluated using bioinformatics analyses. Genes with altered differential expression were identified via Deseq2. BLAST analyses were applied to identify genes with differential expression under cold stress conditions, and the biological processes, molecular functions, and cellular components of the genes were examined using Gene Ontology (GO) analyses. Furthermore, KEGG pathway analyses were used to determine metabolic pathways and stress response mechanisms. Simple repeat sequences (SSRs) were identified from transcriptome data using GMATA software, and SSR primer designs were performed. The aim is for these results to contribute to understanding the molecular defense mechanisms that develop against cold stress in dill, and to future genetic, molecular, and marker-assisted breeding studies aimed at abiotic stress tolerance.

Keywords: Abiotic Stress, Bioinformatics, Cold Stress, Dill, SSR, Transcriptome Analysis

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her zaman destek olan, değerli bilgi, birikim ve tecrübeleriyle yol gösteren, bilimsel bakış açımı geliştirmeme katkı sağlayan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Ali Tefik UNCU'ya emekleri ve sabrı için teşekkür ederim. Değerli katkıları için tez jüri üyeleri Prof. Dr. Emrah TORLAK ve Prof. Dr. Önder TÜRKMEN hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde bana her konuda destek olan ve katkı sağlayan arkadaşım Şule ŞİRİN'e, bu süreçte her koşulda yanımda olup motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan canım arkadaşım Besna DALMIŞ'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen kıymetli babam Hüseyin SAFRAN'a, kıymetli annem Hatice SAFRAN'a, her konuda yanımda olup moral ve motivasyon sağlayan bir tanecik ablam Havva Nur BAĞÖNÜ'ne ve canım kardeşlerime teşekkür ederim.

Ayrıca, tüm bu süreçte her stresli anımda yanımda olan ve beni cesaretlendiren çok değerli arkadaşım Emin KASKAN'a teşekkür ederim.

Secde Nur SAFRAN
KONYA-2026

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Dereotu (<i>Anethum graveolens</i> L.).....	3
2.1.1. Dereotunun sınıflandırılması	4
2.1.2. Biyoaktif bileşenler ve besin öğeleri	5
2.1.3. Farmakolojik aktiviteler.....	6
2.1.3.1. Antioksidan etkisi	6
2.1.3.2. Antimikrobiyal etkisi	7
2.1.3.3. Antikanser ve antimutajenik etkisi	8
2.1.3.4. Antidiyabetik etkisi.....	9
2.1.3.5. Antihiperlipidemik etkisi	9
2.1.3.6. Anti-inflamatuar, analjezik ve antispazmodik etkiler.....	9
2.1.3.7. Diğer farmakolojik etkiler	10
2.1.3.8. Yan etkiler.....	10
2.1.4. Üretimi ve ekonomik önemi	10
2.1.5. Yetiştirilme şartları	11
2.2. Bitkilerde Abiyotik Stres Faktörleri	12
2.2.1. Soğuk stresi.....	13
2.2.2. Yapılan çalışmalar	14
2.3. SSR (Basit Dizi Tekrarları) / Mikrosatellit Markörleri ve Önemi	16
2.4. RNA Dizileme (RNA-Seq)	17
2.5. Veri Analiz Basamakları.....	21
2.5.1. Kalite kontrolü ve ham veri filtreleme.....	21
2.5.2. <i>De novo</i> transkriptom birleştirme	24
2.5.2.1. Trinity	24
2.5.2.2. rnaSPAdes.....	24
2.5.3. Transkriptom kalitesinin ve bütünlüğünün değerlendirilmesi	25
2.5.4. Transkript kümelemesi	26
2.5.5. Kodlayan bölge tahmini.....	26
2.5.6. Diferansiyel gen ifadesi analizi.....	27
2.5.7. Fonksiyonel anotasyon	27
2.5.7.1. Dizi benzerlik aramaları ve BLAST analizi	28
2.5.7.2. Gen ontolojisi (GO)	28
2.5.7.3. KEGG yolak analizi.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30

3.1. Dereotu Bitkisinin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulaması.....	30
3.2. Total RNA İzolasyonu	30
3.3. RNA Kalite Ölçümü	31
3.4. Kütüphane Hazırlığı ve RNA Sekanslama (RNA-Seq).....	31
3.5. Biyoinformatik Analiz	31
3.5.1. Ham veri kalite kontrolü ve filtreleme.....	32
3.5.2. <i>De novo</i> transkriptom birleştirme	32
3.5.3. Veri kalite ve bütünlük analizleri.....	32
3.5.4. Veri kümeleme Kalite kontrolü ve ham veri filtreleme	32
3.5.5. Kodlayan bölgelerin tahmini	32
3.5.6. Diferansiyel eksprese genlerin (DEG) tanımlanması	33
3.5.7. Veri tabanı oluşturma ve homoloji temelli benzerlik analizi.....	33
3.5.8. Gen ontolojisi (GO) analizi.....	33
3.5.9. Genlerin metabolik yol analizi (KEGG analizi)	34
3.6. SSR Markör Geliştirme	34
3.7. Proteinlerin Üç Boyutlu Homoloji Modellemesi.....	34
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Diferansiyel İfade Analizi Sonuçları	35
4.2. Homoloji Tabanlı Fonksiyonel Analiz Sonuçları	40
4.3. Gen Ontolojisi (GO) Sonuçları	49
4.4. KEGG Sonuçları	53
4.5. <i>A. graveolens</i> Transkriptomunda SSR MarkörlerinTespiti	55
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	59
5.1. Sonuçlar	59
5.2. Öneriler	59
KAYNAKLAR	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. a. Tohumlar b. Bitki c. Çiçek	3
Şekil 2.2. <i>A. graveolens</i> uçucu yağında bulunan bileşenlerin kimyasal yapısı.	5
Şekil 2.3. Abiyotik stres faktörleri.....	13
Şekil 2.4. RNA-Seq iş akışı	21
Şekil 2.5. <i>De novo</i> (referanssız) transkriptom veri analiz basamakları ve kullanılan araçlar	23
Şekil 4.1. Tespit edilen benzersiz proteinlerin fonksiyonel gruplara göre dağılım yüzdeleri.....	40
Şekil 4.2. DREB1D (A) ve CBF1 (B) proteinlerinin Swiss-Model tabanlı üç boyutlu (3D) homoloji modellemesi.....	43
Şekil 4.3. COR413-PM2 proteinin Swiss-Model tabanlı üç boyutlu (3D) homoloji modellemesi	44
Şekil 4.4. MAPK3 (A) ve MAPK6 (B) proteinlerinin Swiss-Model tabanlı üç boyutlu (3D) homoloji modellemesi	46
Şekil 4.5. CRPK1 proteininin Swiss-Model tabanlı üç boyutlu (3D) homoloji modellemesi	48
Şekil 4.6. İfadesi artan genlerin gen ontolojisi analizine ait biyolojik proses (BP), moleküler fonksiyon (MF) ve hücresel bileşen (CC) sonuçları.....	49
Şekil 4.7. İfadesi azalan genlerin gen ontolojisi analizine ait biyolojik proses (BP), moleküler fonksiyon (MF) ve hücresel bileşen (CC) sonuçları.....	50

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. <i>Anethum graveolens</i> L. Sistematigi	4
Çizelge 2.2. Ülkemizde yıllara göre dereotu üretimi	11
Çizelge 4.1. DESeq2 programı yukarı regüle olan genler	35
Çizelge 4.2. DESeq2 programı aşağı regüle olan genler	39
Çizelge 4.3. BLASTp analiz sonuçları	41
Çizelge 4.4. KEEG analizi sonucu tespit edilen yollar	54
Çizelge 4.5. 2-6 mer tarama aralığında tespit edilen SSR'ların istatistikleri	55
Çizelge 4.6. Tekrar motiflerinin SSR lokus sayıları	55
Çizelge 4.7. En çok tekrar eden SSR motifleri	56
Çizelge 4.8. 2-6 mer tarama aralığında en çok tekrar eden motif grupları	56
Çizelge 4.9. 3-mer tarama aralığında tespit edilen SSR'ların istatistikleri	57
Çizelge 4.10. En çok tekrar eden 3-mer SSR motifleri	57
Çizelge 4.11. 3-mer tarama aralığında en çok tekrar eden motif grupları	57
Çizelge 4.12. Analiz sonucu tespit edilen SSR markörlerinin primerleri ve ürün boyutu	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda sunulmuştur.

SİMGELER

°C	Santigrat derece
CO ₂	Karbondioksit
mL	Mililitre
mg	Miligram
NaCl	Sodyum klorür
NO	Nitrik Oksit
µL	Mikrolitre

KISALTMALAR

BLAST	Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
BP	Biyolojik Proses
CC	Hücresel Bileşen (Cellular Component)
DEG	Diferansiyel Ekspres Genler
GO	Gen Ontolojisi
HSP	Heat Shock Protein (Isı Şok Protein)
KEGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
Log2FC	Log2 Fold Change (Log2 Kat Değişimi)
MF	Moleküler Fonksiyon
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
PacBio	Pacific Biosciences
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
Pfam	Protein Aileleri Veritabanı (Protein families database)
qRT-PCR	Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
TF	Transkripsiyon Faktörü

1. GİRİŞ

Gıda güvenliği ve üretimi için en büyük risk faktörlerinden birisi her yıl etkileri daha belirgin hale gelen iklim değişiklikleridir. Genetik çeşitliliği azaltan, ürünlerin verimini düşüren dolayısıyla da ekonomi ve gıdaya ulaşım açısından zorluklara neden olan bu değişiklikler için önlem alınması gerekmektedir. Çünkü genetik çeşitliliğin azalmasıyla birlikte bitkilerin karşılaştığı abiyotik streslere karşı uyum yetenekleri de azalmaktadır. Bu stres faktörleri arasında özellikle soğuk stresi, bitkilerin büyüme, gelişme ve coğrafi dağılımını sınırlayan en önemli çevresel faktörlerden biridir. Soğuk stresi; hücre zarı akışkanlığının bozulması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi ve metabolik dengesizlikler gibi pek çok olumsuzluğa yol açarak bitki gelişimini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle bitkilerin abiyotik streslere maruz kaldığında verdiği cevapları anlamlandırmak moleküler açıdan oldukça önemlidir.

Yeni nesil dizileme teknolojileri ile yapılan transkriptomik analizler (RNA-seq), bitkilerin stres anında verdikleri toplam mRNA yanıtını (transkriptom) ortaya koyarak, adaptasyon mekanizmalarının moleküler düzeyde açıklanmasına katkı sağlamaktadır. Aromatik ve tıbbi bitkiler arasında önemli bir yere sahip olan dereotu (*Anethum graveolens* L.), hem gıda endüstrisinde hem de farmakolojik alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, dereotunun özellikle erken gelişim dönemlerinde maruz kaldığı soğuk stresi, ürün kalitesini ve toplam verimini ciddi oranda düşürmektedir. Buna rağmen, dereotunda soğuk stresine karşı gelişen moleküler yanıt mekanizmaları halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Yapılan tez çalışması kapsamında, dereotu transkriptomu RNA-seq teknolojisi kullanılarak sekanslanmış ve elde edilen veriler üzerinden diferansiyel gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu genlerin biyolojik rollerini ortaya koymak amacıyla BLAST tabanlı homoloji analizi, Gen Ontolojisi (GO) ve KEGG analizleri yapılarak fonksiyonel anotasyonları yapılmıştır. Bunun yanı sıra, elde edilen transkriptom verileri üzerinde GMATA yazılımı kullanılarak SSR bölgeleri belirlenmiş ve bu bölgelerden potansiyel moleküler markör tasarımı gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması, dereotunun soğuk stresine verdiği moleküler yanıtların ilk kez kapsamlı bir şekilde ortaya konulması, stres tolerans mekanizmalarının anlaşılması, verim ve kalite kayıplarının azaltılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlanması amacıyla yürütülmüştür. Ayrıca, elde edilen SSR bölgeleri üzerinden moleküler markör geliştirilerek, dereotunda genetik çeşitliliğin ortaya konulması ve

ileride yürütülecek ıslah çalışmalarına moleküler düzeyde katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Literatürde dereotunun soğuk stresine yönelik transkriptomik çalışmaların son derece sınırlı olması, bu tez çalışmasının özgün değerini ve önemini artırmaktadır. Elde edilen verilerin, bitkide stres kaynaklı verim ve kalite kayıplarının azaltılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesinde kullanılabilir nitelikte olması beklenmektedir. Ayrıca, bu çalışma kapsamında geliştirilen SSR belirteçleri dereotunda genetik çeşitliliğin ortaya konulmasına olanak sağlayarak, gelecekte yürütülecek ıslah çalışmalarına önemli bir moleküler altyapı sunmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Dereotu (*Anethum graveolens* L.)

Dereotu (*Anethum graveolens* L.), maydanozgiller (*Apiaceae/ Umbelliferae*) familyasına ait bir baharat bitkisi olup tipik bir dış çaprazlama türüdür ve diploid ($2n=22$) kromozom yapısına sahiptir (Amiri ve Joharchi, 2016; Ayhan ve Özel, 2017; Mandavia ve Tomar, 2019). Tek ya da iki yılda bir, otsu, tohumla çoğaltılan bu bitki *Anethum* cinsinin tek türüdür (Kadoglidou vd., 2023). *A. graveolens*'in genom büyüklüğü, kromozom düzeyinde gerçekleştirilen çalışma sonucunda 1.17 GB olarak belirtilmiştir (Y.-H. Wang vd., 2026). Dereotunun tohum, bitki ve çiçek yapıları Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. a. Tohumlar b. Bitki c. Çiçek (Shekhawat ve Jana, 2010)

Anavatanının Asya'nın batısı ve Avrupa'nın güneyi olduğu (Ayhan ve Özel, 2017), çok eski çağlardan beri yetiştirildiği bilinmektedir (Bailer vd., 2001). Aynı zamanda akdeniz bölgesinde de doğal olarak yetiştiği belirtilmiştir. Ancak günümüzde hemen hemen tüm Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri ve Akdeniz ülkeleri de dahil birçok ülkede yetiştirildiği bilinmektedir (Yaldiz vd., 2018).

A. graveolens'in sindirim hastalıkları, mide ağrısı, solunum problemleri, laktasyon yetmezliği, kolesterolün ve glikozun azaltılması gibi durumlarda kullanılması geleneksel bitkisel tıpta tavsiye edilmektedir (Goodarzi vd., 2016; Jalili vd., 2021). Günümüzde dereotunun hipolipidemik, antikanser, antidiyabetik, antispazmodik, antimikrobiyal, antifungal, antienflamatuar, antioksidan ajan ve kısırlığı önleyici farmakolojik etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (Chahal vd., 2017; Jalili vd., 2021). Ayrıca hazımsızlık ve şişkinlik giderici, süt salgısını uyarıcı ve analjezik ajan olarak kullanıldığı da belirtilmiştir (Manzuoerh vd., 2019).

Dereotu taze olarak tüketilmesinin yanı sıra tohumları baharat olarak, kurutulmuş yaprakları ise çşni ve çay olarak tüketilmektedir (Shekhawat ve Jana, 2010). Tohumları salatalık turşusunu tatlandırmak amacıyla turşu sanayisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Gıda endüstrisinde sebzeleri, ekmekleri, hamur işlerini, çorbaları, salata ve sosları da tatlandırmak ve baharatlamak için kullanılmaktadır. Bunu yanı sıra olgun tohumları parfümeri ve sabun yapımında, dereotu tohumu yağından elde edilen oleoresin ise sınırlı ticari öneme sahip infüzyon, tentür ve sıvı ekstraktlarında kullanılmaktadır (Small, 2006). Kısacası dereotu gıda, kozmetik, sağlık ve tıbbi amaçlarla kullanıldığından dolayı ticari olarak ve besin değeri açısından oldukça önemlidir (Deveci, 2022; Taddeo vd., 2017).

2.1.1. Dereotunun sınıflandırılması

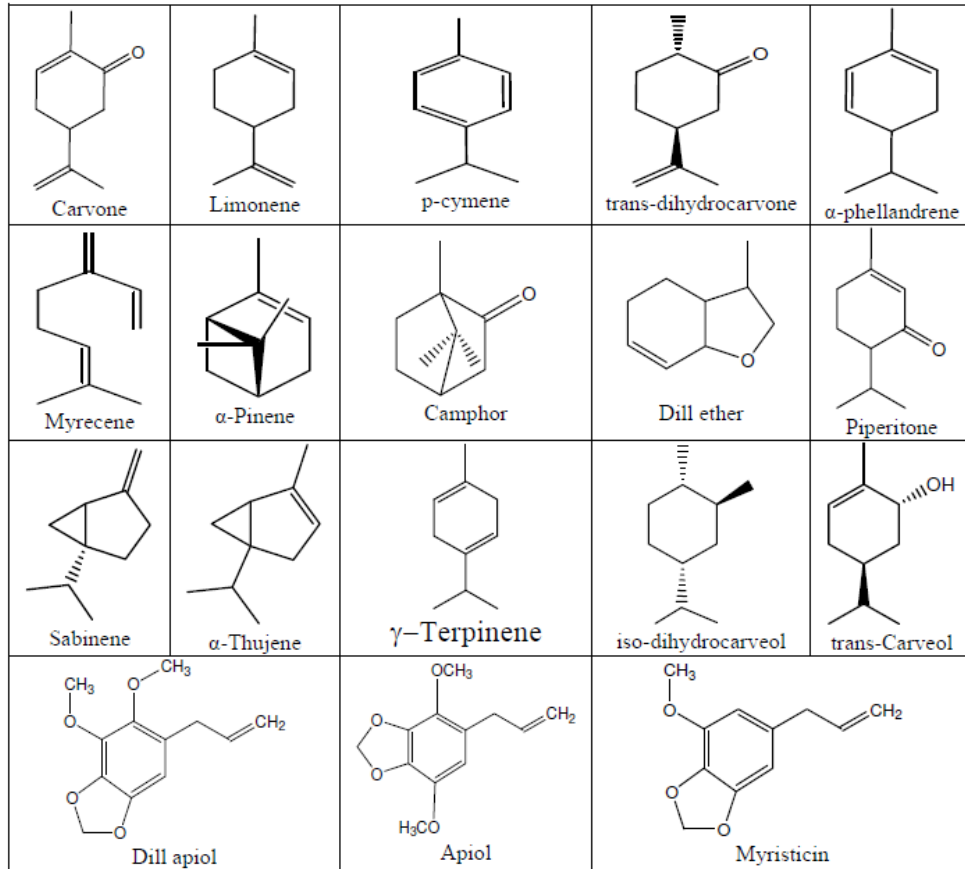
Dereotu, Apiaceae (Umbelliferae) familyasına ait tıbbi ve aromatik bir bitkidir (Ninou vd., 2017). Ailenin diğer üyeleri; frenk maydanozu, melekotu, kereviz, kimyon, kişniş, rezene, galbanum ve anasondur. Bu ailedeki bitkilerin sahip olduğu karakteristik keskin-aromatik koku genellikle içerdikleri uçucu yağ veya oleoresinden kaynaklanmaktadır (Amiri ve Joharchi, 2016). Çizelge 2.1’de dereotunun sınıflandırılması ayrıntılı şekilde gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. *Anethum graveolens* L. Sistematigi (Chahal vd., 2017)

Taksonomik Seviye	Sınıflandırma
Domain	Eukaryota (Ökaryotlar)
Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Apiales
Familya	Apiaceae
Cins	<i>Anethum</i>
Tür	<i>Anethum graveolens</i> L.

2.1.2. Biyoaktif bileşenler ve besin öğeleri

Dereotu yaprakları, uçucu yağ, yağ asitleri, vitamin, mineral, protein ve lif içeren önemli bir bitkidir (Deveci, 2022). Bitkinin yaprak ekstraktlarında 39'u birincil, 2'si ikincil olmak üzere toplam 41 metabolit tespit edilmiştir (Thanuma vd., 2025). Dereotunda %36 karbonhidrat, %15,7 protein, %14,8 lif, %9,8 kül ve %8,4 nem bulunmaktadır (Altameme vd., 2017; Deveci, 2022). Aynı zamanda fenolik asitler (klorojenik asit, vanilik asit, siringik asit, kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit), flavonol (kamferol, kuersetin ve rutin), flavon (apigenin, lutealin), flavanon (naringenin) gibi fenolik bileşikler, polifenoller, antioksidanlar, temel mineraller, folik asit, riboflavin, niasin, pantotenik asit, folat, A vitamini, C vitamini ve B6 vitamini içeren oldukça zengin bir kaynaktır (Fincan ve Çiftci, 2021; Kalangi vd., 2016). Dereotu eteri, karvon, limonen, apiol, trans-dihidrokarvon bitkide başlıca bileşenler olarak bulunurken gama-terpinen, m-simen ve miristisin minör bileşenler olarak bulunmaktadır (Babri vd., 2012). *A. graveolens* uçucu yağında bulunan bileşenlerin kimyasal yapısı Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. *A. graveolens* uçucu yağında bulunan bileşenlerin kimyasal yapısı (Chahal vd., 2017)

2.1.3. Farmakolojik aktiviteler

Anethum graveolens (dereotu), sahip olduğu fitokimyasal bileşenler sayesinde çok yönlü farmakolojik özellikler göstermektedir. Dereotu, yalnızca besin olarak değil, aynı zamanda çeşitli biyolojik etkileri nedeniyle de dikkat çeken bitkiler arasında yer almaktadır. Bu kapsamda dereotunun farmakolojik özellikleri birçok farklı başlık altında incelenmektedir.

2.1.3.1. Antioksidan etkisi

Antioksidanlar, oksitleyici zincir reaksiyonlarının başlatılmasını ya da yayılmasını engelleyip lipitlerin ve diğer moleküllerin oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddelerdir (Velioglu vd., 1998). Dereotu esansiyel yağlarının ve aseton ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin çeşitli testlerle incelenmesi sonucu orta ve ileri düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Singh vd., 2007). *A. graveolens*'in antioksidan aktivitesi daha çok fenolik bileşenlerden kaynaklanmakta olup serbest radikalleri absorbe etme ve etkisizleştirme, tekli ve üçlü oksijeni söndürme, peroksitleri ayrıştırma gibi önemli görevleri üstlenirler (Ozlman vd., 2021).

Dereotu çiçeği, tohumu ve yapraklarının antioksidan aktivitesi heksan, etil asetat, su, aseton ve etanol ekstraktlarında tespit edilmiştir (Isbilir ve Sagiroglu, 2011; Shyu vd., 2009). Bitkinin antioksidan aktivitesi değerlendirildiğinde tüm testlerde en yüksek antioksidan aktiviteyi çiçek ekstraktının gösterdiği saptanmıştır. Çiçek ekstraktları arasında en yüksekten en düşüğe doğru aktivite gösterenler ise sırasıyla etil asetat, etanol ve heksan ekstraktı olmuştur. Bu ekstrakttaki başlıca fenolik asit, flavonoid ve proantosiyaniidler sırasıyla klorojenik asit, mirisetin, pentahidroksiflavan olarak belirtilmiş ve korelasyon analizi sonucu bu bileşenlerin miktarı ile antioksidan aktivite arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir (Shyu vd., 2009). Ayrıca antioksidan aktiviteler ile beş (piridoksal, indol-3-laktat, adenin, inozin, folat) metabolit arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Buna karşın üç metabolit (β -hidroksibütirat, sellobiyoz, α -glukoz) ise antioksidan aktivitelerle negatif ilişki sergilemiştir (Thanuma vd., 2025). *A. graveolens* tohumlarından izole edilen kuersetin ve izoharmentin flavonoidleri antioksidan aktiviteye ve serbest radikallerle mücadele edebilme yeteneğine sahiptir (Shekhawat ve Jana, 2010).

Albino ratlar ile yapılan bir çalışmada dereotu etanol ekstraktının ratlarda artan serum enzimlerinin ve antioksidan enzimlerin aktivitesini geri kazandırdığı belirtilmiştir (Tamilarasu vd., 2012).

2.1.3.2. Antimikrobiyal etkisi

A. graveolens'in sulu ekstraktları, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* ve *Salmonella typhi* 'e karşı geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite göstermektedir (Arora ve Kaur, 2007). Ekstraksiyonun yüksek aktivitesi, polar fonksiyonel grup içeren aromatik çekirdeğe sahip dillapiyol ve anetol gibi ana bileşenlerin kimyasal yapısına dayandırılmaktadır (Shekhawat ve Jana, 2010).

A. graveolens'in tüm bitki ve uçucu yağları *E. coli*, *S.aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *P. Aeruginosa* patojen bakterilerine karşı antibakteriyel açıdan aktiftir. Bitkinin tohum uçucu yağlarının gram-pozitif (*S. epidermis*, *E. faecalis*) ve gram- negatif (*P.aeruginosa*) bakterilere karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Ancak gram- negatif bakterilerin gram-pozitif bakterilere göre daha yüksek inhibisyon oranına sahip olduğu bildirilmektedir. Bu antibakteriyel aktivitedeki farklılık test edilen bakteri suşları, farklı konsantrasyonlar ve uçucu yağların ana bileşenleri ile ilgilidir (Ozliman vd., 2021).

Ayrıca *A. graveolens* uçucu yağının gram-negatif (*E coli*, *S. typhi* ve *S. Dysenteriae*) ve gram pozitif (*B. cereus*, *S. aureus*, *S. faecium*) bakteriler üzerindeki antibakteriyel aktivitesinin konsantrasyona bağlı olarak artmakta olduğu ve bakteriler üzerinde tetrasikline göre daha düşük, kloramfenikole göre daha yüksek inhibitör etki gösterdiği de belirtilmektedir (Kaur vd., 2021).

Dereotu yağının *Yersinia enterocolitica*'ya karşı güçlü antibakteriyel etki göstermesinin yanı sıra, *Geotrichum candidum* ve *Rhodotorula glutinis*'e karşı güçlü bir antifungal etki gösterdiği de bildirilmektedir (Elgayyar vd., 2001). Ayrıca bitkinin uçucu yağlarının *Candida albicans*, *Penicillium islandicum* ve *Aspergillus flavus*'a karşı antifungal açıdan aktif olduğu belirtilmektedir. D-limonen ve D-karvon'un *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans*'a karşı güçlü antifungal aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Altameme vd., 2017). Dereotu yağı, *Fusarium graminearum*'a karşı %100 antifungal aktivite göstermekte ve *Penicillium citrinum*'un büyümesini kontrol etmektedir (Singh vd., 2005).

Dereotu esansiyel yağının başta *E. Coli* olmak üzere çeşitli mikroorganizmalara karşı yüksek antimikrobiyal aktivitesinin karvondan kaynaklandığı düşünülmektedir (Milenković vd., 2024; Stanojević vd., 2016). Ayrıca yapılan çalışmalar karvon ve limonen açısından zengin dereotu esansiyel yağlarının yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmektedir (Kaur vd., 2021). Bazı yazarlar ise antimikrobiyal aktiviteleri bu bitkideki furanokumarin bileşiğine atfetmektedir (Altameme vd., 2017).

2.1.3.3. Antikanser ve antimitojenik etkisi

A. graveolens'in potansiyel antikanser aktivitesi, çeşitli kanser hücre hatlarında ve hayvan kanser modellerinde araştırılmıştır. Bitkinin metanol ekstraktlarının insan mide kanseri (MK-1), insan rahim ağzı kanseri (HeLa) ve fare deri kanseri (B16F10) hücre hatlarında hücre çoğalmasını inhibe ettiği (Nokano vd.,1998), fare lösemi hücrelerine (L1210) karşı ise sitotoksik/antikanser aktivite sergilediği (Goun vd., 2002) bildirilmiştir. Dahası dereotunun metanolik ekstraktının meme (MCF-7), akciğer (A-549), rahim ağzı kanseri hücre hatlarında antikanser/sitotoksik potansiyel gösterdiği, özellikle MCF-7 hücrelerinde oksidatif stresi artırarak ve kaspaz enzimlerini (kaspaz-3 ve 9) aktive ederek hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (Al-Oqail ve Farshori, 2021).

Dereotu uçucu yağının insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) sitotoksik etkisi olduğu (Sharopov vd., 2013), insan karaciğer kanseri hücre hattında (HepG2) ise hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Al-Sheddi vd., 2019). Yapılan araştırmalar *A. graveolens*'te bulunan apigenin, krizin, luteolin, mirisetin, naringenin, skutellarein gibi fitokimyasalların bazı hepatoprotektif etkiye sahip olmaları nedeniyle bitkinin karaciğer kanserine karşı bitkisel bir ilaç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Mohammed vd., 2018; Sathya ve Gopalakrishnan, 2013). Bitkinin, insan yumurtalık kanseri hücre hattında DNA hasarı oluşturmada sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Ekin vd., 2024).

A. graveolens yağının sitotoksik etkisinin büyük ihtimalle karvon ve limonen bileşiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İnsan lösemi hücre hattında (HL-60) reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artıran ve mitokondri membran potansiyellerini düşürerek apoptozu indükleyen bileşenlerin D-limonen ve d- karvon olduğu bildirilmiştir (Sharopov vd., 2013).

2.1.3.4. Antidiyabetik etkisi

Tip 2 diyabetli hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmalar *A. graveolens* takviyesinin insülin duyarlılığını iyileştirdiği, toplam kolestrol ve LDL-C konsantrasyonlarında anlamlı bir düşüşe neden olduğu bildirmiştir (Mobasseri vd., 2014). Yapılan hayvan çalışmalarında ise, *A. graveolens*'in alloksan ile indüklenmiş diyabetik sıçan modellerinde kan glukoz seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (Ahmady vd., 2005). Ayrıca dereotu yaprağı ekstraktının, dişi sıçanlarda kortikostereoid kaynaklı tip 2 diyabeti düzenlediği belirtilmiştir. Bu ekstraktın deksametazonun sıçanların karaciğerinde yaptığı değişiklikleri tersine çevirdiği; kan şekeri ve insülin seviyelerini dengelediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar *A. graveolens* yaprak ekstraktının, herhangi bir hepatotoksik etki yaratmadan, özellikle steroid kaynaklı diyabet vakalarında diyabeti düzenleme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Panda, 2008).

2.1.3.5. Antihiperlipidemik etkisi

Diyabetik ve lipidemik sıçan modelleriyle yapılan iki farklı çalışmada, *A. graveolens* ekstraktlarının total kolestrol (TC), trigliserid (TG), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyesini artırdığı gözlemlenmiştir (Ahmady vd., 2005; Yazdanparast ve Bahramikia, 2008). *A. graveolens*'in antihiperlipidemik etkisinin, kolestrolü düşürmede önemli bir rol oynayan d-limonen bileşeninden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca dereotundaki polifenol, C vitamini ve karotenoidler gibi antioksidan bileşenlerin de bitkinin kan lipidini düşürme aktivitesine katkı sağlayabileceği belirtilmiştir (Sadeghi vd., 2022).

2.1.3.6. Anti-inflamatuar, analjezik ve antispazmodik etkiler

A. graveolens tohumunun hidroalkolik ekstraktının sıçanlarda iltihaplanma ve ağrıda önemli bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Valadi vd., 2010). Deretounun uçucu yağ ve ana bileşenlerinin anti-inflamatuar aktivitesinin, indüklenbilir nitrik oksit (NO) sentaz ekspresyonunu inhibe ederek NO aşırı üretimini önlemesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu etkide, ana bileşenlerden sabinen ön plana çıkmış ve en yüksek anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Kazemi, 2015). Ayrıca dereotu meyvesinin hidroalkolik ekstraktının, sıçan ince bağırsaklarında güçlü antispazmodik aktivite sergilediği gözlemlenmiştir (Naseri ve Heidari, 2007).

2.1.3.7. Diğer farmakolojik etkiler

A. graveolens üzerine yapılan çalışmalar, bitkinin uçucu yağları ve ekstraktlarının geniş bir biyolojik aktiviteye sahip olduğunu bildirmektedir. Bitkinin *C. maculatus*, *P. americana*, *M. domestica*, *T. castaneum* ve *T. confusum*'a karşı insektisidal etkisi olduğu rapor edilmiştir (Babri vd., 2012; Ebadollahi vd., 2012; Khani, 2013). Bunun yanı sıra, hayvan çalışmalarında anti-stres ve bilişsel fonksiyonları destekleyici etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Koppula ve Choi, 2011).

Üreme sistemi üzerinde uterus kasılmalarını modüle edici (Zagami vd., 2012), gastrointestinal sistem üzerinde antiülser ve antisekretuar (Hosseinzadeh vd., 2002) etkiler gösterdiği vurgulanmaktadır. Ayrıca diüretik (Mahran vd., 1992) aktivite ve farklı fizyolojik sistemler üzerinde sahip olduğu düzenleyici etkiler de literatürde bulunmaktadır.

2.1.3.8. Yan etkiler

Yapılan klinik çalışmalar *A. graveolens*'in herhangi bir yan etkisini rapor etmemiştir (Kojuri vd., 2007; Mansouri vd., 2012; Mirhosseini vd., 2014; Rashidlamir vd., 2012). *A. graveolens*'in güvenli olduğu ancak nadir de olsa alerjik reaksiyon, kusma, ishal, ağız kaşıntısı, ürtiker, dil ve boğaz şişmesi gibi etkilere neden olabileceği bildirilmektedir (Al-Snafi, 2014).

2.1.4. Üretimi ve ekonomik önemi

A. graveolens'in de içinde bulunduğu apiaceae familyasına ait türlerin bolluğu açısından dünyadaki en önemli ilk üç ülke Çin, Türkiye ve İran'dır (Ajani vd., 2008). Dereotu, dünyada en fazla ticareti yapılan tıbbi ve aromatik bitkiler arasındadır. Hindistan ve Pakistan en önemli üreticileridir (Yaldiz vd., 2018). Avrupa'da dereotu tarımının daha çok uçucu yağ elde etmek amacıyla yapıldığı bildirilmiştir (Bezli, 2020). Uçucu yağ açısından en çok üretildiği ülke Macaristan iken (Small, 2006; Yaldiz vd., 2018) Almanya, Hollanda, Rusya, İsveç ve Güney Amerika'da da aynı amaçla kullanılmaktadır (Bezli, 2020). Aynı zamanda dünyadaki yıllık uçucu yağ üretiminin %10-15'ini Kanada karşılamaktadır. Kalite açısından ise en çok Mısır, Fiji, Meksika, Hollanda, ABD, İngiltere, Macaristan ve Almanya'da üretilmektedir. Macaristan, ABD ve Bulgaristan (20 ton) dereotundan esansiyel yağ üreten öncü ülkelerdendir (Small, 2006; Pulur, 2012; Yaldiz vd., 2018).

Ülkemizde ise en büyük dereotu ekim alanları Akdeniz Bölgesi'nde (4113 da), en küçük dereotu ekim alanları Güneydoğu Anadolu'da (10 da) bulunmaktadır. Akdeniz Bölgesi (4061 ton) ve Marmara Bölgesi (1639 ton) dereotu bitkilerinin başlıca üreticileri iken Ege (671 ton), İç Anadolu (495 ton) ve Karadeniz (314 ton) bölgeleri de en çok üreten bölgelerdendir. Doğu Anadolu (25 ton) ve Güneydoğu Anadolu (3 ton) ise en az üretim yapan bölgelerdir (Yaldiz vd., 2018).

Türkiye'de en fazla dereotu üreticiliği yapan ilk 10 ilimiz sırasıyla Hatay, Bursa, Balıkesir, İzmir, Eskişehir, Ankara, Muğla, Tokat, Samsun ve Aydın'dır (Yaldiz vd., 2018). Ülkemizde yıllara göre dereotu üretimi Çizelge 2.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Ülkemizde yıllara göre dereotu üretimi (TÜİK)

Üretim yılı	Üretim miktarı (ton)
2020	8,267
2021	10,432
2022	10,229
2023	14,470
2024	15,048
2025	15,450

Çizelge 2.2'de sunulan verilere göre Türkiye'deki dereotu üretim miktarı 2022 yılındaki kısmi düşüş hariç tutulduğunda genel bir artış eğilimi sergilemiş ve üretim hacmi 2025 yılı itibarıyla 15.450 tona ulaşmıştır.

2.1.5. Yetiştirilme şartları

Dereotu ılık ve sıcak iklim bitkisidir (Deveci, 2022; Shekhawat ve Jana, 2010). Yetiştirirken tam güneş ve 6-26 °C arasında sıcaklık gereklidir. Ürün kalitesinin yüksek olması için uzun günlere ihtiyaç duyulmaktadır (Small, 2006). Çoğu sebze de görüldüğü gibi koşullar belirli sıcaklıkların altında olduğunda dereotunda hasar oluşmaktadır (Deveci, 2022; Shekhawat ve Jana, 2010). Bu nedenle soğuk bölgelerde ekimi örtü altında yapılmalıdır (Bezli, 2020). İlkbahar ve sonbahar aylarında havalar ılıman olduğundan dolayı genelde tercihen açıkta yetiştirilmektedir. Nem oranı yüksek bölgeler dereotu yetiştiriciliği için daha uygun ortamlardır (Deveci, 2022; Shekhawat ve Jana, 2010).

Dereotunun sıcak havaya maruz kalması bitkinin çiçek açmasına buna bağlı olarak da yaprak üretiminin azalmasına sebep olur. Bu nedenle kuru dönemlerde sulama yapılmalıdır. Ek su, fide aşamasından bitkilerin boyu neredeyse 60 cm yüksekliğe ulaşınca kadar üstten yağmurlama olarak verilmelidir. Sonrasında, havadaki su

damlacıklarının nemli tohum başlarında küf oluşma riskini artırmasından dolayı karık sulamasına geçilmelidir. Düşük nem, dolu, kuvvetli rüzgarlar ve sert yağmurlar gibi abiyotik streslerin çiçeklenme ve tohumlanma sırasında meydana gelmesi bitkiye zarar vermektedir (Small, 2006).

Dereotu için genellikle besin maddeleri açısından zengin, iyi drene edilmiş gevşek topraklar ve tam güneş tercih edilmektedir. Toprak pH'ının 5.3-7.8 aralığında ve kireç bakımından zengin olması aroma ve eterik yağ açısından zengin dereotunun yetiştirilmesine olanak vermektedir (Deveci, 2022; Shekhawat ve Jana, 2010). Ekim yapılmadan önce tarla iyi bir şekilde hazırlanmalı ve yabancı otlar temizlenmelidir. Tarlaya 3-5 ton arasında çiftlik gübresi atılarak derin sürüm yapılmalıdır (Bezli, 2020). Azot ve fosforlu gübre seviyeleri yağ içeriğini ve toplam dereotu verimini etkilemektedir (Small, 2006).

Dereotu tohumları 5-10 mm derinliğe ekilmelidir (Small, 2006). Sonrasında toprak nemini korumak ve tohumun toprakla temasını sağlamak amacıyla üzerine bastırılmalı ve sulama gerçekleştirilmelidir. Uygun koşullar altında 7-21 gün sonra tohumların çimlenerek filizlenmeye başladığı görülmektedir (Bezli, 2020). Çimlenme için biraz ışık gereklidir ve en iyi sıcaklık 15-21°C arasındadır (Small, 2006).

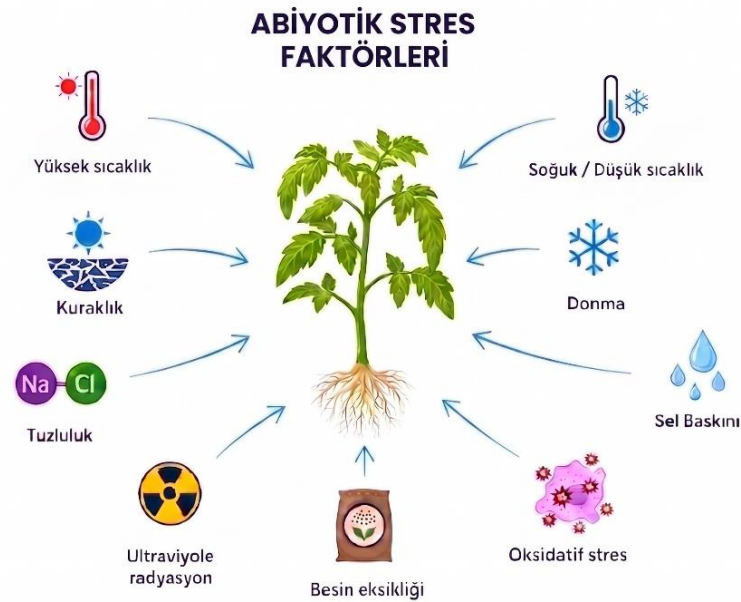
Bu bitki yetiştirilirken birçok sorunla karşı karşıya kalınmaktadır. Bunlardan biri bitkinin topraktan çıkışı esnasında karşılaştığı danaburnu ve toprak kurtlarıdır. Bir diğer ciddi sorun ise yabancı otlardır ve bu sorun yaygın olarak herbisit kullanılarak çözülmektedir. Ek olarak, dereotu ile kişniş birlikte ekildiğinde haşere kontrolünün sağlandığı bildirilmektedir (Deveci, 2022; Shekhawat ve Jana, 2010).

2.2. Bitkilerde Abiyotik Stres Faktörleri

Bitkinin metabolizmasını, büyümesini veya gelişimini olumsuz etkileyen ya da kısıtlayan her türlü elverişsiz koşul ya da madde 'bitki stresi' olarak tanımlanmaktadır (Lichtenthaler, 1996). Stres, gen ifadesinin değişmesi, hücresel metabolizmanın farklılaşması, büyüme hızının düşmesi, ürün veriminin azalması gibi çeşitli bitkisel tepkileri tetiklemektedir (Verma vd., 2013). Bitki stresi, temel olarak biyotik ve abiyotik faktörler olmak üzere iki ana kategoride incelenmektedir. Biyotik stresler arasında mikroorganizmalar, zararlılar ve yabancı otlar gibi canlı organizmalar yer alırken; abiyotik stresler arasında soğuk, sıcak, tuzluluk, kuraklık, sel, besin eksikliği ve ultraviyole

radyasyon dahil olmak üzere yüksek ve düşük ışık yoğunlukları gibi çevresel etmenler yer almaktadır (Francini ve Sebastiani, 2019; Kranner vd., 2010).

Abiyotik stres, bitkilerin büyüme ve verim performansını doğrudan etkileyen morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde olumsuz bozulmalara yol açmaktadır. Bitkiler, abiyotik strese karşı moleküler, hücresel ve fizyolojik düzeyde çeşitli değişiklikler başlatarak strese tepki vermeyi ve uyum sağlamayı amaçlamaktadır. Özellikle kuraklık, tuzluluk, sıcaklık değişimleri ve besin yetersizliği gibi abiyotik stres faktörleri, bitkilerin su ve besin alımını sınırlandırarak büyüme süreçlerini ve mahsul verimliliğini olumsuz yönde etkilemektedir (Yadav vd., 2020). Abiyotik stres faktörleri Şekil 2.3'te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Abiyotik stres faktörleri (Created with BioRender.com)

2.2.1. Soğuk stresi

Soğuk stresi, bitki büyümesini durdurmak için gerekli olan optimum sıcaklığın altındaki aralık olarak tanımlanmaktadır. Bu stres; donma ($<0\text{ }^{\circ}\text{C}$), soğutma ($0-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve alt optimum (büyüme sınırından optimuma) koşullar olmak üzere bitki yetiştiriciliği için yaygın olan üç sıcaklık bölgesi ile karakterize edilmektedir (Kazemi-Shahandashti ve Maali-Amiri, 2018; Soualiou ve ark., 2022; Zhu ve ark., 2007). Soğuk stresi bitkilerin büyümesini, gelişmesini, coğrafi dağılımını ve tarımsal verimliliğini sınırlamaktadır (Adhikari ve ark., 2022; Ritonga ve Chen, 2020; Zhu ve ark., 2007). Soğuk stresinin bitkilere karşı etkilerinin şiddeti birçok faktöre bağlıdır. Bunlar bitkinin türü, kökeni

(ılıman/tropikal), organları (sürgün/kök), büyüme aşaması (vegetatif/üreme), stresin süresi ve diğer çevresel faktörlerdir (Soualiou ve ark., 2022).

Bitkinin üreme gelişimi sırasında soğuk stresine maruz kalması çiçek dökülmesi polen kısırlığı, polen tüpü bozulması, ovul düşmesi ve meyve setinin azalmasına sebebiyet vererek verimi düşürmektedir (Thakur ve ark., 2010). Soğuk stresi, su rejimini, mineral besin dağılımını, fotosentezi ve solunum hızını da değiştirmektedir. Klorofil yıkımına ve PSII'nin maksimum kuantum verimine neden olarak fotosentez gibi bazı hayati süreçleri olumsuz etkilemektedir. Ayrıca toplam çözünür protein içeriği birikimine, elektrolit sızıntısına, peroksidaz aktivitesine, protein bozulmasına ve ROS içeriğinin artmasına sebebiyet vermektedir. Tüm bu etkilerin sonucu olarak yaprak genişlemesi azalır, solma, kloroz, nekroz, zayıf çimlenme, sersemlemiş fide ve üreme organlarında hasarlar görülür (Ghassemi ve ark., 2021; Mahajan ve Tuteja, 2005).

2.2.2. Yapılan çalışmalar

Dar ve ark. yaptıkları çalışmada havuca soğuk stresi uygulayarak belirli genlerin ekspresyon seviyelerini incelemiştir. Siyah havuç ve mor kırmızı havuç tohumları sterilize edilerek 15 gün boyunca kuluçka makinesinde 28 °C'de çimlendirilmiştir. Çimlenen fideler 12 saat, 4 °C'de soğuk stresine tabi tutulmuştur. Aynı tohumların farklı bir grubu saksılarda kontrol şartları altında ekilmiştir. Kontrollü büyüme koşullarında yetiştirilen on iki haftalık havuç genotiplerinden bir grup 24 saat 4 °C soğuk stresin maruz bırakılırken diğer gruba stres uygulanmamıştır. Yapılan qRT-PCR sonuçlarında *MYB-6* geninin gen ekspresyonunun *GAPDH*'a göre stres uygulanmayan genotiplere kıyasla soğuk stresi uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. *LDOX-1* geninin ekspresyon seviyelerinin soğuk stresi uygulanan bitkilere kıyasla stres uygulanmayan bitkilerde daha düşük olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışma neticesinde araştırmacılar, antosiyanin biyosentetik yol genlerinin (*MYB6* ve *LDOX-1*) 12 saat 4°C soğuk stresinde tüm genotiplerde ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde artırdığını göstererek bu iki genin antosiyaninlerin biyosentezinde aktif rol oynadığı sonucuna varmasına neden olmuştur (Dar vd., 2022).

Li ve ark. yaptıkları çalışmada dereotu ile aynı familyadan olan maydanozu çeşitli abiyotik streslere maruz bırakarak sekiz aday geni (*elF-4a*, *SAND*, *UBC*, *TIP41*, *GAPDH*, *ACTIN*, *EF-1a*, *TUB*) incelemiştir. Bu çalışmada kıvrıkcık maydanoz tohumları uygun ışık yoğunluğunda, 16 °C'de 8 saat gece ve 25 °C'de 16 gündüz kontrollü büyüme

odasında plastik saksılarda yetiştirilmiştir. 8 haftanın sonunda sağlıklı fideler çeşitli stres uygulamalarında kullanılmıştır. Soğuk ve sıcak stresleri için fideler 4 °C ve 38 °C'deki büyüme odalarında 2 saat tutulmuştur. Sonrasında geNorm, NormFinder, Bestkeeper ve RefFinder yazılımları kullanılarak sekiz aday referans genin stabilitesini analiz etmişlerdir. Soğuk stresinde en stabil genler geNorm analizleri sonucu *GAPDH* ve *elF-4α*, Normfinder'a göre *elF-4α* ve *TUB* olarak belirlenmiştir. BestKeeper analiz sonucuna göre ise yine *elF-4α* soğuk stresinde en kararlı gen iken RefFinder analizi sonuçlarında abiyotik streslerde en kararlı genler *EF-1α* ve *TUB* aday genleri olarak bulunmuştur. Böylece araştırmacılar çalışmalarının neticesinde *EF-1α* ve *TUB* genlerini abiyotik stresler altında en uygun genler olabileceğini ve çalışmada uygulanan tüm koşullar altında kullanılabileceğini belirtmişlerdir (M.-Y. Li vd., 2016).

Duan ve ark. kerevizde NAC transkripsiyon faktörlerini genom çapında analiz etmek ve çeşitli abiyotik streslere yanıtlarını incelemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bazı NAC TF genlerinin ekspresyon seviyeleri yaralanma, soğuk, susuzluk ve şok gibi abiyotik streslerden etkilendiği için kerevizde farklı stres koşulları altında NAC'ın tepkisini incelemek amacıyla stres ve gelişim aşamasıyla ilişkili olabileceğini düşündükleri on dokuz aday geni seçmişlerdir. Kereviz tohumları çimlendirilip yapay iklim odasında uygun ışık yoğunluğu kullanılarak %75 bağıl nem ile 16 saat gündüz 25 °C'de, 8 saat gece 16°C'de yetiştirildikten sonra çeşitli streslere maruz bırakılmıştır. Soğuk stresine maruz bırakmak için 4 °C'deki büyüme odasına yerleştirilip kontrol ve stres gruplarının yaprakları, yaprak sapları ve kökleri toplanmıştır. Ardından bitkinin tepesindeki üçüncü ve dördüncü yapraklar 1,2,4,8 ve 24 saatlik muamelede toplanmıştır. Soğuk stresine uzun süre maruz kalan kerevizlerde *AgNAC5*, *AgNAC47*, *AgNAC54*, *AgNAC63* ve *AgNAC87* genlerinin ekspresyon seviyeleri ilk aşamada artmış, 4. saatte ise zirve yapmıştır. Daha sonra ekspresyon düzeyleri hemen azalmış ve soğuk stresinin geç aşamasında artmıştır. *AgNAC92* geninin ekspresyon seviyesi 8. saatte artmış ve kontrol grubundan 74,13 kat daha yüksek çıkmıştır. *AgNAC82*, *AgNAC87* ve *AgNAC111*' in 4. saatteki ekspresyon seviyeleri ise oldukça yüksek çıkmıştır (Duan vd., 2020).

Tian ve ark. yaptıkları çalışmada havuçtan dokuz aday referans gen (*GAPDH*, *ACTIN*, *elF-4α*, *PP2A*, *SAND*, *TIP41*, *UBQ*, *EF-1α*, *TUB*) klonlayarak bitkileri çeşitli abiyotik streslere ve hormon uyarılarına maruz bırakmıştır. Havuç tohumları uygun ışık yoğunluğu ve %60 bağıl nemde 25 °C'de 16 saat gündüz, 16 °C'de 8 saat gece yapay iklimlendirme odalarında yetiştirilmiştir. Ardından sekiz haftalık fidelere ışık inkübatörü

kullanılarak 2 saat boyunca 4 °C’de soğuk stresi uygulanmıştır. Daha sonra aday referans genlerin ekspresyon stabilitesini hesaplamak amacıyla geNorm, NormFinder ve BestKeeper yazılımlarını kullanmışlardır. Soğuk stresinde geNorm analizinde kullanılabilecek en kararlı iki gen *ACTIN* ve *UBQ* genleridir. NormFinder ve BestKeeper tarafından beşinci ve altıncı sıraya yerleştirilip tercih edilen referans genin *ACTIN* olabileceği düşünülmüştür. *UBQ*, NormFinder’da soğuk stresi altında en stabil referans gen olarak belirlenirken BestKeeper’da bir varyasyon göstermiştir. BestKeeper tarafından *SAND* en stabil gen olarak sıralanmıştır. Araştırmacılar bu sonuçlardan yola çıkarak, soğuk stresinde normalizasyon için referans genlerin en iyi kombinasyonunun *ACTIN* ya da *GAPDH* ile kombine edilmiş *UBQ* olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmalarının tek bir genin tüm hücre tiplerinde, tüm deneysel koşullarda stabil bir şekilde eksprese edilemeyeceğini kanıtladığını söylemişlerdir (Tian vd., 2015).

Chen ve ark. üç kereviz çeşidinden (Liuhe Huangxinqin, Jinnan Shiqin ve Ventura) *Agmt2* genini klonlamış ve çeşitli abiyotik streslere (tuz, kuraklık, soğuk, sıcak) maruz bırakarak genin yanıtını incelemiştir. Her üç kerevizde kontrollü büyüme odasında 25 °C’de 16 saat gündüz ve 16 °C’de 8 saat gece yetiştirilmiştir. Abiyotik stresler uygulanırken 2 aylık fideler kullanılmış ve 4 °C’ de soğuk stresine, 38°C’de sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. Genç yapraklı örnekler 0, 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde toplanmıştır. Uygulanan abiyotik stresler, üç kereviz çeşidinde *Agmt2* gen ekspresyonunda farklı sonuçlara sebebiyet vermiştir. Jinnan Shiqin’de *Agmt2* geninin ekspresyon seviyesinin uygulanan tüm abiyotik streslerde azaldığı görülmüştür. Liuhe Huangxinqin’de *Agmt2* geninin ekspresyon seviyesinin soğuk, tuz ve kuraklık streslerinde azaldığı tespit edilmiştir. Ventura’da ise *Agmt2* geninin ekspresyon seviyesinin uygulanan tüm abiyotik streslerde indüklendiği gözlemlenmiştir. Bu çeşitteki *Agmt2* geninin göreceli ekspresyon miktarları başlarda soğuk, sıcak ve kuraklık streslerinde 1 ve 2 saat sonra arttığı ve ardından azaldığı görülmüştür. 24 saat sonra *Agmt2* geninin tekrar arttığı tespit edilmiştir (Y.-Y. Chen vd., 2015).

2.3. SSR (Basit Dizi Tekrarları) / Mikrosatellit Markörleri ve Önemi

SSR markörleri, bitki genetiği ve ıslahında oldukça önemlidir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun en büyük nedeni, yüksek değişkenlik, çok çeşitlilik, multi-alelik doğası, ko-dominant kalıtım, tekrarlanabilirlik, genomda fazla miktarda bulunma, geniş

genom kapsamı (mitokondri ve kloroplast genomları dahil) ve yüksek verimli genotiplendirme gibi avantajlı birçok özelliğe sahip olmasıdır (Parida ve ark., 2009).

Prokaryot ve ökaryotlarda oldukça yaygın olan SSR'lar, 1-6 baz çifti uzunluğunda olup bir ya da birkaç bazın art arda tekrarlanmasıyla oluşmaktadır (Victoria ve ark., 2011). SSR'lar hem kodlanan hem de kodlanmayan gen bölgelerinde nükleer genom boyunca dağılmış halde bulunmasının yanı sıra kloroplastik ve mitokondriyal genomlarda da bulunabilmektedir. SSR bölgelerindeki farklı tekrarların bir sonucu olarak yüksek uzunlukta polimorfizm oluşmaktadır. Bu sayede PCR reaksiyonu kullanılarak kolay ve tekrarlanabilir olarak tespit edilebilmektedirler (Kalia ve ark., 2011).

SSR marköründe içinde bulunduğu DNA temelli markörler, tohum koleksiyonları ve ıslah yapılan hatlardaki çeşitliliği tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır (Varshney ve ark., 2006). SSR markörü yüksek verimli genotiplemeye müsaittir ve yabani türlerde genetik uzaklık temelinde çeşitlilik çalışmaları yapmada, kültüre alınan bitkilerin bağlantı haritalarını oluşturmada, gen akışı ve krossing-over oranını tahmin etmede, babalık ve parmak izi analizlerinde, yüksek çözünürlükleri genom haritalarının oluşturulmasında, genotipler arası akrabalık derecesini belirlemede ve evrimsel ilişkilerin kurulmasında kullanılan oldukça değerli bir markördür (Jonah ve ark., 2011; Kalia ve ark., 2011).

2.4. RNA Dizileme (RNA-Seq)

Transkriptom, bir hücrenin belirli bir fizyolojik durum ya da gelişim aşamasındaki tüm transkriptlerinin ve miktarlarının tamamını ifade eder. Genomun işlevsel kapasitesinin yorumlanması, hücre ve dokuların moleküler bileşenlerinin belirlenmesi, gelişim ve hastalıkların aydınlatılması için transkriptomun anlaşılması kritik öneme sahiptir (Z. Wang vd., 2009). Bu bağlamda transkriptomik biliminin temel hedefi (Z. Wang vd., 2009):

- mRNA'lar, ncRNA'lar ve sRNA'lar da dahil olmak üzere tüm transkript türlerini kapsayan bir katalog oluşturmak;
- Genlerin transkripsiyonel yapısını; başlangıç bölgeleri, 5' ve 3' uçları, ekleme modelleri ve diğer post-transkripsiyonel modifikasyonları yönünden karakterize etmek;
- Her transkriptin gelişim sırasında ve farklı koşullar altındaki değişen ifade seviyelerini belirlemektir.

Bu hedefler doğrultusunda, transkriptomu belirlemek ve ölçmek için hibritleme ve dizi tabanlı yaklaşımları da içeren çeşitli teknolojiler ortaya çıkmıştır (Z. Wang vd., 2009).

RNA-seq, yüksek verimli dizileme teknolojilerini kullanarak transkriptomun hem nicel hem de nitel olarak incelenmesine imkan veren modern bir dizileme yöntemidir (Z. Wang vd., 2009). Bu modern dizileme tabanlı yaklaşımları anlamak için, onların temelini oluşturan dizileme yaklaşımlarının bilinmesi gerekmektedir.

Dizileme teknolojilerinin gelişimi, Sanger dizileme yöntemi ile başlamıştır (Metzker, 2010). Sanger ve Maxam-Gilbert tarafından geliştirilen dizileme yöntemleri ‘birinci nesil’ dizileme yöntemleri olarak kabul edilmektedir (Mandlik vd., 2024). Sanger yöntemi, dideoksi nükleotidlerin (ddNTP’ler) zincir sonlandırıcı olarak kullanılarak farklı uzunluklardaki DNA parçalarının sentezlenmesi prensibine dayanmaktadır (Sanger vd., 1977). Maxam- Gilbert yöntemi ise kimyasal parçalanmaya dayanan ve özellikle kısa DNA dizilerinde etkili sonuçlar veren bir dizileme yaklaşımıdır (Maxam ve Gilbert, 1980). Ancak Maxam-Gilbert yöntemi, toksik ve radyoaktif kimyasallar kullanıldığı için tehlikeli kabul edilmektedir. Günümüzde Sanger yöntemine yapılan geliştirme ve iyileştirmelerden dolayı Sanger yöntemi Maxam-Gilbert yöntemine göre daha çok tercih edilmektedir. Sanger dizileme yöntemi, tekli ya da düşük verimli DNA dizileme için yaygın olarak kullanılmasına rağmen analiz hızını iyileştirmek zor olduğundan dolayı bitki genomları gibi karmaşık genomların dizilenmesinde kullanılamamaktadır. Ayrıca son derece pahalı ve zaman alıcı bir dizileme yöntemidir (Kchouk vd., 2017).

Birinci nesil dizilemedeki bahsedilen sınırlamalar, yeni nesil sekanslama (NGS) olarak da bilinen ‘ikinci nesil’ dizileme teknolojilerinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. NGS’ de Roche/454, Illumina, Ion torrent ve SOLiD platformları geliştirilmiştir. Tüm bu ikinci nesil dizileme platformlarının ortak özelliği DNA izolasyonu ve kütüphane hazırlığıdır (Mandlik vd., 2024). İkinci nesil dizileme teknolojileri milyonlarca kısa okumayı paralel olarak üretebilme, hızlı ve düşük maliyetli dizileme özelliklerine sahiptir. Ancak ikinci nesil dizileme teknolojileri işlem süresi ve maliyeti artıran PCR amplifikasyonu aşamasına ihtiyaç duymaktadır (Kchouk vd., 2017). Dahası, genomların karmaşık yapısı ve yüksek oranda uzun, tekrarlayan diziler ya da kopya sayısı varyasyonları içermesi NGS teknolojilerinin bu bölgeleri doğru şekilde tespit etmesini zorlaştırmaktadır. Dolayısıyla da kısa okumalar genom birleştirmeyi zor hale getirmektedir (Kchouk vd., 2017; Wiedmann ve Carroll, 2018).

İkinci nesil dizileme teknolojilerinin yol açtığı sorunların giderilmesi amacıyla, ‘üçüncü nesil’ dizileme (TGS) teknolojileri ortaya çıkmıştır. Üçüncü nesil dizileme teknolojileri, PCR amplifikasyonuna ihtiyaç duymadığından dolayı daha hızlı ve düşük maliyetli bir yöntem sunmaktadır. Bu teknolojiler birkaç kilobaz uzunluğunda okumalar elde edebilmektedir. Uzun okuma özelliği sayesinde karmaşık genomların birleştirilmesi ve tekrarlayan bölgelerin daha doğru analiz edilmesi sağlanmaktadır (Kchouk vd., 2017; L. Liu vd., 2012). Dahası üçüncü nesil dizileme, sinyali gerçek zamanlı olarak yakalama ve nükleotid eklenmesinin enzimatik reaksiyon sırasında doğrudan izlenmesi imkanını sunmaktadır (L. Liu vd., 2012). TGS, ‘tek molekül gerçek zamanlı (SMRT)’ dizileme ve mevcut kısa okuma teknolojilerine dayanarak uzun okumalar oluşturan sentetik yaklaşım olmak üzere iki ana yaklaşım içermektedir. Pacific Biosciences (PacBio) SMRT dizileme yaklaşımını kullanırken, Oxford Nanopore Technologies nanopore tabanlı tek molekül dizileme yaklaşımı kullanmaktadır (Goodwin vd., 2016; Jain vd., 2016). TGS platformlarının en büyük sorunu, uzun okuma dizilemesi sırasında meydana gelen yüksek hata oranıdır. Ancak, 30 geçişten (30X kapsama) sonra birden fazla geçiş yoluyla dizileme kapsamı artırılarak bu hata oranı azaltılabilmektedir (Goodwin vd., 2016; Mandlik vd., 2024).

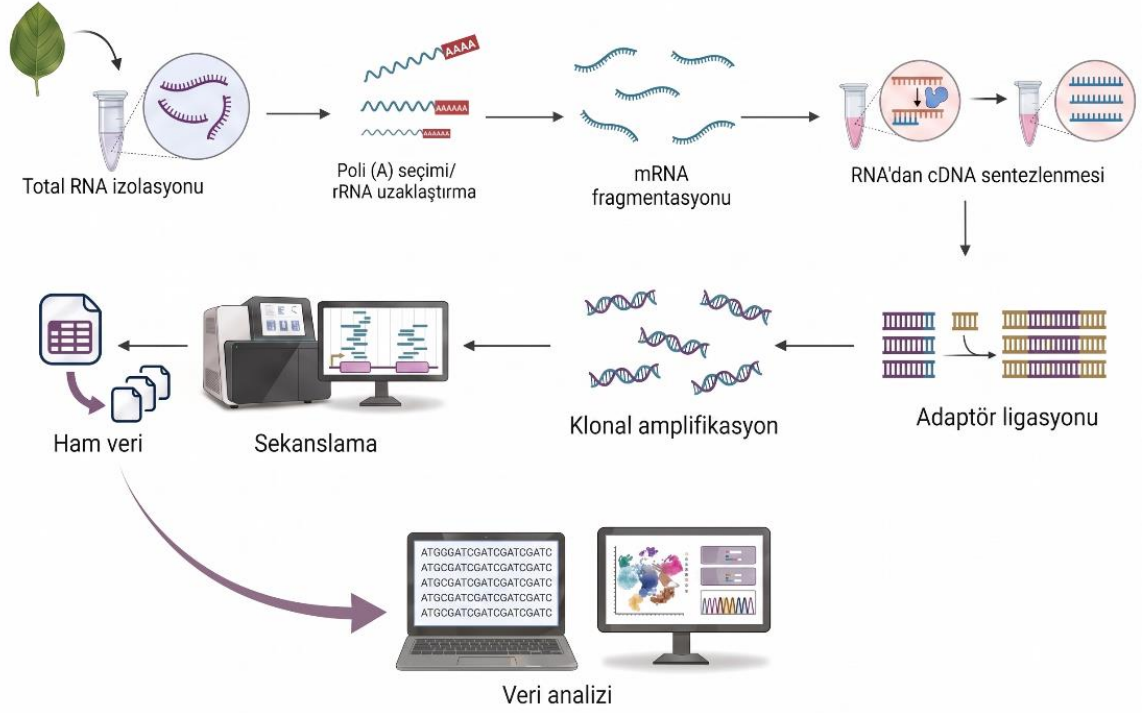
RNA-seq çalışmalarında ilk olarak, izole edilen toplam RNA’nın kalite kontrolü yapılmalıdır. Bu bağlamda RNA bütünlüğünü gösteren RIN değerinin ≥ 8 olması önerilmektedir (Withanage vd., 2022). Ardından toplam RNA’nın büyük kısmını oluşturan rRNA’nın uzaklaştırılması gerekir. Ökaryotlarda bu amaçla poli(A) seçimi ile zenginleştirme ya da rRNA azaltma yöntemleri tercih edilmektedir. Poli(A) seçimi yüksek kaliteli ve bütünlüğü korunmuş RNA (yüksek RIN) gerektirmektedir. Bu durum genellikle bilinen ekzonlara düşen okumaların genel oranının daha yüksek olmasına olanak sağlamaktadır. Ancak bozulmuş veya sınırlı örneklerde rRNA azaltma daha uygun olmaktadır (Conesa vd., 2016).

Poli(A) seçimi ya da rRNA uzaklaştırma işleminden sonra RNA örnekleri, dizileme platformlarının okuma uzunluğu sınırlamaları nedeniyle uygun boyut aralığında parçalara ayrılma işlemine tabi tutulmaktadır. RNA parçalama işlemi kimyasal, enzimatik ya da mekanik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Bu süreçte transkript bölgelerinin temsilini etkileyebilecek teknik yanlışlıklar oluşabilmektedir. İşlem sonunda elde edilen RNA parçaları cDNA sentezinde kullanılmaktadır (Hrdlickova vd., 2017).

RNA-seq analizleri, DNA tabanlı dizileme yapan platformlarda gerçekleştirildiği için RNA’nın cDNA’ya dönüştürülmesi gerekmektedir (Hrdlickova vd., 2017).

Kütüphane hazırlığı, elde edilen cDNA dizileme verilerinin orijinal RNA popülasyonunu ne ölçüde temsil ettiğini belirlemesi nedeniyle RNA-seq'in kritik aşamalarından biridir (Marguerat ve Bähler, 2010). RNA-seq kütüphane protokollerinde, parçalanmış RNA'ların rastgele hekzamer primerlerle ters transkripsiyonu ya da tam uzunluktaki cDNA'nın parçalanması sonucu elde edilen uygun boyutlardaki cDNA'lar, amplifikasyon ve dizilemeden önce DNA adaptörlerine bağlanmaktadır. Ancak bu yaklaşım, elde edilen cDNA'nın hangi RNA ipliğine (sense/antisense) karşılık geldiği bilgisinin kaybolmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla antisens transkriptlerin ve yeni RNA türlerinin tanımlanmasını zorlaştırmakta ve anlamlı RNA ekspresyonunun yanlış ölçülmesine neden olmaktadır. Bu sorunu çözmek amacıyla, transkript yönlülüğünü koruyan çeşitli iplikçik (strand)-spesifik kütüphane hazırlama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler adaptör ekleme (adaptör ligasyonu) ve etiketleme stratejileri aracılığıyla RNA'nın orijinal yön bilgisini korumaktadır (Hrdlickova vd., 2017).

Adaptörler eklendikten sonra, dizileme platformlarının algılama sınırları sebebiyle cDNA'lar PCR ile çoğaltılmaktadır (klonal amplifikasyon). Ancak bu işlemin, cDNA özelliklerine bağlı olarak çoğaltma yanlılığı oluşturma ihtimali vardır. Bu sorunu azaltmak için PCR kopyalarını ayırt edebilen benzersiz moleküler etiketler (UMI'ler) geliştirilmiştir. Bu moleküler etiketler düşük RNA girdisi ve çok sayıda PCR döngüsüne ihtiyaç duyan dizilemelerde doğru analiz için gereklidir (Hrdlickova vd., 2017). Çoğaltma işleminin ardından cDNA kütüphanesi dizilemeye (sekanslama) hazır hale gelmektedir (Mandlik vd., 2024). RNA-Seq iş akışı Şekil 2.4'te gösterilmektedir.



Şekil 2.4. RNA-Seq iş akışı (Created with BioRender.com)

2.5. Veri Analiz Basamakları

Transkriptom analizinde elde edilen verilerin güvenilir ve anlamlı sonuçlar ortaya koyabilmesi için sistematik bir işleme sürecinden geçirilmesi gerekmektedir. Bu süreç, ham verilerin doğruluğunu sağlamayı, biyolojik yorumların tutarlılığını artırmayı ve analiz sonuçlarının bilimsel geçerliliğini desteklemeyi amaçlamaktadır. Şekil 2.5'te *de novo* (referanssız) transkriptom veri analiz basamakları ve kullanılan araçlar yer almaktadır.

2.5.1. Kalite kontrolü ve ham veri filtreleme

Sekanslama sonucu üretilen okumalar, transkriptom birleştirmenin temelini oluşturan ham verileri meydana getirir. Modern sekanslama yöntemlerinin hata oranları oldukça düşük olsa da, bu ham veriler belirli düzeyde hatalar içerebilir (Stoler ve Nekrutenko, 2021). Nitekim okumaların bolluğu, uzunluğu, zincir yönelimi (strandedness), eşli olup olmaması (paired-ness), genel GC içeriği, k-mer bileşimi ve içerdiği hatalar gibi özellikleri; birleştirme kalitesini ve sonraki analiz süreçlerini doğrudan etkilemektedir. Dolayısıyla transkriptom birleştirme sürecinin ilk adımı, ham okuma verilerinin kalite kontrolünden geçirilmesidir (Raghavan vd., 2022).

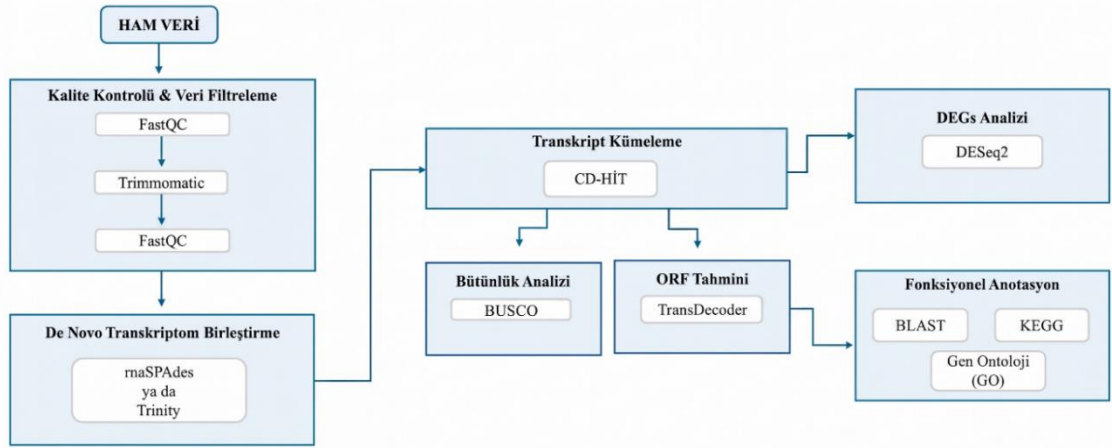
Kalite kontrol sürecinin başlangıcında, ham okumaların yapısal kalitesi; sekanslama platformu tarafından oluşturulan parametreler ya da doğrudan ham okumalardan hesaplanan parametreler üzerinden değerlendirilmektedir (Trivedi vd., 2014). Babraham Enstitüsü tarafından geliştirilen FastQC bu parametrelerin oluşturulmasında en çok tercih edilen araçlardan biridir. Galaxy platformu üzerinden erişilen sürümlerinde, ham dizileme verilerini değerlendirerek 10 analiz modülü içeren HTML formatında kapsamlı bir kalite kontrol raporu sunmaktadır Söz konusu modüller şunlardır (Andrews vd., 2010):

- Temel İstatistikler: Dosya adı, türü, toplam okuma sayısı, okuma uzunluğu ve %GC içeriği gibi genel bilgiler içermektedir.
- Baz Başına Dizi Kalitesi: Okumaların her bir baz pozisyonundaki kalite skorlarını içermektedir.
- Okuma Başına Kalite Skorları: Toplam okumaların ortalama kalite skorlarına göre dağılımını vermektedir.
- Baz Başına Dizi İçeriği: Okumaların her bir pozisyonundaki dört bazın (A, T, G, C) yüzdesel oranlarını vermektedir.
- Okuma Başına GC İçeriği: Okumaların GC oranını teorik normal dağılım eğrisi ile karşılaştırmaktadır.
- Baz Başına N İçeriği: Okumalarda tahmin edilemeyen bazların (N) oranını tespit etmektedir.
- Okuma Uzunluğu Dağılımı: Veri setindeki okumaların uzunluk aralıklarını listelemektedir.
- Dizi Yineleme Seviyeleri: Birbirinin aynısı olan okumaların (duplike) oranını tespit etmektedir.
- Aşırı Temsil Edilen Diziler: Veride normalden çok daha sık rastlanan spesifik dizilerin listesini içermektedir.
- Adaptör İçeriği: Okumalardaki bilinen adaptör dizilerinin bulunma oranını göstermektedir.

Bu modüller, verinin güvenilirliğini doğrulamak ve kütüphane hazırlık aşamasındaki olası teknik hataları tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu sayede ileri analizlerin doğruluğuna ve güvenilirliğine önemli ölçüde katkı sağlanmaktadır (Andrews vd., 2010). FastQC'ye alternatif olarak; yüzlerce numunenin raporunu tek bir çıktıda birleştirerek karşılaştırmalı analize imkan tanıyan MultiQC (Ewels vd., 2016), kalite

kontrol ve trimleme işlemlerini yüksek hızda ve tek adımda gerçekleştiren fastp (S. Chen vd., 2018) ya da FastQC ile tam uyumlu sonuçlar üreten, daha düşük bellek kullanımı ve yüksek işlem hızına sahip C++ tabanlı Falco (de Sena Brandine ve Smith, 2021) gibi modern yazılımlar önerilmektedir.

Kalite kontrol raporlarının adaptör dizilerinin varlığını tespit etmesi durumunda bu dizilerin transkriptom birleştirme işleminden önce temizlenmesi gerekmektedir. Bu aşamada yaygın olarak kullanılan Trimmomatic, eşzamanlı işleme desteği sayesinde tek uçlu ve çift uçlu okumalarda verilerin kalite bazlı trimlenmesine ve adaptörlerin kaldırılmasına olanak tanımaktadır (Bolger vd., 2014). Araç, Kayan Pencere (SW) kalite filtrelemesi ve Maksimum Bilgi (MI) kalite filtrelemesi olmak üzere iki kalite işleme yöntemi sunmaktadır. Kayan pencere yöntemi, okumanın 5' ucundan başlayarak bir baz penceresini kaydırmakta ve ortalama kalite belirtilen eşik altına düştüğünde o noktadan itibaren bazları trimlemektedir. MI yöntemi ise sabit bir kalite eşiği uygulamak yerine, okuma boyunca ilerledikçe trimleme kriterlerinin kademeli olarak sıkılaştırıldığı daha dinamik bir yaklaşım sergilemektedir (Maran ve Davis G., 2022). Trimmomatic'e alternatif olarak; adaptör dizilerinin hassas bir şekilde kaldırılmasında yaygın olarak tercih edilen Cutadapt (Martin, 2011) ya da kalite kontrol ve otomatik adaptör algılama süreçlerini birleştiren, Trim Glore araçları önerilmektedir.



Şekil 2.5. De novo (referanssız) transkriptom veri analiz basamakları ve kullanılan araçlar

2.5.2. *De novo* transkriptom birleştirme

RNA-seq okumaları, farklı transkriptlerin çeşitli bölgelerine karşılık gelen parçaların bir karışımından oluşmaktadır. Bu verilerde transkripsiyonel gürültü, dizileme hataları ve alternatif splicing'ten kaynaklanan transkript izoformları da yer almaktadır. Transkriptom birleştirme okumaların kökenini doğru bir şekilde belirleyerek özgün dizileri mümkün olduğunca doğru biçimde yeniden oluşturmayı amaçlar. Bu süreç, temel olarak okumalar (ya da bunların alt dizileri) arasındaki örtüşmelerin incelenmesi ve bu parçaların birleştirilerek daha uzun bitişik dizilere (kontigler) dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır (Martin ve Wang, 2011; Raghavan vd., 2022). Bu doğrultuda, özellikle referans genomun bulunmadığı çalışmalarda Trinity (Grabherr vd., 2011) ve rnaSPAdes (Bushmanova vd., 2019) yaygın olarak tercih edilmektedir.

2.5.2.1. Trinity

Trinity, birbirini takip eden üç ana modül (Inchworm, Chrysalis ve Butterfly) kullanarak referans genom olmadan transkriptom birleştirme işlemini gerçekleştirmektedir. k-mer tabanlı yaklaşım kullanarak çalışan Inchworm, ham okumaları transkriptlerin benzersiz dizilerine dönüştürerek ilk aşamayı tamamlamaktadır. Ayrıca bu modül, özellikle birbirine benzeyen varyantlar arasından en iyi temsilciyi seçmektedir. Bir sonraki aşamada Chrysalis, alternatif splicing kaynaklı transkriptlerin bölümlerine ya da paralog genlerin benzersiz bölümlerine benzer kontigleri kümelemektedir. Ardından, her bir küme için varyantlar arasındaki örtüşmelerin karmaşıklığını yansıtan de Bruijn grafiği oluşturmaktadır. Son aşamada ise Butterfly, bu grafiklerdeki okumaların ve okuma eşleşmelerinin izlediği yolları analiz ederek tüm olası transkript dizilerini rapor etmektedir. Bu sayede alternatif splicing kaynaklı izoformlar ve paralog genlerden köken alan transkriptler başarılı bir şekilde birbirinden ayırt edilebilmektedir (Grabherr vd., 2011).

2.5.2.2. rnaSPAdes

rnaSPAdes, temelde SPAdes genom birleştirme algoritmasına ait dört ana adımı (de Bruijn grafiği oluşturma, grafik basitleştirme, okuma eşleme, exSPAnde modülünde tekrar çözünürlüğü ve iskele oluşturma) kullanarak referans genom olmadan transkriptom birleştirme yapabilmektedir. Fakat, grafik oluşturma ve okuma eşleşme süreçleri her ne kadar veri kümesinden bağımsız olsa da grafik basitleştirme ve tekrar çözünürlüğü

süreçleri genomik dizilerin özelliklerine bağlı olduğundan, bu aşamaların transkriptom verilerine doğrudan uygulanması sınırlı olabilmektedir. Bu sebeple rnaSPAdes; grafik basitleştirme ve tekrar çözünürlüğü aşamalarında içerdiği transkriptom odaklı algoritmik modifikasyonlar ile genomik birleştirme yaklaşımlarından ayrılmaktadır (Bushmanova vd., 2019).

Söz konusu algoritmik modifikasyonlar, rnaSPAdes'e iki önemli avantaj sunmaktadır (Bushmanova vd., 2019):

- Çoklu k-mer stratejisi sayesinde, farklı uzunluklardaki okuma örtüşmeleri değerlendirilerek yüksek ifade edilen genlerin ve nadir transkriptlerin daha dengeli bir şekilde birleştirilmesine olanak tanımaktadır.
- Grafik sadeleştirme yöntemleri, transkriptomdaki ifade düzeyleri arasındaki farklılıkları dikkate alarak özellikle birbirine çok benzeyen paralog genlerin ya da alternatif izoformların hatalı bir şekilde birleşmesini önlemeye çalışmaktadır.

Bu nitelikleri nedeniyle rnaSPAdes, referans genom olmadan yapılan çalışmalarda tercih edilen temel araçlardan biridir.

2.5.3. Transkriptom kalitesinin ve bütünlüğünün değerlendirilmesi

RNA-seq verilerinin gürültülü yapısı ve kimerik birleşimler ya da parçalı kontigler gibi referanssız birleştirme sürecinde ortaya çıkabilecek hatalar nedeniyle, birleştirme kalitesinin değerlendirilmesi sonraki analizler için büyük önem taşımaktadır (Raghavan vd., 2022). Bu bağlamda, birleştirme içeriğini evrensel ve tek kopyalı ortolog genler üzerinden değerlendirmek en çok tercih edilen yaklaşımlardan biridir. Bu yaklaşımda BUSCO en yaygın kullanılan araçtır (Raghavan vd., 2022; Seppey vd., 2019).

BUSCO, OrthoDB (Zdobnov vd., 2021) veri tabanındaki evrensel tek kopyalı ortolog gen setlerini referans olarak kullanmaktadır. BUSCO analizi, bu genlerin birleştirmede ne oranda tam, parçalı ya da eksik olduğunu belirlemektedir. Yüksek kaliteli bir birleşimde bu evrensel genlerin büyük bölümünün tam uzunlukta temsil edilmesi beklenmektedir. Ancak eksik ya da parçalı eşleşmelere rastlanması birleştirme kalitesinde sorun olabileceğini göstermektedir. Bu doğrultuda BUSCO, transkriptom ve genom birleştirmenin bütünlüğünü değerlendirmede standart ve güvenilir bir araç olarak görülmektedir (Raghavan vd., 2022; Seppey vd., 2019).

2.5.4. Transkript kümelemesi

Referanssız (*de novo*) transkriptom birleştirme sürecinde genomdaki gerçek gen sayısından çok daha fazla dizi (kontig) üretilmesine sıkça rastlanmaktadır. Gen sayısı ve birleştirilen transkript sayısı arasındaki bu tutarsızlık, transkripsiyonun gürültülü ve yaygın bir süreç olmasından kaynaklanmakta, bunun sonucunda *de novo* birleştirilen kontiglerde, protein kodlayan transkriptler dışında transkripsiyonel hatalar, pre-mRNA'lar ve ncRNA'lar da yer almaktadır. Dizi sayısının artmasının bir başka sebebi de alternatif splicing sonucu oluşan izoformlardır. Ancak, bu dizilerin tamamının korunması her zaman şart olmayıp, veriyi anlamlı ve yönetilebilir bir hale getirmek amacıyla, bu fazlalığın giderilmesi oldukça önemli bir adımdır. Bu amaçla CD-HIT gibi araçlar yaygın olarak tercih edilmektedir (Raghavan vd., 2022).

CD-HIT, birleştirme sürecinde veri setlerinde ortaya çıkan dizi tekrarını azaltmayı ve dizi analizlerinin performansını iyileştirmeyi amaçlayan yüksek performanslı bir kümeleme algoritmasıdır. Algoritma, dizileri uzunluklarına göre sıralayarak her küme için genellikle en uzun diziyi 'temsilci dizi' olarak seçip diğer dizileri belirlenen benzerlik eşiklerine göre bu temsilcilere atayarak kümeleme işlemini gerçekleştirmektedir. k-mer tabanlı 'kısa kelime filtrelemesi (short word filter)' yaklaşımını kullanıp diziler arasındaki benzerliği tarayarak büyük veri setlerinin kısa sürede işlenmesini sağlamaktadır ve bu özelliği ile geleneksel hizalama yöntemlerinden ayrılmaktadır (Fu vd., 2012; W. Li ve Godzik, 2006). Bu özellikleri sayesinde CD-HIT, transkriptom analizlerinde veri setinin sadeleştirilmesini sağlayarak sonraki analiz basamaklarının daha yönetilebilir ve tutarlı bir veri yapısında olmasına imkân tanımaktadır.

2.5.5. Kodlayan bölge tahmini

Referanssız transkriptom birleştirme sonucu elde edilen transkriptlere biyolojik anlam kazandırabilmek için açık okuma çerçevelerinin (ORF) tahmin edilmesine ve protein kodlama potansiyelinin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu aşamada TransDecoder en çok tercih edilen araçtır (Raghavan vd., 2022).

TransDecoder, birleştirilmiş transkript verileri üzerinde çalışarak nükleotid bileşimi, açık okuma çerçevesi (ORF) uzunluğu ve isteğe bağlı olarak protein aileleri veri tabanı (Pfam) domain içeriğini değerlendirerek olası protein kodlayan bölgeleri tahmin etmektedir (Hass vd., 2013). Bu sayede, referans genom bilgisi bulunmayan

organizmalarda RNA-Seq verilerinden elde edilen transkriptlerden, fonksiyonel anotasyon analizlerinde kullanılabilecek olası protein dizileri elde edilebilmektedir.

2.5.6. Diferansiyel gen ifadesi analizi

RNA-seq yaklaşımının temel amaçlarından biri de değişen fizyolojik ya da çevresel koşullar karşısında gen ifadesinde meydana gelen değişimleri değerlendirmektir. Bu süreç, kontrol ve deney gruplarına maruz bırakılan bağımsız örneklerden RNA elde edilmesiyle yürütülmektedir. Ardından, dizilenmiş okumalar organizmanın referans genomuna haritalanarak iki grup arasındaki gen ifade farkları değerlendirilmektedir. Gerçekleştirilen bu yöntem diferansiyel ifade (DE) analizi olarak adlandırılmaktadır ve çeşitli koşullar altında genlerin aktivitelerini anlamamıza olanak tanımaktadır (Oshlack vd., 2010; Raghavan vd., 2022) Deseq2, edgeR ve limma bu alandaki temel paketler olarak kabul edilmektedir. Deseq2, diğer iki paketle kıyaslandığında daha az farklı ifade edilen gen tespit etmesiyle en tutucu yaklaşımı sergilemektedir (Raghavan vd., 2022).

Deseq2, RNA-seq sayım verilerini negatif binom dağılımını kullanarak modellemektedir. Ayrıca, genler arası bilgi paylaşımına dayanan Bayes temelli daraltma (shrinkage) yaklaşımını kullanarak dispersiyon ve log2Foldchange tahminlerini stabilize etmektedir. Bu sayede özellikle düşük sayımlı genlerde görülen yüksek varyansı azaltarak gen ifadesi farklarının daha güvenilir bir şekilde hesaplanmasını sağlamaktadır (Love vd., 2014).

Bu modelleme yaklaşımının sonucunda her gen için log2 kat değişimi, standart hata, test istatistiği, p-değeri ve düzeltilmiş p-değeri içeren istatistiksel çıktılar elde edilmektedir. Çıktılar, genlerin diferansiyel olarak ifade edilip edilmediğinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Love vd., 2014). Log2Foldchange değeri ise ifadesi artan genleri pozitif (+), azalan genleri negatif (-) olarak belirtip gen ifadesindeki değişimin yönünü göstermektedir (Raghavan vd., 2022).

Analiz sonuçları PCA ve ısı haritası kullanılarak görselleştirilmektedir. Örnekler arasındaki benzerlikleri ve kümelenme yapılarını gösteren bu yöntemler verinin daha kolay anlaşılmasını sağlamaktadır (Yalamanchili vd., 2017).

2.5.7. Fonksiyonel anotasyon

Gen ya da protein hakkında biyolojik bilgileri toplama süreci fonksiyonel anotasyon olarak adlandırılmaktadır. Bu süreç ilgili moleküllerin alternatif adlarını,

moleküler işlevlerini, etkileşimlerini, hücre içi lokalizasyonlarını, fonksiyonel bölgelerini, sinyal peptitlerini, glikolizasyon ve bağlanma bölgelerini, düşük karmaşıklık bölgelerini, ekspresyon özelliklerini, biyolojik aktivitelerini ve organizma içindeki kimliklerini sistematik olarak belirlemeyi amaçlamaktadır (Mishra vd., 2022).

2.5.7.1. Dizi benzerlik aramaları ve BLAST analizi

Genom anotasyonunda homoloji tabanlı yöntemler önemli bir yere sahiptir (Mathe, 2002). Homoloji aktarımı da, transkriptom anotasyonunda en çok tercih edilen yaklaşımdır (Punta ve Ofran, 2008). Bu yaklaşımda, birleştirilmiş diziler sorgu olarak kullanılıp BLAST gibi araçlar aracılığıyla iyi anotasyon yapılmış referans veri tabanlarıyla karşılaştırılmaktadır (Pearson, 2013b). Özellikle işlevi belirlenmek istenen bir protein dizisi UniProtKB/Swiss-Prot (The UniProt Consortium, 2007) gibi güvenilir veri tabanlarındaki işlevi bilinen homolog dizilerle hizalanmaktadır (Punta ve Ofran, 2008). Ardından, elde edilen eşleşmelere göre dizilere kimlik ve fonksiyon atanmaktadır. En uygun eşleşme genellikle E-değerine göre seçilmektedir. E-değerlerinin düşük olması benzerliğin tesadüf olmadığını ve olası homolojik ilişkiyi göstermektedir (Pearson, 2013a; Punta ve Ofran, 2008). Anotasyon nükleotit ya da protein dizileri üzerinden yapılabilmektedir. Ancak proteinler daha korunmuş ve fonksiyonel olarak daha anlamlı olduklarından dolayı daha hassas ve hızlı arama imkânı sunmaktadır. Bu sebeple, genellikle protein düzeyinde analiz tercih edilmektedir (Raghavan vd., 2022).

2.5.7.2. Gen ontolojisi (GO)

Gen Ontolojisi (GO), genlerin ve gen ürünlerinin fonksiyonlarını tanımlayan kapsamlı bir bilgi tabanıdır. GO anotasyonları farklı türleri kapsamaktadır ancak mevcut bilgi çoğunlukla model organizmalardan elde edilen deneysel veriler üzerine kuruludur. GO bilgi tabanı; GO ontolojisi, kanıt temelli GO anotasyonları ve biyolojik süreçleri modelleyen GO-CAM olmak üzere üç bileşenden meydana gelmektedir. Bileşenler, yeni bilimsel bilgilere bağlı olarak sürekli güncellenmekte, genişletilmekte ve kalite kontrol süreçlerinden geçmektedir (The Gene Ontology Consortium vd., 2023).

GO gen fonksiyonlarını üç ana başlıkta sınıflandırmaktadır. Bir gen ürününün; katıldığı biyolojik süreçleri biyolojik proses (BP), moleküler seviyede gerçekleştirdiği faaliyetleri moleküler fonksiyon (MF) ve hücre içindeki lokasyonunu hücresel bileşen (CC) ile tanımlamaktadır (The Gene Ontology Consortium vd., 2023). Bu aşama, çoklu

gen fizyolojisinin aydınlatılmasında ve dizi grupları arasındaki fonksiyonel farklılıkların değerlendirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Mishra vd., 2022).

2.5.7.3. KEGG yolak analizi

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veritabanı, genleri ve proteinleri hücrel süreçler ve metabolik yollar içinde anlamlandırmak amacıyla geliştirilmiştir (Kanehisa ve Goto, 2000). Bu veri tabanı metabolik yollar, sinyal iletim ağları ve hücrel süreçler arasındaki etkileşimleri göstermektedir (Mishra vd., 2022).

KEGG; PATHWAY (yolak haritaları), GENES (gen katalogları) ve BRITE (fonksiyonel sınıflandırma) gibi temel bileşenlerden oluşmakta ve KEGG Orthology (KO) sistemi ile bu bileşenleri birbirine bağlamaktadır (Kanehisa vd., 2017). GENES veri tabanı farklı organizmalara ait tanımlanmış genleri ve genom içeriklerini sağlamaktadır. PATHWAY veri tabanı ise bu gen ürünlerinin metabolik, düzenleyici ve hastalıkla ilişkili ağlar içindeki etkileşimlerini göstermektedir. Genlerin ve proteinlerin moleküler fonksiyonları KO sistemi ile ortolog gruplar halinde tanımlanarak KO veritabanında saklanmaktadır. KEGG'in bu işlevleri sayesinde belirli koşullar altında genlerin yer aldığı biyolojik yollar ve ilişkili olduğu metabolik yollar belirlenerek genomun daha iyi anlaşılmasına imkan verilmektedir (Kanehisa vd., 2016, 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Dereotu Bitkisinin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulaması

Çalışmada kullanılan dereotu bitkisi Selçuk Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir. Dereotu tohumları çimlendikten sonra, kontrollü büyüme kabininde yetiştirilmeye başlanmıştır. Bitkiler, 27 °C gün ve 19 °C gece sıcaklığında, %75 nem ve 12 saatlik ışık periyodunda büyütülmüştür. Gerçek üç yaprak aşamasına ulaşan bitkiler kontrol ve stres grubu olarak ikiye ayrılmıştır.

Stres grubu bitkilere, gerçek yaprak oluşumundan 40 gün sonra 4 °C'de gün ve gece sıcaklığı koşullarında, 12 saatlik ışık periyodunda iki gün boyunca soğuk stresi uygulanmıştır. Soğuk stresine maruz bırakılan bitkiler ile kontrol grubundan RNA izolasyonu yapılmak üzere üç biyolojik tekrar ve iki teknik tekrar olacak şekilde örnekler toplanmıştır.

3.2. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, Quick-RNA Plant Miniprep kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sürecinde izlenen adımlar aşağıda verilmiştir.

Analiz öncesinde hazırlık aşaması olarak, RNA Wash Buffer (konsantre) içerisine 96 ml %100 etanol eklenmiştir. Tüm santrifüj işlemleri oda sıcaklığında ve 10,000-16,000 x g kuvvetinde 30 saniye süreyle yapılmıştır.

İzolasyon aşamasında, yaklaşık 150 mg ağırlığındaki taze yaprak doku ZR BashingBead Lysis tüpüne aktarılarak üzerine 800 µl RNA Lysis Buffer eklenmiş ve örnekler parçalanmıştır. Doku kalıntılarının çöktürülmesi amacıyla tüp 1 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen berrak üst sıvı (süpernatant) Zymo-Spin™ IIICG kolonuna aktarılarak tekrar santrifüj yapılmıştır.

Elde edilen akışkan kendi hacmi kadar %95-100 etanol eklenmiş ve karışım Zymo-Spin™ IICR kolonuna yüklenerek santrifüj edilmiştir. Bu adımda altta kalan sıvı atılarak kolona sırasıyla 400 µl RNA Prep Buffer ve 700 µl RNA Wash Buffer eklenip santrifüj işlemleri tekrarlanmıştır. Son yıkama adımında, kolona tekrar 400 µl RNA Wash Buffer eklenmiş ve kalıntı tamponların tamamen uzaklaştırılması için kolon 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Son aşamada, saflaştırılan RNA'nın geri kazanılması için kolon nükleaz içermeyen yeni bir tüpe aktarılmış; kolon matriksine doğrudan 50 µl DNase/RNase Free Water eklenerek yapılan son santrifüj işlemiyle RNA izolasyonu tamamlanmıştır.

3.3. RNA Kalite Ölçümü

İzole edilen toplam RNA örneklerinin kalitesi Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı kullanılarak değerlendirilmiştir. Örneklerin RNA Bütünlük Numarası (RIN) değerlerinin 6 ile 8 arasında olduğu ve bu değerlerin RNA-Seq analizleri için gerekli standartları karşıladığı belirlenmiştir. Ardından RNA örnekleri, yeni nesil sekanslama (NGS) hizmeti alınmak üzere yurt dışına gönderilmiştir. Elde edilen ham sekans verileri, tez kapsamında tanımlanan biyoinformatik analiz araçları kullanılarak işlenmiş ve analiz edilmiştir.

3.4. Kütüphane Hazırlığı ve RNA Sekanslama (RNA-Seq)

RNA-Seq kütüphane hazırlığı ve sekanslama hizmetleri, BMK-GENE (Beijing Genome Institute) firmasından alınmıştır. Kütüphane hazırlık sürecinde, toplam RNA örneklerinden ribozomal RNA (rRNA) uzaklaştırılarak mRNA zenginleştirilmesi yapılmıştır. Ardından, mRNA molekülleri belirli fragman aralıkları elde etmek amacıyla uygun fragmentasyon protokollerine tabi tutulmuştur.

Fragmentasyon işlemini takiben boyut seçimi yapılmış ve elde edilen mRNA parçaları kullanılarak cDNA kütüphaneleri oluşturulmuştur. Hazırlanan kütüphaneler, Illumina platformunda kısa okuma 150 bp (base pair) uzunluğunda, çift yönlü (paired-end) okuma stratejisi ile sekanslanmıştır.

3.5. Biyoinformatik Analiz

Sekanslama sonrası elde edilen verilerin analizi, açık erişimli bir biyoinformatik platformu olan Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>) üzerinden gerçekleştirilmiştir. Platforma fastasanger.gz formatında yüklenen sıkıştırılmış ham veriler, Convert compressed file to uncompressed v1.0 aracı kullanılarak açık hale getirilmiştir. Ardından bu veriler, FASTQ splitter (v1.1.5) programı aracılığıyla ileri (forward) ve geri (reverse) okumalar şeklinde birbirinden ayrılmıştır. Yapılan bu işlemlerle, kontrol ve soğuk stresine maruz bırakılan deney grubu olmak üzere toplam 6 örnek, ileri biyoinformatik analizler için hazır hale getirilmiştir.

3.5.1. Ham veri kalite kontrolü ve filtreleme

Okuma kalitelerini değerlendirmek amacıyla FastQC (v0.74) programı kullanılmıştır. Bu aşamada, her bir örnek için baz kalitesi dağılımı, GC içeriği, dizi uzunluğu dağılımı ve adaptör içeriği gibi temel parametreler analiz edilmiştir.

FastQC raporları doğrultusunda, verilerin güvenilirliğini artırmak ve düşük kaliteli bazıları uzaklaştırmak için Trimmomatic (v0.39) programı kullanılmıştır. Bu aşamada, dizilerin temizlenmesi, düşük kaliteli okumaların filtrelenmesi ve belirli bir uzunluğun altındaki fragmanların çıkarılması sağlanmıştır. Ardından örneklerin kalitesi tekrar kontrol edilmiştir.

3.5.2. *De novo* transkriptom birleştirme

Transkriptomun birleştirilmesi amacıyla rnaSPAdes (v4.2.0) programı kullanılmıştır. Çalışılan türün referans genomu bulunmadığı için analizler *de novo* olarak yapılmıştır. Bu aşamada, kısa okumalardan (reads) daha uzun ve anlamlı transkript parçaları (contig) elde edilmiştir.

3.5.3. Veri kalite ve bütünlük analizleri

Birleştirilen transkriptomun kalitesini ve bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla BUSCO (v5.8.0) programı kullanılmıştır. Bu analizde, transkriptom seti içerisindeki tek kopya genlerin (ortologlar) varlığı kontrol edilmiş, tam, eksik veya parçalı genlerin oranları belirlenmiştir.

3.5.4. Veri kümeleme Kalite kontrolü ve ham veri filtreleme

Birleştirilen transkriptom setindeki benzer veya yinelenen dizileri (redundant sequences) temizlemek amacıyla CD-HIT (v4.8.1) programı kullanılmıştır. Bu aşamada, birbirine belirlenen eşik değeri ve üzerinde benzerlik gösteren diziler gruplandırılarak her küme için tek bir temsilci dizi seçilmiştir. Böylece veri setindeki karmaşıklığın azaltılması sağlanmıştır.

3.5.5. Kodlayan bölgelerin tahmini

Birleştirilen transkriptlerdeki muhtemel kodlayan bölgelerin (ORF-Open Reading Frame) belirlenmesi amacıyla TransDecoder (v5.5.0) programı kullanılmıştır. Bu

aşamada, transkript dizileri taranarak belirli bir uzunluğun üzerindeki açık okuma çerçeveleri tespit edilmiş ve bu bölgelerden protein dizileri tahmin edilmiştir.

3.5.6. Diferansiyel eksprese genlerin (DEG) tanımlanması

Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade edilen genlerin (DEG) belirlenmesi amacıyla DESeq2 (v2.11.40.8) programı kullanılmıştır. Bu analiz ile genlerin örnekler arasındaki ifade düzeyleri ve değişim miktarları istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Annotate DESeq2/DEXSeq output tables (v1.1.0) aracıyla işlenerek daha kolay yorumlanabilir tablolara dönüştürülmüştür.

Verilerin anlamlandırılması amacıyla, Sort (v1.2.0) programı kullanılarak genler log2 kat değişimi (log2FC) değerine artandan azalana doğru sıralanmıştır. Analiz sonuçlarından, log2FC değeri 2'nin üzerinde (up-regulated) ve -2'nin altında (down-regulated) olan genler filtrelenerek ayrı dosyalar halinde kaydedilmiştir.

3.5.7. Veri tabanı oluşturma ve homoloji temelli benzerlik analizi

UniProt veri tabanından Viridiplantae taksonomik grubu altında yer alan ve 'cold stress' ile 'freezing stress' anahtar kelimelerine sahip tüm protein dizileri FASTA formatında indirilmiştir. Bu protein dizileri, NCBI BLAST+ makeblastdb (v2.16.0) programı kullanılarak veri tabanına dönüştürülmüştür.

TransDecoder aracılığıyla tahmin edilen aday protein dizileri ile oluşturulan veri tabanındaki protein dizilerinin benzerliklerini belirlemek amacıyla NCBI BLAST+ blastp (v2.16.0) programı kullanılmıştır. Analiz sırasında, istatistiksel anlamlılık için E-değeri $\leq 1e-10$ olarak belirlenmiştir.

3.5.8. Gen ontolojisi (GO) analizi

Farklı düzeylerde ifade edilen genlerin (DEG) dahil olduğu biyolojik süreçlerin, hücresel bileşenlerin ve moleküler fonksiyonların tanımlanması amacıyla gen ontolojisi (GO) analizleri yapılmıştır. Bu aşamada, anlamlı düzeyde ekspresyon farkı gösteren genlerin fonksiyonel olarak hangi biyolojik kategorilerde yoğunlaştığını belirlemek için KOBAS 2.0 programı kullanılmıştır.

3.5.9. Genlerin metabolik yol analizi (KEGG analizi)

Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade edilen genlerin hangi metabolik süreçlerle ve sinyal yollarıyla ilişkili olduğunu belirlemek amacıyla KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) zenginleştirme analizleri yapılmıştır. Bu analizde, KOBAS 2.0 programı kullanılarak, soğuk stresi altında aktifleşen veya baskılanan biyolojik yollar istatistiksel olarak tanımlanmıştır.

3.6. SSR Markör Geliştirme

Elde edilen nükleotit dizileri üzerindeki basit sekans tekrarlarının (SSR) tespiti, primer tasarımı ve markör haritalama analizleri için GMATA v2.3 (gmata2.3.jar) yazılım paketi kullanılmıştır. Perl, R ve Java yazılımları yüklenerek analizlerin yürütülebilmesi için gerekli altyapı sağlanmıştır.

SSR tespiti aşamasında, RNA-Seq analizi sonucunda elde edilen transkript dizileri yazılımın ‘SSR identification’ modülüne FASTA formatında yüklenmiştir. Analizler iki farklı parametre setiyle yürütülmüştür. İlk aşamada 2-6 nt uzunluğundaki tüm SSR motifleri taranırken; ikinci aşamada 3-mer (tri-nükleotit) motifleri ayrı olarak analiz edilmiştir. Minimum tekrar sayısı 5 olarak belirlenmiştir. Analizler sonucunda SSR lokuslarının motif tipleri, tekrar sayıları ve diziler üzerindeki pozisyonları belirlenmiştir.

3.7. Proteinlerin Üç Boyutlu Homoloji Modellemesi

Aday protein dizilerinin üç boyutlu yapıları, Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) web sunucusu kullanılarak homoloji modelleme yaklaşımı ile tahmin edilmiştir. Protein dizileri FASTA formatında sisteme yüklenmiş, uygun şablon yapılar otomatik olarak belirlenmiş ve üç boyutlu modeller oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Veri analizinden elde edilen bulgular, çalışmanın temel çıktısını oluşturmuştur. Bu bulgular literatürdeki bilgilerle karşılaştırılarak yorumlanmış ve çalışmanın özgün katkıları ortaya konmuştur.

4.1. Diferansiyel İfade Analizi Sonuçları

Kontrol ve deney grupları arasındaki diferansiyel gen ekspresyonu, DESeq2 analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda, istatistiksel olarak anlamlı diferansiyel ifade gösteren genler (DEGs) belirlenmiştir. Bu genler, yukarı ve aşağı regüle olan genler olarak sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.1 ve 4.2).

Çizelge 4.1. DESeq2 programı yukarı regüle olan genler

Gen Adı	Log2(FC)	P-değeri	Gen Adı	Log2(FC)	P-değeri
<i>CIPK23</i>	5,67	1,3088E-162	<i>NCED3</i>	4,02	1,49829E-06
<i>LEA14</i>	5,65	7,4581E-140	<i>KINI</i>	4,02	8,6493E-06
<i>P5CS1</i>	5,63	4,8531E-100	<i>FAD7</i>	3,94	1,11729E-05
<i>COR47</i>	5,63	2,61502E-75	<i>APX1</i>	3,92	1,52619E-05
<i>AKT1</i>	5,62	4,63116E-74	<i>LTI78</i>	3,89	2,25149E-05
<i>RD29A</i>	5,59	1,15457E-69	<i>BADH1</i>	3,87	2,40665E-05
<i>NAC019</i>	5,58	1,33352E-45	<i>FAD2</i>	3,85	3,04343E-05
<i>P5CS2</i>	5,56	2,69286E-38	<i>COLDAIR</i>	3,81	5,65382E-05
<i>SnRK2.2</i>	5,44	4,12596E-38	<i>GolS2</i>	3,76	6,71122E-05
<i>sHSP18.2</i>	5,41	9,9322E-31	<i>RS3</i>	3,74	7,03159E-05
<i>RS</i>	5,35	4,03481E-28	<i>NHX1</i>	3,74	7,91438E-05
<i>SnRK2.6</i>	5,34	2,00957E-26	<i>HSP90</i>	3,73	8,17497E-05
<i>COR15A</i>	4,82	1,26471E-24	<i>ERF1</i>	3,72	9,68755E-05
<i>TPP</i>	4,81	6,51749E-23	<i>AFP</i>	3,70	0,000120669
<i>MAPK3</i>	4,78	1,08954E-21	<i>DHAR</i>	3,65	0,000161765
<i>AVP1</i>	4,72	5,02667E-20	<i>BiP</i>	3,12	0,000163411
<i>RD22</i>	4,71	2,11544E-18	<i>ERD10</i>	3,11	0,000206287
<i>MAPK6</i>	4,70	6,16462E-18	<i>HSP70</i>	3,11	0,000215863
<i>WRKY34</i>	4,69	6,94475E-18	<i>SOD1</i>	3,10	0,000340514
<i>ZAT12</i>	4,69	1,86004E-17	<i>SWEET11</i>	3,09	0,000365151
<i>HKT1</i>	4,68	7,7586E-17	<i>HSP101</i>	3,09	0,000375807
<i>GR</i>	4,64	2,99843E-14	<i>CYS</i>	3,08	0,000644173
<i>SOS1</i>	4,59	1,49934E-11	<i>CMO</i>	2,96	0,000805972
<i>SPS</i>	4,56	1,07066E-10	<i>TPS1</i>	2,96	0,001168427
<i>ABA3</i>	4,50	4,72609E-10	<i>GSTU19</i>	2,95	0,002133205
<i>CIPK8</i>	4,49	3,53323E-09	<i>IMT1</i>	2,95	0,002224614
<i>APX2</i>	4,48	4,00735E-09	<i>GSTU</i>	2,95	0,002307804
<i>CBF2</i>	4,08	2,10249E-08	<i>CAT1</i>	2,92	0,003586067
<i>GPX3</i>	4,06	1,72441E-07	<i>BAM1</i>	2,92	0,003613879
<i>RD29B</i>	4,05	2,93548E-07	<i>CBF1</i>	2,91	0,005759713
<i>AOX1</i>	4,03	7,06322E-07	<i>KIN2</i>	2,89	0,00730515

Soğuk stresine maruz kalan dereotu bitkisinde *ERD10*, *LEA14*, *COR47*, *COR15A*, *KINI*, *KIN2*, *RD29A* (*LTI78*), *RD29B* ve *RD22* genlerinin ekspresyon seviyelerinin

anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu genlerin önemli bir kısmı fonksiyonel olarak dehidrin/LEA ve soğuk regüle (COR) gen aileleri altında değerlendirilmektedir. Bu çalışmada söz konusu genlerin yukarı regülasyonu, literatürde bildirilen abiyotik stres yanıt mekanizmalarıyla uyum göstermekte ve elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Bu kapsamda, *ERD10*, *COR47*, *RD29A* ve *RD29B* genlerinin ait olduğu dehidrin/LEAII protein ailesinin geç embriyogenez sırasında biriktiği ve çeşitli hücre dehidrasyonuna neden olan kuraklık, tuzluluk, soğuk gibi abiyotik stres faktörleri tarafından vejetatif dokularda indüklendiği bilinmektedir (Hao vd., 2022). Transgenik Arabidopsis bitkilerinin yapraklarında soğuk, kuraklık ve tuzluluk stresi altında *COR47* ve *RD29A* genlerinin önemli ölçüde yukarı regüle edildiğinin bildirilmesi, bu genlere ait ekspresyon bulgularımızla örtüşmektedir (L. Zhou vd., 2022). Benzer şekilde, ABA ile indüklenen bir gen olan *RD29B* geninin dehidrasyon stresine maruz kalan *A. thaliana*'da ilk stresten sonra güçlü bir şekilde indüklendiği, ikinci stresten sonra ekspresyonunun daha da artarak transkripsiyonel hafıza sergilediği bildirilmiştir (Virlouvet vd., 2014). Şaperon aktivitesi ve membran stabilizasyonu sağlayan *ERD10*'un, soğuk uygulandığında yanıt olarak ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde, dehidrasyon koşullarında ise ekspresyonunun devamlı yukarı regüle edildiğine dair literatür bilgisi bulgularımızı doğrular niteliktedir (S. Y. Kim ve Nam, 2010).

Soğuk düzenleyici genlerden biri olan *COR15A*'nın soğuğa maruz kalan *A. thaliana* bitkilerinde ekspresyonunun arttığı ve bu artışın don toleransı ile ilişkili olabileceği; ayrıca kuraklık ve tuzluluk streslerinde de ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Hundertmark ve Hinch, 2008; Zuther vd., 2012). *KIN1* ve *KIN2* genlerinin soğuk stresinde koordineli olarak düzenlenen ve ABA tarafından indüklenen soğukla indüklenebilir genler olduğu rapor edilmiştir (Kurkela ve Borg-Franck, 1992). Ayrıca *A. thaliana*'da, soğuk stres koşullarında bu üç genin ekspresyonunun ortamdaki CO₂ konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğini gösteren bir çalışma, en yüksek ekspresyonun düşük CO₂ koşullarında gözlemlendiğini bildirerek elde ettiğimiz yukarı regülasyon eğilimini desteklemektedir (Barnaby vd., 2020).

LEA (Geç embriyogenezde bol bulunan) genlerinden biri olan *LEA14*'ün *A. thaliana*'da tohum ve tohum dışı dokularda kuraklık, tuzluluk ve soğuk, *Ipomoea batatas* (tatlı patates)'da ise tuzluluk ve dehidrasyon streslerinde ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (Hundertmark ve Hinch, 2008; Park vd., 2011). Benzer şekilde *Morus multicaulis* (dut ağacı)'da *RD22* geninin düşük sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk stresleri

altında ekspresyonunun farklı seviyelerde arttığı bildirilmiştir (H. Wang vd., 2014). Söz konusu literatür bilgileri, bu gen grubuna ait ekspresyon sonuçlarımızla uyum içindedir.

Çalışma doğrultusunda *CBF1*, *CBF2*, *WRKY34*, *ZAT12* ve *ERF1* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu genler, stres koşullarında gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alan transkripsiyon faktörleri olup, abiyotik stres yanıtlarında önemli rol oynamaktadır (Lindemose vd., 2013). Üzüm çeşitlerinde, soğuk stresi altında *CBF1* ve *CBF2*'nin ekspresyon seviyelerinin arttığını bildiren çalışma, bu genlere ait bulgularımızla paralellik göstermektedir (Karimi vd., 2015). *WRKY* genlerinin çeşitli abiyotik stres yanıtlarını düzenleme görevinin yanı sıra, antosiyanin biyosentezi ve bazı gelişimsel süreçlerde rol aldığı da bilinmektedir. *A. thaliana*'da yapılan çalışmada soğuk uygulamasının yabancı tip bitkilerde *WRKY34* geninin ekspresyon seviyesini artırdığı rapor edilmiştir (Zou vd., 2010). Bunun yanı sıra, etilen sinyal yolunun bir alt bileşeni olan *ERF1*'in tuz ve kuraklık stresi altında ekspresyonunun arttığı ve *A. thaliana*'da aşırı ifadesinin bu streslere karşı toleransı artırdığı gözlemlenmiştir (Cheng vd., 2013). Son olarak, *A. thaliana*' da çinko parmak transkripsiyon faktörlerinden *ZAT12*'nin soğuk, ozmotik, tuz ve kuraklık stresleri altında kök ve sürgün dokularında, UV-B ve yaralanma streslerinde ise sürgün dokusunda ekspresyonunun yüksek oranda arttığı literatürde bildirilmiştir (Yin vd., 2017). Bu literatür bilgileri, dereotunun maruz kaldığı transkripsiyonel yeniden yapılanmanın ne kadar geniş bir kapsama yayıldığını açıkça ortaya koymakta ve çalışma sonuçlarımızı güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Yürütülen çalışma kapsamında *APX1*, *APX2* ve *CAT1* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu genler, bitkilerin reaktif oksijen türlerinin (ROS) detoksifikasyonunda görev alan askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) enzimatik antioksidan savunma sistemlerinin kodlanmasında rol oynadığı bilinmektedir (J.-X. Liu vd., 2019). *Apium graveolens* (kereviz)'ten izole edilen *APX1*'in kuraklık stresi altında ekspresyonunun arttığı ve *A. thaliana*' da aşırı ekspresyonunun kuraklığa direnci artırdığı bildirilmiştir (J.-X. Liu vd., 2019). Benzer şekilde *A. thaliana*' da yapılan bir çalışmada sıcaklık stresi altında *APX1* ve *APX2* genlerinin ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Panchuk vd., 2002). Durum buğdayından (*Triticum turgidum L. subsp. durum*) izole edilen *CAT1*'in tuz ve kuraklık stresi altında ekspresyonunun arttığı ve bu genin tarım bitkilerinde çoklu abiyotik streslere karşı toleransta rol oynadığı rapor edilmiştir (Feki vd., 2015). Benzer stres koşullarında rapor edilen bu ekspresyon

profilleri, dereotunda elde ettiğimiz antioksidan gen aktivasyonu bulgularını doğrudan desteklemektedir.

Yürütülen çalışmada *MAPK3*, *MAPK6*, *SnRK2.2* ve *SnRK2.6* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu genler, bitkilerde stres sinyal iletiminde rol alan protein kinazların kodlanmasında rol oynamaktadır (Kulik vd., 2011). *MAPK3* ve *MPK6* genlerinin de dahil olduğu mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadı, ökaryotlarda korunmuş üç bileşenli bir sinyal iletim sistemidir. Bu kaskad, bitkilerde çevresel sinyallerin hücrel yanıtla dönüştürülmesinde ve abiyotik stres yanıtlarının düzenlenmesinde rol almaktadır (Sinha vd., 2011). *SnRK2.2* ve *SnRK2.6*'nın ait olduğu SnRK2 ailesi ise bitkiye özgü serin/treonin kinazlardan oluşmakta olup, bu kinazlar bitkilerde abiyotik stres yanıtlarında ve ABA bağımlı gelişim süreçlerinde rol oynamaktadır (Kulik vd., 2011). Buğdayda (*Triticum aestivum*) yapılan çalışmada, kuraklık ve sıcaklık stresi altında *MAPK3* ve *MAPK6*'nın ifadelerinin önemli ölçüde yukarı regüle olduğu bildirilmiştir (Y. Li vd., 2024). Mısırdaki (*Zea mays*) yapılan bir çalışmada, *SnRK2.2*'nin ABA uygulaması ve sıcaklık stresi altında, *SnRK2.6*'nın ise tuz stresi altında ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Huai vd., 2008). Literatürdeki bu bilgiler, dereotunda soğuk stres sinyalinin algılanması ve iletilmesinde MAPK ve SnRK kaskadlarının merkezi birer aktör olarak işlev gördüğünü göstererek çalışma sonuçlarımızı güçlendirmektedir.

Çalışma sonucunda *NHX1* ve *SOS1* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu genler, plazma membranı (*SOS1*) ve vakuol membranında (*NHX1*) lokalize olan Na^+/H^+ karşı taşıyıcı (antiporter) proteinlerin kodlanmasında rol oynamaktadır. Söz konusu proteinler, hücre içi sodyum dengesinin korunmasında görev alarak tuz stresine karşı adaptasyonda kritik öneme sahip, evrimsel olarak korunmuş taşıyıcı sistemler arasında bulunmaktadır (Ruiz-González vd., 2025). Pamukta (*Gossypium hirsutum*) genomunda tanımlanan *SOS1* gen ailesi üyelerinin tuz ve kuraklık stresleri altında farklı ekspresyon profilleri sergilediği ve bazı üyelerinde ekspresyon seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Iqra vd., 2025). Tuz stresine maruz kalan *Oryza sativa*'da *NHX1* ve *SOS1* genlerinin ekspresyonunun arttığı, bu artışın hücre içi Na^+ birikiminin düzenlenmesine ve tuz toleransının artmasına katkı sağladığını rapor eden çalışma, bulgularımızı destekler niteliktedir. (Solis vd., 2022).

Yürütülen çalışmada *AFP* geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. *AFP* genleri, bitkilerde ve diğer organizmalarda antifriz proteinlerini kodlamaktadır. Ayrıca bu genler, buz kristali oluşumunu inhibe ederek

donma stresine tolerans sağlamaktadır (Atıcı ve Nalbantoğlu, 2003; Kazemi-Shahandashti ve Maali-Amiri, 2018). *AFP* geninin dereotunda yukarı regülasyon göstermesi, bitkinin soğuğa karşı fiziksel düzeyde koruma mekanizması geliştirdiğini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlar, dereotunda soğuk stresine karşı *ERD10*, *LEA14*, *RD29A/B* gibi koruyucu proteinleri kodlayan genlerin, *CBF1* ve *CBF2* gibi transkripsiyon faktörlerinin, *APX* ve *CAT* gibi antioksidan savunma genlerinin ve MAPK ile SnRK sinyal yollarına ait bileşenlerin aktifleştğini göstermiştir. Bu durum, bitkinin düşük sıcaklık koşullarına karşı hücrel dengeyi korumaya yönelik çok yönlü bir stres yanıtı geliştirdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca elde edilen bulguların literatürde farklı bitki türleri için bildirilen çalışmalarla paralellik göstermesi, belirlenen genlerin soğuk stres toleransında önemli rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Çizelge 4.2. DESeq2 programı aşağı regüle olan genler

Gen Adı	Log2(FC)	P-değeri	Gen Adı	Log2(FC)	P-değeri
<i>RBC1</i>	-5,47	0,007248	<i>CYCB1</i>	-4,84	1,4E-20
<i>EXPA1</i>	-5,46	0,005948	<i>HCT</i>	-4,84	7,59E-23
<i>PIP2;1</i>	-5,43	0,005272	<i>LHCB6</i>	-4,83	1,25E-23
<i>NRT1.1</i>	-5,37	0,003298	<i>SUS1</i>	-4,82	1,69E-25
<i>EXP2</i>	-5,32	0,002788	<i>PETE1</i>	-4,30	4,68E-26
<i>PAL1</i>	-5,32	0,00276	<i>Xyl1</i>	-4,29	1,25E-28
<i>SPS1</i>	-5,31	0,001959	<i>PSBO1</i>	-4,28	5,47E-29
<i>EXP-A8</i>	-5,31	0,001744	<i>IAA19</i>	-4,27	1,32E-32
<i>HOS9</i>	-5,30	0,001386	<i>PORB</i>	-4,26	1,79E-33
<i>RBCS</i>	-5,22	0,001193	<i>PIP2;2</i>	-4,23	4,14E-39
<i>ARGOS</i>	-5,21	0,000593	<i>AGP2</i>	-4,23	5,99E-40
<i>CYCA2;1</i>	-5,19	0,000335	<i>EXPA8</i>	-4,23	9,08E-42
<i>XTH2</i>	-5,18	7,37E-05	<i>PIN1</i>	-3,50	1,1E-46
<i>SULTR1;1</i>	-5,17	2,64E-05	<i>PsbA</i>	-3,48	7,65E-48
<i>GA3ox</i>	-5,16	2,54E-05	<i>LHCA1</i>	-3,48	5,95E-48
<i>SUT2</i>	-5,15	1,83E-05	<i>PME3</i>	-3,47	4,83E-48
<i>CESA</i>	-5,14	1,18E-05	<i>GAPDH</i>	-3,46	2,88E-52
<i>GASA4</i>	-5,12	1,08E-05	<i>PIN3</i>	-3,46	1,92E-68
<i>PSBQ</i>	-5,12	7,87E-06	<i>CHSY</i>	-3,46	5,1E-71
<i>FNR1</i>	-5,07	9,58E-07	<i>RBCS3B</i>	-3,46	2,24E-75
<i>SAUR19</i>	-5,06	3,54E-07	<i>TUA6</i>	-3,45	1,93E-84
<i>PsbD</i>	-4,98	1,53E-07	<i>LHCB1</i>	-3,45	1,1E-86
<i>XTH17</i>	-4,98	1,28E-07	<i>RBCS1A</i>	-3,43	4,88E-90
<i>CDKB1;1</i>	-4,98	1,4E-08	<i>IAA1</i>	-3,43	2,29E-92
<i>EXST</i>	-4,98	9,74E-09	<i>GA20ox1</i>	-3,42	6,15E-95
<i>TUB-A</i>	-4,95	5,47E-10	<i>SAUR1</i>	-3,42	4,5E-106
<i>TUBB1</i>	-4,91	1,59E-12	<i>FLA1</i>	-3,42	4,1E-122
<i>PCNA1</i>	-4,90	1,15E-14	<i>PIP1;2</i>	-3,41	4,2E-123
<i>ACT2</i>	-4,87	8,73E-18	<i>CDKB1</i>	-3,41	6,5E-141
<i>AMT1.1</i>	-4,85	1,75E-18	<i>PSAK</i>	-3,41	1,9E-151
<i>KRP2</i>	-4,84	1,74E-18	<i>MYB4</i>	-2,63	2,7E-155

Soğuk stresine maruz kalan dereotu bitkisinde *RBCL*, *RBCS* ve *RBCS1A* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. *RBCL* geni Rubisco'nun büyük alt birimini, *RBCS* gen ailesi ise küçük alt birimini kodlamaktan sorumludur (Chase vd., 1993; Izumi vd., 2012). Rubisco (ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz) atmosferik CO₂'nin bağlanmasından sorumlu temel enzimdir ve fotosentetik kapasitenin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir (Hauser vd., 2015). Ayrıca yaprak proteinlerinin büyük kısmını oluşturması nedeniyle, bitkilerde azotun geri dönüşümü açısından da kritik öneme sahiptir (Izumi vd., 2012). Yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan *Triticum aestivum* (buğday) bitkisinde uzun süreli sıcaklık stresi altında, sıcaklığa duyarlı genotipin hem *rbcL* hem de *rbcS* genlerinin ekspresyonu ciddi şekilde azalırken; sıcaklığa toleranslı genotipin bu genlerin ekspresyon seviyelerini korumada daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Almeselmani vd., 2012). Bu durumla paralel olarak, *Solanum lycopersicum*'da yapılan bir çalışmada, *rbcL* transkriptlerinin kombine stres (sıcaklık ve kuraklık) altında, *rbcS* transkriptlerinin ise kombine ve bireysel sıcaklık stresi altında ekspresyonlarının azaldığı rapor edilmiştir (Raja vd., 2020). Benzer şekilde *A. thaliana* bitkisinde büyüme sıcaklığı arttıkça *RbcS1A* transkriptlerinin ekspresyonunun azaldığı ve yüksek sıcaklık koşullarının Rubisco enzimi üretimi üzerinde genel bir baskılayıcı etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Cavanagh vd., 2023). Farklı bitki türlerinde sıcaklık stresine bağlı olarak gelişen bu *rbcL* ve *rbcS* transkript azalışları, çalışma bulgularımızı destekler niteliktedir.

Yürütülen çalışmada *LHCB1*, *LHCB6* ve *LHCA1* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. *LHCA* ve *LHCB* genleri, ışık enerjisi yakalama, bitki büyümesi, gelişimi ve stres tepkilerinde rol oynayan ışık hasadı klorofil a/b bağlayıcı proteini (Lhc) kodlamaktadır (T. Huang vd., 2025). Lhca proteinleri fotosistem I (PSI) anten kompleksinde görev almakta, Lhcb proteini ise fotosistem II (PSII)'nin ana ışık hasat kompleksini oluşturmakta ve ışık enerjisinin reaksiyon merkezlerine aktarılmasında rol oynamaktadır (Alboresi vd., 2009). Literatürde bu genlerin stres altındaki yanıtlarının türlere göre değişiklik gösterdiği görülmektedir; örneğin *Apium graveolens* (kereviz)'in belirli çeşitlerinde soğuk, sıcaklık, kuraklık ve tuz stresi altında *LHCB1* geninin ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Jiang vd., 2014). Buna karşılık, *Oenanthе javanica* (su kerevizi)'da ise sıcaklık ve kuraklık stresi sonrasında ekspresyonunun azalması, çalışma bulgularımızla örtüşmektedir. (Jiang vd., 2014). Yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan *Cucumis sativus* (salatalık) bitkisinde *LHCB6*

ve *LHCA1* genlerinin ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı bildirilmesi de yine bulgularımızla paralellik göstermektedir (Y. Miao ve Zhang, 2025).

Çalışma sonucunda *PsbQ*, *PsbO1*, *PsaK*, *PsbA* ve *PsbD* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bu genler, fotosistem I (*PsaK*) ve fotosistem II'nin (*PsbQ*, *PsbO1*, *PsbA* ve *PsbD*) yapısal organizasyonu, elektron taşınımı ve fotosentetik verimliliği sürdürmede görevli proteinlerin kodlanmasında rol oynamaktadır. Sözü geçen proteinler birlikte fotosentetik elektron transfer zincirini düzenleme ve stres koşullarında fotosistem stabilitesinin korunmasında görev almaktadır (Fromme vd., 2001; Ifuku ve Noguchi, 2016). Bulgularımız, literatürde farklı abiyotik stres faktörleri altında fotosistem bileşenlerinde gözlenen ekspresyon azalışları ile örtüşmektedir. Nitekim kuraklık stresine maruz kalan bazı *Hordeum vulgare* (arpa) kültürlerinde *LHCB1*, *PsbQ* ve *PsbO* genlerinin ekspresyonunun azaldığı belirtilmiştir (Daszkowska-Golec vd., 2019). Benzer şekilde *Avena sativa* (beyaz yulaf) bitkisinde 15 günlük tuz stresi altında *PsbO*, *PsbA* ve *PsbD* genlerinin ekspresyon seviyesinin azaldığı, tuz stresi ve sodyum asetatı (NaCl+SA) birlikte maruz kaldıklarında ise *PsbA* geninin ifadesinin artarken, *PsbD* ve *PsbO* geninin ifadesinin azaldığı bildirilmiştir (Kappachery vd., 2024). Kuraklık stresi altında *Prunus persica* (şeftali) ve *Carthamus tinctorius* (aspir) bitkisinde *PsaK* geninin ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir (Haider vd., 2018; Sabzeali vd., 2026). Işık hasadı, enerji transferi ve fotosentetik elektron aktarımını sınırlandırarak bitkinin fotosentez hızında düşüşe yol açtığı belirtilen *PsaK* ifadesindeki azalışlar, çalışma bulgularımızı desteklemektedir (Sabzeali vd., 2026).

Yürütülen çalışma kapsamında *FNRI* ve *PetE1* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. *FNRI* geni, fotosentetik elektron taşıma zincirinde ferrodoksin NADP⁺'a elektron transferini sağlayan ferredoksin-NADP⁺ redüktaz (FNR) enziminin izoformlarından birinin kodlanmasından sorumludur (Mulo, 2011). *PETE1* geni ise fotosentetik elektron taşıma zincirinde sitokrom b6f kompleksinden PSI'ye elektron taşıyan bakır bağlayıcı plastosiyanin proteininin kodlanmasından sorumludur (Ivanov vd., 2012). Bu genlerin stres altındaki regülasyon mekanizmaları incelendiğinde; *Chenopodium quinoa* (kinoa) bitkisine kombine stres (yüksek sıcaklık ve tuzluluk stresi) uygulandığında *FNRI* geninin ifadesinin azaldığı bildirilmiştir (Shuyskaya vd., 2023). Benzer şekilde *Capsicum annuum*'da yapılan bir çalışmada *petE* geninin soğuk stres uygulamasının ilk aşamasında ekspresyonunun arttığı ancak stres devam ettikçe ekspresyonunun azaldığı, soğuk stresinin ardından gelen yeniden ısınma sürecinde ise yine ifadesinin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (W.

Miao vd., 2021). Farklı bitki türlerinde stresin ilerleyen evrelerinde ya da kombine stres koşullarında gözlenen bu transkript azalışları, elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Yürütülen çalışmada *PIP2;1* ve *PIP2;2* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bu iki gen, plazma membranındaki aquaporin proteinlerini kodlayan PIP (plazma membran içsel protein) ailesinin üyelerindendir (Kobae vd., 2006; Quigley vd., 2001). Ayrıca her ikisi de hücreler arası su taşınımı ve tuz stres yanıtında görev almaktadır (Kobae vd., 2006). Literatür incelediğinde; durum buğdayının tuza toleranslı genotipinde ABA uygulaması, tuz ve kuraklık stresi altında *PIP2;1* geninin ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Ayadi vd., 2011). Benzer şekilde kuraklık stresine maruz kalan *Cicer arietinum* (nohut) bitkisinin kuraklığa duyarlı genotipinde *PIP2;1* ve *PIP2;2* genlerinin ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir (Azeem vd., 2019). *Festuca* (yumak) bitkisinin hem yüksek hem de düşük don toleranslı genotiplerinde soğuğa adaptasyon/dayanıklılık (cold-hardening) sırasında *PIP2;1* transkriptlerinin azaldığı ortaya konmuştur (Pawłowicz vd., 2017). Literatürde gözlenen bu *PIP2* transkript azalışları, çalışma sonuçlarımızla örtüşmektedir.

Yürütülen çalışmada *EXPA1* ve *EXPA8* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. *EXPA1* ve *EXPA8* hücre duvarındaki polisakkaritler arası etkileşimi zayıflatarak hücre duvarı gevşemesini ve hücre uzamayı sağlayan expansin proteinlerini kodlayan genlerdir (Cosgrove, 2000; Cosgrove, 2015). Elde ettiğimiz bu transkript azalışları, abiyotik stres koşullarında hücre büyümesi ve duvar esnekliğinin baskılanmasına yönelik literatür verileriyle örtüşmektedir. Nitekim soğuk stresine maruz kalan *A. thaliana*'da *EXPA1* geninin ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (B. Lee vd., 2005). Benzer şekilde *A. thaliana*'da soğuk, sıcaklık, tuz, kuraklık, ABA, fosfat ve azot eksikliği gibi çevresel stresler altında *EXPA8* geninin ekspresyonunun azaldığı rapor edilen çalışma da bulgularımızı desteklemektedir (Mehdizadeh Hakkak ve Tohidfar, 2026).

Çalışmada *SAUR19*, *IAA19* ve *PIN1* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. *SAUR19* (küçük oksin yükseltici RNA 19) bitki büyümesi, gelişimi ve stres tepkilerinin çeşitli süreçlerinde rol oynayan *SAUR* gen ailesindendir. Bu gen, hücre uzaması ve plazma membranı H⁺-ATPaz aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur (Farquharson, 2014; H. Zhang vd., 2021). *IAA19* geni, bitkilerde oksin sinyallemede görev alan oksin ko-reseptörleri ve transkripsiyonel baskılayıcılardan oluşan Aux/IAA protein ailesinin oksine duyarlı üyelerinden birinin kodlanmasında rol oynar (Salehin vd., 2019). *PIN1* geni ise plazma zarı boyunca

elektrokimyasal gradyan üzerinden enerji tüketen bir oksin çıkış taşıyıcıları alt grubunu kodlayan *PIN* gen ailesinin bir üyesidir (J.-J. Zhou ve Luo, 2018). Oksin algılanması, taşınımı ve hücre uzaması mekanizmalarıyla doğrudan bağlantılı olan bu üç genin ekspresyon seviyelerinin çalışmamızda anlamlı şekilde azalması, dereotunun soğuk stresi altında büyüme sınırlamalarına gittiğini düşündürmektedir.

Yürütülen çalışmada *PAL1* ve *HCT* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. *PAL1* geni, bitkilerde fenilpropanoid yolunun başlangıcını katalizleyen PAL (fenilalanin amonyum liyaz) enziminin kodlanmasından sorumlu genlerden biridir. Ayrıca, lignin biyosentezi ve stres yanıt süreçlerinde görev olarak bitkinin abiyotik streslere karşı adaptasyonunda rol oynamaktadır. *HCT* geni ise fenilpropanoid yolunda lignin biyosentezine katkı sağlayan hidroksisinamoil transferaz enzimini kodlamaktan sorumludur ve lignin biyosentezinde ara basamakların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Raes vd., 2003). *Camellia sinensis* (çay) bitkisinde *HCT* geninin ekspresyonunun düşük sıcaklık, yüksek tuzluluk ve kuraklık stresi altında arttığı, yüksek sıcaklık stresi altında ise azaldığı bildiren çalışma, bu gene ait bulgularımızla örtüşmektedir (Feki vd., 2015).

Çalışma kapsamında *HOS9* geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. *HOS9* geni, CBF'den bağımsız stres yanıt yolunda işlev gören homeodomain tipi bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktan sorumludur. Bu gen, düşük sıcaklık koşullarında stres yanıtı ile ilişkili genlerin düzenlenmesinde rol oynayarak bitkinin donma toleransına katkı sağlamaktadır (J. Zhu vd., 2004).

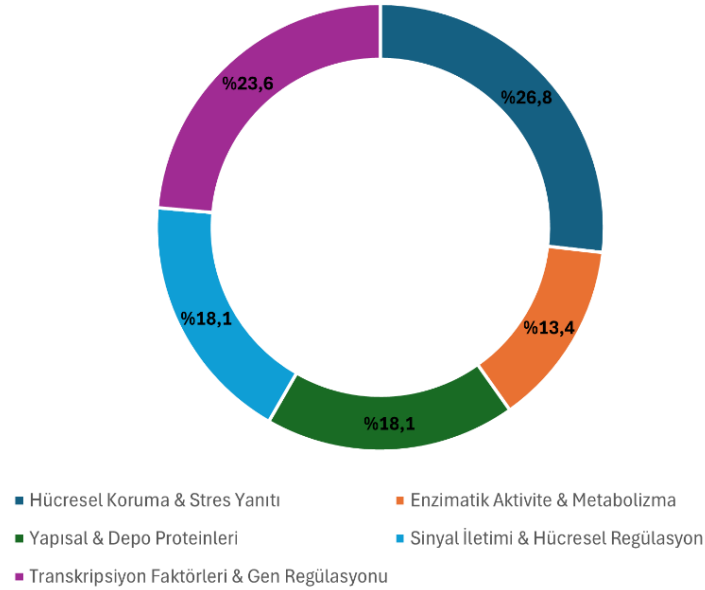
Elde edilen sonuçlar, dereotunda soğuk stresi altında *RBCL*, *RBCS* gibi fotosentezle ilişkili genlerinin, *LHCB1*, *PsbA* gibi ışık hasadı ve fotosistem bileşenlerinin ve *RBCS1A*, *FNRI*, *PetE1* gibi karbon fiksasyonu ve elektron taşınımında görevli genlerin aktivitesinin genel olarak azaldığını göstermiştir. Benzer şekilde *PIP2;1*, *PIP2;2* gibi su taşınımı, *EXPA1*, *EXPA8* gibi hücre genişlemesi ve *SAUR19*, *PIN1*, *IAA19* gibi oksin aracılı büyüme düzenlenmesinde görevli genlerin baskılanması, büyüme süreçlerinin yavaşlatıldığını ortaya koymaktadır. Bu durum, bitkinin kaynaklarını büyüme yerine stres toleransına yönlendirdiğini düşündürmektedir. Ayrıca literatürle uyumlu bu bulgular, gözlenen ekspresyon değişimlerinin korunmuş bir soğuk stres adaptasyon mekanizmasını yansıttığını desteklemektedir.

4.2. Homoloji Tabanlı Fonksiyonel Analiz Sonuçları

Gerçekleştirilen BLAST analizleri sonucunda, E -değeri $\leq 1e-10$ kriterine göre filtrelenen *Anethum graveolens* transkriptom veri seti içerisinde toplam 254 adet benzersiz (unique) protein tanımlanmıştır. Elde edilen proteinler amino asit dizi benzerlikleri ve korunmuş alan (domain) yapıları baz alınarak farklı protein aileleri altında sınıflandırılmıştır. Tespit edilen benzersiz proteinlerin fonksiyonel gruplara göre dağılımı Şekil 4.1’de, BLASTp analiz sonuçları ise Çizelge 4.3’te yer almaktadır.

Analiz edilen veri seti; özellikle soğuk stresi ve donma stresi ile ilişkili proteinleri içeren özelleşmiş veri tabanlarına dayandığından, tanımlanan proteinlerin tamamına yakınının stres yanıt mekanizmaları ve sinyal iletim yolları ile doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir. Belirlenen aday proteinlerin stres koşulları üzerindeki rolleri literatürdeki benzer çalışmalarla da desteklenmektedir.

Ayrıca benzersiz proteinler arasından seçilen bazı proteinlerin üç boyutlu yapıları SWISS-MODEL kullanılarak modellenmiş ve elde edilen yapısal modeller Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5’te verilmiştir.



Şekil 4.1. Tespit edilen benzersiz proteinlerin fonksiyonel gruplara göre dağılım yüzdeleri

Çizelge 4.3. BLASTp analiz sonuçları

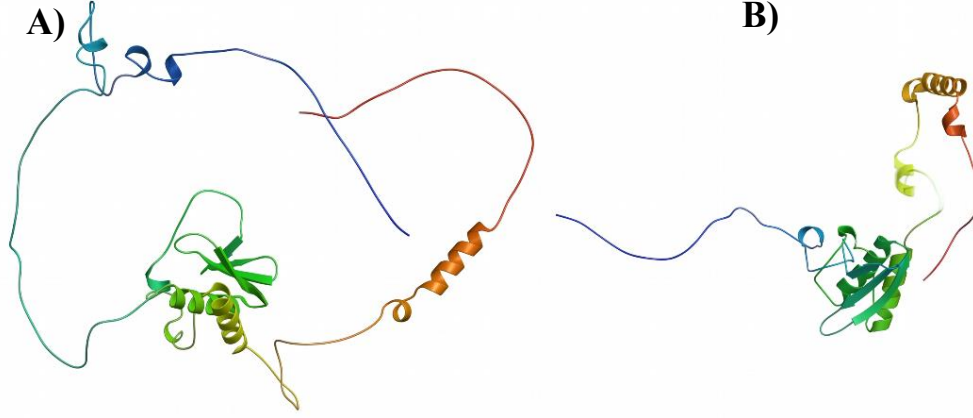
Protein Tanımı	Gen/Protein Sembolü	Uniprot ID	E- değeri	Bit Skor
C-repeat/DRE binding factor 1	CBF1 (DREB1B)	A0A220T7V6	3,87E-82	241
C-repeat/DRE binding factor 2	CBF2 (DREB1C)	A0A6C0TIZ6	6,52E-77	230
C-repeat/DRE binding factor 3	CBF3 (DREB1A)	Q9M0L0	3,00E-74	218
C-repeat/DRE binding factor 4	CBF4 (DREB1D)	Q9FJ93	1,04E-80	237
Dehydration-responsive element-binding protein 1F	DREB1F	Q9LN86	6,52E-62	190
Dehydration-responsive element-binding protein 2A	DREB2A	O82132	3,44E-19	80,5
Dehydration-responsive element-binding protein 2B	DREB2B	O82133	1,04E-20	84,7
JERF3	JERF3	Q6TXK7	2,52E-100	294
Ethylene-responsive transcription factor 5	ERF5	O80341	1,03E-48	159
Ethylene-responsive transcription factor ERF012	ERF012	Q9SFE4	1,08E-47	151
Ethylene-responsive transcription factor ERF113	ERF113	A0A6P5TMF5	6,70E-45	146
Cold acclimation protein WCOR413	COR413	P93613	1,13E-76	226
Cold-regulated 413 plasma membrane protein 1	COR413-PM1	Q9XIM7	1,23E-83	243
Cold-regulated plasma membrane protein 2	COR413-PM2	A0A1U8E7A7	1,98E-107	303
Cold acclimation protein COR413-TM1	COR413-TM1	Q84XU9	2,41E-12	60,1
COR410 protein	COR410	A0A6A2WDN4	3,73E-19	78,6
Cold-responsive protein kinase 1	CRPK1	Q93YN1	8,75E-172	481
Mitogen-activated protein kinase 3	MAPK3	Q39023	0	628
Mitogen-activated protein kinase 6	MAPK6	Q39026	0	583
Mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAPKK2	Q9S7U9	1,14E-65	207
Diacylglycerol kinase 2	DGK2	Q9FFN7	0	996
Diacylglycerol kinase 3	DGK3	Q8VZG1	8,87E-142	407
Diacylglycerol kinase 5	DGK5	Q9C5E5	0	711
WRKY transcription factor 25	WRKY25	D7LBL7	4,94E-88	273
WRKY transcription factor 33	WRKY33	D7LLK7	6,99E-117	351
Peroxidase 1	PRX1	P0DI10	2,81E-75	241
Peroxidase 24	PRX24	Q9ZV04	2,46E-60	202
Peroxidase 27	PRX27	Q43735	8,91E-73	234
Peroxidase 35	PRX35	Q96510	3,57E-67	219
Peroxidase 57	PRX57	Q43729	1,79E-70	228
Peroxidase 64	PRX64	Q43872	1,09E-67	221
Peroxidase 73	PRX73	Q43873	1,57E-66	218
Dehydrin ERD10	ERD10	P42759	3,12E-29	106
Dehydrin Rab15	Rab15	A0AAV9DCP0	2,83E-21	82
Dehydrin Rab18	Rab18	A0A6J0KZK5	2,01E-22	85,1
Dehydrin COR47	COR47	A0A151TD44	6,94E-31	109
Cold shock protein 1	CSP1	O65639	9,73E-36	134
Cold shock domain-containing protein 3	CSP3	Q94C69	1,28E-22	96,3

Çizelge 4.3'te verilen BLASTp analiz sonuçları, aday proteinlerin referans proteinlerle yüksek düzeyde benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen düşük

E-değeri ve yüksek bit skor değerleri, aday proteinlerin referans proteinlerle güçlü ve güvenilir homoloji ilişkileri sergilediğini göstermektedir. Bu sonuçlar, belirlenen aday proteinlerin ilgili protein ailelerine ait olduğunu ve fonksiyonel olarak benzer özellikler taşıyabileceğini desteklemektedir.

Soğuk stresine maruz kalan dereotu bitkisinde elde edilen protein dizilerinin önemli bir kısmı DREB1/CBF transkripsiyon faktör ailesine ait çok sayıda üye ile yüksek homoloji göstermiştir. DREB1/CBF transkripsiyon faktörlerinin soğuk, kuraklık, sıcaklık ve yüksek sıcaklık stres koşullarında indüklenebildiği ve stres yanıt genlerinin transkripsiyonel düzenlenmesinde rol aldığı literatürde bildirilmiştir (Morran vd., 2011).

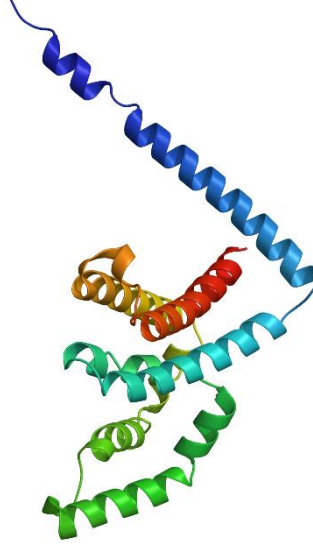
Yürütülen çalışmada CBF1/DREB1B, CBF2/DREB1C, CBF3/DREB1A, CBF4/DREB1D, DREB1F ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu homoloji verileri ve aday protein profili, literatürde farklı bitki türlerinin soğuk ve diğer abiyotik stres yanıtlarında bu faktörlerin güçlü bir şekilde indüklendiğini gösteren bulgularla örtüşmektedir. Örneğin *Arabidopsis thaliana*'da yapılan bir çalışmada *CBF1*, *CBF2* ve *CBF3* genlerinin soğuk stresi tarafından güçlü bir şekilde indüklendiği ortaya konmuştur (Shinwari vd., 1998). Benzer şekilde *Oryza sativa*'da gerçekleştirilen bir çalışmada yine bu üç genin soğuk stresi sırasında indüklendiği ve bitkide soğuk toleransını arttırdığı belirtilmiştir (Donde vd., 2019). Yapılan bir başka *A. thaliana* çalışmasında ise *DREB1D* geninin kuraklık stresine maruz kaldığında ekspresyon seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Haake vd., 2002). Ayrıca yabani (*Vitis riparia*) ve kültür (*Vitis vinifera*) üzümlerinde *DREB1D* transkript seviyelerinin soğuk uygulaması sonrası genç ve olgun dokularda artış gösterdiği, bu artışın uzun süreli olarak korunduğu ve bu durumun bitkinin kışa dayanıklılık kapasitesi açısından önemli olduğu rapor edilmiştir (Xiao vd., 2008). Çeşitli abiyotik stresler uygulanan iki farklı *O. Sativa* kültüründe *DREB1F* geninin soğuk, kuraklık ve tuz stresleri ile indüklendiği ortaya konulmuştur (Q. Wang vd., 2008). Tuzluluk stresine maruz kalan *A. thaliana* köklerinde de *DREB1F* ifadesinin güçlü, *DREB1D* ifadesinin zayıf indüklendiği rapor edilmiştir (Sakuma vd., 2002).



Şekil 4.2. DREB1D (A) ve CBF1 (B) proteinlerinin Swiss-Model tabanlı üç boyutlu (3D) homoloji modellenmesi

Çalışma kapsamında *COR* (Cold-Regulated) gen ailesine ait COR413, COR413-PM1, COR413-PM2, COR413-TM1 ve COR410 ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Tanımladığımız bu aday COR proteinleri, literatürde farklı bitki türlerinde soğuğa alışma, donma ve abiyotik stres toleransını sağlayan temel moleküler mekanizmalarla uyum göstermektedir. Nitekim yapılan bir çalışmada *Brachypodium sylvaticum*'un dokuz genotipinde COR413 ve COR410'un diferansiyel olarak düzenlendiği, bu durumun bitkinin soğuğa alışma ve sonrasında donma toleransındaki artışı sağlayan moleküler mekanizmaya sahip olduğunu gösterdiği belirtilmiştir (Lambert-Rivest, 2019). Literatürde, *Dendrobium Sonia* ve *Chimonanthus praecox*'tan izole edilen COR413-PM1 homologlarının, *A. thaliana*'da aşırı ekspresyonu soğuk ve kuraklık stres toleransını artırırken, *D. Sonia* kaynaklı genin tuz stresine karşı da ek tolerans sağladığı bildirilmiştir (Deng vd., 2024; Yi vd., 2026). Benzer şekilde *Saussurea involucrata*'dan izole edilen COR413-PM1 homologunun aşırı ekspresyonunun, pamukta (*Gossypium hirsutum*) soğuk ve kuraklık stresine karşı toleransı artırdığı rapor edilmiştir (M. Wang vd., 2023). *Phlox subulata*'dan izole edilen *COR413-PM2* geninin aşırı ekspresyonunun, Ca^{2+} akışını, *COR* ve *CBF* genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek *A. thaliana*'da düşük sıcaklık toleransını artırdığı ortaya konmuştur (A. Zhou vd., 2018). Ayrıca *Solanum lycopersicum*'dan izole edilen *COR413-PM2* homologunun aşırı ekspresyonunun transgenik domates bitkilerinde soğuk stres toleransını artırdığı, genin yapraklarda daha yüksek düzeyde eksprese olduğu ve soğuk stresi koşullarında ekspresyonunun indüklendiği rapor edilmiştir (L. Zhang vd., 2021). Literatürde, COR413-TM1 proteininin *A. thaliana* başta olmak üzere çeşitli tahıl türlerinde (*Hordeum vulgare* ve *Triticum aestivum*) ve bazı bitki türlerinde düşük sıcaklık koşullarına yanıt

olarak indüklendiği ve soğuk toleransına katkı sağladığı, ayrıca bu genin pirinçte kuraklık toleransını artırdığı gösterilmiştir (Breton vd., 2003; C. Zhang vd., 2017).



Şekil 4.3. COR413-PM2 proteinin Swiss-Model tabanlı üç boyutlu (3D) homoloji modellemesi

Yürütülen çalışma sonucunda ERF ailesine ait JERF3, ERF5, ERF012 ve ERF113 ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Bu aday transkripsiyon faktörleri, literatürde farklı bitki türlerinde çoklu abiyotik streslere karşı tolerans ve duyarlılık dengesini kontrol eden karmaşık moleküler mekanizmalarla önemli ölçüde örtüşmektedir. Örneğin *S. lycopersicum*'dan izole edilen JERF3'ün soğuk, tuzluluk, etilen, abisisik asit ve jasmonik asit tarafından indüklendiği ve JERF3 eksprese eden tütünde (*Nicotiana tabacum*) tuzluluk, kuraklık ve donma stresine karşı toleransı artırdığı bildirilmiştir (H. Wang vd., 2004; Wu vd., 2008). Benzer şekilde, transgenik pirinçlerde de JERF3'ün aşırı ekspresyonunun kuraklığa ve ozmotik strese karşı toleransı artırdığı rapor edilmiştir (H. Zhang vd., 2010). Domateste yapılan bir başka çalışmada ise ERF5 ekspresyonunun soğuk ve yüksek sıcaklık stresinde tüm organlarda, yaralanma, tuzluluk, kuraklık ve su stresinde belirli organlarda indüklendiği ve ERF5'i aşırı eksprese eden transgenik bitkilerin tuz ve kuraklık stresine karşı artan bir direnç gösterdiği ortaya konmuştur (Pan vd., 2012). Ayrıca domatesten izole edilen ERF5 homoloğunu aşırı eksprese eden transgenik bitkilerin (*A. thaliana*) absisik asite karşı aşırı duyarlılık gösterirken tuz stresine karşı artan tolerans sergilediği belirtilmiştir (Chuang vd., 2010). *A. thaliana*'da yapılan bir çalışmada, *erf012* mutantlarla kıyaslandığında, ERF012'nin aşırı ifadesinin düşük sıcaklıkta antosiyanin birikimini azaltarak soğuk stres toleransı

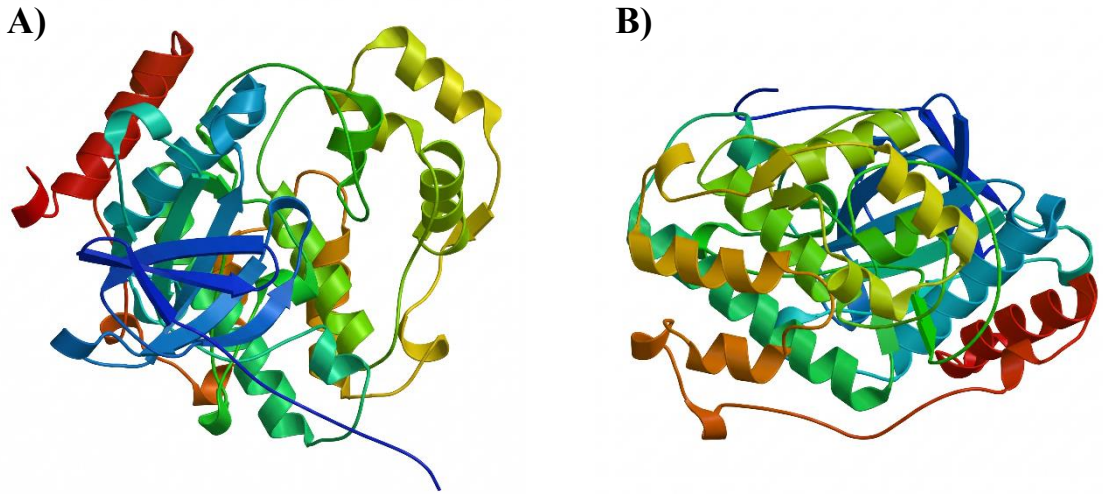
düşürdüğü; yüksek sıcaklıkta ise klorofil kaybını artırarak ısı stresine duyarlılığı yükselttiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, ERF012'nin aşırı ifadesinin kuraklık, tuzluluk ve ağır metal streslerine karşı direnci artırdığı da rapor edilmiştir (Y. Huang vd., 2022). Üzüm asmasından (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) izole edilen ERF113 homologunun transgenik *A. thaliana* bitkilerinde aşırı ekspresyonunun su baskınına karşı toleransı artırdığı ve oksidatif hasarı azalttığı; bu etkinin ATHB-13 ile protein-protein etkileşimi üzerinden düzenlendiği ortaya konmuştur (Min vd., 2026). *A. thaliana*'da yapılan bir çalışma ERF113 (RAP2.6L) transkriptlerinin ısı stresinden etkilenmediğini, tuz ve kuraklık stresi sırasında ifadesinin arttığını, donma stresinin ardından ise ifadesinin azaldığını bildirmiştir (Krishnaswamy vd., 2011).

Yürütülen çalışmada DREB2A ve DREB2B ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Bu aday protein dizileri, literatürde kuraklık, tuzluluk ve termal stres yanıt yollarında kritik roller üstlenen DREB2 ailesi üyelerinin işlevsel dinamikleriyle paralellik göstermektedir. Nitekim *A. thaliana*'da yapılan bir çalışmada DREB2A ve DREB2B'nin kuraklık (dehidrasyon) ve tuzluluk stresleri altında indüklendiği, ancak düşük sıcaklık stresinde indüklenmediği bildirilmiştir (Q. Liu vd., 1998; Nakashima vd., 2000; Sakuma vd., 2002). Benzer bir çalışmada *A. thaliana*'da DREB2A'nın aktif formunun kuraklık stresine karşı toleransı artırdığını, ancak donma stresine benzer bir tolerans sağlamadığını rapor etmiştir (Sakuma vd., 2006). Ayrıca yapılan bir çalışmada *Pennisetum glaucum*'dan (inci darısı) izole edilen DREB2A'yı aşırı eksprese eden *A. thaliana*'da ısı, tuzluluk ve kuraklık stresine karşı toleransın arttığı, ayrıca uzun süreli soğuk uygulamalarında transgenik bitkilerin yabancı tipe kıyasla daha yüksek hayatta kalma oranı gösterdiği ortaya konmuştur (Meena vd., 2022).

Çalışma doğrultusunda WRKY33 ve WRKY25 (WRKY DNA-binding protein 25) ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Bu aday protein dizileri, literatürde düşük sıcaklık ve çoklu abiyotik stres sinyal iletim ağlarında pozitif regülatör olarak işlev gören WRKY üyelerinin moleküler dinamikleriyle önemli bir uyum sergilemektedir. Örneğin *Betula pendula* (huş ağacı) ve *A. thaliana*'nın da dahil edildiği bir çalışmada WRKY33'ün ABA'dan bağımsız, WRKY25'in ABA'ya bağımlı ve her ikisinin de CBF'den bağımsız olarak soğuk stresinde indüklendiği bildirilmiştir. Aynı çalışma her iki genin aşırı ekspresyonunun *A. thaliana*'da donma toleransını artırdığı *B. pendula*'da ise özellikle WRKY33 aşırı ekspresyonunun donmaya karşı dayanıklılığı artırdığı belirtilmiştir. Bu bulgular sonucunda her iki genin de soğuk toleransını pozitif olarak düzenlediği, ancak WRKY33'ün daha baskın bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Jia

vd., 2026). Benzer şekilde, Zea mays'tan izole edilen WRKY33 homologunun yüksek tuz, kuraklık, soğuk ve ABA uygulamalarıyla indüklendiği, ayrıca Arabidopsis'te aşırı ekspresyonunun stresle ilişkili genleri normal koşullarda bile aktive ederek bitkinin tuz stresine karşı toleransını artırdığı bildirilmiştir (H. Li vd., 2013). *A. thaliana*'da yapılan bir başka çalışmada ise WRKY25'in ısı stresi koşullarında ekspresyonunun değiştiği ve stres yanıtıyla ilişkili genlerin regülasyonunda rol alarak bitkinin yüksek sıcaklığa karşı toleransına katkı sağladığı ortaya konmuştur (S. Li vd., 2009).

Yürütülen çalışmada MAPKK2 (MKK2), MAPK3 ve MAPK6 ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Bu bulgular düşük sıcaklık sinyal iletim mekanizmalarının ve hücrel yanıt kontrol ağlarının karakterizasyonu açısından literatür verileriyle desteklenmektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada MAPKK2'nin soğuk ve tuz stresi ile aktive edildiği, ancak ısı stresiyle aktive olmadığı, ayrıca soğuk ve tuz stresinin, MAPKK2'nin dahil olduğu MAPK kaskadı üzerinden MPK6 aktivasyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Teige vd., 2004). Benzer şekilde domatesten izole edilen MAPK3 homologunun transgenik tütün bitkilerinde aşırı ekspresyonunun düşük sıcaklık stresine karşı toleransı artırdığı ortaya konmuştur (L. Yu vd., 2015). Literatürde soğuk stresinde MAPKK2'nin dahil olduğu MAPK kaskadının soğuk toleransına pozitif etki ettiği, ancak MKK4/5 tarafından aktive edilen MPK3 ve MPK6 kaskadının ICE1'in fosforilasyonu yoluyla stabilitesini azaltarak CBF aracılı soğuk yanıtı baskılayabildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada MKK2 kaskadının, MPK3 ve MPK6'nın aktivitesini baskılayarak bitkinin soğuk stres yanıtını dengede tuttuğu rapor edilmiştir (Zhao vd., 2017).



Şekil 4.4. MAPK3 (A) ve MAPK6 (B) proteinlerinin Swiss-Model tabanlı üç boyutlu (3D) homoloji modellenmesi

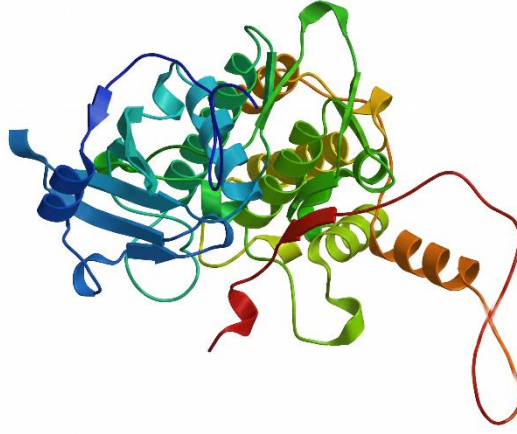
Çalışma kapsamında Diasilgliserol kinaz (DGK) 2, DGK3 ve DGK5 ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Literatürde *DGK2*, *DGK3* ve *DGK5* genleri soğuk stresi altında indüklenmesine rağmen, DGAT (diasilgliserol açiltransferaz) ile olan dengeye bağlı olarak donma stresinde toleransı azaltabileceği gösterilmiştir. Nitekim, *DGK2*, *DGK3* ve *DGK5* genlerinin çalışmadığı mutant *A. thaliana*'larda hücre hasarına yol açan fosfatidik asit (PA) birikiminin sınırlanarak donma toleransının arttığı bildirilmiştir (W.-J. Tan vd., 2018). Benzer şekilde, *A. thaliana*'da yapılan bir çalışmada DGK5 ve PA'nın ABA2 aracılığıyla ABA'nın biyosentezini baskılayarak tuz ve kuraklık stresine karşı bitkiyi olumsuz etkilediği rapor edilmiştir. Ancak, *dgk5* mutant bitkilerde ABA seviyelerinin yükselerek bitkinin kuraklık ve tuz stresine karşı dayanıklı hale geldiği ortaya konmuştur (J. Li vd., 2024).

Yürütülen çalışmada Peroksidaz (Prx)1, Prx24, Prx27, Prx35, Prx57, Prx64, Prx73 ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Literatürde farklı *A. thaliana* popülasyonlarında *Prx24*, *Prx27*, *Prx57*, *Prx64*'ün soğuk stresinde, *Prx35*'in ısı ve tuzluluk stresinde, *Prx1*'in soğuk ve ısı stresinde, *Prx73*'ün ise her üç stres koşulunda ekspresyonunun arttığı, bu genlerin ilgili streslere toleransta rol alabileceği bildirilmiştir (Eljebbawi vd., 2022).

Yürütülen çalışma sonucunda LEA II/ Dehidrin protein ailesine ait COR47, ERD10, Rab15 ve Rab18 ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Literatürde *A. thaliana*'da COR47 protein ve transkriptlerinin düşük sıcaklık, Rab18 transkriptlerinin ABA ve tuzluluk stresi altında biriktiği bildirilmiştir (Nylander vd., 2001). Ayrıca *Poa pratensis* L.'de yapılan çalışmada, Rab15'in kuraklık stresi altında kuraklığa toleranslı genotiplerde, duyarlı genotiplere kıyasla daha yüksek seviyede indüklendiği belirtilmiştir (Bushman vd., 2021). Bir başka çalışmada ise *COR47* ve *ERD10*'un *A. thaliana*'da soğuk stresine yanıt olarak indüklendiği ve bu genlerin donmaya duyarlı enzimleri donma (düşük sıcaklık) kaynaklı hasara karşı koruyarak kriyoprotektif aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Ohkubo vd., 2020).

Yürütülen çalışmada CSP (Cold shock protein) 1 ve CSP3 ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. Soğuk stresine maruz bırakılan *A. thaliana*'da CSP1 miktarının arttığı, ayrıca CSP1'in aşırı ekspresyonunun su eksikliğine karşı toleransı artırdığı literatürde belirtilmiştir (Juntawong vd., 2013). Ayrıca, Pak-choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) ve Çin lahanasında (*B.rapa* ssp. *pekinensis*) yapılan çalışmada, pak-choi'de CSP1 ve CSP3'ün ABA, ozmotik, soğuk ve tuz stresinde indüklendiği, çin

lahanasında ise CSP1'in yine bu dört stres koşulunda indüklendiği ancak CSP3'ün sadece ABA ve ozmotik strese indüklendiği bildirilmiştir (F. Huang vd., 2019). Bezer şekilde, *A. thaliana*'da yapılan bir çalışmada CSP3'ün tuz ve kuraklık stresi sırasında indüklendiği ve bu stres koşullarına karşı toleransın düzenlenmesinde rol oynadığı ortaya konmuştur (M.-H. Kim vd., 2013). Bir diğer çalışmada ise *AtCSP3*'ün bir RNA şaperonu olarak işlev görüp, transgenik bitkilerde aşırı ekspresyonunun yüksek donma toleransı sağladığı rapor edilmiştir (M.-H. Kim vd., 2009).



Şekil 4.5. CRPK1 proteininin Swiss-Model tabanlı üç boyutlu (3D) homoloji modellemesi

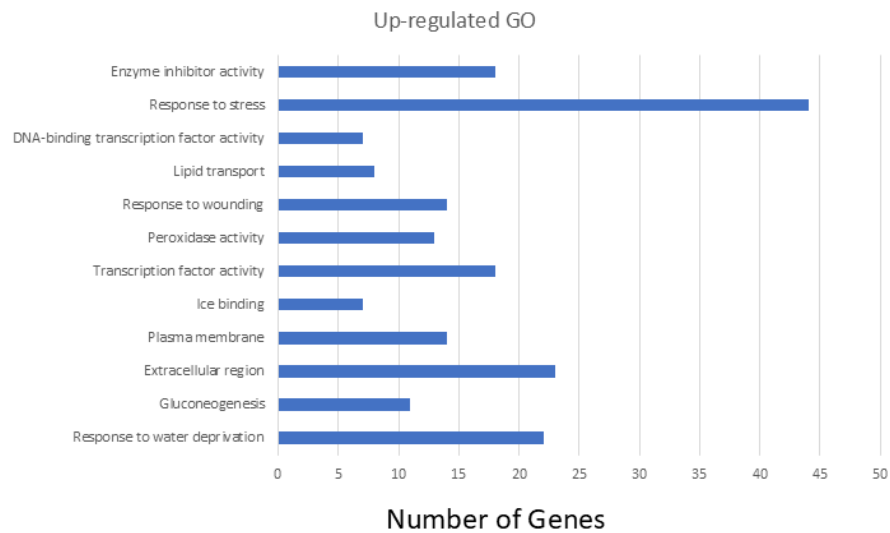
Yürütülen çalışmada Cold- responsive protein kinase 1 (CRPK1) ile homoloji gösteren aday protein dizileri belirlenmiştir. CRPK1'in, *A. thaliana*'da 14-3-3 proteinleri ve CBF transkripsiyon faktörleri aracılığıyla plazma zarından çekirdeğe soğuk sinyalini ileterek donma toleransının düzenlenmesinde rol aldığı literatürde bildirilmiştir (Z. Liu vd., 2017).

Tespit edilen aday protein dizileri ile literatür karşılaştırıldığında, *Anethum graveolens*'te tanımlanan homolog dizilerin abiyotik stres yanıtında rol oynayan, birbiriyle ilişkili farklı sinyal yollarına sahip olduğu görülmektedir. Farklı gen ailelerinin birlikte bulunması, dereotunun abiyotik strese karşı oldukça kompleks ve evrimsel olarak korunmuş bir savunma mekanizmasına sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, hem dereotunun soğuğa adaptasyon yeteneğinin moleküler temelini aydınlatmakta hem de gelecekteki ıslah çalışmalarında aday genlerin seçimi için önemli bir veri seti sunmaktadır. BLAST analiz sonuçlarının literatürde bildirilen sekanslarla yüksek düzeyde uyum göstermesi, elde edilen verilerin güvenilirliğini ve biyolojik olarak anlamlılığını desteklemektedir.

4.3. Gen Ontolojisi (GO) Sonuçları

Diferansiyel ifade gösteren genlerin daha iyi anlaşılması amacıyla gen ontolojisi (GO) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz kapsamında genler, biyolojik proses (BP), moleküler fonksiyon (MF) ve hücresel bileşen (CC) olmak üzere üç ana GO kategorisine atanmıştır. İfadesi artan ve azalan genlerin gen ontolojisi analizine ait BP, MF ve CC sonuçları Şekil 4.6 ve 4.7’de yer almaktadır.

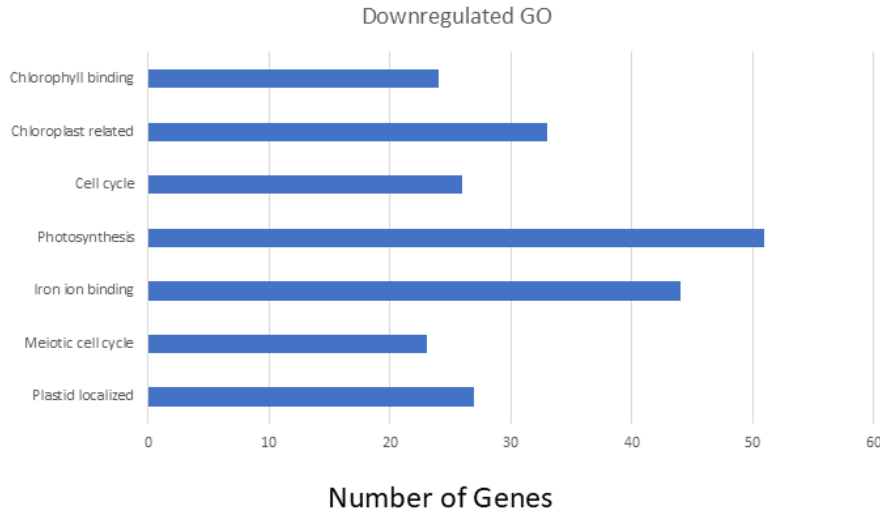
İfade seviyesi artan genlerin GO analizi sonucunda, biyolojik proses (BP) kategorisinde 6 alt başlık belirlenmiştir. “Su eksikliğine yanıt” başlığında 22, “glikoneogenez” başlığında 11, “yaralanmaya yanıt” başlığında 14, “lipit taşınması” başlığında 8 ve “strese yanıt” başlığında 44 genin gruplandığı tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak “soğuğa yanıt” başlığının bu kategoride yer aldığı görülmüştür.



Şekil 4.6. İfadesi artan genlerin gen ontolojisi analizine ait biyolojik proses (BP), moleküler fonksiyon (MF) ve hücresel bileşen (CC) sonuçları

Moleküler fonksiyon (MF) kategorisinde 5 alt başlık belirlenmiştir. “Buz bağlama aktivitesi” başlığında 7, “transkripsiyon faktörü aktivitesi” başlığında 18, “peroksidaz aktivitesi” başlığında 13, “enzim inhibitör aktivitesi” başlığında 18 ve “DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi” başlığında 7 genin gruplandığı tespit edilmiştir.

Hücresel bileşen (CC) kategorisinde 4 alt başlık belirlendi. “Ekstraselüler bölge” başlığında 23 ve “plazma membranı” başlığında 14 genin gruplandığı tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak “sitoplazma” ve “çekirdek” başlığının da bu kategori içerisinde yer aldığı görülmüştür.



Şekil 4.7. İfadesi azalan genlerin gen ontolojisi analizine ait biyolojik proses (BP), moleküler fonksiyon (MF) ve hücresel bileşen (CC) sonuçları

İfadesi azalan genlerin GO analizi sonucunda, biyolojik proses (BP) kategorisinde 3 alt başlık belirlenmiştir. “Fotosentez” başlığında 51, “mayoz hücre döngüsü” başlığında 23 ve “hücre döngüsü” başlığında 26 genin gruplandığı tespit edilmiştir.

Moleküler fonksiyon (MF) kategorisinde 2 alt başlık belirlenmiştir. “Klorofil bağlama” başlığında 24 ve “demir iyonu bağlama” başlığında 44 genin gruplandığı tespit edilmiştir.

Hücresel bileşen (CC) kategorisinde 2 alt başlık belirlenmiştir. “Kloroplast” başlığında 33 ve “plastit” başlığında 27 genin gruplandığı tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen bulgular, literatürde rapor edilen çalışmalar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Yürütülen çalışmada, ifadesi artan genlerin biyolojik proses (BP) kategorisinde “su eksikliğine yanıt”, “glikoneogenez”, “yaralanmaya yanıt”, “lipit taşınması”, “strese yanıt” ve “soğuğa yanıt” süreçlerinde yer aldığı belirlenmiştir. Bu bulgular, farklı bitki türlerinde çeşitli abiyotik stres koşullarının incelendiği çalışmalarla uyumludur. Nitekim *Capsicum annuum* bitkisinin ısı, soğuk, tuzluluk ve ozmotik stres koşullarına verdiği yanıtların transkriptom düzeyinde incelendiği bir çalışmada, biyolojik proses (BP) kategorisinde “su eksikliğine yanıt” ve “yaralanmaya yanıt” süreçlerinin anlamlı düzeyde zenginleştiği rapor edilmiştir (Kang vd., 2020). Benzer şekilde *Hordeum vulgare* (arpa) üzerine yapılan ve soğuk, ısı, tuzluluk, kuraklık, su baskını gibi streslere ait transkriptom veri setlerinin analiz edildiği bir çalışmada, BP kategorisinde “soğuğa yanıt”, “su eksikliğine yanıt” ve “glikoneogenez” süreçlerinin zenginleştiği bildirilmiştir (Panahi, 2025). Ayrıca kuraklık stresine maruz

kalan *Cicer arietinum* (nohut) bitkisinde, ifadesi artan genlerin GO analizi sonucunda BP kategorisinde “strese yanıt” sürecinde zenginleşme gösterdiği ortaya konmuştur (Mahdavi Mashaki vd., 2018). *Oryza sativa* (pirinç) bitkisinin soğuk, sıcaklık, kuraklık, tuzluluk gibi çoklu abiyotik streslere yanıtına ilişkin yapılan meta analizde DEG’lerin BP kategorisinde “strese yanıt” ve “lipit taşınması” süreçlerinde anlamlı düzeyde zenginleştiği bildirilmiştir (Azad vd., 2024). Bu biyolojik süreçlerin birlikte yukarı regüle olması, bitkinin su eksikliği ve soğuk gibi abiyotik stres koşullarına karşı metabolik süreçlerini yeniden düzenlediğini ve stresle ilişkili savunma yollarını aktive ettiğini göstermektedir. Bitkinin bu davranışı, stres koşullarına uyum sağlamak için bütüncül bir yanıt geliştirdiğini düşündürmektedir.

Yürütülen çalışmada, ifadesi artan genlerin moleküler fonksiyon (MF) kategorisinde “buz bağlama aktivitesi”, “transkripsiyon faktörü aktivitesi”, “peroksidaz aktivitesi”, “enzim inhibitör aktivitesi” ve “DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi” süreçlerinde yer aldığı belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde, çalışma bulgularımızla uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Örneğin *Solanum lycopersicum* üzerinde yapılan bir çalışmada tuz stresi altında ifadesi artan genlerin moleküler fonksiyon (MF) kategorisinde “DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi” ve “peroksidaz aktivitesi” süreçlerinde zenginleşme gösterdiği bildirilmiştir (Y. Wang vd., 2026). Benzer şekilde, *A. thaliana*’da kuraklık, sıcaklık ve tuz gibi çeşitli abiyotik streslerle yapılan meta analizde ve *Zea mays* (mısır) bitkisinde soğuk ve kuraklık stresiyle yapılan çalışmada moleküler fonksiyon (MF) kategorisinde “transkripsiyon faktörü aktivitesi” sürecinin anlamlı düzeyde zenginleştiği rapor edilmiştir (Biniaz vd., 2022; Lu vd., 2017). (Mahdavi Mashaki vd., 2018). Ayrıca *Oryza sativa* (pirinç) bitkisinin soğuk, sıcaklık, kuraklık, tuzluluk gibi çoklu abiyotik streslere yanıtına ilişkin yapılan meta analizde DEG’lerin MF kategorisinde “transkripsiyon faktörü aktivitesi” ve “enzim inhibitör aktivitesi” süreçlerinde anlamlı düzeyde zenginleştiği ortaya konmuştur (Azad vd., 2024). *Zea mays* bitkisinin farklı hatlarında soğuk uygulaması sonucu DEG’lerin MF kategorisinde “buz bağlama aktivitesi” sürecinde zenginleştiği rapor edilmiştir (Z. Li vd., 2016). Bu bulgular, stres koşullarının bitkide savunma, koruma ve gen düzenlenmesi ile ilişkili mekanizmaları aktive ettiğini göstermektedir. Bu süreçlerde yukarı regüle olan genlerin, hücresel dengenin korunması ve stresin oluşturduğu olumsuz etkilerin azaltılmasında görev aldığı düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında, ifadesi artan genlerin hücresel bileşen (CC) kategorisinde “ekstraselüler bölge”, “plazma membranı”, “sitoplazma” ve “çekirdek” bileşenlerinde

yer aldığı belirlenmiştir. Kuraklık stresine maruz kalan *Medicago sativa* (yonca) bitkisinde kuraklığa yanıt veren genlerin GO analizi sonucunda hücresel bileşen (CC) kategorisinde “plazma membranı” ve “ekstraselüler bölge” lokalizasyonlarında zenginleştiği bildirilmiştir (Wan vd., 2022). Ayrıca *Zea mays*’ın soğuk ve kuraklık stresine maruz bırakıldığı bir çalışmada unigenlerin CC kategorisinde “ekstraselüler bölge” bileşeninde yer aldığı rapor edilmiştir (Lu vd., 2017). Bir başka çalışmada düşük sıcaklık stresine maruz bırakılan *Zea mays* bitkisinde DEP’lerin (diferansiyel ifade gösteren proteinler), kuraklık stresine maruz kalan *Brassica napus* (kolza) bitkisinde ise ifadesi artan genlerin CC kategorisinde “sitoplazma” bileşeninde zenginleştiği ortaya konmuştur (X. Tan vd., 2020; T. Yu vd., 2025). *Medicago sativa* bitkisinde soğuk stresi sonrası DEmRNA (diferansiyel ifade gösteren mRNA) ’ların CC kategorisinde “ekstraselüler bölge”, “plazma membranı”, “sitoplazma” ve “çekirdek” bileşenlerinde zenginleştiği rapor edilmiştir (L. Zhu vd., 2026). Bu bulgular, stres koşullarına yanıtın tek bir hücresel bölgeyle sınırlı kalmadığını ve hücresel düzeyde kapsamlı bir adaptasyon sürecinin mevcut olduğunu göstermektedir.

Yürütülen çalışma doğrultusunda, ifadesi azalan genlerin biyolojik proses (BP) kategorisinde “mayoz hücre döngüsü”, “fotosentez” ve “hücre döngüsü” süreçlerinde yer aldığı belirlenmiştir. Bu bulgular, farklı bitki türlerinde çeşitli abiyotik stres koşullarına verilen transkriptomik yanıtlarla paralellik göstermektedir. Literatürde, *Olea europaea*’nın (zeytin) soğuk stresinde, *Pseudotsuga menziesii*’nin (köknar) sıcaklık stresinde, *Quercus lobata*’nın (vadi meşesi) ise kuraklık stresinde ifadesi azalan genlerin GO analizi sonucunda biyolojik proses kategorisinde “fotosentez” sürecinde zenginleşme gösterdiği rapor edilmiştir (Estravis-Barcala vd., 2020; Hess vd., 2016; Leyva-Pérez vd., 2015). Bir başka çalışmada soğuk stresine maruz bırakılan *Cucumis sativus* (salatalık) bitkilerinde DEG’lerin GO analizi sonucu BP kategorisinde “fotosentez” sürecinde zenginleşme gösterdiği bildirilmiştir (C. Tan vd., 2023). Kuraklık stresine maruz kalan *Eucalyptus grandis* (okaliptüs) üzerinde gerçekleştirilen meta-analizde, ifadesi azalan genlerin GO analizi sonucunda BP kategorisinde “hücre döngüsü” sürecinde anlamlı şekilde zenginleştiği bildirilmiştir (Aires-Teixeira vd., 2026). Isı stresine maruz kalan *Triticum aestivum* (buğday) bitkisine yapılan transkriptom çalışmasında ise DEG’lerin BP kategorisinde “hücre döngüsü” sürecinde zenginleşme gösterdiği belirtilmiştir (Lamba vd., 2022). Yüksek ağır metal kirliliğine sahip topraklarda yetişen *Arabidopsis halleri*’nde DEG’lerin BP kategorisinde “mayoz hücre döngüsü” sürecinde zenginleştiği bildirilmiştir (G. Lee vd., 2021). Bu sonuçlar, abiyotik

stres koşullarında bitkilerin enerji üretimi, hücre döngüsü ve büyüme ile ilişkili süreçleri baskılayarak kaynaklarını stres yanıt mekanizmalarına yönlendirdiğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışma sonucunda, ifadesi azalan genlerin moleküler fonksiyon (MF) kategorisinde “klorofil bağlama” ve “demir iyonu bağlama” süreçlerinde yer aldığı belirlenmiştir. Transgenik tütün bitkilerinde yapılan bir çalışmada soğuk stresi altında tanımlanan DEG’lerin GO analizi sonucunda moleküler fonksiyon (MF) kategorisinde “demir iyonu bağlama” sürecinde zenginleştiği bildirilmiştir (Shi ve Zhu, 2024). Benzer şekilde, *Brassica napus* bitkisinde kadmiyum (Cd) stresinde DEG’lerin MF kategorisinde “klorofil bağlama” sürecinde zenginleştiği bildirilmiştir (Ding vd., 2018). Bu bulgular, bitkinin stres altında enerji tasarrufuna yönelerek bazı temel metabolik süreçleri geri plana atabileceğine işaret etmektedir.

Yürütülen çalışmada, ifadesi azalan genlerin hücresel bileşen (CC) kategorisinde “kloroplast” ve “plastit” bileşenlerinde yer aldığı belirlenmiştir. *Brassica napus* bitkisinde sıcaklık stresinde ifadesi azalan genlerin GO analizi sonucunda hücresel bileşen kategorisinde (CC) “kloroplast” ve “plastit” bileşenlerinde zenginleştiği bildirilmiştir (Shahsavari vd., 2025). Bu sonuçlar, bitkinin stres altında fotosentetik aktivitesini ve buna bağlı metabolik faaliyetlerini azaltma eğiliminde olabileceğini ortaya koymaktadır.

4.4. KEGG Sonuçları

Diferansiyel ifade gösteren genlerin fonksiyonel rollerinin moleküler düzeyde anlaşılması amacıyla KEGG yolu analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde, *A. graveolens*’in soğuk stresine yanıtında rol oynadığı düşünülen genlerin yer aldığı çeşitli biyolojik yollar tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

KEGG yolak analizi sonucunda, 12 temel metabolik ve sinyal iletim yolağı tespit edilmiştir. Analiz kapsamında; temel enerji metabolizmalarına ait “fotosentez”, “fotosentez-anten proteinleri”, “nişasta ve süktroz metabolizması”, “karbon fiksasyonu (C₃)” ve “karbon metabolizması” yolları belirlenmiştir. Ayrıca hücresel süreçlerden “hücre döngüsü”, “ribozom”, “yağ asidi biyosentezi” ve “fenilpropanoid biyosentezi” ile sinyal iletim mekanizmalarından “bitki hormon sinyal iletimi”, “bitkilerde MAPK sinyal yolağı” ve “glutatyon metabolizması” yolları da tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. KEEG analizi sonucu tespit edilen yollar

İşlevsel Yolak Kategorisi	KEEG Yolak Adı
Enerji ve Karbon Metabolizması	Karbon metabolizması
	Karbon fiksasyonu (C ₃)
	Fotosentez
	Fotosentez - anten proteinleri
	Nişasta ve sükröz metabolizması
Hücrel Süreçler ve Biyosentez	Hücre döngüsü
	Ribozom
	Yağ asidi biyosentezi
	Fenilpropanoid biyosentezi
Sinyal İletimi ve Stres Yanıtı	Bitki hormon sinyal iletimi
	Bitkilerde MAPK sinyal yolağı
	Glutasyon metabolizması

Çalışma kapsamında elde edilen bulgular, literatürde rapor edilen çalışmalar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Nitekim çalışmada elde ettiğimiz bulgular literatürle örtüşmektedir. Örneğin, tuz-alkali stresine maruz bırakılan *Medicago falcata* (kart yonca) bitkisinde gerçekleştirilen KEEG analizi sonucunda, “bitkilerde MAPK sinyal yolağı”, “fotosentez-anten proteinleri” ve “bitki hormon sinyal iletimi” yollarının hem strese toleranslı hem de duyarlı hatlarda zenginleştiği; “fotosentez”, “nişasta ve sükröz metabolizması”, “fenilpropanoid biyosentezi” ve “glutasyon metabolizması” yollarının ise sadece strese toleranslı hatlarda zenginleştiği bildirilmiştir (Chai vd., 2025). Benzer şekilde soğuk stresi altında *Nicotiana tabacum* (tütün) bitkisinin soğuğa duyarlı kültüründe “fotosentez” ve “yağ asidi biyosentezi” yollarının; soğuğa toleranslı kültüründe “bitki hormon sinyal iletimi”, “hücre döngüsü” ve “karbon metabolizması” yollarının; her iki kültürde ise “ribozom” yolağının ortak olarak zenginleştiği rapor edilmiştir (Jin vd., 2017). Kuraklık stresine maruz kalan *Oryza sativa* bitkisinde DEG’lerin, “fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu”, “karbon metabolizması”, “bitkilerde MAPK sinyal yolağı”, “fotosentez” ve “fotosentez-anten proteinleri” yollarında zenginleştiği rapor edilmiştir (Barzi vd., 2026).

Elde edilen sonuçların, literatürde bildirilen çalışmalarla genel olarak paralellik gösterdiği görülmektedir. Bu bulgular, bitkinin enerji üretimi, büyüme ve savunma mekanizmalarını birlikte düzenleyerek çevresel koşullara uyum sağlamaya çalıştığını düşündürmektedir. Özellikle hücrel düzenleme ile stres yanıtı arasındaki etkileşim, bitkinin çevresel koşullara karşı bütüncül bir adaptasyon stratejisi izlediğini göstermektedir.

4.5. *A. graveolens* Transkriptomunda SSR Markörlerin Tespiti

Analiz edilen *A. graveolens* transkriptomunda bulunan SSR bölgelerinin belirlenmesi amacıyla GMATA programı kullanılmıştır. Programa girdi olarak sağlanan 71057 sekans verisinden 2899 SSR lokusu tespit edilmiştir. Bu yüksek sayı incelenen transkriptomun mikrosatellit içeriği bakımından zengin olduğunu göstermektedir. Tespit edilen lokusların 2564 adedi için uygun primer tasarlanırken, 335 lokus için primer tasarımı gerçekleştirilmemiştir. Analizler sonucunda 2219 benzersiz (unique) markör saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. 2-6 mer tarama aralığında tespit edilen SSR'ların istatistikleri

Tespit edilen SSR'ların istatistikleri	
Veri olarak girilen toplam sekans sayısı	71057
Tespit edilen toplam SSR lokusu	2899
Primer tasarlanan toplam SSR lokusu	2564
Primer tasarlanmayan toplam SSR lokusu	335
Benzersiz markör sayısı	2219

En az 2 en fazla 6 tekrar olmak üzere analiz edilen SSR lokuslarında, 3-mer (tri-nükleotit) toplam 1711 SSR lokusu ile en fazla tekrar eden motif olarak tespit edilmiştir. 4-mer (tetra-nükleoit) ise toplam 3 SSR lokusu ile en az tekrar eden motif olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Tekrar motiflerinin SSR lokus sayıları

Motif (-mer)	Toplam
2	1155
3	1711
4	3
5	7
6	23

Analiz sonuçlarına göre, en fazla tekrar eden di-nükleotit motifinin 257 SSR ile 'GA', en fazla tekrar eden tri-nükleotit motifinin ise 153 SSR ile 'TGA' olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.7). En çok tekrar eden motif gruplarının 3-mer yapısında olduğu görülmektedir; ancak toplam sayı baz alındığında 'TC/GA' ve 'AG/CT' motif grubunun daha fazla olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. En çok tekrar eden SSR motifleri

SSR Motifi	Toplam sayısı
GA	257
AG	211
TC	203
CT	172
TGA	153
GAT	116
CAG	87
GAA	74
AAG	71
ATG	68

Çizelge 4.8. 2-6 mer tarama aralığında en çok tekrar eden motif grupları

Motif Grubu	Toplam sayısı	Motif Grubu	Toplam sayısı
TC/GA	460	AAG/CTT	89
AG/CT	383	GCA/TGC	87
TGA/TCA	189	ACC/GGT	86
ATC/GAT	144	TGG/CCA	86
GAA/TTC	138	ATG/CAT	85
CA/TG	119	TCC/GGA	65
CAG/CTG	113	GCT/AGC	63
TCT/AGA	90	AT/AT	55
GTG/CAC	89	GAG/CTC	50
GT/AC	89	TA/TA	44

Genel SSR dağılımı 2-6 mer aralığında taranmış; toplam sayı baz alındığında ‘TC/GA’ ve ‘AG/CT’ gibi 2-mer motifleri en yüksek frekansa sahip olsada, ilk 10 grup içerisinde trinükleotitlerin (3-mer) sayıca ve oransal olarak yoğunluk gösterdiği saptanmıştır. Di-nükleotit (2-mer) tekrarları sayıca fazla olmalarına karşın, PCR aşamasında 'stutter band' (gölge bant) oluşturma riskleri nedeniyle analizlerde zorluk çıkarabilmektedir (Guichoux vd., 2011). Buna karşın hem daha stabil amplifikasyon sağlamaları hem de jel elektroforezinde daha net ayırım sunmaları sebebiyle (Guichoux vd., 2011), bu çalışmada primer tasarımı için tri-nükleotit (3-mer) motiflere odaklanılmıştır.

Programı girdi olarak sağlanan 71057 sekans verisinden 1713 SSR lokusu tespit edilmiştir. Tespit edilen lokusların 1489 adedi için uygun primer tasarlanırken, 224 lokus için primer tasarımı gerçekleştirilmemiştir. Analizler sonucunda 1313 benzersiz (unique) markör saptanmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. 3-mer tarama aralığında tespit edilen SSR'ların istatistikleri

Tespit edilen SSR'ların istatistikleri	
Veri olarak girilen toplam sekans sayısı	71057
Tespit edilen toplam SSR lokusu	1713
Primer tasarlanan toplam SSR lokusu	1489
Primer tasarlanmayan toplam SSR lokusu	224
Benzersiz markör sayısı	1313

Çizelge 4.10 incelendiğinde analiz sonuçlarına göre, en fazla tekrar eden motifin 154 SSR ile 'TGA' motifi olduğu saptanmıştır. Bunu sırasıyla 'GAT' ve 'CAG' motifleri izlemektedir. Yapılan analizler sonucunda, 2-6 mer genel tarama aralığında elde edilen tri-nükleotit sayıları ile sadece 3-mer motiflerine odaklanılan tarama sonuçlarının paralellik gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.10). 3-mer tarama aralığında en çok tekrar eden motif gruplarının ise sırasıyla 'TGA/TCA', 'GAT/ATC' ve 'TTC/GAA' grupları olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.11). Analiz sonucu elde edilen SSR markörlerinin bazılarına ait primerler ve ürün boyutu Çizelge 4.12'de yer almaktadır.

Çizelge 4.10. En çok tekrar eden 3-mer SSR motifleri

SSR Motifi	Toplam sayısı
TGA	154
GAT	116
CAG	87
GAA	74
AAG	71
ATG	67
TTC	64
GCA	56
AGA	53
CCA	47

Çizelge 4.11. 3-mer tarama aralığında en çok tekrar eden motif grupları

Motif Grubu	Toplam sayısı	Motif Grubu	Toplam sayısı
TGA/TCA	190	CAT/ATG	84
GAT/ATC	144	GGA/TCC	65
TTC/GAA	138	AGC/GCT	63
CAG/CTG	113	GAG/CTC	52
TCT/AGA	90	AGG/CCT	42
CAC/GTG	89	TTG/CAA	38
AAG/CTT	89	ACA/TGT	33
GCA/TGC	87	GTT/AAC	31
CCA/TGG	86	CGG/CCG	27
GGT/ACC	86	AAT/ATT	23

Çizelge 4.12. Analiz sonucu tespit edilen SSR markörlerinin primerleri ve ürün boyutu

Marker	Primer Forward	Primer Reverse	Ürün Boyutu
>Ag_SSR110	GGTGTTCATACGTCTGGTG	CAGGCCGAATTAGGAAATCA	185
>Ag_SSR118	AGGAGGAACACTACGCGAGA	TTCTGCTGCCTTGACACAAC	181
>Ag_SSR157	TTGTGGCTCTTCGTCATCAG	CACCGATGCAGGTGTAATTG	239
>Ag_SSR160	TCACAGTCCACTTTGCAAGC	ACCTGCTCACCTGCAGTCTT	201
>Ag_SSR168	GCTTGACGATCGCAGTTACA	CTGCCGCACTATTGTCTTCA	245
>Ag_SSR178	GAGGAGCTGCGGTGTAAAG	AGCATGTCGATGCACTTGAG	227
>Ag_SSR182	ACCTTTGGCTCCTCAACCTT	AAGCTGGTGGTGGAGATTTG	212
>Ag_SSR195	AAAGGCGTCAACTCCTGCTA	ACTACAACGTGGGCTCCATC	228
>Ag_SSR322	TAGAAGGTGAGGGTGCTGCT	AGTGACCGCTAATTGGGTTG	212
>Ag_SSR342	CGGAGATCAGAGAGCCAAAC	ACTGACCATTTGGCTGTTTCC	264
>Ag_SSR410	TATGATCCTCAACCGCAACA	TGGTTCCTTTCGACATCTCC	164
>Ag_SSR424	CATCTCTGCAGCCCCATATT	TATCCATCTCCCAGCTGTCC	274
>Ag_SSR455	GCTGCAGGAGTTAGTGGTC	CTCTCCAGCTGCGTCTCT	205
>Ag_SSR472	GTGGGTGAAAGAGAGCAAGC	AATCACCCCGACAATATCCA	223
>Ag_SSR473	AATCCAAGGCGATGATGAAG	ATTGATTGCCGAGAAAATCG	203
>Ag_SSR476	AGGTTGGATTGAGTCGGTTG	TCCTCCCTAACCCCATATCC	210
>Ag_SSR508	CAACAACCCAGCAAGAAAT	GGTGATCATAACGAGCCTGT	187
>Ag_SSR524	ACTCACCGGACATTTCTTCG	GTCGGTTTGATCTTCGTCGT	227
>Ag_SSR543	AATTGGTTTGAGCCGTTGAC	ACCTCCACCTCCTTCACCTT	218
>Ag_SSR599	CCGGACATCAGAGTTCCAAT	ATACGCGAAGCTCGTTTGTT	159
>Ag_SSR617	GATCACTCCTCTCCGATCCA	CGTGAGCGTATGACCACATC	198
>Ag_SSR721	GGCTTTCACCTGCACCTCAA	CTCGCTTGTTCAAGTCATGGA	273
>Ag_SSR758	GATTCGGATGAGGATGAGGA	CATTAAACGCATTGCACCAC	169
>Ag_SSR768	ATGCATGCTACAAGGGGAAC	AGTAGGTGGGCGAAAAGGAT	210
>Ag_SSR785	TGTTGTGCGAGGAGTGAGTG	CGGCTAAATCACGAGACACA	206
>Ag_SSR808	TCAAGAAGCAGCAGAAGCAA	TCGACGACGAAAGAGTGATG	154
>Ag_SSR817	GCTCCTCAAGGTTTCCCTTT	AACTGACATGCTGTCTGATGG	279
>Ag_SSR853	AAGAGGTCCAAAGCAAAGCA	CTCCAAGTTAAGCCGCAAAG	275
>Ag_SSR922	CAACCACAGAAAGCGATTCA	TTTAGACACCTTCCGCTGAT	244
>Ag_SSR965	TTTAGATGGGGAGCAACACC	CCGGAGTATTTTCAGGACCA	157
>Ag_SSR969	GACGACGGCATTTTATACGAA	GAGTGGCTCAACAGGAGGAG	252
>Ag_SSR975	GCAGGTTCCACAGAAATGGT	AACAAGAATGGGTGGTCTGC	179
>Ag_SSR992	GAAACCCTAGTCCGGTCCTC	ATGAAAGGCAACCAATCAGG	251
>Ag_SSR1002	GAGAGCATGGTGGCGTAAAT	AGCCAATTGCTAGAGCCAGA	243
>Ag_SSR1018	TTTCGCGGTGGAAAAGATAG	CTCCCCTTCTGACAACCTCA	189
>Ag_SSR1021	GAATTGCTTGCCCTCTTCTG	GATGGGACCAGCTTGTGAAT	269
>Ag_SSR1040	ACGCTTCGATCATAACGGTTC	CACACACACTCCTGCTGCTT	279
>Ag_SSR1059	CCGCCCACCTAAGAAATCAAA	GACCTCACCGGAATGAGAAA	231
>Ag_SSR1084	GTGGTGCTAATGGTGGCTTT	CCATCATGCCGATCATCTC	169
>Ag_SSR1147	CACCTGTCTCCAAGTCAGCA	TATCCTGCACACAGCTTTCG	267
>Ag_SSR1176	AGCCAAATTTTCATCCACAG	TGGCCGTTATTGGAAGTAGG	175
>Ag_SSR1187	TAATGTCCGCCCAAGTAAG	AGTGGAGGGGTAGGCAATCT	274
>Ag_SSR1245	AACCCATGATCGAAGAGGTG	TGGGGCTTTGGACAAGTATC	226
>Ag_SSR1276	AACCCACCTCTTCTCCTGT	GTCATCAGCAGAGCAACCAA	201
>Ag_SSR1283	CCTGATTCTCGCTACGCTTC	AGCTGAATCCTTGCTCCAGA	233
>Ag_SSR1293	GGGGAAATCAAGCAAGAACA	CACTAGCTGCAACCCTCACA	163

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yürütülen çalışmada, soğuk stresine maruz kalan dereotu (*Anethum graveolens*) bitkisinde ekspresyon seviyeleri değişen genler transkriptomik analiz aracılığıyla tespit edilmiştir. Deseq2 programı aracılığıyla tespit edilen DEG'lerde log2FC değeri 2'nin üstünde ve -2'nin altında olan genler belirlenmiş ve bu genler üzerine yoğunlaşmıştır. Seçilen genlerin potansiyel biyolojik rollerinin tespit edilmesi amacıyla yapılan literatür taraması sonucunda çoğunun farklı bitki ve abiyotik stres koşullarında benzer yanıtlar verdiği anlaşılmıştır. Dahası DEG analizleri sonucunda stres yanıtı, savunma mekanizmaları ve transkripsiyonel düzenleme ile ilişkili genlerin aktif hale geldiği; fotosentez, klorofil bağlama ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ise baskılandığı belirlenmiştir.

Tespit edilen genlerin BLAST, GO ve KEGG analizleri gerçekleştirilerek fonksiyonel anotasyonu yapılmıştır. Homoloji tabanlı çalışan BLAST programı aracılığıyla 254 benzersiz (unique) protein tanımlanmış ve anlamlandırılmıştır. Gen ontolojisi (GO) analizleri, soğuk stresinin biyolojik süreçler, moleküler fonksiyonlar ve hücresel aktivitelerde önemli değişimlere neden olduğunu göstermiştir. KEGG analizleri ise soğuk stresinin metabolik süreçler, sinyal iletim mekanizmaları ve hücresel düzenleme ile ilişkili yolları etkilediğini ortaya çıkarmıştır. BLAST, GO ve KEGG analizlerinden elde edilen bulgular, soğuk stresinin dereotu bitkisinde çok yönlü moleküler değişimlere neden olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçların, soğuk stresine karşı gelişen moleküler yanıt mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

GMATA programı kullanılarak gerçekleştirilen SSR analizi sonucunda trinükleotit motifler üzerinden yapılan taramada toplam 1313 benzersiz (unique) SSR belirlenmiştir. Tespit edilen SSR lokuslarının büyük çoğunluğu için uygun primer tasarımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen SSR markörlerinin gelecekte yapılacak moleküler markör geliştirme ve genetik çalışmalar için önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

5.2. Öneriler

Bu çalışma kapsamında elde edilen RNA-seq verilerinin, dereotunda soğuk stresine karşı gelişen moleküler yanıtların anlaşılmasına önemli katkılar sağladığı

düşünülmektedir. Ancak bitkilerin stres yanıtı oldukça karmaşık ve çok katmanlı bir süreç olduğundan, elde edilen bulguların farklı yaklaşımlarla (proteomik, metabolomik, qRT-PCR, fizyolojik ve biyokimyasal) desteklenmesi gerekmektedir. Gelecek çalışmalarda, dereotunun farklı gelişim evrelerinde ve farklı stres koşulları (kuraklık, tuzluluk, ısı stresi vb.) altında da analiz edilmesi, stres yanıt mekanizmalarının daha net anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

Bu çalışmada belirlenen diferansiyel olarak ifade edilen genlerin bir kısmının farklı bitki türlerinde daha önce raporlanmış olması, bu genlerin dereotu özelinde stres yanıtındaki rollerinin tür-spesifik olarak değerlendirilmesini önemli hale getirmektedir. Bu kapsamda, özellikle soğuk stresine yanıtla ilişkili aday genlerin deneysel yöntemlerle doğrulanması ve fonksiyonel rollerinin detaylandırılması önerilmektedir. Böylece elde edilen bulguların biyolojik anlamı güçlendirilebilir.

Bunun yanında, transkriptom verileri üzerinden elde edilen SSR bölgeleri kullanılarak geliştirilen moleküler markörlerin, farklı dereotu genotipleri ve popülasyonlarında test edilmesi önerilmektedir. Bu markörlerin genetik çeşitliliğin belirlenmesi, popülasyon yapısının ortaya konulması ve stres toleransı yüksek bireylerin seçilmesi gibi ıslah çalışmalarında kullanılabilecek önemli araçlar olduğu düşünülmektedir.

Son olarak, RNA-seq tabanlı bu tür çalışmaların farklı dereotu çeşitlerinde ve farklı çevresel koşullarda genişletilmesi, hem tür içi genetik varyasyonun ortaya konulmasına hem de iklim değişikliğinin tarımsal üretim üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahmady, M. N., Vahdati, A., ve Madani, H. (2005). Effects of hydroalcoholic extract of *Anethum graveolens* (Dill) on plasma glucose and lipid levels in diabetes induced rats.
- Adhikari, L., Baral, R., Paudel, D., Min, D., Makaju, S. O., Poudel, H. P., Acharya, J. P., ve Missaoui, A. M. (2022). Cold stress in plants: Strategies to improve cold tolerance in forage species. *Plant Stress*, 4, 100081. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100081>
- Aires-Teixeira, J. V., Pereira Lima, N. M., Almeida Sarmiento, R., Quintanilha-Peixoto, G., ve Pimenta De Oliveira, K. K. (2026). Bulk RNA-seq datasets analysis integration identifies robust drought-responsive genes and functional networks in *Eucalyptus grandis*. *Frontiers in Bioinformatics*, 6, 1743474. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2026.1743474>
- Ajani, Yousef, Ahmad Ajani, Jenny M. Cordes, Stephen R. Downie, ve Mark F. Watson. 2008. "Phylogenetic Analysis of nrDNA ITS Sequences Reveals Relationships within Five Groups of Iranian Apiaceae Subfamily Apioideae".
- Alboresi, A., Ballottari, M., Hienerwadel, R., Giacometti, G. M., ve Morosinotto, T. (2009). Antenna complexes protect Photosystem I from Photoinhibition. *BMC Plant Biology*, 9(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-71>
- Almeselmani, M., Deshmukh, P. S., ve Chinnusamy, V. (2012). Effects of Prolonged High Temperature Stress on Respiration, Photosynthesis and Gene Expression in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties Differing in their Thermotolerance. *Plant Stress*, 6(1), 25-32.
- Al-Oqail, M. M., ve Farshori, N. N. (2021). Antioxidant and Anticancer Efficacies of *Anethum graveolens* against Human Breast Carcinoma Cells through Oxidative Stress and Caspase Dependency. *BioMed Research International*, 2021(1), 5535570. <https://doi.org/10.1155/2021/5535570>
- Al-Sheddi, E. S., Al-Zaid, N. A., Al-Oqail, M. M., Al-Massarani, S. M., El-Gamal, A. A., ve Farshori, N. N. (2019). Evaluation of cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptosis induced by *Anethum graveolens* L. essential oil in human hepatocellular carcinoma cell line. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(7), 1053-1060. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.09.001>
- Al-Snafi, A. E. (2014). The Pharmacological Importance Of *Anethum Graveolens*. A Review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(4).
- Altameme, H. J., Hameed, I. H., ve Hamza, L. F. (2017). *Anethumgraveolens*: Physicochemical Properties, Medicinal Uses, Antimicrobial Effects, Antioxidant Effect, Anti-Inflammatory and Analgesic Effects: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 8(03). <https://doi.org/10.25258/ijpqa.v8i03.9569>

- Amiri, M. S., ve Joharchi, M. R. (2016). *Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review*.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Arora, D. S., ve Kaur, G. J. (2007). Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. *Journal of Natural Medicines*, 61(3), 313-317. <https://doi.org/10.1007/s11418-007-0137-8>
- Atıcı, Ö., ve Nalbantoğlu, B. (2003). Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, 64(7), 1187-1196. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00420-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00420-5)
- Ayadi, M., Cavez, D., Miled, N., Chaumont, F., ve Masmoudi, K. (2011). Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. Durum) and their role in abiotic stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(9), 1029-1039. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.06.002>
- Ayhan, H., ve Özel, A. (2017). Harran Ovası Koşullarında Dereotu (*Anethum graveolens* L.)'nda Uygun Hasat Zamanının Belirlenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 466-479. <https://doi.org/10.29050/harranziraat.320160>
- Azad, M., Tohidfar, M., Ghanbari Moheb Seraj, R., Mehralian, M., ve Esmailzadeh-Salestani, K. (2024). Identification of responsive genes to multiple abiotic stresses in rice (*Oryza sativa*): A meta-analysis of transcriptomics data. *Scientific Reports*, 14(1), 5463. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54623-7>
- Azeem, F., Ahmed, B., Muhammad Atif, R., Amjad Ali, M., Nadeem, H., Hussain, S., Rasool, S., Manzoor, H., Ahmad, U., ve Afzal, M. (2019). Drought affects aquaporins gene expression in important pulse legume chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 51(1). [https://doi.org/10.30848/PJB2019-1\(30\)](https://doi.org/10.30848/PJB2019-1(30))
- Babri, R. A., Khokhar, I., Mahmood, Z., ve Mahmud, S. (2012). *Chemical Composition And Insecticidal Activity Of The Essential Oil Of Anethum Graveolens L.*
- Bailer, J., Aichinger, T., Hackl, G., De Hueber, K., ve Dachler, M. (2001). Essential oil content and composition in commercially available dill cultivars in comparison to caraway. *Industrial Crops and Products*, 14(3), 229-239. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(01\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00088-7)
- Barnaby, J. Y., Kim, J., Devi, M. J., Fleisher, D. H., Tucker, M. L., Reddy, V. R., ve Sicher, R. C. (2020). Varying Atmospheric CO₂ Mediates the Cold-Induced CBF-Dependent Signaling Pathway and Freezing Tolerance in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7616. <https://doi.org/10.3390/ijms21207616>
- Barzi, S. M. A., Ahmadikhah, A., ve Haghi, R. (2026). Comparative Transcriptome Analysis of Two Contrasting Rice Genotypes Reveals the Role of Photosynthesis, CO₂ Fixation/Metabolism and MAPK Signaling Pathways in Response to Drought Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 45(2), 1537-1552. <https://doi.org/10.1007/s00344-025-11961-8>

- Bezli, S. (2020). *Dereotu (Anethum Graveolens L.) Ekim Yöntemlerini İyileştirme Olanakları (Master's Thesis, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).*
- Biniaz, Y., Tahmasebi, A., Afsharifar, A., Tahmasebi, A., ve Poczai, P. (2022). Meta-Analysis of Common and Differential Transcriptomic Responses to Biotic and Abiotic Stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 11(4), 502. <https://doi.org/10.3390/plants11040502>
- Bolger, A. M., Lohse, M., ve Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Breton, G., Danyluk, J., Charron, J.-B. F., ve Sarhan, F. (2003). Expression Profiling and Bioinformatic Analyses of a Novel Stress-Regulated Multispanning Transmembrane Protein Family from Cereals and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132(1), 64-74. <https://doi.org/10.1104/pp.102.015255>
- Bushman, B. S., Robbins, M. D., Thorsted, K., Robins, J. G., Warnke, S. E., Martin, R., ve Harris-Shultz, K. (2021). Transcript responses to drought in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) germplasm varying in their tolerance to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 190, 104571. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104571>
- Bushmanova, E., Antipov, D., Lapidus, A., ve Prjibelski, A. D. (2019). rnaSPAdes: A *de novo* transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience*, 8(9), giz100. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz100>
- Cavanagh, A. P., Slattery, R., ve Kubien, D. S. (2023). Temperature-induced changes in *Arabidopsis* Rubisco activity and isoform expression. *Journal of Experimental Botany*, 74(2), 651-663. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac379>
- Chahal, K., Kumar, A., Bhardwaj, U., ve Kaur, R. (2017). *Chemistry and biological activities of Anethum graveolens L. (dill) essential oil: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2), 295-306.
- Chai, H., Wang, X., Yang, Z., Li, S., Xu, Y., Wu, Y., ve Shen, Z. (2025). Comparative transcriptome analysis of differentially expressed genes of *Medicago falcata* L. breeding lines response to saline-alkaline stress. *BMC Plant Biology*, 25(1), 623. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06599-3>
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R. A., Hills, H. G., Qiu, Y.-L., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., ... Albert, V. A. (1993). Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80(3), 528. <https://doi.org/10.2307/2399846>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., ve Gu, J. (2018). fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>

- Chen, Y.-Y., Li, M.-Y., Li, Y., Wang, F., Xu, Z.-S., ve Xiong, A.-S. (2015). Isolation and characterization of the Agmt2 gene and its response to abiotic and metal stress in *Apium graveolens*. *Scientia Horticulturae*, 186, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.011>
- Cheng, M.-C., Liao, P.-M., Kuo, W.-W., ve Lin, T.-P. (2013). The Arabidopsis Ethylene Response Factor1 Regulates Abiotic Stress-Responsive Gene Expression by Binding to Different cis-Acting Elements in Response to Different Stress Signals. *Plant Physiology*, 162(3), 1566-1582. <https://doi.org/10.1104/pp.113.221911>
- Chuang, H., Harnrak, A., Chen, Y.-C., ve Hsu, C.-M. (2010). A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(2), 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.047>
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X., ve Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, 17(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), 321-326. <https://doi.org/10.1038/35030000>
- Cosgrove, D. J. (2015). Plant expansins: Diversity and interactions with plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 162-172. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.014>
- Dar, N. A., Mir, M. A., Mir, J. I., Mansoor, S., Showkat, W., Parihar, T. J., Haq, S. A. U., Wani, S. H., Zaffar, G., ve Masoodi, K. Z. (2022). MYB-6 and LDOX-1 regulated accretion of anthocyanin response to cold stress in purple black carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5353-5364. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07077-3>
- Daszkowska-Golec, A., Collin, A., Sitko, K., Janiak, A., Kalaji, H. M., ve Szarejko, I. (2019). Genetic and Physiological Dissection of Photosynthesis in Barley Exposed to Drought Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6341. <https://doi.org/10.3390/ijms20246341>
- Deng, Y., Lin, Y., Wei, G., Hu, X., Zheng, Y., ve Ma, J. (2024). Overexpression of the CpCOR413PM1 Gene from Wintersweet (*Chimonanthus praecox*) Enhances Cold and Drought Tolerance in Arabidopsis. *Horticulturae*, 10(6), 599. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10060599>
- De Sena Brandine, G., ve Smith, A. D. (2021). Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Research*, 8, 1874.
- Deveci, B. (2022). *Dereotu, Maydanoz ve Rokada Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi*.
- Ding, Y., Jian, H., Wang, T., Di, F., Wang, J., Li, J., ve Liu, L. (2018). Screening of candidate gene responses to cadmium stress by RNA sequencing in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32), 32433-32446. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3227-0>

- Donde, R., Gupta, M. K., Gouda, G., Kumar, J., Vadde, R., Sahoo, K. K., Dash, S. K., ve Behera, L. (2019). Computational characterization of structural and functional roles of DREB1A, DREB1B and DREB1C in enhancing cold tolerance in rice plant. *Amino Acids*, 51(5), 839-853. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02727-0>
- Duan, A.-Q., Yang, X.-L., Feng, K., Liu, J.-X., Xu, Z.-S., ve Xiong, A.-S. (2020). Genome-wide analysis of NAC transcription factors and their response to abiotic stress in celery (*Apium graveolens* L.). *Computational Biology and Chemistry*, 84, 107186. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.107186>
- Ebadollahi, A., Nouri-Ganbalani, G., Hoseini, S. A., ve Sadeghi, G. R. (2012). Insecticidal Activity of Essential Oils of Five Aromatic Plants Against *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(2), 256-262. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644044>
- Ekin, B., Günay, S., ve Erden, Y. (2024). Dereotu (*Anethum graveolens*) İnsan Yumurtalık Kanseri Hücre Hattı A2780 Üzerinde DNA Hasarına Neden Olmadan Hücre Ölümünü İndükler. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 14(2), 894-900. <https://doi.org/10.21597/jist.1345204>
- Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., ve Mount, J. R. (2001). Antimicrobial Activity of Essential Oils from Plants against Selected Pathogenic and Saprophytic Microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1019-1024. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.7.1019>
- Eljebbawi, A., Savelli, B., Libourel, C., Estevez, J. M., ve Dunand, C. (2022). Class III Peroxidases in Response to Multiple Abiotic Stresses in *Arabidopsis thaliana* Pyrenean Populations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3960. <https://doi.org/10.3390/ijms23073960>
- Estravis-Barcala, M., Mattera, M. G., Soliani, C., Bellora, N., Opgenoorth, L., Heer, K., ve Arana, M. V. (2020). Molecular bases of responses to abiotic stress in trees. *Journal of Experimental Botany*, 71(13), 3765-3779. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz532>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., ve Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Farquharson, K. L. (2014). SAUR19 Links Auxin and Plasma Membrane H⁺ -ATPases in Cell Expansion. *The Plant Cell*, 26(5), 1835-1835. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127886>
- Feki, K., Kamoun, Y., Ben Mahmoud, R., Farhat-Khemakhem, A., Gargouri, A., ve Brini, F. (2015). Multiple abiotic stress tolerance of the transformants yeast cells and the transgenic *Arabidopsis* plants expressing a novel durum wheat catalase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 420-431. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.034>
- Fincan, M., ve Çiftci, Y. (2021). Vurgulu Elektrik Alan Ön İşlemi İle Dereotundan Fenoliklerin Ekstraksiyonu: Dondurup Çözündürme, Isıl İşlem, Mikrodalga Ön

- İşlemleri Ve Solvent Ekstraksiyonu İle Karşılaştırılması. *Gıda*, 46(6), 1343-1357. <https://doi.org/10.15237/gida.GD21092>
- Francini, A., ve Sebastiani, L. (2019). Abiotic Stress Effects on Performance of Horticultural Crops. *Horticulturae*, 5(4), 67. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5040067>
- Fromme, P., Jordan, P., ve Krauß, N. (2001). Structure of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1507(1-3), 5-31. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00195-5)
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., ve Li, W. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150-3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Ghassemi, S., Delangiz, N., Asgari Lajayer, B., Saghafi, D., ve Maggi, F. (2021). Review and future prospects on the mechanisms related to cold stress resistance and tolerance in medicinal plants. *Acta Ecologica Sinica*, 41(2), 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2020.09.006>
- Goodarzi, M. T., Khodadadi, I., Tavalani, H., ve Abbasi Oshaghi, E. (2016). The Role of *Anethum graveolens* L. (Dill) in the Management of Diabetes. *Journal of Tropical Medicine*, 2016, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2016/1098916>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., ve McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333-351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Goun, E. A., Petrichenko, V. M., Solodnikov, S. U., Suhinina, T. V., Kline, M. A., Cunningham, G., Nguyen, C., ve Miles, H. (2002). Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3), 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00116-2)
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644-652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., ve Petit, R. J. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11(4), 591-611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J., Pineda, O., Thomashow, M. F., ve Zhang, J. Z. (2002). Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 130(2), 639-648. <https://doi.org/10.1104/pp.006478>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis,

- J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494-1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Haider, M. S., Kurjogi, M. M., Khalil-ur-Rehman, M., Pervez, T., Songtao, J., Fiaz, M., Jogaiah, S., Wang, C., ve Fang, J. (2018). Drought stress revealed physiological, biochemical and gene-expressional variations in 'Yoshihime' peach (*Prunus Persica* L) cultivar. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 83-90. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1432772>
- Hao, Y., Hao, M., Cui, Y., Kong, L., ve Wang, H. (2022). Genome-wide survey of the dehydrin genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relatives: Identification, evolution and expression profiling under various abiotic stresses. *BMC Genomics*, 23(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08317-x>
- Hauser, T., Bhat, J. Y., Miličić, G., Wendler, P., Hartl, F. U., Bracher, A., ve Hayer-Hartl, M. (2015). Structure and mechanism of the Rubisco-assembly chaperone Raf1. *Nature Structural ve Molecular Biology*, 22(9), 720-728. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3062>
- Hess, M., Wildhagen, H., Junker, L. V., ve Ensminger, I. (2016). Transcriptome responses to temperature, water availability and photoperiod are conserved among mature trees of two divergent Douglas-fir provenances from a coastal and an interior habitat. *BMC Genomics*, 17(1), 682. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3022-6>
- Hosseinzadeh, H., Karimi, G., ve Ameri, M. (2002). Effects of *Anethum graveolens* L. seed extracts on experimental gastric irritation models in mice. *BMC Pharmacology*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-2-21>
- Hrdlickova, R., Toloue, M., ve Tian, B. (2017). RNA -Seq methods for transcriptome analysis. *WIREs RNA*, 8(1), e1364. <https://doi.org/10.1002/wrna.1364>
- Huai, J., Wang, M., He, J., Zheng, J., Dong, Z., Lv, H., Zhao, J., ve Wang, G. (2008). Cloning and characterization of the SnRK2 gene family from *Zea mays*. *Plant Cell Reports*, 27(12), 1861-1868. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0608-8>
- Huang, F., Wang, J., Tang, J., ve Hou, X. (2019). Identification, evolution and functional inference on the cold-shock domain protein family in Pak-choi (*Brassica rapa* ssp. *Chinensis*) and Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*). *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 232-241. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1618504>
- Huang, T., Dong, L., Han, S., Han, X., Yin, J., Hou, L., ve Liu, Y. (2025). Comprehensive analysis of *Vicia faba* light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (Lhc) revealed the roles of VfLhcb1.5, VfLhcb3.3, VfLhcb4, and VfLhca4 in photosynthesis and stress tolerance. *Plant Stress*, 18, 101052. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2025.101052>
- Huang, Y., Liu, L., Hu, H., Tang, N., Shi, L., Xu, F., ve Wang, S. (2022). Arabidopsis ERF012 Is a Versatile Regulator of Plant Growth, Development and Abiotic

- Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6841. <https://doi.org/10.3390/ijms23126841>
- Hundertmark, M., ve Hinch, D. K. (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9(1), 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-118>
- Ifuku, K., ve Noguchi, T. (2016). Structural Coupling of Extrinsic Proteins with the Oxygen-Evolving Center in Photosystem II. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00084>
- Iqra, L., Shahid, M. N., ve Caetano-Anollés, G. (2025). Genome-Wide Identification and Abiotic Stress-Responsive Expression Analysis of the SOS1 Gene Family in *Gossypium hirsutum* L. *Life*, 15(12), 1843. <https://doi.org/10.3390/life15121843>
- Isbilir, S. S., ve Sagiroglu, A. (2011). Antioxidant Potential of Different Dill (*Anethum Graveolens* L.) Leaf Extracts. *International Journal of Food Properties*, 14(4), 894-902. <https://doi.org/10.1080/10942910903474401>
- Ivanov, A. G., Sane, P. V., Simidjiev, I., Park, Y.-I., Huner, N. P. A., ve Öquist, G. (2012). Restricted capacity for PSI-dependent cyclic electron flow in $\Delta petE$ mutant compromises the ability for acclimation to iron stress in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(8), 1277-1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.03.014>
- Izumi, M., Tsunoda, H., Suzuki, Y., Makino, A., ve Ishida, H. (2012). RBCS1A and RBCS3B, two major members within the *Arabidopsis* RBCS multigene family, function to yield sufficient Rubisco content for leaf photosynthetic capacity. *Journal of Experimental Botany*, 63(5), 2159-2170. <https://doi.org/10.1093/jxb/err434>
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., ve Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: Delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
- Jalili, C., Moradi, S., Mirzababaei, A., Mohammadi, H., Heydarzadeh, F., Miraghajani, M., ve Lazaridi, A.-V. (2021). Effects of *Anethum graveolens* (dill) and its derivatives on controlling cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Herbal Medicine*, 30, 100516. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100516>
- Jia, Y., Zhang, Y., Ye, X., Guo, L., Li, H., Guo, Y., Wang, J., Wang, S., ve Wu, W. (2026). Evolutionary and functional analyses in angiosperms reveal a conserved cold-responsive WRKY 33- NAC 032 module. *New Phytologist*, 250(3), 1704-1721. <https://doi.org/10.1111/nph.71013>
- Jiang, Q., Xu, Z.-S., Wang, F., Li, M.-Y., Ma, J., ve Xiong, A.-S. (2014). Effects of abiotic stresses on the expression of *Lhcb1* gene and photosynthesis of *Oenothera javanica* and *Apium graveolens*. *Biologia Plantarum*, 58(2), 256-264. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0396-7>

- Jin, J., Zhang, H., Zhang, J., Liu, P., Chen, X., Li, Z., Xu, Y., Lu, P., ve Cao, P. (2017). Integrated transcriptomics and metabolomics analysis to characterize cold stress responses in *Nicotiana tabacum*. *BMC Genomics*, 18(1), 496. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3871-7>
- Jonah, P. M., Bello, L. L., Lucky, O., Midau, A., ve Moruppa, S. M. (2011). *Review: The Importance of Molecular Markers in Plant Breeding Programmes*.
- Juntawong, P., Sorenson, R., ve Bailey-Serres, J. (2013). Cold shock protein 1 chaperones mRNA s during translation in *A rabidopsis thaliana* . *The Plant Journal*, 74(6), 1016-1028. <https://doi.org/10.1111/tpj.12187>
- Kadoglidou, K., Cook, C., Boutsika, A., Sarrou, E., Mellidou, I., Aidonidou, C., ... ve Xanthopoulou, A. (2023). Evaluation of a dill (*Anethum graveolens* L.) gene bank germplasm collection using multivariate analysis of morphological traits, molecular genotyping and chemical composition to identify novel genotypes for plant breeding. *PeerJ*, 11, e15043.
- Kalangi, S. K., Dayakar, A., Gangappa, D., Sathyavathi, R., Maurya, R. S., ve Narayana Rao, D. (2016). Biocompatible silver nanoparticles reduced from *Anethum graveolens* leaf extract augments the antileishmanial efficacy of miltefosine. *Experimental Parasitology*, 170, 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.002>
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., ve Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., ve Morishima, K. (2017). KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D353-D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- Kanehisa, M., ve Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1).
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., ve Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D457-D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
- Kang, W.-H., Sim, Y. M., Koo, N., Nam, J.-Y., Lee, J., Kim, N., Jang, H., Kim, Y.-M., ve Yeom, S.-I. (2020). Transcriptome profiling of abiotic responses to heat, cold, salt, and osmotic stress of *Capsicum annuum* L. *Scientific Data*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0352-7>
- Kappachery, S., AlHosani, M., Khan, T. A., AlKharoossi, S. N., AlMansoori, N., AlShehhi, S. A. S., AlMansoori, H., AlKarbi, M., Sasi, S., Karumannil, S., Elangovan, S. K., Shah, I., ve Gururani, M. A. (2024). Modulation of antioxidant defense and PSII components by exogenously applied acetate mitigates salinity stress in *Avena sativa*. *Scientific Reports*, 14(1), 620. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51302-5>

- Karimi, M., Ebadi, A., Mousavi, S. A., Salami, S. A., ve Zarei, A. (2015). Comparison of CBF1, CBF2, CBF3 and CBF4 expression in some grapevine cultivars and species under cold stress. *Scientia Horticulturae*, 197, 521-526. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.011>
- Kaur, V., Kaur, R., ve Bhardwaj, U. (2021). A review on dill essential oil and its chief compounds as natural biocide. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(3), 412-431. <https://doi.org/10.1002/ffj.3633>
- Kazemi, M. (2015). Phenolic profile, antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of *Anethum graveolens* L. essential oil. *Natural Product Research*, 29(6), 551-553. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.951934>
- Kazemi-Shahandashti, S.-S., ve Maali-Amiri, R. (2018). Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *Journal of Plant Physiology*, 226, 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.03.022>
- Kchouk, M., Gibrat, J. F., ve Elloumi, M. (2017). Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*, 09(03). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000395>
- Khani, A. (2013). Chemical Composition And Insecticide Activity Of Essential Oil From Dill Seeds Abbas Khan1, Farzaneh Basavand. *International Journal of Agriculture*, 3(3).
- Kim, M.-H., Sasaki, K., ve Imai, R. (2009). Cold Shock Domain Protein 3 Regulates Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23454-23460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025791>
- Kim, M.-H., Sato, S., Sasaki, K., Saburi, W., Matsui, H., ve Imai, R. (2013). COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 is involved in salt and drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *FEBS Open Bio*, 3(1), 438-442. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.10.003>
- Kim, S. Y., ve Nam, K. H. (2010). Physiological roles of ERD10 in abiotic stresses and seed germination of *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 29(2), 203-209. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0813-0>
- Kobae, Y., Mizutani, M., Segami, S., ve Maeshima, M. (2006). Immunochemical Analysis of Aquaporin Isoforms in *Arabidopsis* Suspension-Cultured Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(4), 980-987. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.980>
- Kojuri, J., Vosoughi, A. R., ve Akrami, M. (2007). Effects of *anethum graveolens* and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-5>
- Koppula, S., ve Choi, D. (2011). *Anethum Graveolens* Linn (Umbelliferae) Extract Attenuates Stress-induced Urinary Biochemical Changes and Improves Cognition in Scopolamineinduced Amnesic Rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1). <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i1.66540>

- Kranner, I., Minibayeva, F. V., Beckett, R. P., ve Seal, C. E. (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*, 188(3), 655-673. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>
- Krishnaswamy, S., Verma, S., Rahman, M. H., ve Kav, N. N. V. (2011). Functional characterization of four APETALA2-family genes (RAP2.6, RAP2.6L, DREB19 and DREB26) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 75(1-2), 107-127. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9711-7>
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., ve Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 Protein Kinases—Key Regulators of Plant Response to Abiotic Stresses. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 15(12), 859-872. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0091>
- Kurkela, S., ve Borg-Franck, M. (1992). Structure and expression of kin2, one of two cold- and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 19(4), 689-692. <https://doi.org/10.1007/BF00026794>
- Lamba, K., Kumar, M., Singh, V., Chaudhary, L., Sharma, R., Yadav, S., Yashveer, S., Dalal, M. S., Gupta, V., Nagpal, S., Saini, M., Rai, N. K., Pati, R., ve Malhotra, K. (2022). Transcriptome Profiling in Leaves of Wheat Genotype under Heat Stress. *Plants*, 11(22), 3100. <https://doi.org/10.3390/plants11223100>
- Lambert-Rivest, G. (2019). *Brachypodium sylvaticum: Developing a new model to study freezing tolerance in temperate perennial grasses*.
- Lee, B., Henderson, D. A., ve Zhu, J.-K. (2005). The *Arabidopsis* Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1. *The Plant Cell*, 17(11), 3155-3175. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035568>
- Lee, G., Ahmadi, H., Quintana, J., Syllwasschy, L., Janina, N., Preite, V., Anderson, J. E., Pietzenuk, B., ve Krämer, U. (2021). Constitutively enhanced genome integrity maintenance and direct stress mitigation characterize transcriptome of extreme stress-adapted *Arabidopsis halleri*. *The Plant Journal*, 108(4), 896-911. <https://doi.org/10.1111/tpj.15544>
- Leyva-Pérez, M. D. L. O., Valverde-Corredor, A., Valderrama, R., Jiménez-Ruiz, J., Muñoz-Merida, A., Trelles, O., Barroso, J. B., Mercado-Blanco, J., ve Luque, F. (2015). Early and delayed long-term transcriptional changes and short-term transient responses during cold acclimation in olive leaves. *DNA Research*, 22(1), 1-11. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu033>
- Li, H., Gao, Y., Xu, H., Dai, Y., Deng, D., ve Chen, J. (2013). ZmWRKY33, a WRKY maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation*, 70(3), 207-216. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9792-9>
- Li, J., Yao, S., Kim, S.-C., ve Wang, X. (2024). Lipid phosphorylation by a diacylglycerol kinase suppresses ABA biosynthesis to regulate plant stress responses. *Molecular Plant*, 17(2), 342-358. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2024.01.003>

- Li, M.-Y., Song, X., Wang, F., ve Xiong, A.-S. (2016). Suitable Reference Genes for Accurate Gene Expression Analysis in Parsley (*Petroselinum crispum*) for Abiotic Stresses and Hormone Stimuli. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01481>
- Li, S., Fu, Q., Huang, W., ve Yu, D. (2009). Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor WRKY25 in heat stress. *Plant Cell Reports*, 28(4), 683-693. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0666-y>
- Li, W., ve Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658-1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- Li, Y., Li, Y., Zou, X., Jiang, S., Cao, M., Chen, F., Yin, Y., Xiao, W., Liu, S., ve Guo, X. (2024). Bioinformatic Identification and Expression Analyses of the MAPK–MAP4K Gene Family Reveal a Putative Functional MAP4K10-MAP3K7/8-MAP2K1/11-MAPK3/6 Cascade in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants*, 13(7), 941. <https://doi.org/10.3390/plants13070941>
- Li, Z., Hu, G., Liu, X., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Yuan, X., Zhang, Q., Yang, D., Wang, T., ve Zhang, Z. (2016). Transcriptome Sequencing Identified Genes and Gene Ontologies Associated with Early Freezing Tolerance in Maize. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01477>
- Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of plant physiology*, 148(1-2), 4-14.
- Lindemose, S., O'Shea, C., Jensen, M., ve Skriver, K. (2013). Structure, Function and Networks of Transcription Factors Involved in Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5842-5878. <https://doi.org/10.3390/ijms14035842>
- Liu, J.-X., Feng, K., Duan, A.-Q., Li, H., Yang, Q.-Q., Xu, Z.-S., ve Xiong, A.-S. (2019). Isolation, purification and characterization of an ascorbate peroxidase from celery and overexpression of the AgAPX1 gene enhanced ascorbate content and drought tolerance in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 19(1), 488. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2095-1>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., ve Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., ve Shinozaki, K. (1998). Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low- Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(8), 1391-1406.
- Liu, Z., Jia, Y., Ding, Y., Shi, Y., Li, Z., Guo, Y., Gong, Z., ve Yang, S. (2017). Plasma Membrane CRPK1-Mediated Phosphorylation of 14-3-3 Proteins Induces Their

- Nuclear Import to Fine-Tune CBF Signaling during Cold Response. *Molecular Cell*, 66(1), 117-128.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.016>
- Love, M. I., Huber, W., ve Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, X., Zhou, X., Cao, Y., Zhou, M., McNeil, D., Liang, S., ve Yang, C. (2017). RNA-seq Analysis of Cold and Drought Responsive Transcriptomes of *Zea mays* ssp. *Mexicana* L. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00136>
- Mahajan, S., ve Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139-158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>
- Mahdavi Mashaki, K., Garg, V., Nasrollahnezhad Ghomi, A. A., Kudapa, H., Chitikineni, A., Zaynali Nezhad, K., Yamchi, A., Soltanloo, H., Varshney, R. K., ve Thudi, M. (2018). RNA-Seq analysis revealed genes associated with drought stress response in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plos One*, 13(6), e0199774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199774>
- Mahran, G. H., Kadry, H. A., Isaac, Z. G., Thabet, C. K., Al-Azizi, M. M., ve El-Olemy, M. M. (1991). Investigation of diuretic drug plants. 1. Phytochemical screening and pharmacological evaluation of *Anethum graveolens* L., *Apium graveolens* L., *Daucus carota* L. and *Eruca sativa* mill. *Phytotherapy Research*, 5(4), 169-172.
- Mandavia, M., Tomar, R., ve Shiwani. (2019). A Draft Genome Sequencing of Dill (*Anethum graveolens* L.) Using Ion Torrent Sequencing Technology. *International Journal of Chemical Studies*.
- Mandlik, J. S., Patil, A. S., ve Singh, S. (2024). Next-Generation Sequencing (NGS): Platforms and Applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 16(Suppl 1), S41-S45. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_838_23
- Mansouri, M., Nayeibi, N., Keshtkar, A., Hasani-Ranjbar, S., Taheri, E., ve Larijani, B. (2012). The effect of 12 weeks *Anethum graveolens* (dill) on metabolic markers in patients with metabolic syndrome; a randomized double blind controlled trial. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 47. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-47>
- Manzuoerh, R., Farahpour, M. R., Oryan, A., ve Sonboli, A. (2019). Effectiveness of topical administration of *Anethum graveolens* essential oil on MRSA-infected wounds. *Biomedicine ve Pharmacotherapy*, 109, 1650-1658. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.117>
- Maran, M. I. J., ve Davis G., D. J. (2022). Benefits of merging paired-end reads before pre-processing environmental metagenomics data. *Marine Genomics*, 61, 100914. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2021.100914>

- Marguerat, S., ve Bähler, J. (2010). RNA-seq: From technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(4), 569-579. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0180-6>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12.
- Martin, J. A., ve Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, 12(10), 671-682.
- Mathe, C. (2002). Current methods of gene prediction, their strengths and weaknesses. *Nucleic Acids Research*, 30(19), 4103-4117. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf543>
- Maxam, A. M., ve Gilbert, W. (1980). [57] Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. In *Methods in enzymology* (Vol. 65, pp. 499-560). Academic Press.
- Meena, R. P., Ghosh, G., Vishwakarma, H., ve Padaria, J. C. (2022). Expression of a Pennisetum glaucum gene DREB2A confers enhanced heat, drought and salinity tolerance in transgenic Arabidopsis. *Molecular Biology Reports*, 49(8), 7347-7358. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07527-6>
- Mehdizadeh Hakkak, M., ve Tohidfar, M. (2026). Integrative cross-platform transcriptomic analysis coupled with machine learning identifies candidate biomarkers of abiotic stress resilience in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*, 26(1), 619. <https://doi.org/10.1186/s12870-026-08451-8>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—The next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Miao, W., Song, J., Huang, Y., Liu, R., Zou, G., Ou, L., ve Liu, Z. (2021). Comparative Transcriptomics for Pepper (Capsicum annuum L.) under Cold Stress and after Rewarming. *Applied Sciences*, 11(21), 10204. <https://doi.org/10.3390/app112110204>
- Miao, Y., ve Zhang, K. (2025). Genome-Wide Identification of Cucumber Lhc Genes' Family and Their Expression Analysis. *Horticulturae*, 11(7), 736. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11070736>
- Milenković, L., Ilić, Z. S., Stanojević, L., Danilović, B., Šunić, L., Kevrešan, Ž., Stanojević, J., ve Cvetković, D. (2024). Chemical Composition and Bioactivity of Dill Seed (Anethum graveolens L.) Essential Oil from Plants Grown under Shading. *Plants*, 13(6), 886. <https://doi.org/10.3390/plants13060886>
- Min, Z., Liu, J., Zhao, L., Wang, X., Jiang, L., Zhang, Y., ve Ge, Q. (2026). Grapevine ERF transcription factor VvERF113 enhances waterlogging tolerance in plants via interaction with the HD-Zip I transcription factor VvATHB-13. *Plant Physiology and Biochemistry*, 234, 111266. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2026.111266>

- Mirhosseini, M., Baradaran, A., ve Rafieian-Kopaei, M. (2014). Anethumgraveolens and hyperlipidemia: A randomized clinical trial. *Journal of Research in Medical Sciences*, 19.
- Mishra, P., Maurya, R., Avashthi, H., Mittal, S., Chandra, M., ve Ramteke, P. W. (2022). Genome assembly and annotation. İçinde *Bioinformatics* (ss. 49-66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00013-4>
- Mobasser, M., Payahoo, L., Ostadrahimi, A., ve Mahluji, S. (2014). Anethum graveolens Supplementation Improves Insulin Sensitivity and Lipid Abnormality in Type 2 Diabetic Patients. *Pharmaceutical Sciences*, 20, 40-45.
- Mohammed, F. A., Elkady, A. I., Syed, F. Q., Mirza, M. B., Hakeem, K. R., ve Alkarim, S. (2018). Anethum graveolens (dill) – A medicinal herb induces apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 219, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.008>
- Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., Eliby, S., Shirley, N., Langridge, P., ve Lopato, S. (2011). Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*, 9(2), 230-249. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x>
- Mulo, P. (2011). Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR): Structure, function and location. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8), 927-934. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.001>
- Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., ve Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology*, 42(4).
- Naseri, M. K., ve Heidari, A. (2007). Antispasmodic Effect of Anethum graveolens Fruit Extract on Rat Ileum. *International Journal of Pharmacology*, 3(3), 260-264. <https://doi.org/10.3923/ijp.2007.260.264>
- Ninou, E. G., Mylonas, I. G., Tsivelikas, A. L., ve Ralli, P. E. (2017). Phenotypic diversity of Greek dill (*Anethum graveolens* L.) landraces. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil ve Plant Science*, 67(4), 318-325. <https://doi.org/10.1080/09064710.2016.1276957>
- Nakano, Y., Matsunaga, H., Saita, T., Mori, M., Katano, M., ve Okabe, H. (1998). Antiproliferative constituents in Umbelliferae plants II.: screening for polyacetylenes in some Umbelliferae plants, and isolation of Panaxynol and falcariindiol from the root of Heracleum moellendorffii. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(3), 257-261.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E. T., ve Welin, B. V. (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. 45(3), 263-279.

- Ohkubo, T., Kameyama, A., Kamiya, K., Kondo, M., ve Hara, M. (2020). F-segments of Arabidopsis dehydrins show cryoprotective activities for lactate dehydrogenase depending on the hydrophobic residues. *Phytochemistry*, 173, 112300. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112300>
- Oshlack, A., Robinson, M. D., ve Young, M. D. (2010). From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biology*, 11(12), 220. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-12-220>
- Ozliman, S., Yaldiz, G., Camlica, M., ve Ozsoy, N. (2021). Chemical components of essential oils and biological activities of the aqueous extract of *Anethum graveolens* L. grown under inorganic and organic conditions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00224-9>
- Pan, Y., Seymour, G. B., Lu, C., Hu, Z., Chen, X., ve Chen, G. (2012). An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Reports*, 31(2), 349-360. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1170-3>
- Panahi, B. (2025). The molecular core responses to multiple abiotic stresses in barley (*Hordeum vulgare* L.): Insights from global transcriptome analysis. *South African Journal of Botany*, 177, 237-250. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.11.039>
- Panchuk, I. I., Volkov, R. A., ve Schöffl, F. (2002). Heat Stress- and Heat Shock Transcription Factor-Dependent Expression and Activity of Ascorbate Peroxidase in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129(2), 838-853. <https://doi.org/10.1104/pp.001362>
- Panda, S. (2008). The effect of *Anethum graveolens* L. (dill) on corticosteroid induced diabetes mellitus: Involvement of thyroid hormones. *Phytotherapy Research*, 22(12), 1695-1697. <https://doi.org/10.1002/ptr.2553>
- Parida, S. K., Kalia, S. K., Kaul, S., Dalal, V., Hemaprabha, G., Selvi, A., Pandit, A., Singh, A., Gaikwad, K., Sharma, T. R., Srivastava, P. S., Singh, N. K., ve Mohapatra, T. (2009). Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(2), 327-338. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0902-4>
- Park, S.-C., Kim, Y.-H., Jeong, J. C., Kim, C. Y., Lee, H.-S., Bang, J.-W., ve Kwak, S.-S. (2011). Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (IbLEA14) gene influences lignification and increases osmotic- and salt stress-tolerance of transgenic calli. *Planta*, 233(3), 621-634. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1326-3>
- Pawłowicz, I., Rapacz, M., Perlikowski, D., Gondek, K., ve Kosmala, A. (2017). Abiotic stresses influence the transcript abundance of PIP and TIP aquaporins in *Festuca* species. *Journal of Applied Genetics*, 58(4), 421-435. <https://doi.org/10.1007/s13353-017-0403-8>

- Pearson, W. R. (2013a). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Current Protocols in Bioinformatics*, 42(1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>
- Pearson, W. R. (2013b). BLAST and FASTA Similarity Searching for Multiple Sequence Alignment. İçinde D. J. Russell (Ed.), *Multiple Sequence Alignment Methods* (C. 1079, ss. 75-101). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_5
- Pulur, A. (2012). *Anethum Graveolens L. Bitkisinin Fitoterapi Yönünden İncelenmesi*.
- Punta, M., ve Ofran, Y. (2008). The Rough Guide to In Silico Function Prediction, or How To Use Sequence and Structure Information To Predict Protein Function. *PLoS Computational Biology*, 4(10), e1000160. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000160>
- Quigley, F., Rosenberg, J. M., Shachar-Hill, Y., ve Bohnert, H. J. (2001). From genome to function: The Arabidopsis aquaporins. *Genome Biology*, 3(1), research0001.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-research0001>
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J. H., Van De Peer, Y., ve Boerjan, W. (2003). Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(3), 1051-1071. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026484>
- Raghavan, V., Kraft, L., Mesny, F., ve Rigerte, L. (2022). A simple guide to *de novo* transcriptome assembly and annotation. *Briefings in Bioinformatics*, 23(2), bbab563. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab563>
- Raja, V., Qadir, S. U., Alyemeni, M. N., ve Ahmad, P. (2020). Impact of drought and heat stress individually and in combination on physio-biochemical parameters, antioxidant responses, and gene expression in *Solanum lycopersicum*. *3 Biotech*, 10(5), 208. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02206-4>
- Rashidlamir, A., Gholamian, S., Javaheri, A. H., ve Dastani, M. (2012). *The effect of 4-weeks aerobic training according with the usage of Anethum Graveolens on blood sugar and lipoproteins profile of diabetic women*. 3(9).
- Ritonga, F. N., ve Chen, S. (2020). Physiological and Molecular Mechanism Involved in Cold Stress Tolerance in Plants. *Plants*, 9(5), 560. <https://doi.org/10.3390/plants9050560>
- Ruiz-González, M. X., Vélez-Mejía, A., ve Vicente, O. (2025). Coevolutionary Patterns in SOS1 and NHX1: Insights into Plant Ion Homeostasis Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(19), 9276. <https://doi.org/10.3390/ijms26199276>
- Sabzeali, F., Ahmadikhah, A., Farrokhi, N., ve Haghi, R. (2026). Transcriptome analysis of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) reveals the roles of osmotic adjustment and regulatory mechanisms in response to drought stress. *BMC Plant Biology*, 26(1), 503. <https://doi.org/10.1186/s12870-026-08366-4>
- Sadeghi, M., Kabiri, S., Amerizadeh, A., Heshmat-Ghahdarijani, K., Masoumi, G., Teimouri-Jervevani, Z., ve Amirpour, A. (2022). *Anethum graveolens* L. (Dill)

- Effect on Human Lipid Profile: An Updated Systematic Review. *Current Problems in Cardiology*, 47(11), 101072. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2021.101072>
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., ve Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of Arabidopsis DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3), 998-1009. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6299>
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., ve Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional Analysis of an *Arabidopsis* Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, 18(5), 1292-1309. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035881>
- Salehin, M., Li, B., Tang, M., Katz, E., Song, L., Ecker, J. R., Kliebenstein, D. J., ve Estelle, M. (2019). Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in Arabidopsis by regulating glucosinolate levels. *Nature Communications*, 10(1), 4021. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12002-1>
- Sanger, F., Nicklen, S., ve Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sathya, V., ve Gopalakrishnan, V. K. (2013). Virtual Screening Of Potential Drug-Like Inhibitors From Medicinal Plants Against Hbxip Of Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2).
- Seppey, M., Manni, M., ve Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. İçinde M. Kollmar (Ed.), *Gene Prediction* (C. 1962, ss. 227-245). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14
- Shahsavari, M., Mohammadi, V., Alizadeh, B., ve Daryani, P. (2025). RNA-Seq Meta-Analysis Unveils Key Genes and Pathways in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Responses to Drought and Heat Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 44(7), 3660-3680. <https://doi.org/10.1007/s00344-025-11658-y>
- Sharopov, F. S., Wink, M., Gulmurodov, I. S., Isupov, S. J., Zhang, H., ve Setzer, W. N. (2013). Composition and Bioactivity of the Essential Oil of *Anethum graveolens* L. from Tajikistan. *Nt. J. Med. Arom. Plants*, 3(2), 125-130.
- Shekhawat, G., ve Jana, S. (2010). *Anethum graveolens*: An Indian traditional medicinal herb and spice. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 179. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70915>
- Shi, G., ve Zhu, X. (2024). Transcriptome sequencing analysis of overexpressed SikCDPK1 in tobacco reveals mechanisms of cold stress response. *BMC Genomics*, 25(1), 971. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10801-5>

- Shinwari, Z. K., Nakashima, K., Miura, S., Kasuga, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., ve Shinozaki, K. (1998). An Arabidopsis Gene Family Encoding DRE/CRT Binding Proteins Involved in Low-Temperature-Responsive Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(1), 161-170. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9267>
- Shuyskaya, E., Rakhmankulova, Z., Prokofieva, M., Kazantseva, V., ve Lunkova, N. (2023). Impact of Salinity, Elevated Temperature, and Their Interaction with the Photosynthetic Efficiency of Halophyte Crop *Chenopodium quinoa* Willd. *Agriculture*, 13(6), 1198. <https://doi.org/10.3390/agriculture13061198>
- Shyu, Y.-S., Lin, J.-T., Chang, Y.-T., Chiang, C.-J., ve Yang, D.-J. (2009). Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. *Food Chemistry*, 115(2), 515-521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.039>
- Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P., ve Catalan, C. (2005). Chemical Constituents, Antimicrobial Investigations, and Antioxidative Potentials of *Anethum graveolens* L. Essential Oil and Acetone Extract: Part 52. *Journal of Food Science*, 70(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07190.x>
- Singh, G., Maurya, S., Marimuthu, P., Murali, H. S., ve Bawa, A. S. (2007). *Antioxidant and antibacterial investigations on essential oils and acetone extracts of some spices*. 6(2), 114-121.
- Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B., ve Tuteja, N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling ve Behavior*, 6(2), 196-203. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14701>
- Small, E. (2006). *Culinary herbs*. NRC Research Press.
- Solis, C. A., Yong, M.-T., Zhou, M., Venkataraman, G., Shabala, L., Holford, P., Shabala, S., ve Chen, Z.-H. (2022). Evolutionary Significance of NHX Family and NHX1 in Salinity Stress Adaptation in the Genus *Oryza*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2092. <https://doi.org/10.3390/ijms23042092>
- Soualiou, S., Duan, F., Li, X., ve Zhou, W. (2022). Crop Production Under Cold Stress: An understanding of plant responses, acclimation processes, and management strategies. *Plant Physiology and Biochemistry*, 190, 47-61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.08.024>
- Stanojević, L. P., Stanković, M. Z., Cvetković, D. J., ve Stanojević, J. S. (2016). *Dill (Anethum graveolens L.) seeds essential oil as a potential natural antioxidant and antimicrobial agent*. 7(1), 31-39.
- Stoler, N., ve Nekrutenko, A. (2021). Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 3(1), lqab019. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqab019>
- Taddeo, V. A., Genovese, S., Medina, P. D., Palmisano, R., Epifano, F., ve Fiorito, S. (2017). Quantification of biologically active O- prenylated and unprenylated phenylpropanoids in dill (*Anethum graveolens*), anise (*Pimpinella anisum*), and

- wild celery (*Angelica archangelica*). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, 319-324. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.048>
- Tamilarasi, R., Sivanesan, D., ve Kanimozhi, P. (2012). Hepatoprotective and antioxidant efficacy of *Anethum graveolens* linn in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino rats.
- Tan, C., Li, N., Wang, Y., Yu, X., Yang, L., Cao, R., ve Ye, X. (2023). Integrated Physiological and Transcriptomic Analyses Revealed Improved Cold Tolerance in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) by Exogenous Chitosan Oligosaccharide. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6202. <https://doi.org/10.3390/ijms24076202>
- Tan, W.-J., Yang, Y.-C., Zhou, Y., Huang, L.-P., Xu, L., Chen, Q.-F., Yu, L.-J., ve Xiao, S. (2018). Diacylglycerol Acyltransferase and Diacylglycerol Kinase Modulate Triacylglycerol and Phosphatidic Acid Production in the Plant Response to Freezing Stress. *Plant Physiology*, 177(3), 1303-1318. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00402>
- Tan, X., Li, S., Hu, L., ve Zhang, C. (2020). Genome-wide analysis of long non-coding RNAs (lncRNAs) in two contrasting rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes subjected to drought stress and re-watering. *BMC Plant Biology*, 20(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2286-9>
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L., ve Hirt, H. (2004). The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 15(1), 141-152. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.023>
- Thakur, P., Kumar, S., Malik, J. A., Berger, J. D., ve Nayyar, H. (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 67(3), 429-443. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.09.004>
- Thanuma, J., Phetcharaburanin, J., Dokduang, H., Loilome, W., Klanrit, P., Wangwiwatsin, A., ve Namwat, N. (2025). Metabolomic analysis of bioactive compounds in dill (*Anethum graveolens* L.) extracts. *PeerJ*, 13, e19567. <https://doi.org/10.7717/peerj.19567>
- The Gene Ontology Consortium, Aleksander, S. A., Balhoff, J., Carbon, S., Cherry, J. M., Drabkin, H. J., Ebert, D., Feuermann, M., Gaudet, P., Harris, N. L., Hill, D. P., Lee, R., Mi, H., Moxon, S., Mungall, C. J., Muruganugan, A., Mushayahama, T., Sternberg, P. W., Thomas, P. D., ... Westerfield, M. (2023). The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, 224(1), iyad031. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>
- The UniProt Consortium. (2007). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 36(Database), D190-D195. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm895>
- Tian, C., Jiang, Q., Wang, F., Wang, G.-L., Xu, Z.-S., ve Xiong, A.-S. (2015). Selection of Suitable Reference Genes for qPCR Normalization under Abiotic Stresses and

- Hormone Stimuli in Carrot Leaves. *PLOS ONE*, 10(2), e0117569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117569>
- Trivedi, U. H., Cézard, T., Bridgett, S., Montazam, A., Nichols, J., Blaxter, M., ve Gharbi, K. (2014). Quality control of next-generation sequencing data without a reference. *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00111>
- TÜİK: <https://veriportali.tuik.gov.tr/tr/statistical-themes> [Erişim tarihi: 15.03.2026].
- Valadi A, Nasri S, Abbasi N, Amir GR. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract from the seed of *Anethum graveolens* L. *Journal of Medicinal Plants*. 2010; 9(34):124-130
- Varshney, R. K., Hoisington, D. A., ve Tyagi, A. K. (2006). Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 490-499. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.08.006>
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., ve Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4113-4117. <https://doi.org/10.1021/jf9801973>
- Verma, S., Nizam, S., ve Verma, P. K. (2013). Biotic and abiotic stress signaling in plants. In *Stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective, volume 1* (pp. 25-49). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6372-6_2
- Victoria, F. C., Da Maia, L. C., ve De Oliveira, A. C. (2011). In silicocomparative analysis of SSR markers in plants. *BMC Plant Biology*, 11(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-15>
- Virlouvet, L., Ding, Y., Fujii, H., Avramova, Z., ve Fromm, M. (2014). ABA signaling is necessary but not sufficient for *RD 29 B* transcriptional memory during successive dehydration stresses in *A rabidopsis thaliana* . *The Plant Journal*, 79(1), 150-161. <https://doi.org/10.1111/tpj.12548>
- Wan, L., Li, Y., Li, S., ve Li, X. (2022). Transcriptomic Profiling Revealed Genes Involved in Response to Drought Stress in Alfalfa. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(1), 92-112. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10287-x>
- Wang, H., Huang, Z., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Wu, Y., Huang, D., ve Huang, R. (2004). Ectopic overexpression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Molecular Biology*, 55(2), 183-192. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0113-6>
- Wang, H., Liu, Z., Li, F., Wang, Y., Fang, R., Zhao, W., ve Lia, L. (2014). Molecular cloning of a dehydration-responsive protein gene (MRD22) from mulberry, and determination of abiotic stress patterns of MRD22 gene expression. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 40(2), 185-192. <https://doi.org/10.1134/S1068162014010130>

- Wang, M., Wang, L., Yu, X., Zhao, J., Tian, Z., Liu, X., Wang, G., Zhang, L., ve Guo, X. (2023). Enhancing cold and drought tolerance in cotton: A protective role of SikCOR413PM1. *BMC Plant Biology*, 23(1), 577. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04572-6>
- Wang, Q., Guan, Y., Wu, Y., Chen, H., Chen, F., ve Chu, C. (2008). Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology*, 67(6), 589-602. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9340-6>
- Wang, Y., Liu, J., ve Gao, H. (2026). Physiological and transcriptomic analyses reveal that exogenous silicon alleviate the response of tomato to salt stress. *Plant Signaling ve Behavior*, 21(1), 2652178. <https://doi.org/10.1080/15592324.2026.2652178>
- Wang, Y.-H., Liu, P.-Z., Zhang, R.-R., Sun, Y.-J., Xie, Y.-Q., Fang, F., Liu, H., Tan, G.-F., Chen, Z.-F., Zhang, J., ve Xiong, A.-S. (2026). Insights into dill (*Anethum graveolens*) flavor formation via integrative analysis of chromosomal-scale genome, metabolome and transcriptome. *Journal of Advanced Research*, 79, 847-862. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2025.03.024>
- Wang, Z., Gerstein, M., ve Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wiedmann, M., ve Carroll, L. M. (2018). Next-generation sequencing. *Encyclo. Food Chem*, 376.
- Withanage, M. H. H., Liang, H., ve Zeng, E. (2022). RNA-Seq Experiment and Data Analysis. İçinde K. M. Eyster (Ed.), *Estrogen Receptors* (C. 2418, ss. 405-424). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1920-9_22
- Wu, L., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, X.-C., ve Huang, R. (2008). Transcriptional Modulation of Ethylene Response Factor Protein JERF3 in the Oxidative Stress Response Enhances Tolerance of Tobacco Seedlings to Salt, Drought, and Freezing. *Plant Physiology*, 148(4), 1953-1963. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126813>
- Xiao, H., Tattersall, E. A. R., Siddiqua, M. K., Cramer, G. R., ve Nassuth, A. (2008). CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant, Cell ve Environment*, 31(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01741.x>
- Yadav, S., Modi, P., Dave, A., Vijapura, A., Patel, D., ve Patel, M. (2020). Effect of abiotic stress on crops. *Sustainable crop production*, 3(17), 5-16.
- Yalamanchili, H. K., Wan, Y., ve Liu, Z. (2017). Data Analysis Pipeline for RNA-seq Experiments: From Differential Expression to Cryptic Splicing. *Current Protocols in Bioinformatics*, 59(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.33>

- Yaldiz, G., Çamlica, M., ve Özen, F. (2018). Evaluation of Yield and Quality Characteristics of Dill (*Anethum graveolans* L.) in Turkey and the World. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 28(1), 89-93.
- Yazdanparast, R., ve Bahramikia, S. (2008). Evaluation of the effect of *Anethum graveolens* L. crude extracts on serum lipids and lipoproteins profiles in hypercholesterolaemic rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(2), 88-94.
- Yi, S., Mo, S., Yu, X., Luo, X., Liao, Y., Li, C., Yin, J., ve Lu, S. (2026). Overexpression of the *DhCOR413PM1* gene from *Dendrobium Sonia* "Hiasakul" enhances cold, drought and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Ornamental Plant Research*, 6(1), 0-0. <https://doi.org/10.48130/opr-0025-0051>
- Yin, M., Wang, Y., Zhang, L., Li, J., Quan, W., Yang, L., Wang, Q., ve Chan, Z. (2017). The *Arabidopsis* Cys2/His2 zinc finger transcription factor ZAT18 is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 68(11), 2991-3005. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx157>
- Yu, L., Yan, J., Yang, Y., ve Zhu, W. (2015). Overexpression of tomato mitogen-activated protein kinase SlMPK3 in tobacco increases tolerance to low temperature stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121(1), 21-34. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0675-1>
- Yu, T., Zhang, J., Ma, X., Cao, S., Li, W., ve Yang, G. (2025). Proteomic Analysis of Low-Temperature Stress Response in Maize (*Zea mays* L.) at the Seedling Stage. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(9), 784. <https://doi.org/10.3390/cimb47090784>
- Zagami, S. E., Golmakani, N., Kabirian, M., ve Shakeri, M. T. (2012). Effect of Dill (*Anethum graveolens* Linn.) seed on uterus contractions pattern in active phase of labor. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 11(4), 602-606.
- Zdobnov, E. M., Kuznetsov, D., Tegenfeldt, F., Manni, M., Berkeley, M., ve Kriventseva, E. V. (2021). OrthoDB in 2020: Evolutionary and functional annotations of orthologs. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D389-D393. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1009>
- Zhang, C., Li, C., Liu, J., Lv, Y., Yu, C., Li, H., Zhao, T., ve Liu, B. (2017). The OsABF1 transcription factor improves drought tolerance by activating the transcription of COR413-TM1 in rice. *Journal of Experimental Botany*, 68(16), 4695-4707. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx260>
- Zhang, H., Liu, W., Wan, L., Li, F., Dai, L., Li, D., Zhang, Z., ve Huang, R. (2010). Functional analyses of ethylene response factor JERF3 with the aim of improving tolerance to drought and osmotic stress in transgenic rice. *Transgenic Research*, 19(5), 809-818. <https://doi.org/10.1007/s11248-009-9357-x>
- Zhang, H., Yu, Z., Yao, X., Chen, J., Chen, X., Zhou, H., Lou, Y., Ming, F., ve Jin, Y. (2021). Genome-wide identification and characterization of small auxin-up RNA (SAUR) gene family in plants: Evolution and expression profiles during normal

- growth and stress response. *BMC Plant Biology*, 21(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02781-x>
- Zhang, L., Guo, X., Zhang, Z., Wang, A., ve Zhu, J. (2021). Cold-regulated gene LeCOR413PM2 confers cold stress tolerance in tomato plants. *Gene*, 764, 145097. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145097>
- Zhao, C., Wang, P., Si, T., Hsu, C.-C., Wang, L., Zayed, O., Yu, Z., Zhu, Y., Dong, J., Tao, W. A., ve Zhu, J.-K. (2017). MAP Kinase Cascades Regulate the Cold Response by Modulating ICE1 Protein Stability. *Developmental Cell*, 43(5), 618-629.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.024>
- Zhou, A., Liu, E., Li, H., Li, Y., Feng, S., Gong, S., ve Wang, J. (2018). PsCor413pm2, a Plasma Membrane-Localized, Cold-Regulated Protein from Phlox subulata, Confers Low Temperature Tolerance in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2579. <https://doi.org/10.3390/ijms19092579>
- Zhou, J.-J., ve Luo, J. (2018). The Pin-Formed Auxin Efflux Carriers in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2759. <https://doi.org/10.3390/ijms19092759>
- Zhou, L., Yarra, R., Yang, Y., Liu, Y., Yang, M., ve Cao, H. (2022). The oil palm R2R3-MYB subfamily genes EgMYB111 and EgMYB157 improve multiple abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell Reports*, 41(2), 377-393. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02814-1>
- Zhu, J., Dong, C.-H., ve Zhu, J.-K. (2007). Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.010>
- Zhu, J., Shi, H., Lee, B., Damsz, B., Cheng, S., Stirm, V., Zhu, J.-K., Hasegawa, P. M., ve Bressan, R. A. (2004). An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, *HOS9*, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26), 9873-9878. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403166101>
- Zhu, L., Zhao, Y., Guo, M., Bai, J., Zhang, L., ve Li, Z. (2026). Deciphering the ceRNA Network in Alfalfa: Insights into Cold Stress Tolerance Mechanisms. *Biomolecules*, 16(2), 208. <https://doi.org/10.3390/biom16020208>
- Zou, C., Jiang, W., ve Yu, D. (2010). Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 61(14), 3901-3914. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq204>
- Zuther, E., Schulz, E., Childs, L. H., ve Hinch, D. K. (2012). Clinal variation in the non-acclimated and cold-acclimated freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant, Cell ve Environment*, 35(10), 1860-1878. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02522.x>