

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***LEA* (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) GENLERİNİN
KAVUN (*Cucumis melo* L.) VE KARPUZ (*Citrullus lanatus*)
TÜRLERİNDE TANIMLANMASI, BİYOİNFORMATİK
ANALİZLERİ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GEN İFADE
ANALİZLERİNİN İNCELENMESİ**

Sibel KARA

Danışman	Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Musa KAVAS

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU – 2016

TEZ ONAYI

Sibel KARA tarafından hazırlanan "**LEA (Late Embryogenesis Abundant) Genlerinin Kavun (*Cucumis melo L.*) ve Karpuz (*Citrullus lanatus*) Türlerinde Tanımlanması, Biyoinformatik Analizleri Ve Kuraklık Stresi Altında Gen İfade Analizlerinin İncelenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. M. Cengiz BALOĞLU
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi Yrd. Doç. Dr. Musa KAVAS
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



15/04/2016

Enstitü Müdürü Prof. Dr. Ömer KÜÇÜK

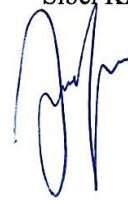


TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza

Sibel KARA



ÖZET

Yüksek Lisans

LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) GENLERİNİN KAVUN (*Cucumis melo* L.) VE KARPUZ (*Citrullus lanatus*) TÜRLERİNDE TANIMLANMASI, BİYOBİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GEN İFADE ANALİZLERİNİN İNCELENMESİ

Sibel KARA

Kastamonu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. M. Cengiz BALOĞLU

LEA genleri çeşitli stres faktörlerine karşı önemli fonksiyonlara sahip olan geç yanıt veren genlerdir. Kavun ve karpuz genomları yayınlanmış olmasına rağmen *LEA* gen ailesi ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu çalışmada kavun ve karpuz türlerindeki *LEA* gen ailesi üyeleri biyoinformatik programlarla kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Kavunda 61, karpuzda ise 73 *LEA* geni tanımlanmıştır. En yüksek ortolog gen oranları kavun ile soya arasında %63, karpuz ile kavak arasında %71 ilişki saptanmıştır. Diğer türlerdeki *LEA* genleriyle segmental ve tandem duplikasyonlar belirlenmiştir. İki tür için korunmuş miRNA'lar *in silico* olarak analiz edilmiştir. Kavunda 21 farklı miRNA'nın 21 *CmLEA* geni; karpuzda ise 22 farklı miRNA tarafından 21 *CILEA* geninin hedeflendiği görülmüştür. İki türün SRA veritabanından transkriptom analizi yapılmıştır. Kavunun farklı çeşitlerinde tuz stresi altında *CmLEA* genlerinin ifadesinin çoğunlukla arttığı gözlenmiştir. *CILEA* genlerinin ifade seviyesinin floem dokudakilerin vasküler dokulardakine göre arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada kuraklık stresi altında *LEA* gen ailesi üyeleri olan kavunda *CmLEA* 42, *CmLEA* 43; karpuzda ise *CILEA* 46, *CILEA* 48'in gen ifade seviyesi Real Time PZR analizi ile incelenmiştir. İki bitki türünde kuraklık stresi altında yaprak ve köklerden 0., 3., 12. ve 24. saatte örnekleme yapılmıştır. Eş zamanlı PZR sonuçlarına göre yaklaşık olarak kavunda *CmLEA* 42 geni yaprakta 24. saatte 4 kat; kökte 3. saatte 1,5 kat; *CmLEA* 43 geni 24. saatte yaprakta 2,5 kat, kökte 24. saatte 3 kat gen ifadesi artmıştır. Karpuzda ise *CILEA* 46 geni yaprakta 3. saate 2,5 kat, kökte 12. saatte 1,2 kat; *CILEA* 48'de ise yaprakta 3. saatte 1,2 kat, kökte 3. ve 24. saatte 1,5 kat bir artış göstermektedir. Çalışmamız *LEA* genlerinin, kavun ve karpuzda kuraklığa yanıt mekanizmasının açığa çıkarılmasında öncü bir çalışma olabileceği gibi gelecekteki çalışmalara da farklı bir perspektif oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler: Kavun, karpuz, *LEA*, biyoinformatik, kuraklık stresi, PEG, qRT-PCR, gen ifadesi, transkriptom analizi.

2016, 162 sayfa
Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

MSc. Thesis

IDENTIFICATION, BIOINFORMATICS ANALYSIS OF LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) GENES IN MELON (*Cucumis melo* L.) AND WATERMELON (*Citrullus lanatus*) AND GENE EXPRESSION ANALYSIS UNDER DROUGHT STRESS CONDITION

Sibel KARA

Kastamonu University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Genetics and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Cengiz BALOĞLU

LEAs which are late responsive genes, have important functions in response to various stress factors. Although genomes of melon and watermelon have been published, there is a little information about *LEA* gene family in these species. *LEA* gene family members in melon and watermelon species were examined in a comprehensive manner with bioinformatics tools. A total of 61 and 73 *LEA* genes have been identified in melon and watermelon, respectively. The highest orthologous genes rates were observed with melon and soybean (63%); watermelon and poplar (71%). The highest orthologous genes rates were observed with melon and soybean (63%); watermelon and poplar (71%). In silico conserved miRNAs analysis was performed for two species. It was shown that 21 different *CmLEA* and *CILEA* genes were targeted with 21 and 22 different miRNAs, respectively. Two species of transcriptome analysis was made from SRA databases. When compared to different melon varieties under salt stress condition, gene expression of *CmLEA* genes were generally up-regulated. Gene expression of *CILEA* genes were significantly increased in phloem tissue rather than vascular tissue. Furthermore, gene expression levels of *LEA* gene family members including *CmLEA* 42, *CmLEA* 43 in melon and *CILEA* 46, *CILEA* 48 in watermelon were examined by Real Time PCR. Leaves and roots from two plant species under drought stress at 0, 3, 12 and 24 hours were sampled. Expression level of *CmLEA* 42 gene increased to 4 folds in the leaves (24th hours) and 1,5 folds in the roots (3rd hours). *CmLEA* 43 gene expression raised to 2,5 folds at 24th hours in leaves and 3 folds at 24th hours in roots. In watermelon, *CILEA* 46 gene expression increased to 2,5 folds in the leaves (3rd hours) and 1,2 folds in the roots (12th hours). *CILEA* 48 gene expression raised to 1,2 folds at 3rd hours in leaves and 1,5 folds at 24th hours in roots. This research may be a pioneer work for uncovering of drought- response mechanism in melons and watermelons and may provide a different perspective for the future studies.

Key Words: Melon, watermelon, *LEA*, bioinformatics, drought stress, PEG, qRT-PCR, gene expression, transcriptome analysis.

2016, 162 pages

Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince beni yönlendiren, önerilerini eksik etmeyen, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU' na, deneylerimin tüm aşamalarında yardımcı olan Arş. Gör. Esra Nurten YER, Pınar BALOĞLU ve Fadime ÇETİN' e, tüm sıkıntılı anlarımda yanımda olan arkadaşım Tahir ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

114O761 kodlu 'Cucurbitaceae Ailesinde Bulunan *LEA* (Late Embryogenesis Abundant) Genlerinin Tanımlanması, Biyoinformatik Analizleri ve Kuraklık Stresi Altında Gen İfade Analizlerinin İncelenmesi' isimli TÜBİTAK projesi ile Yüksek lisans süresince deneylerimi maddi olarak destekleyen Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU'na teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca elinden gelen her türlü desteği yapan babam, annem ve kardeşime en içten duygularla teşekkür ederim.

Sibel KARA
Kastamonu, Nisan, 2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kavun ve Karpuz Hakkında Genel Bilgiler	4
1.1.1. Kavun (<i>Cucumis melo</i>)	4
1.1.1.1. Kavunun tarihçesi	5
1.1.1.2. Kavunun sınıflandırılması	5
1.1.1.3. Kavunun ekonomik önemi	5
1.1.1.4. Kavunun yetiştiği iklimsel koşullar ve toprak isteği	7
1.1.2. Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>).....	7
1.1.1.1. Karpuzun tarihçesi	8
1.1.1.2. Karpuzun sınıflandırılması	8
1.1.1.3. Karpuzun ekonomik önemi	8
1.1.1.4. Karpuzun yetiştiği iklimsel koşullar ve toprak isteği	9
1.2. Bitkilerde Stres Kavramı	10
1.2.1. Kuraklık stresi	11
1.2.1.1. Kuraklık stresi ile bağlantılı genler	13
1.3. LEA Proteinleri (Geç Embriyogenez Proteinleri)	14
1.3.1. LEA proteinlerinin yapısı	15
1.3.2. LEA proteinlerinin sınıflandırılması	15
1.3.3. LEA proteinlerinin fonksiyonları.....	17
1.4. Bitkilerde Stres Koşullarında Gen İfadesinin Düzenlenmesi	18
1.5. Gen İfadesinde Kullanılan Analizler	22

1.5.1. Eş Zamanlı - PZR.....	23
1.5.2. Yeni nesil DNA dizileme.....	27
2. KURAMSAL TEMELLER.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Kimyasal Madde ve Kitler	35
3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler.....	35
3.1.3. Bitki materyali	36
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Kavun ve Karpuzda <i>LEA</i> Genlerinin Biyoinformatik Analizleri.....	36
3.2.2. <i>LEA</i> Genleri Kromozomal Yerleşimlerinin Belirlenmesi, Gen Yapısının Tahmini ve Genomik Dağılımın Hesaplanması.....	37
3.2.3. Dizi Hizalanması, Filogenetik Analizler ve Korunmuş Motiflerin Belirlenmesi.....	38
3.2.4. Gen Ontoloji Analizleri.....	38
3.2.5. Kavun ve Karpuzdaki <i>LEA</i> Proteinlerinin Diğer Türler İle Karşılaştırmalı Fiziksel Haritasının Çıkarılması	38
3.2.6. Homolog ve Homolog Olmayan Değişim Oranlarının Hesaplanması.....	39
3.2.7. <i>LEA</i> Genlerini Hedef Alan miRNA' ların Bilgisayarlı Tanımlanması	39
3.2.8. <i>LEA</i> Proteinlerinin Homoloji Modellemesi.....	40
3.2.9. Transkriptom Verisi Kullanılarak Kavun ve Karpuz <i>LEA</i> Genleri Ekspresyon Profilinin Çıkarılması	41
3.2.10. Bitki Örnekleri, Yetiştirme Koşulları ve Stres Uygulanması	43
3.2.11. Moleküler Genetik Metodlar.....	45
3.2.11.1 <i>RNA izolasyonu</i>	45
3.2.11.2. <i>DNaz muamelesi</i>	46
3.2.11.3. <i>cDNA sentezi (Komplementer DNA sentezi)</i>	47
3.2.11.4. <i>Primer tasarlama</i>	49
3.2.11.5. <i>Agaroz jel elektroforezi</i>	51
3.2.11.6. <i>PZR analizleri</i>	52
3.2.12. Eş Zamanlı PZR Analizleri	54
3.2.13. İstatistiksel Analizler	56

4. BULGULAR	57
4.1. Kavunda <i>LEA</i> Genlerinin Belirlenmesi ve Analizleri	57
4.1.1. <i>CmLEA</i> Genlerinin Biyoinformatik Analizleri	57
4.1.2. Filogenetik Analizler.....	57
4.1.3. <i>CmLEA</i> Hedef Genlerinin miRNA Analizleri	63
4.1.4. <i>CmLEA</i> Genlerinin Transkriptom Analizi	63
4.1.5. <i>LEA</i> Genlerinin Kuraklık Stresi Altında Gen İfade Analizleri	68
4.2. Karpuzda <i>LEA</i> Genlerinin Belirlenmesi ve Analizleri	71
4.2.1. <i>CILEA</i> Genlerinin Biyoinformatik Analizleri	71
4.2.2. Filogenetik Analizler.....	73
4.2.3. <i>CILEA</i> Hedef Genlerinin miRNA Analizleri	80
4.2.4. <i>CILEA</i> Genlerinin Transkriptom Analizi	80
4.2.5. <i>LEA</i> Genlerinin Kuraklık Stresi Altında Gen İfade Analizleri	84
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	87
KAYNAKLAR	96
EKLER.....	117
EK 1 Hoagland çözeltisinin kimyasal içeriği	119
EK 2 Kavunda (<i>Cucumis melo</i>) tanımlanan <i>LEA</i> genleri.....	120
EK 3 <i>CmLEA</i> aminoasitlerinin motif özellikleri	123
EK 4 <i>CmLEA</i> aminoasitlerinin motif bileşenleri.....	124
EK 5 <i>CmLEA</i> genlerinin duplikasyonları ile homolog ve homolog olmayan değişim sonuçları	125
EK 6 <i>CmLEA</i> genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları	126
EK 7 <i>CmLEA</i> genlerinin duplikasyonları ve birbirinden ayrılma oranlarının ortalaması	131
EK 8 Kavunda psRNATarget veritabanından elde edilen miRNA hedefleri	132
EK 9 Kavunda çalışılan genlerin protein ve mRNA sekansı	135
EK 10 Karpuzda (<i>Citrullus lanatus</i>) tanımlanan <i>LEA</i> genleri	136
EK 11 Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>) ve <i>Arabidopsis thaliana</i> ortolog genlerinin gösterimi	140
EK 12 Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>) ve <i>Glycine max</i> ortolog genlerinin gösterimi	141

EK 13 Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>) ve <i>Populus trichocarpa</i> ortolog genlerinin gösterimi	142
EK 14 Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>) ve <i>Solanum tuberosum</i> ortolog genlerinin gösterimi	143
EK 15 Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>) ve <i>Vitis vinifera</i> ortolog genleri gösterimi	144
EK 16 Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>) ve <i>Zea mays</i> ortolog genlerinin gösterimi	145
EK 17 CILEA aminoasitlerinin motif özellikleri	146
EK 18 CILEA aminoasitlerinin motif bileşenleri	147
EK 19 CILEA genlerinin tandem ve segmental duplikasyonları ile homolog ve homolog olmayan değişim sonuçları	148
EK 20 CILEA genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları	149
EK 21 CILEA genlerinin duplikasyonları ve birbirinden ayrılma oranlarının ortalaması	155
EK 22 Karpuzda psRNATarget veri tabanından elde edilen miRNA hedefleri	156
EK 23 Karpuzda çalışılan genlerin protein ve mRNA sekansı	159
EK 24 CmLEA ve CILEA genlerinin eş zamanlı PZR sonucunda kök ve yaprak dokularına ait amplifikasyon eğrileri	160
EK 25 CmLEA ve CILEA genlerinin eş zamanlı PZR sonucunda kök ve yaprak dokularındaki erime eğri grafikleri	161
ÖZGEÇMİŞ	162

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
aa	Aminoasit
ABA	Absisik Asit
AFPs	Anti-Freezeing Proteins
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Temel Yerel Hizalama Arama Aracı)
bç	Baz Çifti
bZIP	Basic Leucine Zipper
C	Sitozin
CCD	Charge Coupled Device (Yüklenme iliştilirilmiş araç)
cDNA	Komplementer DNA
CILEA	<i>Citrullus lanatus</i> için tanımlanan LEA genleri
cm	Santimetre
CmLEA	<i>Cucumis melo</i> için tanımlanan LEA genleri
CO ₂	Karbondioksit
Ct	Cycle Threshold (Döngü Eşiği)
Da	Dalton- Atomik kütle birimi
DEPC	Dietil pyrokarnonat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
dTMP	Deoksitimidin Monofosfat
dTTP	Deoksitimidin Trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
E-value	Beklenti Değeri
FAO	Food and Agriculture Organization
G	Guanin
Ka	Homolog Olmayan Değişim Oranı
kDa	Kilodalton
Ks	Homolog Değişim Oranı
Ks/Ka	Homolog Değişimlerin Homolog Olmayan Değişimlere Oranı
L	Litre
LEA	Late Embriogenesis Abundant (Geç Embriyogenez Proteinleri)
m	Metre
M	Molar
Mbç	Bir Milyon Baz Çifti
MEME	Multiple EM for Motif Elicitation
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
miRNA	Mikro RNA
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit

M.Ö	Milattan Önce
MYÖ	Milyonlarca Yıl Önce
ng	Nanogram
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilen Glikol 6000
PZR	Polimer Zincir Reaksiyonu
pI	İzoelektronik Etki Değeri
Ppi	Pirofosfat
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNAze	RiboNükleaz
rpm	Revolution Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RT-PZR	Real Time PZR (Eş Zamanlı PZR)
SMP	Seed Maturation Protein (Tohum Olgunlaşma Proteini)
sn	Saniye
SRA	Sequence Read Archive
T	Timin
TAE	Tris-Asetat Tamponu
Tm	Erime Sıcaklığı- Hidrojen Bağlarının Oluştığı Sıcaklık
Tris	Tris (hidroksimetil)aminomethane
UTR	Untranslated Region (Çevrilmeyen Bölgeler)
°C	Santigrad
~	Yaklaşık olarak
μ	Mikro
μmol	Mikromol
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
Ψs	Çözünen Potansiyeli

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Kavun bitkisinin şematik gösterimi	4
Şekil 1.2. Bitkilerde stres faktörleri	11
Şekil 1.3. Bitki stres algısı dinamiklerinin ve hücresel düzeyde stres tepkisinin şematik gösterimi	19
Şekil 1.4. Bitkiler stres yanıtının iletim yolları	20
Şekil 1.5. RNA düzeyindeki gen anlatımı analiz yöntemleri	23
Şekil 1.6. Eş Zamanlı PZR'nin çalışma prensibi	24
Şekil 1.7. Syber green tekniğinin aşamaları	25
Şekil 1.8. Erime eğrisi (Melting curve) örneği	26
Şekil 1.9. Erime eğrisinin (Melting curve) zamana karşı türevine örnek	27
Şekil 1.10. Pirosekanslamanın reaksiyon diyagramı	30
Şekil 3.1. RNA izolasyonunda oluşan faz ayrımı	46
Şekil 3.2. mRNA'dan cDNA sentezlenme aşaması	48
Şekil 4.1. <i>CmLEA</i> genlerinin filogenetik ağacı.....	58
Şekil 4.2. <i>CmLEA</i> genlerinin Blast2GO yardımıyla elde edilen fonksiyonel analizleri	59
Şekil 4.3. <i>CmLEA</i> proteinlerinin üç boyutlu tahmini yapısı	62
Şekil 4.4. <i>CmLEA</i> genleri için Cantalupo vedranta ve Piel de sapo pinonet çeşitlerinin Conomon SC ve Piel de sapo-t111 ile transkriptom veri analizlerinin karşılaştırılması	64
Şekil 4.5. Kontrol ve tuz stresi altındaki <i>Cucumis melo</i> 'da <i>CmLEA</i> genlerinin transkriptom veri analizi.	65
Şekil 4.6. Olgun beyaz ve sarı meyve kabuğu ile çiçek açtıktan sonra 10 ve 20. günlerindeki beyaz ve sarı meyve kabuğundaki <i>CmLEA</i> genlerinin transkriptom veri analizlerinin karşılaştırılması	67
Şekil 4.7. <i>CmLEA 42</i> ve <i>CmLEA 43</i> geninin agaroz jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.8. <i>CmLEA 42</i> geninin kuraklık stresi altındaki yaprak ve kök dokusunda zamana bağlı gen ifade seviyesi.....	70
Şekil 4.9. <i>CmLEA 43</i> geninin kuraklık stresi altındaki yaprak ve kök dokusunda zamana bağlı gen ifade seviyesi.....	70
Şekil 4.10. Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>)'da tanımlanan <i>LEA</i> genlerinin kromozomal yerleşimi.....	72
Şekil 4.11. <i>Citrullus lanatus</i> 'ta <i>LEA</i> genlerinin kromozomdaki dağılım yüzdesi.....	73
Şekil 4.12. <i>CmLEA</i> genlerinin filogenetik ağacı.....	74
Şekil 4.13. <i>CmLEA</i> genlerinin Blast2GO yardımıyla elde edilen fonksiyonel analizleri	76
Şekil 4.14. <i>CmLEA</i> proteinlerinin üç boyutlu yapısı.....	79

Şekil 4.15. Meyve oluşumu sırasında <i>CILEA</i> genlerinin ifadesindeki değişimlerin karşılaştırması.....	81
Şekil 4.16. Döllenmeden sonra 10, 26, 18, 34, 42, 50. günlerdeki meyve oluşumunda <i>CILEA</i> genlerinin transkriptom veri analizlerinin karşılaştırılması	82
Şekil 4.17. <i>CILEA</i> genlerinin floem ve vasküler dokularda transkriptom analizlerinin karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.18. <i>CILEA 46</i> ve <i>CmLEA 48</i> geninin agaroz jel görüntüsü.....	85
Şekil 4.19. <i>CILEA 46</i> geninin kuraklık stresi altındaki yaprak ve kök dokusunda zamana bağlı gen ifade seviyesi.....	86
Şekil 4.20. <i>CILEA 48</i> geninin kuraklık stresi altındaki yaprak ve kök dokusunda zamana bağlı gen ifade seviyesi.....	86



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1. <i>Kavun (Cucumis melo)</i> sınıflandırılması	5
Tablo 1.2. <i>Dünya kavun üretiminde ilk 5 ülkenin 2013 yılı üretim rakamları ve dünya üretiminden aldıkları pay</i>	6
Tablo 1.3. <i>Ülkemizde yıllara göre kavun üretimi ve ekilen alan</i>	6
Tablo 1.4. <i>Karpuz (Citrullus lanatus)</i> sınıflandırılması	8
Tablo 1.5. <i>Dünya karpuz üretiminde ilk 5 ülkenin 2013 yılı üretim rakamları ve dünya üretiminden aldıkları pay</i>	9
Tablo 1.6. <i>Ülkemizde yıllara göre karpuz üretimi</i>	9
Tablo 1.7. <i>Dünyada kullanılabilen alanların farklı stres faktörlerinden etkilenme oranları</i>	12
Tablo 1.8. <i>LEA genlerinin sınıflandırılması</i>	16
Tablo 1.9. <i>Yeni nesil dizileme yöntemlerinin karşılaştırılması</i>	28
Tablo 3.1. <i>CmLEA genlerinin transkriptom analizi için kullanılacak okumaların giriş numaraları</i>	41
Tablo 3.2. <i>CILEA genlerinin transkriptom analizi için kullanılacak okumaların giriş numaraları</i>	42
Tablo 3.3. <i>RNA örneklerine DNaz enzimi ile muamelesinde reaksiyon bileşenleri</i>	47
Tablo 3.4. <i>cDNA sentezinde I. aşamada kullanılan reaksiyon bileşenleri</i>	48
Tablo 3.5. <i>cDNA sentezinde II. aşamada kullanılan reaksiyon bileşenleri</i>	49
Tablo 3.6. <i>Cucumis melo için tasarlanan PZR primer dizileri</i>	50
Tablo 3.7. <i>Citrullus lanatus için tasarlanan PZR primer dizileri</i>	50
Tablo 3.8. <i>10X TAE tamponun hazırlanışı</i>	51
Tablo 3.9. <i>Marker protokolü</i>	52
Tablo 3.10. <i>Optimizasyonda kullanılan PZR protokolü</i>	52
Tablo 3.11. <i>Optimizasyonda kullanılan PZR döngüsü aşamaları</i>	53
Tablo 3.12. <i>Eş zamanlı PZR Programı</i>	54
Tablo 4.1. <i>Kavun (Cucumis melo) yaprak ve kök örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri</i>	68
Tablo 4.2. <i>Karpuz ile ortolog gen ilişkisi olan türler ve oranları</i>	78
Tablo 4.3. <i>Karpuzda tanımlanan LEA proteinlerinin benzerlik yüzdesi</i>	78
Tablo 4.4. <i>Karpuz (Citrullus lanatus) yaprak ve kök örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri</i>	84

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Sayfa

Fotoğraf 3.1. Kavun tohumlarının Hoagland çözeltilisi ile sulanmasının 7. günü görüntüleri.....	43
Fotoğraf 3.2. Kavun tohumlarının Hoagland çözeltilisi ile sulanmasının 22. günü görüntüleri.....	44
Fotoğraf 3.3. Thermal Cycler Isı bloğu.....	53
Fotoğraf 3.4. Jel Görüntüleme Sistemi Quantum ST5	54
Fotoğraf 3.5. Eş zamanlı PZR cihazı	55



1. GİRİŞ

Cucurbitaceae familyası, 119 cins ve 825 türü içerisinde barındırmaktadır (Jeffrey, 2005; Sarıjlu, 2011). Kavun (*Cucumis melo*) ve karpuz (*Citrullus lanatus*) dünya üzerinde sıcak bölgelerde yayılış gösteren, yüksek ekonomik değere sahip olan Cucurbitaceae familyasının iki farklı türüdür. Kavun, sağlık açısından bakıldığında içerisinde doğal vitamin, mineral ve pigment içeriği barındıran antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri olan bir bitkidir. Bu sebeplerden dolayı oldukça fazla tüketilmektedir. Bilhassa da A ve C vitamini, potasyum ve B6 vitamini deposudur. Kavun hastalıkların önlenmesine katkısı olan, antioksidan özellikli fitokimyasallar ve bir grup karotenoidi yapısında barındırmaktadır (Van Kappel vd., 2001; Vouldoukis, 2004; Solval vd.,2011; Kubilay, 2014). Karpuz ise kırmızı renkli diğer meyve çeşitlerine göre daha fazla likopen içermektedir. Likopen, kalp krizi ve bazı kanser türlerinin önlenmesi için yararlı olduğu düşünülmektedir (Güner ve Wehner, 2004). Karpuzun kabukları hayvan beslenmesinde, çekirdekleri ise kozmetik ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır. Karpuz çekirdeğinin besleyici yönü üzerine yapılan araştırmalar sonucunda gıda alanında tüketilmesi öngörülmüştür (Güneş ve Aşkın, 2016).

Kavun ve karpuz, dünyada ve ülkemizde en çok üretimi yapılan tarım ürünleridir (Taşkaya ve Keskin, 2004). Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren, iki türün üretimi ve ihracatı açısından da bakıldığında ülkemiz dünya genelinde oldukça önemli bir yere sahiptir. FAO verilerine göre dünya sıralamasında ülkemiz 2013 yılında kavun üretiminde 1 699 500 tonla ikinci sırayı alırken, karpuz üretiminde ise 3 887 324 tonla üçüncü sırada yer almaktadır (URL-1, 2013). Türkiye, kavun üretiminde dünya sıralamasında ikinci sırada yer alsada 1993 yılında yapılan üretim miktarıyla 2013 yılındaki üretim miktarı birbirine çok yakındır. Karpuzda ise son 20 yılda dünya sıralamasında ikinci sırada yer alırken sadece 2013 yılı üretimi ile üçüncü sıralara gerilemektedir.

Küresel ısınma sonucunda oluşabilecek olumsuz iklim şartları açısından ülkemiz, risk grubu ülkeler arasında olduğu tahmin edilmektedir (Kaplukan, 2013). İklim değişikliğine nedeniyle artması öngörülen ciddi kuraklık olaylarının sonucunda atmosferik evaporasyon kayıplarının artacağı düşünülmektedir (Teuling vd., 2013; Örs ve Ekinci, 2015). Bu durumda birçok kültür bitkisinde verimlerin düşmesine neden olacağı su götürmez bir gerçektir. Bu zararlardan etkilenmemek için kuraklık stresine karşı oluşan mekanizmanın açıklığa kavuşması gerekmektedir.

Kuraklık stresi, tüm organizmaların yaşam döngüsünü olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Bitkinin çimlenmeden sonraki erken dönemlerinde oluşabilecek kuraklık stresinde, bitkide kök sistemi iyi gelişmediği için geri dönüşümü olmayan yıkıcı zararlar verebilir (Duque vd., 2013). Bu koşulların atlatılmasında bitkilerde fizyolojik, hücrel ve moleküler olmak üzere bir dizi yanıtın oluşmasına neden olmaktadır (Dilek, 2013; Amara vd., 2014).

Organizmalar stres koşullara karşı enzim aktivitesinde değişiklik ve gen ifadesinin düzenlenmesi gibi birçok mekanizmayla hayatta kalmaya çalışırlar. Adaptasyon aşamasında çok sayıda gen indüklenebilmektedir (Dilek, 2013). Bitki adaptasyonunda en önemli nokta; karmaşık gen etkileşimlerini içeren çoklu yanıtların aktivasyonunu ve çok sayıda moleküler yollarla karışmasıdır (Umezawa vd., 2006; Basu, 2012; Duque vd., 2013). Stres koşullarına tolerans birden fazla gen tarafından kontrol edildiğinden bunların klasik ıslah yöntemleriyle belirlenmesinde mümkün değildir (URL-2, 2005). Son yıllarda çalışmalar abiyotik stres koşulları altında bitkilerde oluşan yanıtın farklı bileşenleri ve moleküler faktörlerin aydınlatılması üzerinde durulmaktadır (Duque vd., 2013). Kuraklık stresinin oluşabilecek zararların önüne geçilebilmesinde *LEA* genlerinin gen ifade sisteminin anlaşılması büyük önem arz etmektedir. Bir bitkide *LEA* proteinlerinin varlığı kuruma, tuzluluk ya da dondurucu koşullarla indüklenebilen dehidrasyona karşı hücrel toleransla ilişkilendirilir (Dilek, 2013).

Kavun genom dizisi yayınlanmış olmasına rağmen bu bitkideki kuraklık stresi altında *LEA* genlerinin ifadesi daha önce hiç çalışılmamıştır. Karpuzda ise 2015

yılında tek bir *LEA* geninin kuraklık, düşük sıcaklık, tuzluluk ve ABA stresine maruz bırakılarak gen ifadesi incelenmiştir.

Biyoinformatik yöntemlerden homoloji analizinde bir atadan gelmiş olan canlılarda ortak genetik özellikler (değişim göstermeyen ve korunmuş karakterler) ve yeni oluşmuş özellikler yani mutasyon veya rekombinasyon gibi olaylar tespit edilebilmektedir. Genler bu özelliklerine göre paralog ve ortolog gen olarak ikiye ayrılmaktadır. Farklı türlerde bulunan benzer dizilere veya fonksiyonlara sahip homolog dizilere ortolog diziler veya genler denilmektedir. Paralog diziler veya genler duplikasyon sonucu meydana gelen aynı tür içerisinde atadan gelen homolog dizilerden oluşmaktadır (İnal, 2011).

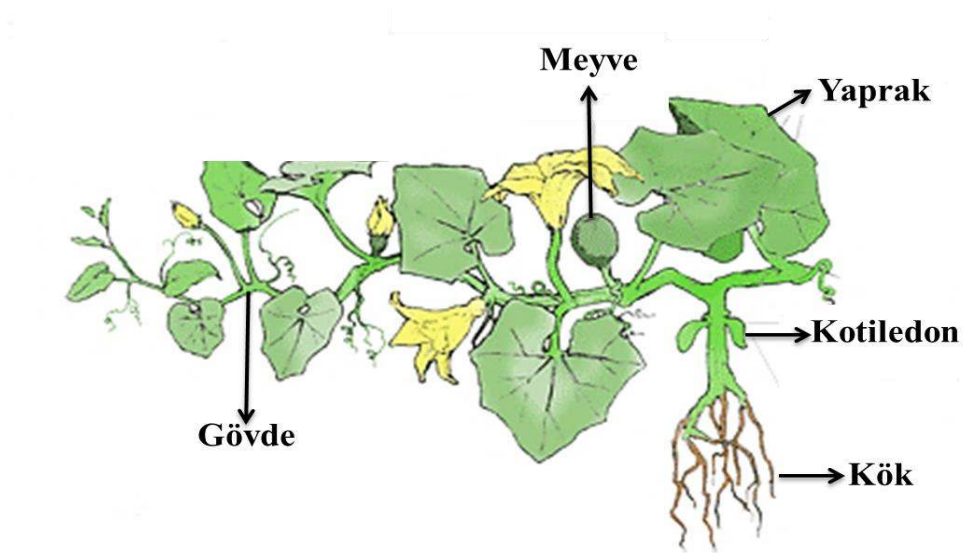
Bu tez çalışmasında biyoinformatik yöntemlerle kavun ve karpuz bitkilerindeki *LEA* gen ailesi üyelerini tespit edilerek *LEA* protein ailesi üyelerinin genomdaki dağılımı, *LEA* proteinlerindeki korunmuş motiflerinin tanımlanması, tahmini üç boyutlu yapılarının incelenmesi ve diğer bitki türlerinde bulunan *LEA* proteinleri ile ortolog ilişkiler ve karşılaştırılması ve korunmuş miRNAların saptanması hedeflenmiştir.

DeneySEL çalışmalarda kuraklık stresi altında kavunda (*Cucumis melo*) *CmLEA 42* (MELO3C020416P1), *CmLEA 43* (MELO3C021179P1); karpuzda (*Citrullus lanatus*) ise *CILEA 46* (Cla012811) ile *CILEA 48* (Cla021949)'in *LEA* genlerinin ekspresyon seviyesi araştırılmıştır. Kavun ve karpuz tohumları hoagland solüsyonu ile belli bir olgunluğa erişince kadar yetiştirilmiştir. İki bitki türünde de yaprak ve köklerden kontrol grubu için örnekleme yapılmıştır. Kuraklık stresi oluşturmak için %10'luk PEG solüsyonu 3., 12. ve 24 saatte verilerek bir örnekleme yapılmıştır. Örneklerle daha sonra sırası ile RNA izolasyonu, DNaz ile muamele ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. *LEA* genlerinin PZR ile optimizasyonu yapıldıktan sonra *LEA* genlerinin Real Time PZR ile analizleri ile gen ekspresyonunun seviyeleri tespit edilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Kavun ve Karpuz Hakkında Genel Bilgiler

1.1.1. Kavun (*Cucumis melo*)

Kavun, 480 milyon baz çifti barındıran genoma ($2n = 24$) sahip olan kabakgiller familyasından tek yıllık bir bitki türüdür (Barbazuk vd, 2007; Dönmez vd., 2015). Kavun genomu 12 adet kromozom içermektedir. Gövdesi, tüylü ve sürünücü olan sarılcı kollara sahiptir (Saygılı, 2005). Kavunun gövdesi büyüme döneminde otsu, yuvarlak ve sert tüylere sahip bir yapıyken daha sonra kısmen odunlaşarak çok köşeli bir görünüm alır ve tüyleri azalır (MEB, 2011). Kavunda kök sistemi uygun koşullarda toprak yüzeyine yakın bir şekilde gelişim göstermektedir. Kökleri kazık ve saçak köklerin kombinasyonundan oluşmaktadır. Kazık kök, 90 cm'e kadar uzayabilirken, saçak kökler 45 cm'e kadar uzabilmektedir. Yaprakları yeşil veya koyu yeşil, oldukça iri, girintili ve çıkıntılı, yüzeyi de hafifçe tüylüdür. Kavunun çiçekleri erkek ve dişi çiçek veya erselik çiçek tipleri olmak üzere iki tiptir. Erkek çiçekler ana kollar üzerinde bulunurken, dişi veya erselik çiçekler ise yan kollar üzerinde yerleşmiştir (Özgür, 1995). Kavunun çiçekleri ve çekirdekleri sarı renkte olup meyveleri oldukça iri yapılıdır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Kavun bitkisinin şematik gösterimi (URL-3, 2002)

1.1.1.1. Kavunun tarihçesi

Kavun (*Cucumis melo* L.) diğer bitkilerle kıyaslandığında yeni kültür tarihine sahiptir. M.Ö. 3000 tarihinden daha önce bir tarihte bu türün kültüre alınmış olabileceği düşünülmektedir. Fakat M.Ö. 2400' lü yıllara ait eserler üzerinde kavuna benzer meyve figürlerine rastlanmıştır. Ayrıca Çin' de Ch'ian Shan Yang bölgesinde yapılan kazılarda tarihi tam netleşmese de bazı kavun tohumları görülmüştür. Bitkinin kökenine dair modern bilgiler 1882 yılında De Candolle ile başlamış olup, kavunun gen merkezinin batı Afrika ve Hindistan olduğunu ileri sürmüştür. Fakat kültürün her iki kıtada farklı zamanlarda başladığını belirtmiştir. 1897 yılında Hooker'e göre kavunun ilk gen merkezi Afrika, ikinci olarak gen merkezi ise İran, Hindistan, Rusya ve Çin' dir (Candan ve Kesercioğlu, 2012).

1.1.1.2. Kavunun sınıflandırılması

Kavun, Cucurbitales takımından Cucurbitaceae familyasına ait olan bir kültür bitkisidir (Tablo 1.1). Sistematikçiler, kavunun sınıflandırmasını yaparken farklı tasnifleme yolları izlemişlerdir. Bunlardan bazıları kavunun altı farklı varyete grubuna ayırmaktadır (Özgür, 1995).

Tablo 1.1. Kavun (*Cucumis melo*) sınıflandırılması (MEB, 2011)

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

1.1.1.3. Kavunun ekonomik önemi

Kavun, farklı iklimlerde yetişebilme kabiliyetinden dolayı dünyada geniş bir tarımsal üretim alanına sahiptir. Dünyada kavun üretimini yapan başlıca beş ülkenin üretim miktarı ve üretimdeki payı Tablo 1.2' de verilmiştir. Kavunun 2013 yılı FAO

verilene göre dünya genelinde toplam 29 462 541 ton üretimi yapılmaktadır. Bu üretimde Çin %48,6' lık payla en büyük üreticidir. Ülkemiz ise Çin'den sonra %5,8'lik payla ikinci sırada yer almaktadır. Özellikle FAO verilerine göre 2003 ile 2013 yılları arasında dünya kavun üretiminin ortalaması alındığında, Çin'den sonra ülkemiz ikinci sırayı korumaktadır.

Tablo 1.2. Dünya kavun üretiminde ilk 5 ülkenin 2013 yılı üretim rakamları ve dünya üretiminden aldıkları pay (FAOSTAT)

	Ülke	Üretim Miktarı (ton)	Üretimdeki payı (Yüzde)
1	Çin	14 336 814	% 48,6
2	Türkiye	1 699 550	%5,8
3	İran	1 501 411	%5,09
4	Mısır	1 020 679	%3,4
5	Hindistan	1 000 000	%3,39
	Toplam üretim hacmi	29 462 541	% 100

Ülkemizin yıllara göre kavun üretimimn ortalaması Tablo 1.3' te verilmiştir. Türkiye son beş yılda ortalama 793 382 dekar alanda 1 692 629 ton üretim yapmaktadır (URL-4, 2015). Ülkemizde yüksek üretim hacmi ile kavun stratejik ürünler arasında sayılabilir (Çelik ve Çelik, 2012). Dolayısıyla kavun üretimini arttırmaya yönelik tüm çalışmalar büyük önem teşkil etmektedir.

Tablo 1.3. Ülkemizde yıllara göre kavun üretimi ve ekilen alan. (URL-1,2016; URL-4, 2015)

Yıllar	Üretim (Ton)	Ekilen Alan (Dekar)
2004	1 750 000	926 350
2005	1 825 000	925 430
2006	1 765 605	887 144
2007	1 661 130	849 185
2008	1 749 935	854 895
2009	1 679 191	826 373
2010	1 611 695	795 713
2011	1 647 988	800 794
2012	1 688 687	796 417
2013	1 699 550	787 687
2014	1 707 302	791 488

1.1.1.4. Kavunun yetiştiği iklimsel koşullar ve toprak isteği

Kavun ılık ve sıcak iklimler de yetişmektedir. Uzun bir gelişme süresi bulunmaktadır. Bu süre zarfında güneşli, sıcak ve kuru bir hava ile yeterli toprak nemi olan yerlerde verimli bir gelişim göstermektedir (Saygılı, 2005). Nemli yerlerde yetiştiklerinde ise mantar hastalıklarından etkilenerek meyve kalitesinde düşüşler yaşanır (URL-5, 2007).

Kavunun toprak isteği derin, geçirgen, humus ve besin maddelerince oldukça zengin, kumlu-tınlı veya tınlı-kumlu topraklardır. Ülkemizde nehir kenarlarındaki topraklarda, rutubetçe zengin veya gelişme dönemlerinde düzenli sulama yapılan yerlerde daha verimli mahsuller alınabilmektedir. Toprağın asitliği yüksek olan yerlerde kavun iyi bir gelişme gösteremez. Kavun yetiştirmek için en elverişli toprağın pH'ı 6,0- 6,7 arasında olması gerekir (MEB, 2011).

Kavun tohumunun çimlenebilmesi için toprak sıcaklık isteği minimum 15,5 °C, optimum 24–35°C, maksimum 38°C'dır. Kavun tohumları 8 ila 10 günde çimlenerek kök salmaya başlar. Hipokotil uzamaya devam eder ve toprak yüzeyine tohum kabuğu ile ilerler. Çoğunlukla tohum kabuğu toprakta kalır. Kotiledon yaprakların olgunlaşması toprak yüzeyine çıkmalarından itibaren 5 ila 7 gün sonrasındadır. Sürgün ucu belirginleşmeye başladığında köklerin gelişimi hızlanarak 2 veya 4 köklü bir görünüm oluşur. İlk yaprak gelişiminden sonra 15–20 gün içinde 4–5 yapraklı bir yapı kazanır (URL-5, 2007).

1.1.2. Karpuz (*Citrullus lanatus*)

Karpuz, 424 milyon baz çifti genom büyüklüğüne sahip olan, 11 kromozomlu, dikotil, tek yıllık bir bitki türüdür (Güner ve Wehner, 2004). Yaprakları yer yer kısa veya uzun bir sapla gövdeye bağlanan oymalı, loplu bir görünümündedir. Genellikle yaprak beş parçadan oluşmaktadır. Yaprakları diğer kabakgiller üyelerine göre daha tüysüz bir yapıdadır (URL-6, 2009). Sürünücü gövdesi ile toprak yüzeyinde yayılarak büyümektedir. Karpuzlarda biyolojik açıdan sapsız daha uzun erkek çiçekler çoğunlukta, dişçi çiçekler erkek çiçeklere nazaran biraz daha büyük, sapsız daha kısa, kalın ve yüzeyleri hafifçe tüylüdür. Az miktarda erselik çiçek

durumlarına rastlanır. Tohum renkleri ve boyutu türlere göre farklılık göstermektedir (MEB, 2008).

1.1.1.1. Karpuzun tarihçesi

Karpuz yetiştiriciliği, Orta Doğu ve Afrika’da oldukça uzun bir geçmişe sahiptir. 10.yüzyılda karpuzun Çin ve Rusya’da yetiştirilmeye başlandığı düşünülmektedir. Karpuz 16. yüzyıldan itibaren İspanyollar, Avrupa’lı göçmenler ve Afrika’lı köleler sayesinde yeni dünya ile tanışmıştır (Robinson ve Decker- Walters 1997; Sarı vd., 2007).

1.1.1.2. Karpuzun sınıflandırılması

Cucurbitales takımından Cucurbitaceae familyasına ait *Citrullus* cinsine ait bir türdür (Tablo 1.4). Afrika, Asya ve Akdeniz’in sıcak bölgelerinde yetişen *Citrullus* cinsi 4 diploid (n=11) türü içerisinde barındırmaktadır (Jeffrey, 1975; Whitaker ve Davis, 1962; Robinson ve Decker- Walters 1997; Sarı vd., 2007). Bunlar; *Citrullus lanatus*, *Citrullus colocynthis*, *Citrullus eccirrhous*, *Citrullus rehmi* (Sarı vd., 2007).

Tablo 1.4. Karpuz (*Citrullus lanatus*) sınıflandırılması (URL-7, 2016)

Domain	Eukarya (Ökaryotlar)
Alem	Plantae
Altalem	Tracheobionta
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	Cucurbitales
Familya	Cucurbitaceae (Kabakgiller)
Cins	<i>Citrullus</i>
Tür	<i>Citrullus lanatus</i>

1.1.1.3. Karpuzun ekonomik önemi

FAO verilerine göre dünyada yaş sebze üretiminde en çok üretimi yapılan ikinci sebze karpuzdur. Dünyada karpuz üretimini yapan başlıca beş ülkenin üretim miktarı ve üretimdeki payı Tablo 1.5’ te verilmiştir. 2013 yılında ortalama karpuz üretiminde Çin 72 943 838 tonla birinci, İran 3 947 057 tonla ikinci, Türkiye ise 3 887 324 tonla

üçüncü sırada yer almaktadır. Karpuz üretiminde 2003 ile 2013 yılları arasındaki üretimin ortalaması alındığında, 3 903 506 tonla ülkemiz ikinci sırada yer almaktadır. Fakat ülkemizin 2013 yılında karpuz üretimi ortalamasının üstünde olmasına rağmen, dünya karpuz üretiminde üçüncü sıraya gerilemiştir.

Tablo 1.5. *Dünya karpuz üretiminde ilk 5 ülkenin 2013 yılı üretim rakamları ve dünya üretiminden aldıkları pay (FAOSTAT)*

	Ülkeler	Üretim miktarı (ton)	Üretimdeki payı (yüzde)
1	Çin	72 943 838	%66,7
2	İran	3 947 057	%3,6
3	Türkiye	3 887 324	%3,6
4	Brezilya	2 163 501	%1,9
5	Mısır	1 894 738	%1,7
	Toplam üretim hacmi	109 278 714	100

Ülkemizin yıllara göre karpuz üretimi Tablo 1.6’ da verilmiştir. Ülkemizde son beş yılda 965 302 dekar alanda ekimi yapıp 3 915 657 ton karpuz üretimi yapılmıştır (URL-4, 2015).

Tablo 1.6. *Ülkemizde yıllara göre karpuz üretimi (FAOSTAT; URL-4, 2015)*

Yıllar	Üretim miktarı (Ton)	Ekilen Alan (Dekar)
2004	3 825 000	1 170 740
2005	3 970 000	1 165 460
2006	3 805 306	1 090 219
2007	3 796 680	1 082 076
2008	4 002 285	1 096 112
2009	3 810 205	997 205
2010	3 683 103	956 598
2011	3 864 489	979 644
2012	4 022 296	977 322
2013	3 887 324	979 458
2014	3 885 617	954 627

1.1.1.4. Karpuzun yetiştiği iklimsel koşullar ve toprak isteği

Karpuz bitkisinin en iyi yetişebildiği topraklar iyi havalanabilen, derin, su tutma kapasitesi fazla olan, kumlu, kumlu-tınlı özelliklerdedir. Karpuz, çoğu kültür

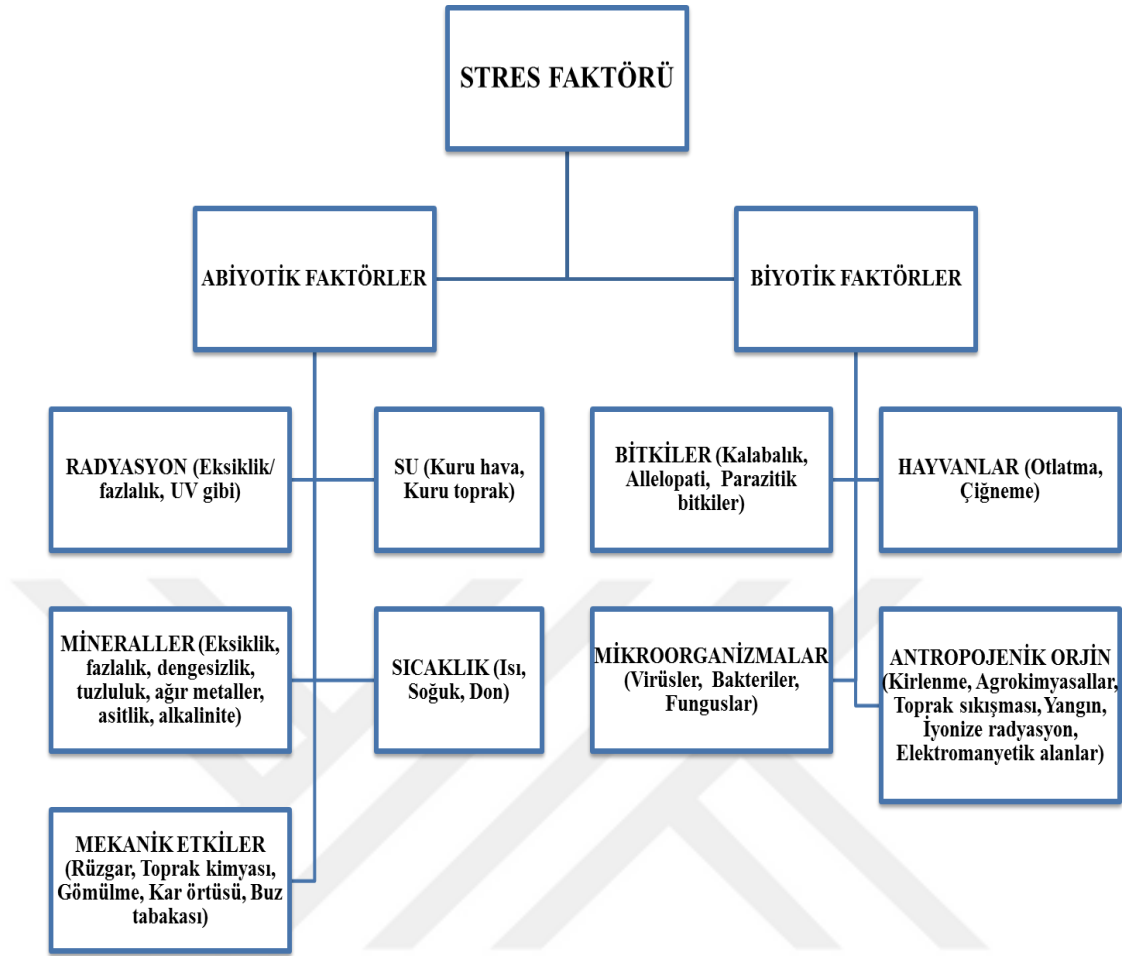
bitkisinin tersine, toprak asitliğine karşı dayanıklılık göstermesinden dolayı hafif asitli topraklarda da yetiştirilebilmektedir. Yetiştigi en elverişli toprak pH' sı 5,0-6,5 olmasına rağmen pH 5,0 olan topraklarda iyi sonuçlar alınabilmektedir (MEB, 2008).

Ilık iklim bitkisi olan karpuz soğuklardan oldukça etkilenmektedir. Bu nedenle ilkbahar ve sonbahar ayları arasındaki koşullarda yetiştirilebilir. Tohum ekiminde toprak sıcaklığının minimum 12°C ve bunun üzerinde olması gerekir. Sıcak ve nemli ortamlarda çeşitli zararlı ve hastalıklardan çabucak etkilenmektedir (MEB, 2008).

1.2. Bitkilerde Stres Kavramı

Organizmaların optimum şartların dışında elverişli olmayan herhangi bir çevre faktörüne stres, elverişsiz bir çevre faktörüne karşı bitkinin hayatta kalabilme yeteneğine ise stres direnci adı verilmektedir (Levitt, 1980; Çırak ve Esendal, 2003). Canlılar âlemine göre bitkiler aktif hareket edememeleri ve bağımlı olarak yaşadıkları çevre koşullarındaki değişikliklerden olumsuz etkilenmelerinden dolayı diğer organizmalara göre çok daha fazla etkilenmektedirler. Yaşam döngüleri boyunca gerçekleşebilecek olan kuraklık, tuzluluk, aşırı yağış, sıcaklık veya soğuk gibi iklimsel faktörlere bağlı abiyotik stres koşulları altında bitkinin büyümesi ve gelişmesini doğrudan etkilemektedir (Taiz ve Zeiger, 2010; Öztürk, 2015).

Stres faktörleri iki farklı şekilde sınıflandırılabilirler (Şekil 1.2); biyotik ve abiyotik stres faktörleri. Biyotik stres faktörleri, mikroorganizmaların enfeksiyonu ve zararlı hayvanların saldırıları sonucunda bitkinin strese girmesine neden olurlar. Abiyotik stres faktörleri ise su, sıcaklık, radyasyon, kimyasallar, manyetik ve elektriksel alanlar gibi çevresel faktörlerdir (Lichtenhaler, 1996; Büyük vd., 2012).



Şekil 1.2. Bitkilerde stres faktörleri (Larcher, 1995; Büyük, 2014)

Bitkiler, çevresel koşullardaki bu gibi değişikliklerden en az zarar görecektir şekilde büyüme ve gelişme mekanizmalarında değişikliklere gidebilirler. Hatta uzun zaman boyunca aynı şartlarda yetiştiklerinde çevresel faktörlerden en az etkilenecek şekilde uyum sağlayabilirler (Dolfeus 2014; Öztürk, 2015).

1.2.1. Kuraklık stresi

Kuraklık, tarımsal üretimin kısıtlanmasında en çok öne çıkan abiyotik stres faktörlerinden biridir. Dünya üzerinde kullanılabilir tarım alanları stres etkenlerine göre bir sıralama (Tablo 1.7) yapıldığında kuraklık stresi % 26'lık bir değerle en büyük paya sahiptir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005; Kuşvuran vd., 2011).

Tablo 1.7. *Dünyada kullanılabilen alanların farklı stres faktörlerinden etkilenme oranları (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005; Kuşvuran vd., 2011)*

Stres faktörleri	Etkilenme oranları
Kuraklık stresi	%26
Mineral madde stresi	%20
Soğuk ve don	%15
Diğer stres faktörleri	%29
%10'nun stres altında olmadığı varsayılmaktadır.	

Bitkilerde kuraklık stresi genel olarak su noksanlığı ve kuruma olarak ikiye ayrılabilir (Smirnoff, 1993; Örs ve Ekinci, 2015). Su noksanlığı, stomaların kapanması ve gaz değişimine sınırlamalar getiren orta düzeydeki su kaybı olarak tanımlanabilir. Bitkinin su kapsamının yaklaşık % 70'de kaldığı hafif su noksanlığında stomaların kapanmasına bağlı olarak karbondioksit alımı kısıtlanmaktadır. Kuruma ise hücre yapısının ve metabolizmanın tamamen bozulması ve enzimle katalizlenen reaksiyonlar sekteye uğrayarak aşırı miktarda su kaybı yaşanması ile ortaya çıkan bir durumdur (Smirnoff, 1993; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005; Örs ve Ekinci, 2015). Kurumaya duyarlı vasküler bitkilerin çoğu vejetatif dokusu, % 30'un altındaki oransal su kapsamına ulaştıktan sonra iyileşme sürecine girememektedirler (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005; Örs ve Ekinci, 2015).

Bitkilerde kuraklık stresinin etkileri sınıflandırıldığında mekanik, metabolik ve oksidatif etkiler olarak üç grupta incelenebilir:

Mekanik Etki: Bitki hücrelerinden belirgin bir su kaybı gerçekleştiğinde bitkide oluşan turgor basıncının kaybıyla, membran yapısı değişikliğe uğramaktadır (Eriş, 1990; Kutlu, 2010). Değişiklik sonrasında oluşan bu yeni yapıda membran lipitleri sıvı-katı fazdakine göre daha az kinetik enerji ile lateral ve rotasyonel hareket göstermektedir. Su kaybı nedeniyle de hücrede hacim azalarak plazma membranı hücre duvarından ayrılır. Böylece yalnız plazmodezmler aracılığıyla ilişkisini sürdürerek plazmoliz olayı gerçekleşir. Gerilim altındaki plazma membranında

yırtılmalar meydana gelebileceği gibi normal hücre metabolizmasını da kalıcı olarak bozabilmektedir (McKersie ve Leshem, 1994; Kutlu, 2010).

Metabolik Etki: Su, hücre ortamında taşıma, çözme, kimyasal reaksiyonlara katılma gibi çoğu fonksiyonel olayda görev yapmaktadır. Hücrede su kaybıyla meydana gelen iyon birikimi, membran bütünlüğünü denatürasyon ve enzim inhibisyonu gibi iç dengeyi bozacak olaylar hücredeki mevcut proteinlerin yapısını bozarak metabolik etkiyi başlatmaktadır. Bununla birlikte hücrede DNA, RNA degradasyonu da gözlenebilmektedir (Kutlu, 2010; Ebrahime, 2013).

Oksidatif Etki: Su miktarının azaldığı dönemlerde vejetatif bitki dokularında oksidatif stresin oluşmasının sebebi, kloroplastta gerçekleşen ışık-klorofil etkileşimleri olduğu varsayılmaktadır. Bitki suyun kısıtlı olduğu durumlarda daha fazla su kaybetmemek için, genelde, stomalarını kapatır, bu da fotosentezle fiksasyon için gerekli CO₂'nin alımının kısıtlanmasına neden olur (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Birçok türde, kuraklık koşullarına karşı artan O₂ oluşum hızı; lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doymunluğuna ve sonuçta membranların tamamına zarar verir (Kutlu, 2010).

1.2.1.1. Kuraklık stresi ile bağlantılı genler

Bitkilerde kuraklık stresi altındayken gen ifadesi değişen birçok gen ve gen ailesi bulunmaktadır. Bu genler strese karşı değişen gen ifadesinin erken veya geç olmasına göre ayırt edilebilirler. Erken yanıt veren ve geç yanıt veren genler olarak iki grupta bir sınıflandırma yapılabilir (Sairam, 2004; Ebrahime, 2013).

Erken yanıt veren genler, dakikalar içerisinde strese yanıt oluşturarak geçici bir süre indüklenebilirler. Böyle bir durumda ortamda sinyal bileşenleri olduğu için bu genlerin indüklenmesinde yeni bir protein sentezine de gerek duyulmamaktadır. Bu genler geç yanıt veren genlerin aktivasyonunu sağlayarak transkripsiyon faktörlerinin de sentezine sebep olurlar (Sairam, 2004; Ebrahime, 2013).

Geç yanıt veren genler ise kuraklık stresi altında ifadeleri artan genlerin çoğunu içerisine almaktadır. Geç yanıt oluşturan genlerin indüklenmesi yavaş ve sürekli bir

şekilde gerçekleşmektedir. Bu genlerin proteinleri arasında LEA proteinleri de yer almaktadırlar (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Sairam, 2004; Ebrahime, 2013).

Geç yanıt veren genler arasında yer alan *LEA* gen ailesinin stres koşulları altındayken ifade ettiği hidrofilik LEA proteinlerinin suyu bağlama kapasitesi bulunmaktadır. Bu nedenden dolayı su noksanlığı durumunda bitkide oluşabilecek olumsuz etkileri azalttığı ve hücrel bütünlüğün korunmasında da etkin bir rolünün olduğu düşünülmektedir (Sairam ve Tyagi 2004).

1.3. LEA Proteinleri (Geç Embriyogenez Proteinleri)

Embriyogenezin geç aşamasında bol miktarda bulundukları için Geç Embriyogenez Proteinleri (Late Embryogenesis Abundant) olarak bir adlandırma yapılmıştır. Bu proteinler ilk olarak buğday (*Triticum aestivum*) ve pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) embriyolarında tanımlanmışlardır (Dure vd., 1981; Galau vd., 1986).

Yüksek yapılı bitkilerde LEA proteinleri, tohum gelişiminin geç dönemi sırasında dehidrasyon ile birlikte oluşan, 10 kDa-30 kDa arasında değişen küçük moleküllerdir. (He, 1996; Hong-Bo vd., 2005). Bitkilerde kuruma meydana gelmesi halinde, tohum gelişiminin son aşamasındayken yüksek konsantrasyonda LEA proteinlerinin çoğunun mRNA'sı embriyo dokularında depolanmaktadır (Bartel vd., 1988; Ingram ve Bartels, 1996; Hong-Bo vd., 2005; Hand vd., 2011, Amara vd., 2014). Embriyo, bitkinin gelişimi sırasında bir dizi aşamadan geçerken yeşerme süresi için gerekli enerjiyi hücrel genişleme aşamasında kuru kütle artışı ile sağlamaktadır. Yani tohumun su içeriğinde bir azalmaya gidilir. Bitkilerin çoğunda bu azalma tohum gelişiminin son aşamasında ve olgunlaşma aşamasında yaklaşık olarak %10'na kadar varmaktadır. Bu aşamada tohumun tüm metabolizmasında gen ifadesi ve protein profilleri önemli ölçüde değişebilmektedir. LEA proteinleri, tohumda depolanan diğer proteinlerin aksine sonradan birikmeye başlamaktadır. Öyle ki, son embriyogenez aşamasında depolanan proteinlerin genleri tamamen degrades olmuşken, LEA proteinlerinin mRNA'ları dehidre olmuş olgun embriyolarda yüksek miktarda bulunmaktadır (Goldberg vd., 1989; Skriver ve Mundy, 1990; Hong-Bo vd., 2005; Amara vd., 2014). LEA proteinleri, bitkide kök

ve diğerk organlarda da bulunmaktadır. Hücrede ise genel olarak sitoplazma ve çekirdekte bulunmaktadır (He, 1996; Hong-Bo vd., 2005).

1.3.1. LEA proteinlerinin yapısı

LEA proteinleri, bir çok hücre tipinde ve değışen konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Pedrosa vd., 2015). Yapılan araştırmalar sonucunda LEA proteinlerinin transmembran proteinler olmadığı, sitoplazmadaki çekirdek, mitokondri ve kloroplast gibi subsellüler alanlarda ifade buldukları belirlenmiştir (Chen et al., 2002; Dilek, 2013).

LEA proteinlerinin ortak özelliğı, yüksek hidrofiliteye (Wise and Tunnacliffe, 2004) sahip küçük moleküller olmalarıdır. Bir diğerk ortak özellikleri ise; çözeltideki ısı stabilitesi ile sonuçlanan bir aminoasit kompozisyonunun olmasıdır. Araştırıcılar, LEA proteinlerini hidrofilinler olarak da sınıflandırabilmektedirler. LEA proteinlerinin çoğı hidrofilik yapıdadır. Glisin, alanin, glutamik asit ve treonin aminoasitleri bakımından zengindirler. Fakat triptofan ve sistein amioasitlerinden yoksundurlar (Dure, 1997; Dilek, 2013). Bu biyokimyasal özelliklerin LEA proteinlerinin ısı ve asit dayanma kapasitelerinde payı bulunmaktadır (Oliveira vd., 2007; Du vd., 2013). LEA proteinleri sulu çözeltilerde doğıal olarak düzensiz ve yapılandırılmamış olmasına rağmen, bazı üyeleri kuraklık sırasında üç boyutlu yapı kazanabilirler (Goyal vd., 2003; Du vd., 2013). Yüksek osmotik koşullara karşı oluşan yanıtta LEA proteinleri, evrimsel olarak korunmuş geniş bir hidrofilik protein grubunun üyeleridirler. LEA proteinleri ailesinde hidrofobik özellik gösteren proteinler de yer almaktadır. Bu gruplandırmanın fonksiyonel önemi açıklığı kavuşmadığı gibi bu proteinlerin varlığı otuz yıldır bilinmesine rağmen tanımlanmış fonksiyonları hakkındaki bilgi oldukça sınırlıdır (Dilek, 2013).

1.3.2. LEA proteinlerinin sınıflandırılması

'LEA Proteins DataBase' veri tabanına göre şimdiye kadar 1493 adet LEA proteini tanımlanmıştır (URL-8, 2015). Araştırmacılar tarafından LEA proteinleri, farklı parametrelere göre farklı sınıflandırmalara tabii tutulmuştur. Yeni keşfedilen LEA proteinleriyle ilgili bilgilerin artması, bu proteinlerin gen ifade profillerindeki

farklılıklar ve özellikle de biyoinformatik araçlarla diğer organizmalarda belirlenmesi nedeniyle sınıflandırmada birçok düzenlemeye gidilse de ortak bir sınıflandırma yapılamamıştır (Tunnacliffe vd., 2005; Bies-Etheve vd., 2008; Battaglia vd., 2008; Battaglia vd., 2013; Amara vd., 2014). LEA proteinleri veri tabanına (URL-8, 2007) göre yıllara göre araştırmacıların yapmış olduğu sınıflandırmalar ile PFAM (URL-9, 2014) da yapılmış olan sınıflandırmalar arasındaki farklılıklar Tablo 1.8’de verilmiştir (Hunault ve Jaspard, 2010; Amara vd., 2014).

Tablo 1.8. *LEA* genlerinin sınıflandırılması (URL-7, 2015)

PFAM	1989	1993	2007	2008	2008	2008	2010
	Dure vd.	Bray	Tunnacliffe and Wise	Battaglia vd.	Bies-Etheve vd.	Hundertmark ve Hinch	LEAP dp
PF00257	D11	Grup 2	Grup 2	Grup 2	Grup 2	Dehidrin	Sınıf 1-4
PF00477	D19, D132	Grup 1	Grup 1	Grup 1	Grup 1	LEA-5	Sınıf 5
PF02987	D7	Grup 3	Grup 3	Grup 3A	Grup 6	LEA-4	Sınıf 6
	D29	Grup 5	-	Grup 3B	-		
PF03168	D95	-	-	Grup 5C	Grup 7	LEA-2	Sınıf 7 ve 8
PF03242	D73	-	LEA5	Grup 5B	Grup 6	LEA-3	Sınıf 9
PF03760	-	Grup 4	Grup 4	Grup 4A	Grup 4	LEA-1	Sınıf 10
	D113			Grup 4B			
PF04927	D34	Grup 6	Grup 6	Grup 5A	Grup 5	SMP	Sınıf 11
PF10714	-	-	-	Grup 6	Grup 8	PvLEA18	Sınıf 12
				Grup 7			

Günümüzde LEA proteinlerinin iki ölçüte göre sınıflandırılması yapılmaktadır. İlk ölçüt, aminoasit dizisi ve korunmuş motiflere dayanarak proteinleri 6 altsınıfa ayırmaktadır. Bu değerlendirme yöntemine klasik değerlendime adı verilmektedir

(Dure vd., 1989; Bray 1993; Cuming 1999; Bies-Etheve vd. 2008; Büyük, 2014). Bunlar; LEA-1, LEA-2, LEA-3, LEA-4, LEA-5, Atipik LEA proteinleri olarak sınıflandırılmıştı. Diğer değerlendirme yönteminde ise peptit kompozisyonlarına bağlı olarak proteinleri sınıflandıran bir bilgisayar analizine (Protein or Oligonucleotide Probability Profile, POPP), dayandığı için POPP sınıflandırması adı verilmektedir. Bu sınıflandırmada LEA proteinleri Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 olmak üzere 4 gruba ayrılır (Wise 2002, 2003).

1.3.3. LEA proteinlerinin fonksiyonları

LEA gen ekspresyonu dehidrasyon, soğuk, tuz veya absisik asit ve etilen gibi bitkide strese neden olacak etmenlere maruz kalan dokularda gözlemlenmiştir (Skriver ve Mundy 1990; Close 1997; Zegzouti vd., 1997; Steponkus vd., 1998; Grelet vd., 2005; Lang vd., 2013). *LEA* genlerinin aşırı ekspresyonunun aydınlatılmasında transgenik bitki ve mayalarda stres tolerasına karşılık gelen proteinler kullanılmıştır. LEA proteinlerini kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu transgenik bitkilerde stres toleransını arttırabilmektedir (Dilek, 2013). Buğdayda *LEA* geninin (*WCOR410*) aşırı ekspresyonu, transgenik çilek yaprağında donma toleransını geliştirmiştir (Houde vd., 2004; Lang vd., 2013). Çeltik ve buğdayda bir arpa geni olan *HVA1* geninin aşırı ekspresyonu transgenik bitkilerde kuraklık ve tuz toleransını artırırken, Arabidopsiste (Puhakainen vd., 2004; Lang vd., 2013) birden fazla *LEA* geninin aşırı ekspresyonu, donma toleransını arttırmıştır (Xu vd., 1996; Sivamani vd., 2000; Lang vd., 2013). LEA proteinini kodlayan çam geninin (*CuCOR19*) ekspresyonuyla transgenik tütünün soğuk toleransı artmıştır (NDong vd., 2003; Dilek, 2013).

LEA proteinlerinin enzim aktivitelerinde koruyucu rol oynadığı belirlenmiştir. LEA proteinleri üzerine yapılan in vitro deneylerde su eksikliğinde laktat dehidrogenaz veya malat dehidrogenaz enzimlerinin inaktivasyonunda görev aldığı kabul edilmiş olup, (Goyal vd., 2005; Reyes vd., 2008; Cao ve Li, 2015) benzer şekilde katalaz (Hara vd., 2001), sitrat sentetaz (Goyal vd., 2005) ve mitokondriyal enzimlerden olan fumaraz ve rhodanaz (Grelet vd., 2005) enzimlerini koruyucu nitelik taşımakta olduğu saptanmıştır (Cao ve Li, 2015). Bazı LEA proteinlerinin membran stabilizasyonunu sağlamada işlev gördüğü, kuraklık halinde ve dondurucu soğuklarda anyonik fosfolipid veziküllerle membranı stabilize ettiği bulunmuştur (Kosova' vd.,

2007; Tolleter vd., 2010; Cao ve Li, 2015). DNA ve RNA'ya bağlanma, sıkı bir hidrojen ağı (Shih vd., 2004; Wolkers vd., 2001) oluşturularak hücrel yapıları stabilize etme ve kuraklık sırasında serbest radikalleri yok edici olarak görev almaktadır (Hara vd., 2003; Li ve Cao, 2015).

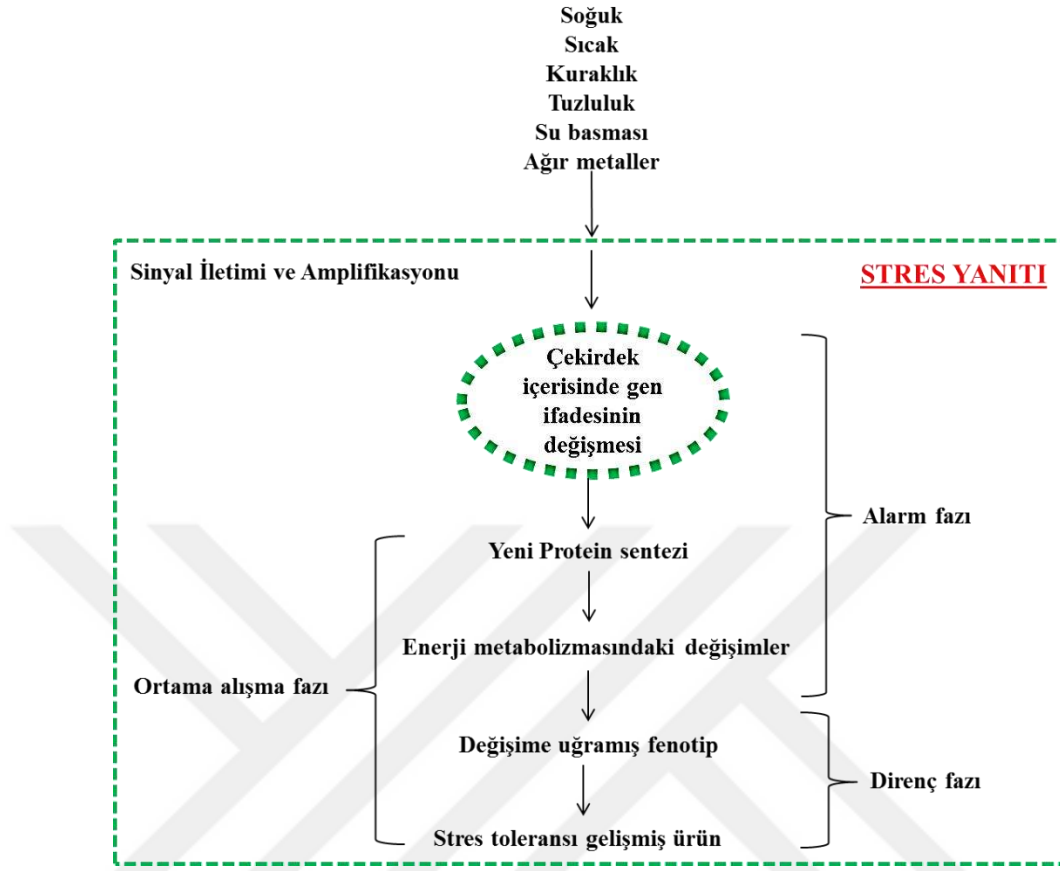
LEA proteinlerinin varlığı, kuraklığın yanında tuzluluk ya da dondurucu koşullarla indüklenabilen dehidrasyona karşı oluşan toleransla da ilişkilendirilmektedir. Sakkaroz ve treholaz gibi disakkaritlerin hücrel kurumaya karşı oluşan toleransta önemli görevler aldığı bilinmesine rağmen anhidrobiyozun oluşabilmesi için hücrenin de şekerler dışında başka ek maddelere ihtiyacı vardır (Dilek, 2013). LEA proteinlerinin görevi şekerlerle beraber membranı korumak ve iyonlar ile kompleks oluşturmak olduğu düşünülmektedir. Şekerlerin varlığının, dehidrasyon altında LEA proteinlerinin koruyucu etkisini arttırdığı da öne sürülmüştür (Wolkers vd., 2001; Liu vd., 2010; Cao ve Li, 2015). Buna ek olarak yapılan son araştırmalarda bazı LEA proteinlerinin antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları ortaya çıkmıştır (Liu vd., 2013; Cao ve Li, 2015).

LEA proteinlerinin fonksiyonu hakkında birçok mekanizma önerilmesine rağmen kesin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (Du vd., 2013).

1.4. Bitkilerde Stres Koşullarında Gen İfadesinin Düzenlenmesi

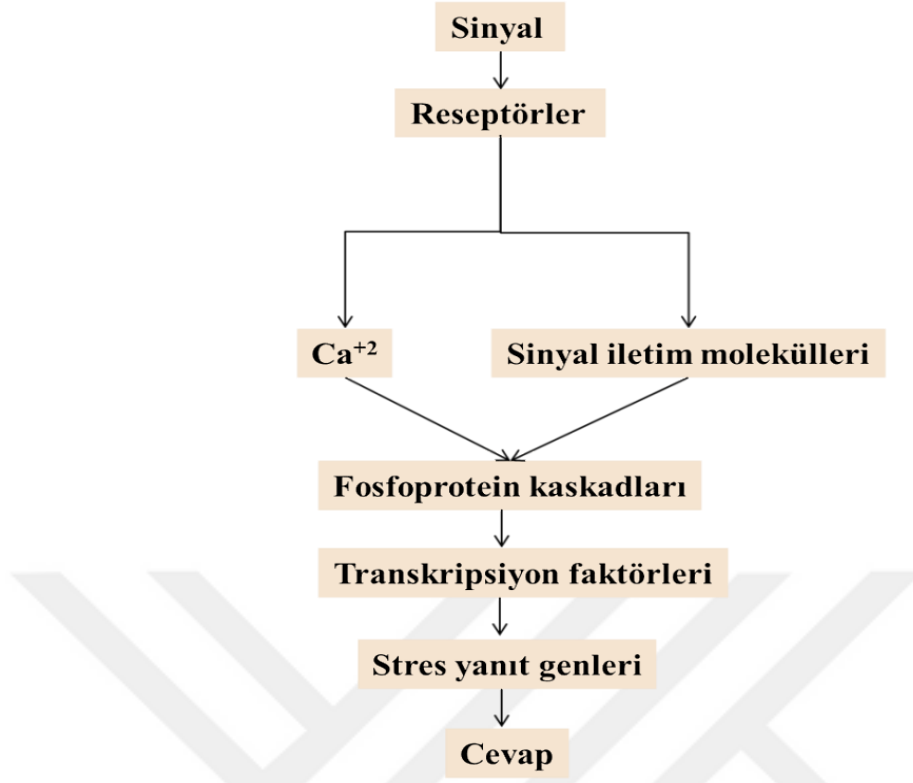
Bitkiler, diğer organizmalarda olduğu gibi iç dengelerini koruma eğilimi göstermektedirler. Değişmiş çevresel koşullar altında bitki, strese karşı yeniden bir homeostazis kurmayı amaçlayarak aktif bir süreç başlatır. Bitkiler değişen şartları algılayarak zarar görmeyi önleyecek şekilde bir yanıt oluştururlar. Bitkide stres cevabının ilk aşaması bir alarm aşamasıdır (Şekil 1.3) ve genellikle kısa sürerek saatler alabilir. Ardından alışma fazı günler, direnç fazı ise haftalar sürerek strese olan direncini artırabilir (Kosova vd, 2015). Bu karmaşık mekanizmanın genlerin ifadesinde çeşitlilik bulması, farklı stres faktörleri tarafından indüklenmesinden kaynaklanmaktadır (Duque vd., 2013).

ÇEVRESEL STRES SİNYALLERİ



Şekil 1.3. Bitki stres algısı dinamiklerinin ve hücresel düzeyde stres tepkisinin şematik gösterimi (Kosova vd, 2015)

Strese maruz kalan bir bitkide sinyal iletimi sinyalin algılanması ile başlar. Bunu sekonder mesajcıların (Örneğin; inozitol fosfatazlar ve reaktif oksijen türleri) oluşturulması izler. Sonrasında çoğunlukla strese karşı düzenlenen genlerin spesifik gruplarını kontrol eden transkripsiyon faktörleri veya hücre savunmasıyla doğrudan ilgili proteinleri hedefleyen protein fosforilasyon kaskatı devreye girer (Şekil 1.4). Bahsi geçen bu genlerin ürünleri bitki hormonlarına benzerlik gösteren düzenleyici moleküller oluşturur. Sekonder sinyal molekülleri reseptör yönetimli Ca^{+2} salınmasını sağlar. Sinyal iletim parçaları ana yol tarafından düzenlenebilir. Sinyal iletiminin erken basamaklarında, Ca^{+2} sekonder sinyal iletim moleküllerini hücre içerisinde dolaştırır (Keskin, 2012).



Şekil 1.4. Bitkiler stres yanıtının iletim yolları (Keskin, 2012)

Çevresel stresle indüklenebilen genler, esas olarak protein ürünleri açısından iki ana gruba ayrılmaktadır. Birinci grup genler; LEA proteinler, AFPs proteinler, ozmotik düzenleyici proteinler, betain sentezleyen enzimler, pirolin ve diğer osmoregülatör gibi doğrudan çevresel strese karşı hücreyi koruma amaçlı ürün oluştururlar. İkinci grup genler ise örneğin transkripsiyon elemanları olarak, gen ekspresyonu ve sinyal transdükyonunu düzenlemekte rol alanlardır (Ciarmiello vd., 2011).

Abiyotik stres koşulları altında bitkide transkriptom seviyesinde yanıtın oluşmasında yeniden düzenlenme, mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAP kinaz) yolağı ile başlamaktadır. MAP kinazlar, hücre dışı sinyallerin hücre genomuna iletilmesinde önemli rol oynayan oldukça korunmuş bir enzim ailesidir. MAP kinaz yolağı aracılığıyla genoma aktarılan bilgi çok sayıda farklı transkripsiyon faktörleriyle metabolizmanın yeniden düzenlenmesinde görevlidir (Bhargava ve Sawant, 2013; Dolferus, 2014; Öztürk, 2015).

Abiyotik ve biyotik stres koşullarında gen anlatımının yeniden yapılanmasında rol oynayan bir diğer etkende miRNA'lardır. Besin eksikliği (Fujii vd., 2005), kuraklık

(Liu vd., 2008; Zhou vd., 2010), soğuk (Zhou vd., 2008), tuzluluk (Liu vd., 2008; Sunkar, vd., 2008), bakteriyel enfeksiyon (Navarro vd., 2006), UV-B radyasyonu (Zhou vd., 2007) ve mekanik stres (Lu vd., 2005) gibi farklı stres koşulları altında birçok bitkide tanımlanmıştır (Khraiwesh vd., 2012). miRNAi mekanizması ilk kez Park vd. (2002) tarafından Arabidopsis'te üzerine yapılan araştırmalarda ortaya çıkmıştır. Bu genlerin işlevinin belirlenmesi için *HEN1-1* ve *CAF-1* mutant Arabidopsis ile mutasyon içermeyen Arabidopsis bitkisinden miRNA izole edilmiştir. Ayrıca tütün, çeltik ve mısır bitkilerinden de homolog olduğu varsayılan genlerin izolasyonu yapılmıştır. Araştırma sonucunda miRNA oluşumunun gelişim tarafından kontrol edildiği ve HEN1-1 and CAF-1 mutant bitkilerde yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir (Park vd., 2002; Aras vd., 2015).

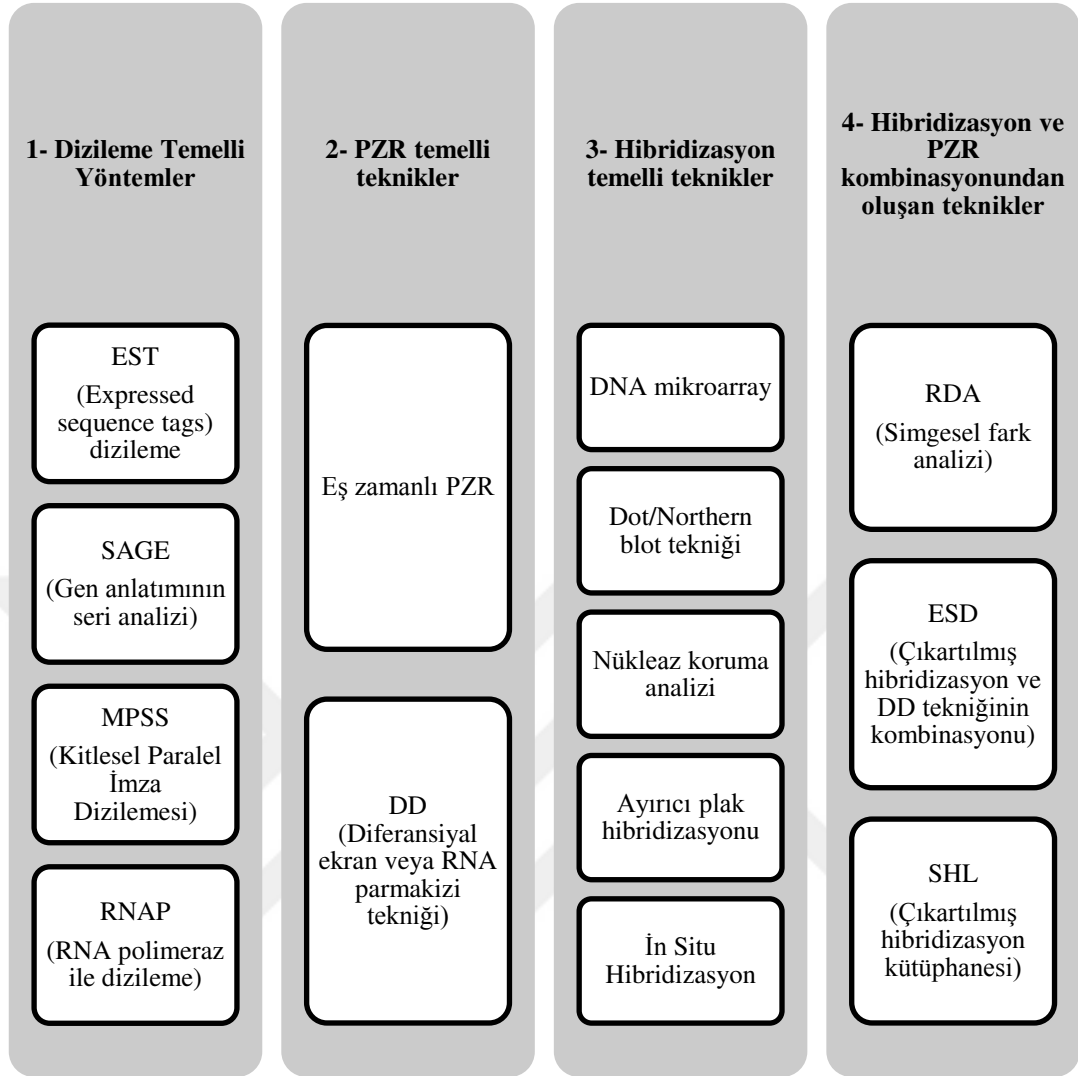
Çevresel stres koşulları, bitkilerde miRNA'ların ifadesinin azalması, artması veya yeni miRNA'ların sentezlenmesine neden olabilir (Khraiwesh vd., 2012). miRNA'lar, kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde gen anlatımının yeniden yapılanmasında rol oynarlar (Öztürk, 2015). Kuraklık stresi altında Arabidopsis, çeltik ve kavakta miRNA profillemesi yapılmıştır. Arabidopsiste yapılan çalışmalarda miR396, miR168, miR167, miR165, miR319, miR159, miR394, miR156, miR393, miR171, miR158 ve miR169 kuraklığa duyarlılık gösterirken dehidrasyondan sorumlu olan miR393, miR319 ve miR397 regülasyonu artmaktadır (Sunkar ve Zhu, 2004; Liu vd., 2008; Khraiwesh vd., 2012). Çeltikte ise miR393 geçici kuraklıkta indüklenirken, miR169g şiddetli kuraklıkta regülasyonu artmıştır (Zhao vd., 2007; Khraiwesh vd., 2012). Kavakta da miR1711-N, miR1445, miR1446a-e ve miR1447 gibi kuraklığa yanıt oluşturan miRNA'lar tespit edilmiştir (Lu vd., 2008; Khraiwesh vd., 2012). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalardaörneğin fasulye, *Medicago truncatula*, buğday, mısır gibi birçok bitkide keşfedilen miRNA'lar kuraklık stresi ile ilişkilendirilmiştir. Korunmuş miRNA'ların çoğu, transkripsiyon faktörlerinin çeşitli ailelerinin hedef mRNA'sını kodlamaktadır (Khraiwesh vd., 2012). Transkripsiyon faktörleri, kuraklık şartları altında gen anlatımını düzenleyen faktörlerden biridir. Kuraklık koşulları altında gen anlatımını düzenleyen transkripsiyon faktörleri, bZIP, AP2/ERF, HD-ZIP, MYB, bHLH, NAC, NF-Y, EAR ve ZPT2 ailelerine dahil çok sayıda spesifik işlevde görev alan proteinlerden oluşan geniş aileler olduğu için henüz pek çoğunun hücre içi görevi

tam olarak bilinmemektedir (Bhargava ve Sawant, 2013; Dolferus, 2014; Öztürk, 2015).

Bitkiler stresle ilişkili çok çeşitli proteinler, transkripsiyon faktörleri, metabolitler aracılığıyla yanıt oluşturabileceği gibi epigenetik regülasyonlar yolu ile de strese cevap oluşturabilirler. Epigenetik değişiklikler; özellikle bitki bir abiyotik strese maruz kaldığında gen ekspresyonu değişikliklerinde önemli rol oynayan RNA tarafından yönlendirilmiş DNA metilasyonu, histon ve ya DNA modifikasyonlarını kapsar (Cushman ve Bohnert 2000; Chinnusamy, 2009; Aras vd., 2015).

1.5. Gen İfadesinde Kullanılan Analizler

Son yıllarda gelişen teknoloji, transkripsiyonel cevaplardan sorumlu binlerce genin hızla değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Stanton, 2001; Kömürcü-Bayrak ve Erginel-Ünaltuna, 2011). İşlevsel genomik üzerine yapılan çalışmalarda iki temel yaklaşım bulunmaktadır. Bunlardan ilki RNA düzeyindeki çalışmalarda, gen anlatımı analiz yöntemlerinin kullanılmasıdır. İkinci yaklaşım ise proteom araştırmalarında kullanılan kütle spektrometri dizilemesi, iki boyutlu jel elektroforezi ve protein array gibi yöntemler kullanılmasıdır. Gen anlatımı analizinde RNA düzeyinde kullanılan yöntemler genel olarak dört grupta incelenebilir (Hess vd., 1998; Kömürcü-Bayrak ve Erginel-Ünaltuna, 2011). Şekil 1.5' te RNA düzeyindeki gen anlatımı analiz yöntemlerinin sınıflandırılması verilmiştir.



Şekil 1.5. RNA düzeyindeki gen anlatımı analiz yöntemleri (Hess vd., 1998; Kömürcü-Bayrak ve Erginel-Ünaltuna, 2011)

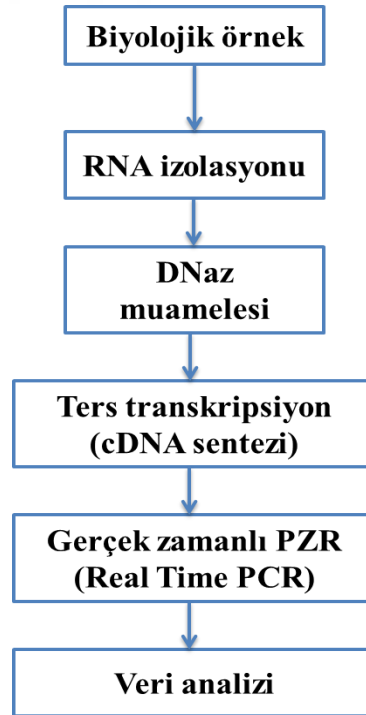
1.5.1. Eş Zamanlı - PZR

Eş zamanlı PZR sistemi, PZR'nin sonuçlarını elde etmek için harcanan vakitten daha kısa sürede sonuçlar elde etmektedir. Buna ilaveten kullanıcının PZR ürünlerinin amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlemlenebilmesini sağlarken, tek bir reaksiyon sonucunda ulaşılan bilginin artırılması için geliştirilmiştir. PZR uygulamalarında optimum performans arayışı sonucunda bu analiz yöntemi geliştirilmiştir (Chou vd., 1992; Kellog vd., 1994; Roche, 2015). Hata payı yüzde birin altındadır (Şanlıdilek, 2009).

Eş zamanlı PZR analizinde PZR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri oluşturabilmek için kullanılan cihazlar (Thermal cycler ısı bloğu) hassas ölçüm aletleriyle bir araya getirilmiştir (Higuchi vd., 1993; Şanlıdilek, 2009).

Eş zamanlı PZR’de floresans boyalarla oluşturulan reaksiyon sırasında her bir PZR döngüsünde verilen ürünün floresans ışığa göre bilgilerini kaydeden ve reaksiyonunun her aşamasından sonuna kadar oluşan ürünün miktarını denetleyen bir sistemdir. Eş zamanlı PZR sisteminde diziye özgü problemler ve diziye özgü olmayan floresan boyalar kullanılarak ışımanın sonuçları bir kamera eşliğinde bilgisayar sistemine aktarılmaktadır (Higuchi vd.,1993; Lay ve Wittwer 1997; Şanlıdilek, 2009).

Eş zamanlı PZR analizi öncesinde kullanılan biyolojik materyalin bir dizi işleminden geçmesi gerekmektedir. Bu işlemlerden sonra optimizasyon ve konsantrasyon gibi bilgiler ışığında eş zamanlı PZR mümkün olmaktadır. Biyolojik materyalin hazırlanması için uyulması gereken süreç şekil 1.6’da verilmiştir.

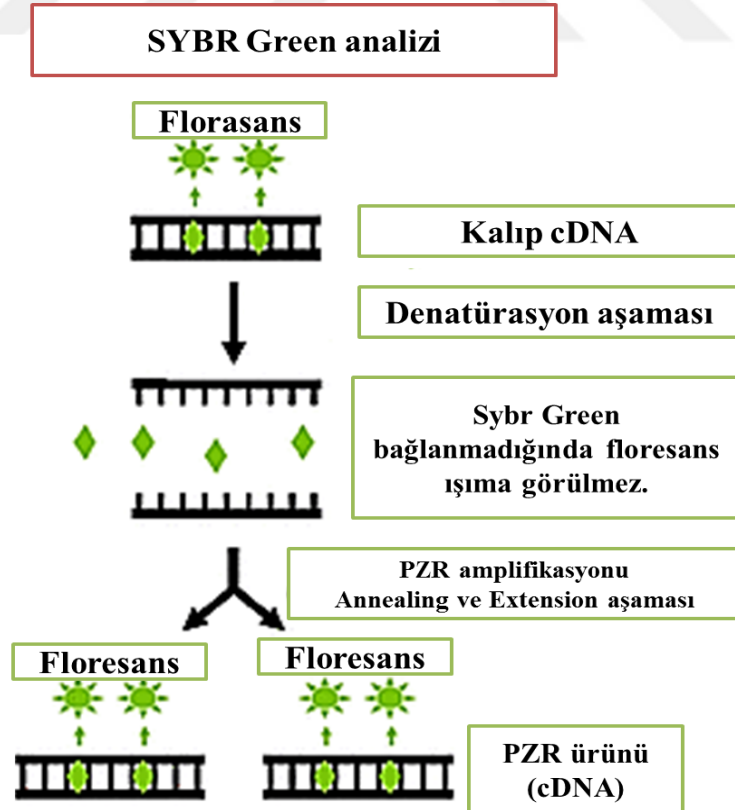


Şekil 1.6. Eş Zamanlı PZR’nin çalışma prensibi (Günel ve Aydın, 2009)

Eş zamanlı PZR’de kullanılan farklı şekillerde floresans ışıma alabilen teknikler bulunmaktadır. Bunlar SYBR Green, hibridizasyon probu, hidroliz probu, simple prob vb. gibi tekniklerdir (Dilek, 2013).

SYBR green

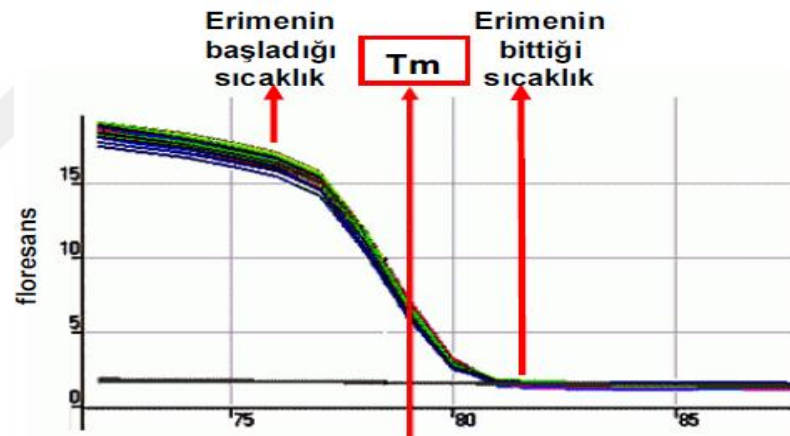
Sybr green uygulamasında; sadece floresans ışımayı çift zincirli DNA’ya bağlandıklarında verebilen syber green boya kullanılmaktadır. Amplifikasyona bağlı olarak Sybr green’li reaksiyondaki DNA artışına göre floresansın miktarı ile ölçüm yapılmaktadır. Reaksiyon tüpünün içerisinde sybr green, primerler ve denatüre olmuş kalıp DNA ayrı ayrı yer aldığı için amplifikasyon başlangıç aşamasında floresans ışıma yok denecek kadar az miktarlardadır. Primerin bağlanmasından sonra gerçekleşen uzama aşamasında kalıp DNA’nın çift zincirli yapıyı oluşturmasıyla DNA’ya bağlanan boya miktarı artmaktadır (Şekil 1.7). Buna bağlı olarak ışıma gösteren floresans miktarında zaman içinde bir artış meydana gelmektedir (Williams 1996; Grove 1999; Şanlıdilek, 2009).



Şekil 1.7. Syber green tekniğinin aşamaları (Smith ve Osborn, 2009)

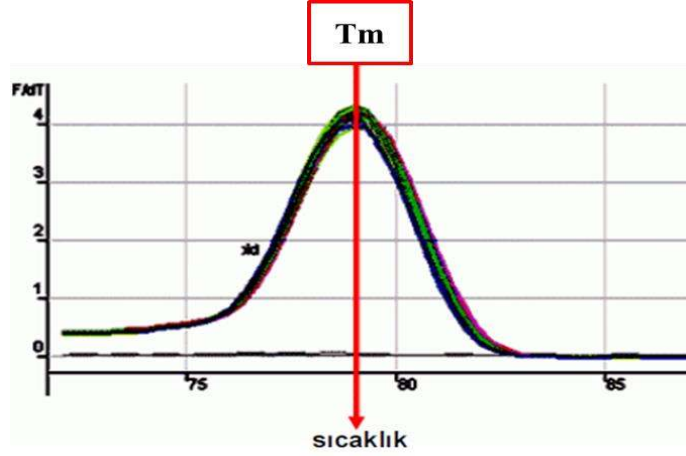
Eş zamanlı PZR'nin sonuçları relatif ve standart-eğri kantitasyonu olarak iki analitik yöntem ile analiz edilebilmektedir (Ginzinger, 2002; Kubista vd., 2006; Kömürcü vd., 2011)

Sybr Green probu, ortamda istenmeyen çift zincirli DNA moleküllerine yani primer dimerlere veya özgül olmayan PZR ürünlerine de bağlanabilmektedir (Bustin and Mueller 2005; Yüzbaşıoğlu, 2008). Bu sebeple floresans ışımasının artışı her zaman istenilen amplifikasyonun gerçekleştiğini göstermez. Amplifikasyon ürününün özgül olup olmadığı Sybr green ile muameleden önce PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi sonucunda belirlenebilmektedir. Bunun dışında RT-PZR cihazlarında primer dimerin oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için ikinci bir seçenek ise “melting curve” (erime eğrisi) analizidir (Yüzbaşıoğlu, 2008).



Şekil 1.8. Erime eğrisi (Melting curve) örneği (Yüzbaşıoğlu, 2008)

Her çift zincirli DNA molekülü kendine has bir “melting temperatures” diğer bir deyişle Tm sıcaklığına sahiptir. Yani çift zincirli DNA'nın %50'sinin tek zincirli hale dönüşmesi için uygun bir sıcaklık bulunmaktadır (Şekil 1.8). Amplifikasyon sonrasında sıcaklık yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans ışıma miktarı tespit edilir. Çift zincirli DNA'nın denatüre olmasıyla Syber green serbest kaldığı için ölçülen floresans ışıma miktarında azalma meydana gelir. Böylelikle elde edilen erime eğrisi yorumlanarak amplifikasyonun özgüllüğü tespit edilebilmektedir. Tm değerinin tam olarak elde edilebilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevinin çizilmesi sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir (Şekil 1.9) (Yüzbaşıoğlu, 2008).



Şekil 1.9. Erime eğrisinin (Melting curve) zamana karşı türevine örnek (Yüzbaşıoğlu, 2008)

Eş zamanlı PZR uygulamalarında kullanılan en önemli değişken eşik döngü değeri olan “Threshold cycle” kısaca Ct değeridir. Bu değer ilk anlamlı artışın olduğu diğer bir deyişle PZR reaksiyonun gerçekleştiği noktayı belirlemektedir. Böylece kurgulanan bir deneyin referans bir gen ile karşılaştırılarak, farklı PZR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı elde edilen Ct değerlerinden öngörülebilmektedir (Womg ve Medrano, 2005).

1.5.2. Yeni nesil DNA dizileme

DNA dizi analizi, bir DNA fragmentinde bulunan A, C, G, T nükleotid sıralarının belirlenmesi olarak nitelendirilmektedir. DNA fragmentine ait olan bu nükleotid dizilerinin belirlenmesi; DNA bölgesinin kodladığı hedef proteinine ilişkin bilgilerin elde edilmesinde, genomik DNA dizisi ile komplementer DNA’ya ait dizi bilgilerinin karşılaştırılarak ekzon ve intron bölgelerinin ortaya çıkarılmasında, gen aktivitesini kontrol eden bölgelerin tanımlanmasında ve evrimsel akrabalık ilişkilerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Türktaş, 2011; Dönmez vd., 2015).

Son yıllarda geliştirilen teknolojiyle DNA dizileme sistemleri, çok daha hızlı bir şekilde ve tek bir okumada başka hiçbir deneysel yöntem ile elde edilemeyecek kadar zengin dizileme yapabilecek kapasiteye ulaşmıştır. Geliştirilen DNA dizileme sistemleri günümüzde yeni nesil dizileme olarak adlandırılmaktadır. Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, dizileme yapılabilmektedir (Türktaş, 2011; Üstek vd., 2011). Yeni nesil dizileme sistemleriyle

genom, transkriptom, DNA-protein etkileşimlerinin geniş kapsamlı analizini sağladığı gibi bu teknoloji ile mRNA, küçük RNA profili, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin genom boyunca karakterizasyonu, kromatin yapısı ve metilasyon paterni, atasal DNA mikrobiyolojisi ve metagenomik çalışmaları da yapılmaktadır (Türktaş vd., 2014).

Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme sistemleri GS FLX 454, Illumina Genome Analyzer, Applied Biosystems SOLID, Helicos, Pacific Biosciences ve ION Torrent PGM'dir (Çakar, 2013). Bu sistemler DNA'yı dizilemede kullandığı yöntem bakımından sentez aracılığıyla dizileme, ligasyon aracılığıyla dizileme ve tek molekül dizileme olmak üzere üç grup altında toplanabilir. Yöntemlerin temelindeki farklılıklar okuma uzunluğu, verim, hata oranı gibi performansları etkileyecek farklılıkların oluşmasına neden olmaktadır (Dönmez vd., 2015). Bu durum sonucunda yeni nesil dizileme yöntemleri arasında çalışma süresinde, okuma uzunluğunda ve tek seferde okuma sayısında da farklılıklar oluşmasını sağlar (Tablo 1.9).

Tablo 1.9. Yeni nesil dizileme yöntemlerinin karşılaştırılması (Dönmez vd., 2015)

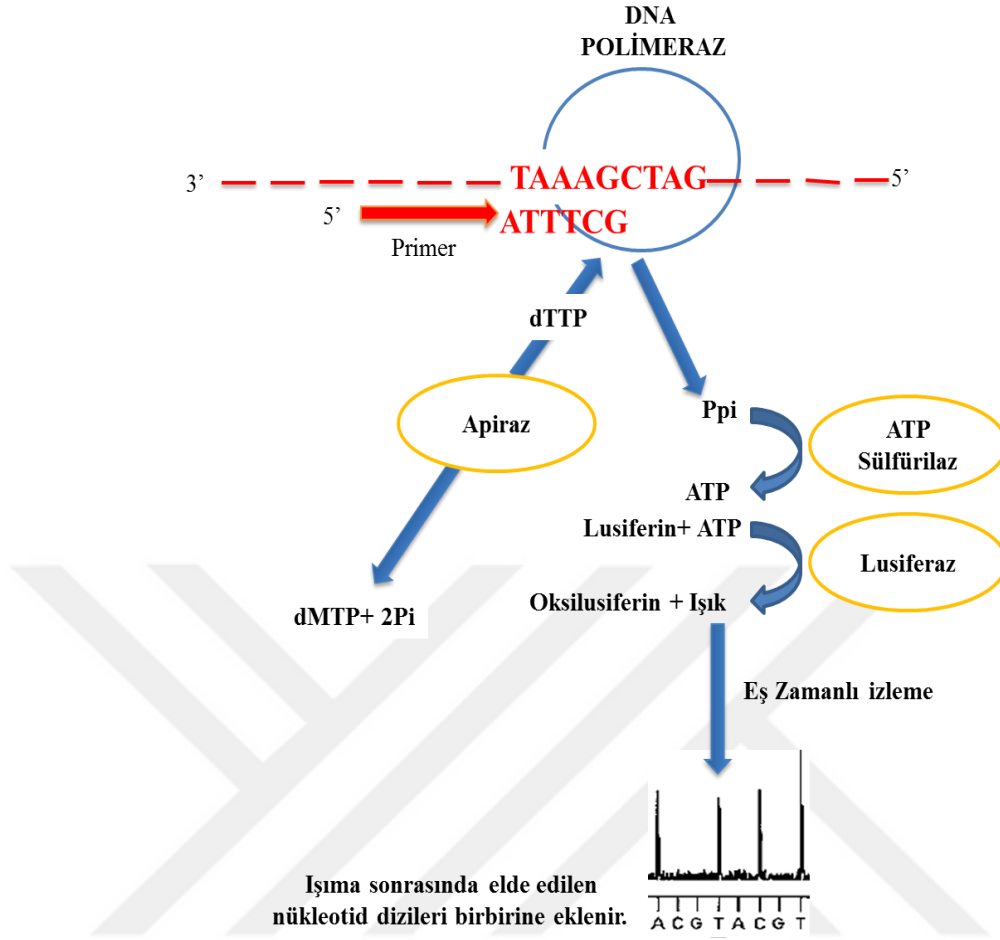
Dizileme platformu	Dizileme yöntemi	Dizileme kimyası	Çalışma süresi	Okuma uzunluğu (bp)	Tek çalışmadaki okuma sayısı (milyon)
Roche 454 FLX	Sentez aracılığıyla	Pirodizileme	24 saat	400-500	~ 1
Illumina	Sentez aracılığıyla	Reversible terminatör	3-10 gün	100	160
Ion torrent	Sentez aracılığıyla	Naturel nükleotidler (200)	2 saat	200	100
ABI Solid	Ligasyon aracılığıyla	Parçalanabilir ligasyon	7-14 gün	50	500
Polonator	Ligasyon aracılığıyla	Parçalanmayan ligasyon	80 saat	28	300-400
Helicos HeliScope	Tek zincir dizileme	Reversible terminatör	8 gün	25-55	600-800
Pacific BioSciences	Tek zincir dizileme	Real time	~ 1 saat	1300	35000

Sentez Aracılığıyla Dizileme

Sentez aracılığıyla dizileme teknolojisinde belirli büyüklükteki DNA fragmentlerine adaptör dizileri bağlanırlar. Bu diziler floresan veya kimyasal olan sinyali geliştirmek üzere amplifiye edilirler. Ardından örnekler flow cell döngüsü için ayrılarak sabitlenir. DNA dizilerinin uzamasında reaksiyonunda DNA polimeraz enzimi görev alır. Bu dizileme tekniğinde okuma uzunluğu, örneklerin amplifiye edilmesi ve sabitlenmesi bakımından farklılık gösteren üç farklı metot bulunmaktadır. Bunlar 454 GS20 pirodizileme, Illuminia ve Ion Torrent metotlarıdır (Egan vd, 2012; Dönmez vd., 2015).

Pirodizileme Metoduyla Genom Dizileme

Pirodizileme tekniğinin temelinde dizileme reaksiyonu sırasında, kalıp DNA dizisine her nükleotit bağlanmasından sonra apiraz enzimi ortamdaki diğer nükleotitleri uzaklaştırır. Nükleotitlerin takılmasıyla yapılan üretimden sonra DNA Polimeraz bir pirofosfat (PPi) açığa çıkarır. Sülfirilaz enzimi ise bu pirofosfatları ATP'ye dönüştürür. Üretilen her ATP Lusiferaz enzimi tarafından hidrolize edilir ve oksilusiferin ve lusiferin substratından ışıma meydana gelir (Boyacıgil, 2012). Bu reaksiyonda ışımayı oksilusiferin sağlamaktadır. Bu ışığın şiddeti ATP miktarıyla doğru orantılı olması sayesinde aynı dizi üzerindeki tek nükleotid tekrarları (homopolimer) tespit edilir. Ortaya çıkan bu ışık CCD kamera tarafından kaydedilir ve bilgisayar program yardımıyla dizi verilerine (flogram) dönüştürülür (Ronaghi, 2001; Üstek vd., 2011)



Şekil 1.10. Pirosekanslamanın reaksiyon diyagramı (O'meara vd., 2001)

Pirosekanslamanın tarihçesi göz önüne alındığında 1985'te pirofosfat algılama prensibi ortaya atılmış, 1988 yılında ise DNA dizileme için bu prensibe dayalı yeni bir metot geliştirilmiştir (Nyren ve Lundin, 1985; Hyman, 1988; Dönmez vd., 2015). Bu teknik daha sonra ticari olarak kullanımı için geliştirilmiştir. 2005 yılında ilk yeni nesil dizileme tekniği olarak 454 teknolojisi piyasada yerini almıştır. Son yıllarda bu teknoloji çok kullanılmakta olup hakkında araştırma yayını yapılan yeni nesil dizileme sistemidir. 454 teknolojisi; 24 saat çalışabilen, 400-500 bç okuma yapan, her çalışma için ise yaklaşık 1 milyon okuma yapan bir sistemdir (Dönmez vd., 2015). 2008 yılında 454 GS FLX Titanium sistemi piyasaya çıkarılmıştır. Bu sistemde doğruluk payı %99,9 olmakla beraber 700 bç uzunluğunda okuma yapabilmektedir. 24 saat içerisindeki her çalışmada 0,7 G veri çıkışı alınır. 2009 yılının sonlarında GS Junior 454 dizileme sistemi ile birleştirilerek kütüphane hazırlanması ve veri işlemesi basitleştirilmiştir. Böylece veri çıkışı her çalışmada 14 G'ye kadar yükseltilmiştir (Ansorge, 2009; Dönmez vd., 2015). Bu yöntem

genomların (bakteri, hayvan, insan) dizilenmesi için kullanılmaya başlanmıştır. Roche sisteminin en büyük avantajı hızıdır. Dizilemenin başlangıcından sonuna kadar 10 saat sürmektedir (Egan vd., 2012; Dönmez vd, 2015).

Melonomiks projesinde, kavunun (*Cucumis melo L.*) 480 Mbp'lik genomu, Roche 454 GS FLX Titanium sistemi ile dizilenmiştir. Toplam olarak 24 milyondan fazla okumayı temsilen 17.6 X kavun genomu ortaya çıkarılmıştır. Şu ana kadar kavun genomunun 382 Mb'lık kısmı yani yaklaşık %80' ni dizilenmiş bulunmaktadır (Barbazuk vd, 2007; Dönmez vd., 2015).



2. KURAMSAL TEMELLER

Kavun genom dizisi ($2n=24$) 2012 yılında yayınlanmıştır (Garcia-Mas vd., 2012). Karpuzun genom dizisi ise doğu Asya karpuzunun ($2n = 2x = 22$) dizilenmesi ile 2013 Ocak ayında elde edilmiştir (Guo vd., 2013). Bu tip genomik çalışmalar ürünlerin ıslahında ve çeşitliliğin genetik temelini ortaya çıkarılmasında yeni ve farklı bakış açıları geliştirilmesi için değerlidir. Genom dizilerinin belirlenmesi ile ürün veriminin artırılması ve gıda güvenliğinin sağlanması öngörüldüğü gibi araştırmacıların fonksiyonel ve yapısal genomik çalışmalara yönelmesinin de önünü açmaktadır (Muthamilarasan vd., 2013).

Bitkiler çeşitli çevresel değişikliklerle karşı karşıya kaldığında gen ifade değişikliği yoluyla kendilerini koruyabilmektedirler (Boyer, 1982; Ahuja vd., 2010; Kim vd., 2015). Bitkilerde LEA proteinlerinin çevresel strese karşı koruma mekanizmalarına katıldığı düşünülmektedir (Liang vd., 2013; Kim vd., 2015). Çeltikte LEA proteinlerinin abiyotik stres koşulları altında hasara uğrayan hücre zarını koruyarak bitkinin performansını arttırdığı düşünülmektedir (Chandra vd., 2004). LEA (Late embryogenesis abundant) proteini isminden de anlaşılacağı üzere ilk defa embriyo gelişiminin ileri safhalarında tohumda keşfedilmiştir (Li ve Galau, 1981). Durum böyleyken, LEA proteinlerinin varlığı yalnızca tohum ile sınırlı değildir. Pek çok LEA proteininin vejetatif dokularda da varlığı söz konusudur (Borovskii vd., 2002; Öztur vd., 2002; Dalal vd., 2009; George vd., 2009; Olvera-Carrillo vd., 2010; Monteiro Costa vd., 2011). Bazı araştırmalarda bakteri ve hayvanlarda da LEA protein homologları saptanmıştır (Stacy ve Aalen, 1998; Boswell vd., 2009; Denekamp vd., 2010; Warner vd., 2010; Wu, vd., 2011). Tanımlanan LEA proteinleri, dizi benzerlikleri ve belli motiflerin varlığı da dikkate alınarak en az yedi grup olarak sınıflandırılmıştır, fakat bu proteinlerin evrensel olarak sınıflandırılmasında açık bir ölçüt henüz oluşturulamamıştır (Dure vd., 1989; Hunault ve Jaspard, 2010).

Bitkilerde kuraklık ve tuz stresine toleransta etkili olan aday genlerin belirlenmesi abiyotik stres yollarının aydınlatılmasında önemli rol oynamaktadır. *LEA* (Late

Embryogenezis Abundant) gen ailesi ve üyesi Dehidrin (DHN) genlerinin kuraklık ve tuz stresi karşısında verdiği yanıtta, pozitif bir korelasyon gösterdiği bilinmektedir (Ebrahime, 2013). Kuraklık, tuz stresi ve ABA uygulamasına maruz bırakılan mısır çeşitlerinin yapraklarında abiyotik stres-yanıt geni olan *LEA14* geninin ifadesi üzerine yapılan çalışmada *LEA14* geninin dayanıklı iki mısır çeşidinin (Dogefl ve Samada) yapraklarının kuraklık ve tuz stresi ile ABA uygulamasının etkilerine karşı yüksek düzeylerde ifade edildiği kanıtlanmıştır (Dilek, 2013). Büyük (2014) tarafından yapılan araştırmada *LEA-3* geninin fasulye bitkisinde hem tuz hem kuraklık stresine karşı olan savunma mekanizmasında rol oynadığı tespit edilmiştir. Salatalıkta *LEA* genlerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmada *CsLEA 09, 32 54, 57* genlerinin kuraklık koşullarında görevli olan genler olabileceği öne sürülmüştür (Çelik-Altunoğlu vd., 2016).

LEA proteinleri üzerine çalışılmasının sebebi, farklı hücrel yapılar da bulunduğ u gibi çok çeşitli organizmalarda bulunarak geniş bir aileyi oluşturmaktadırlar. Bunun yanında yapıları hakkında pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Çoğunun doğal halinin katlanmamış olduğ u düşünülebilir; bu da üç boyutlu yapılarının eksikliğini açıklayabilir. Bu bakımdan bu protein ailesinin üç boyutlu yapılarının var olmadığı değ erlendirmesi yapılabilir. Ayrıca LEA proteinlerinin moleküler etki mekanizmaları hakkında da çok az bilgi mevcuttur. İki dehidrin proteini olan ve grup 2 LEA proteinleri içerisinde yer alan ERD10 and ERD14'ün, potansiyel moleküler ş aperonlar olduğ u gösterilmiştir (Kovacs vd., 2008). Mutant LEA proteinleri kullanılarak yapılan çalışmalar da lizin aminoasitince zengin korunmuş dizileri (K segmentleri) içeren bu LEA protein tipinin anyonik fosfolipidlerce zengin membran yüzeylerine bağ lanmak için bir arayüz oluşturduğ u hipotezini desteklemiştir (Koag vd., 2009). Moleküler dinamik simülasyonları gibi bazı teorik çalışmalar (Li ve He, 2009) olmasına rağmen hala pekçok LEA proteininin moleküler düzeydeki asıl fonksiyonel mekanizmalarının gösterilmesi gerekmektedir. LEA proteinlerinin yapı ve fonksiyonu arasındaki ilişkileri araştırmak bu bakımdan ilgi çekicidir, fakat zordur. Çünkü deneysel delilleri elde etmek hala güçtür. LEA protein dizilerinin bilgisayar ile analizleri, alternatif umut verici bir yol sunmaktadır (Hunault ve Jaspard, 2010).

Genom dizileri belirlenmiş olmasına rağmen salatalık, kavun ve karpuzda tüm genom kullanarak yapılan gen tanımlamaları ve onların karakterizasyonu çalışmaları sınırlıdır (Ling vd., 2011; Li vd., 2012; Baloglu vd., 2014).

2015 yılında karpuz üzerine yapılan çalışmada Cl017745, grup 3 LEA geninin soğuk, kuraklık, tuzluluk, ABA stresine karşı yanıtı, eř zamanlı PZR analizi ile gen ekspresyonu incelenmiştir. Çalışılan tüm stres faktörlerinde gen ifadesinde artış gözlenmiştir (Kim vd., 2015).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Madde ve Kitler

Asetik Asit (Glasiyal Asit, Merck)

Agaroz (Applichem, Almanya)

EDTA (Applichem, Almanya)

Etanol (Kimetsan, Türkiye)

Hoagland (Phyto Technology Laboratories, ABD)

İzopropanol (Applichem, Almanya)

Kloroform (Applichem, Almanya)

Light cyclers 480 SYBR Green I kiti (Roche, ABD)

Nükleik Asit Boyama Solüsyonu-Jel Boyası (Intron Biotechnology)

Polietilen Glikol 6000 (Applichem, Almanya)

Revertaid first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, Litvanya)

RNase zap (Ambion, ABD)

Sıvı azot

Trizol Reagent (Ambion, ABD)

PZR reaksiyon tüpü (Greiner bio-one, ABD)

Tris (Applichem, Almanya)

3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Buz makinesi (Hoshizaki, Europe Limited)

Derin Dondurucu -82 °C (Glacier Nuaire Nu-9668E, Meksika)

Derin Dondurucu -20 °C, Buzdolabı +4 (Arçelik 4252N, Türkiye)

Distile Su Cihazı (Protek Lab, Türkiye)

Elektroforez (Thermo Scientific EC1000XL2 ve EC300XL2, ABD)

Hassas Terazı (Presica 350-8519, İsviçre)

Jel görüntüleme sistemi ECX-F20.M (Vilber lourmat, Fransa)

Jel görüntüleme sistemi Quantum ST5 (Vilber lourmat, Fransa)

Light cyclers 480 II (Roche, ABD)

Manyetik Karıştırıcı (Wisd Laboratory MSH-20A, Kore)
Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)
Mikropipet (Thermo, ABD)
Mikrosantrifüj (N2631-0007 Star Lab, Kore)
Multipurpose Vorteks (Wisd Laboratory Instruments, Kore)
Phmetre (Jenco Quality Instruments, Çin)
Realtime PCR (Roche Light Cycler 480 II, Almanya)
Spektrofotometre Nano Drop (Thermo Sci. Multiskan go, Finlandiya)
Soğutmalı Santrifüj (Hetrich Micro 220/220R, Almanya)
Steril kabin Class II (Tezsan)
Test kabini TK252 (Nüve, Türkiye)
Thermal Cycler Isı bloğu (Thermo, ABD)
Thermo-Shaker (Biosan Ts-100, Letonya)
UV Table Manuel (Prizma, Fransa)
UV Fırın (LG Solar Dom, Kore)

3.1.3. Bitki materyali

Bu çalışmada materyal olarak Galia kavun ve Crisby karpuz tohumları Monsanto Gıda ve Tarım Tic. Ltd. Şti (Antalya)' den temin edilmiştir. Tohumların çimlendirilmesi işlemleri ile bitkilerin gerekli sürede büyümeleri ve stres uygulamaları Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Laboratuvarı'nda bulunan çimlendirme kabininde gerçekleştirilmiştir. Gen ifade çalışmaları Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Ana bilim dalı, Genetik ve Biyomühendislik Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kavun ve Karpuzda LEA Genlerinin Biyoinformatik Analizleri

Biyoinformatik analizlerin uygulanabilmesi için öncelikle *Cucumis melo* ve *Citrillus lanatus*'da bulunan LEA proteinlerinin tanımlanarak protein ve mRNA sekanslarının elde edilmesi gerekmektedir.

LEA genlerinin *Cucumis melo* ve *Citrillus lanatus*'da tanımlanması 3 farklı yaklaşımla yapılmıştır.

1. LEAP veri tabanı kullanılarak (URL-10, 2007) (Hunault ve Jaspard, 2010) 14 bitkinin (*Arabidopsis thaliana*, *Gossypium hirsutum*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Pisum sativum*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Brassica napus*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana tabacum*, *Vitis vinifera*) LEA protein dizileri elde edilmiştir.
2. Elde edilen bu protein dizileri karpuz için ise Cucurbit Genomics veri tabanı (URL-11, 2013), kavun türü için Melonomics veri tabanı kullanılarak (URL-12, 2012) kullanılarak bu bitkilerdeki benzer dizilerle karşılaştırılıp, elde edilen diziler korunmuş bölgelere göre çalışmaya ilave edilmiştir.
3. Çalışmaya dahil edilen her dizinin korunmuş bölgeleri Pfam (URL-9, 2014) veri tabanı kullanılarak kontrolü yapılmıştır.

LEA genleri kavun ve karpuzda ProtParam Tool (URL-13, 2012) veri tabanı kullanılarak izoelektronik etki değeri (pI), moleküler ağırlıkları ve değişkenlik durumları hesaplanmıştır.

3.2.2. *LEA* Genleri Kromozomal Yerleşimlerinin Belirlenmesi, Gen Yapısının Tahmini ve Genomik Dağılımın Hesaplanması

Kavunda bulunan LEA proteinleri scaffold seviyesinde olduğu için kromozomal yerleşimleri belirlenememiştir. Karpuzdaki LEA proteinlerini kodlayan genlerin kromozomal yerleşimleri için ise Cucurbit Genomics veri tabanı (URL-11, 2013) kullanılmıştır.

Kavunda bulunan tandem ve segmental duplikasyonların bulunmasında Melonomics veri tabanından (URL-12, 2012), Karpuzda ise Cucurbit Genomics veri tabanından (URL-11, 2013) faydalanılmıştır.

3.2.3. Dizi Hizalanması, Filogenetik Analizler ve Korunmuş Motiflerin Belirlenmesi

İki bitki türünün sahip olduğu *LEA* genlerinin aminoasit dizileri, MEGA5 programına (Tamura vd., 2011) aktarılmıştır. Çoklu dizi hizalamalarının belirlenmesinde ClustalW programı kullanılmıştır. Elde edilen hizalanmış dizi dosyasından filogenetik ağaç oluşturulması için komşu birleştirme (neighbor joining) adı verilen bir metot (Saitou ve Nei, 1987) kullanılmıştır. Motifler ise protein dizisi içerisinde korunmuş kısa bölgelerdir (Tanyolaç vd., 2012). Protein dizi motiflerinin oluşturulmasında MEME (URL-14, 2015) DNA motif arama aracı (Bailey ve Elkan, 1994) kullanılmıştır. Bu oluşturulan MEME motifleri, InterProScan ile InterPro veri tabanında taranmıştır (Quevillon vd., 2005).

3.2.4. Gen Ontoloji Analizleri

Kavun ve karpuzda bulunan *LEA* dizilerinin fonksiyonel analizlerinin yapılabilmesi için Blast2GO (URL-15, 2015) programına proteinlerin aminoasit dizileri (Conesa ve Götz, 2008) yüklenmiştir. Kullanılan bu program aracılığıyla GO sınıflandırmasının üç kategorisi olan biyolojik işlevler, hücresel içerikler ve moleküler fonksiyonlar olarak belirlenmiştir.

3.2.5. Kavun ve Karpuzdaki LEA Proteinlerinin Diğer Türler İle Karşılaştırmalı Fiziksel Haritasının Çıkarılması

Kavun ve karpuzun kromozomları ile diğer türler arasındaki ortolog ilişkilerin ortaya çıkarılmasında BlastP programı kullanılarak kavun ve karpuz *LEA* proteinlerinin aminoasit dizilerine karşılık *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Populus trichocarpa*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* ve *Zea mays* peptid dizileri taratılmıştır. Phytozome veri tabanında (URL-16, 2015) elde edilen veriler arasından E-değeri $\leq 1e-5$ ve en az %70 benzerlik gösterenler anlamlı kabul edilmiştir. Kavun ve karpuz ile *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Populus trichocarpa*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* ve *Zea mays* kromozomlarında bulunan *LEA* genleri arasındaki ortolog ilişkiler, MapChart programı ile görüntülenmiştir.

3.2.6. Homolog ve Homolog Olmayan Değişim Oranlarının Hesaplanması

Kavun ve karpuzda *LEA* genlerinde duplikasyona uğramış proteinleri kodlayan aminoasit dizileri ile *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Populus trichocarpa*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* ve *Zea mays* arasındaki ortolog gen çiftleri CLUSTALW (URL-17, 2015) tabanlı çoklu dizi hizalama aracıyla hizalanmıştır.

LEA genlerinin aminoasit dizileri ile orjinal komplementer DNA dizilerinin hizalanması yöntemiyle homolog (K_s) ve homolog olmayan (K_a) değişim oranlarını hesaplanması için CODEML (URL-18, 2006) programı (Suyama vd., 2006) kullanılmıştır.

Her iki bitki türünde *LEA* genlerindeki duplikasyonlar ile ayrılma zamanı (milyonlarca yıl önce, MYÖ), λ değişimlerinin her homolog bölge ve her yıla karşılık homolog mutasyon oranı denklem (3.1) kullanılarak hesaplanmıştır (Lynch ve Conery, 2000; Yang vd., 2008).

$$T = \frac{K_s}{2\lambda} \quad (\lambda = 6,5 \times 10^{-9}) \quad (3.1)$$

3.2.7. *LEA* Genlerini Hedef Alan miRNA'ların Bilgisayarlı Tanımlanması

MIR adı verilen endojen genler tarafından kodlanması yapılan miRNA'lar ve bu genlerden birçoğu farklı bitki türleri arasında korunmuşlardır (Nozawa vd., 2012; Çoruh vd., 2014; Pekmezci, 2015). *LEA* genlerinde miRNA kontrollü gen hedeflerinin tanımlanması, miRNA fonksiyonlarının anlaşılmasında büyük bir rol oynamaktadır. Bu nedenle önceden belirlenmiş olan bitki miRNA öncülleri, miRBase v20.0 (URL-19, 2014) programıyla elde edilmiştir. Kavun ve karpuz *LEA* genlerini hedef alan miRNA'ların tanımlanması için bitki miRNA veri tabanı (URL-20, 2010) kullanılmıştır.

İnternet tabanlı psRNA Target Server (URL-21, 2011) aracılığıyla bilinen tüm bitki miRNA'ları ile kavun ve karpuz *LEA* gen transkriptleri hizalandırılıp, varsayılan tüm bitki türleri ile kavun ve karpuz miRNA'larının tanımlanması yapılmıştır.

2005 yılında Zhang tarafından oluşturulan parametreler kullanılarak bilinen tüm bitki miRNA'ları ile onların potansiyel hedefleri değerlendirilmiştir. Bu miRNA hedeflerini doğrulamak amacıyla varsayılan gen homologlarını belirlemek için analizler BLASTX taraması ile yapılmıştır. BLASTX taraması, nükleotid dizisini dönüştürerek bir protein veri tabanına karşı mukayese etmektedir (Tanyolaç vd., 2012).

3.2.8. LEA Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

Biyoinformatik analiz yöntemlerinden biri olan homoloji modellemesi, modellenecek proteine dizi benzerliğine sahip şablon bir yapı mantığıyla çalışmaktadır (Hansen, 2004; Çatık 2008). Bu analizin temelinde çözülmüş yapılar arasında yeterli çeşitlilik sağlanarak geri kalanlar yapıları modellemektir. Proteinlerin şablonla ilişkili olmadığı durumlarda araştırmacılar güvenilir sonuçlar elde edilmesi için dizin hizalamasının en doğru şekilde yapılması gerektiği kanatine varmışlardır (Zhang ve Skolnick, 2005; Çatık 2008). Homoloji modellemesi, bir proteinin üç boyutlu (3D) yapısının, yapısı çözümlenmiş olan bir ya da birkaç protein yapısı üzerinden çözümlenmesidir. Bu metodla elde edilen yapılar, dizilerin birbirlerine benzerliğine bağlıdır (Baxeavanis, 1998; Çatık, 2008).

BLASTP kullanılarak kavun ve karpuzdaki tüm *LEA* genlerindeki benzer dizilerin ve bilinen üç boyutlu yapıya sahip en iyi örneğin belirlenmesi amacıyla Protein Data Bank'da (PDB) (Berman vd., 2000) taratıldı. BlastP taramasında aminoasit dizisinin bir protein veri tabanına göre kıyaslanması yapılmıştır (Tanyolaç vd., 2012).

Phyre2 (URL-22, 2009) programı kullanılarak homoloji modellemesi ile proteinlerin üç boyutlu yapısı tahmin edilmiştir (Kelley ve Sternberg, 2009).

3.2.9. Transkriptom Verisi Kullanılarak Kavun ve Karpuz *LEA* Genleri Ekspresyon Profiline Çıkarılması

RNA-Seq analizlerinin yapılması esnasında bütün Illumina HiSeq okumalarına, açık bir veri bankasının arşivinden (SRA, Sequence Read Archive) ulaşılmıştır. Kavun ve karpuz için kullanılacak olan okumaların giriş numaraları Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. *CmLEA* genlerinin transkriptom analizi için kullanılacak okumaların giriş numaraları

Giriş numarası	Açıklaması
SRR411102	(SRX121032: Cantalupo vedrantaïs)
SRR411100	(SRX121031: Piel de sapo pinonet)
SRR411106	(SRX121030: Conomon SC PI161375)
SRR411104	(SRX121029: Piel de sapo-t111)
SRR1033647	(Cucumis melo tuz)
SRR1033646	(Cucumis melo kontrol)
SRR2082958	(Olgun aşamada beyaz meyve kabuğu 1)
SRR2082965	(Olgun aşamada beyaz meyve kabuğu 2)
SRR2082865	(Çiçek açtıktan 10 gün sonra beyaz meyve kabuğu 1)
SRR2082935	(Çiçek açtıktan 10 gün sonra beyaz meyve kabuğu 2)
SRR2082943	(Çiçek açtıktan 20 gün sonra beyaz meyve kabuğu 1)
SRR2082953	(Çiçek açtıktan 20 gün sonra beyaz meyve kabuğu 1)
SRR2082831	(Olgun aşamada sarı meyve kabuğu 1)
SRR2082832	(Olgun aşamada sarı meyve kabuğu 2)
SRR2082790	(Çiçek açtıktan 10 gün sonra sarı meyve kabuğu 1)
SRR2082791	(Çiçek açtıktan 10 gün sonra sarı meyve kabuğu 2)
SRR2082796	(Çiçek açtıktan 20 gün sonra sarı meyve kabuğu 1)
SRR2082813	(Çiçek açtıktan 20 gün sonra sarı meyve kabuğu 2)

Tablo 3.2. *CILEA* genlerinin transkriptom analizi için kullanılacak okumaların giriş numaraları

Giriş numarası	Açıklaması
SRR1724899	(Döllenmeden sonra 10 günde toplanmış meyve)
SRR1724900	(Döllenmeden sonra 18 günde toplanmış meyve)
SRR1724901	(Döllenmeden sonra 26 günde toplanmış meyve)
SRR1724902	(Döllenmeden sonra 34 günde toplanmış meyve)
SRR1724903	(Döllenmeden sonra 42 günde toplanmış meyve)
SRR1724943	(Döllenmeden sonra 50 günde toplanmış meyve)
WM-UR-1/SRR1001435	(10 günlük beyaz meyve)
WM-UR-2/SRR1001436	(10 günlük beyaz meyve)
WM-IM-1/SRR1001437	(18 günlük açık pembe meyve)
WM-IM-2/SRR1001438	(18 günlük açık pembe meyve)
WM-PM-1/SRR1001439	(28 günlük Pembe meyve)
WM-PM-2/SRR1001440	(28 günlük Pembe meyve)
WM-MA-1/SRR1001441	(34 günlük Olgun Kırmızı meyve)
WM-MA-2/SRR1001442	(34 günlük Olgun Kırmızı meyve)
SRR494474	(WMN- Floem1)
SRR518988	(WMN- Floem 2)
SRR518988	(WMN- Floem 3)
SRR494479	(WMN- Vasküler doku)
SRR518992	(WMN- Vasküler doku 2)
SRR518993	(WMN- Vasküler doku 3)

Tüm okumalar ham sekans verisi olarak “.sra” formatında indirilerek “fastq” formatına dönüştürülmüştür.

Düşük kalitedeki okumalar yani skor değeri 20 altında olanlar (Phred quality Q) çıkarıldıktan sonra temiz bütün okumalara her baz için dizi kalitesi, kalite skoru, baz nükleotid içeriği ve dizi duplikasyon düzeyleri açısından okuma kalitelerinin kontrol

edilebilmesi için FastQC analizi uygulanmıştır. Veri tabanlarının sürekli olarak güncellenmesi dolayısıyla çalışma esnasında kavun ve karpuz ile ilişkili RNA-seq yeni yüklenen verilerde kontrol edilerek çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2.10. Bitki Örnekleri, Yetiştirme Koşulları ve Stres Uygulanması

Kavun ve karpuz tohumları Monsanto Gıda ve Tarım Tic. Ltd. Şti (Antalya)' den temin edilmiştir. Tohumlar distile suyla üç defa yıkandıktan sonra plastik saksılara alınmıştır. Bitki büyütme kabini içerisinde Hoagland solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1950) içeren kültür ortamında 24 ± 2 °C ve 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 30 gün boyunca yetiştirilmiştir. Yetiştirilen kavun ve karpuz örnekleri fotoğraf 3.1 ve 3.2'te gösterilmiştir.



Fotoğraf 3.1. Kavun tohumlarının Hoagland çözeltisi ile sulanmasının 7. günü görüntüleri



Fotoğraf 3.2. Karpuz tohumlarının Hoagland çözeltisi ile sulanmasının 22. günü görüntüleri

Kavun ve karpuz bitkilerinde kuraklık stresi oluşturulabilmesi için Hoagland solüsyonu ile %10'luk polietilen glikol 6000 (PEG-6000) çözeltisi hazırlanmıştır.

PEG 6000 kullanımı, bitkilerde kuraklık stresine neden olmaktadır. İn vitro koşullarda yetiştirilen kuraklığa dayanıklı genotiplerin test edilmesinde oldukça uzun bir süredir kullanılan güvenilir bir maddedir. PEG 6000'in kuraklık stresi oluşturmasının temel nedeni ise çözünen potansiyelini (Ψ_s) arttıran, suyun bitkinin kök sistemi tarafından emilimini engelleyen, nüfuz etmeyen ozmatik bir ajan gibi davranmasıdır (Chezen vd., 1995; Jiang vd., 1995).

Gen ifade analizleri için kullanılacak olan bitkiler 4 veya 5 hafta süresince yetiştirilmiştir. RNA izolasyonu için kontrol bitkisinden kök ve yaprak örnekleri alınmıştır. Stres uygulaması için ise bitkilere 3., 12. ve 24. saatlerinde stres verilerek örnekleme yapılmıştır. Daha sonra morfolojik özellikleri dikkate alınarak Baloğlu vd. (2014)'nin salatalık bitkisinde uygulamış oldukları parametreler kullanılmıştır.

Kontrol bitkileri ve strese tabii tutulmuş bitkiler bitki büyütme kabinde aynı büyüme koşullarında yetiştirilmiştir. 0. saatte alınan örnekler kontrol olarak kullanılmıştır. Gelişmiş olan bitkilerin kök ve yapraklarından doku spesifik ifade analizi için örnekler ayrı ayrı alınmıştır.

Alınan doku örneklerinin her birinden üçer biyolojik örnekleme yapılmıştır. Sonrasında ise sıvı nitrojen ile dondurularak doku spesifik gen ifade analizlerinde kullanılmıştır.

3.2.11. Moleküler Genetik Metodlar

3.2.11.1 RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu Trizol solüsyonu ile yapıldı. İzolasyonlarda Ünver'in 2009'da belirttiği parametreler kullanılmıştır (Ünver ve Budak, 2009).

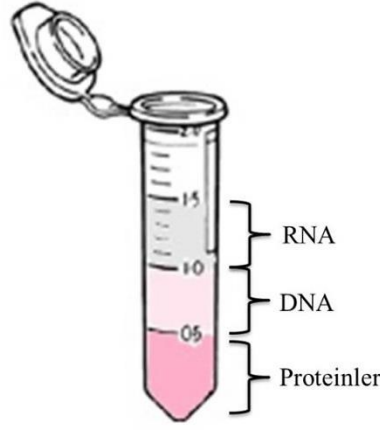
Homojenizasyon işlemi

Çimlendirme kabinde yetiştirilen kavun ve karpuz bitkilerinin yaprak ve köklerinin hasatı gerçekleştirilmiştir. Hasat sonrasında elde edilen bitkilerin yaprakları ve kökleri sıvı azot aracılığıyla ayrı ayrı havanda toz haline gelene kadar parçalanmıştır. Daha sonra 100 mg'lık bitki örnekleri 2 ml'lik steril tüplere alındı. 1 ml Trizol reaktifi içerisinde homojenize edilmiştir.

Faz ayrımının gözlenmesi

Homojenize olmuş örnekler nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrıştırılması için oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Üzerine her 1 ml Trizol reaktifi için 0,2 ml kloroform eklenmiştir.

Tüplerin kapakları dikkatlice kapatılıp 15 sn boyunca elle kuvvetlice karıştırılmıştır. Sonrasında 2-3 dk oda ısısında bekletilip 20 dk 4°C' de 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Tüp içerisinde santrifüj sonrasında şekilde gösterildiği gibi üç ayrı faz oluşmaktadır (Şekil 3.1). RNA bu fazlardan en üstteki fazda bulunmaktadır. Üstteki sıvı faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.



Şekil 3.1. RNA izolasyonunda oluşan faz ayrımı (URL-23, 2016)

RNA'nın çöktürülmesi işlemi

RNA'nın çökmesini sağlamak için izopropil alkol eklenmiştir. İzopropil alkol miktarı homojenizasyon esnasında kullanılan Trizol reaktifinin yarısı kadar kullanılmıştır. Örnekler oda ısısında 10 dk bekletildikten sonra 4°C' de 15 000 rpm' de 10 dk santrifüje edilmiştir. RNA çökeltisi %75'lik etanol ile bir kez yıkandı. Örnekler için kullanılan her 1 ml Trizol reaktifi için 1 ml etanol eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Sonrasında 4°C'de 5 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen RNA çökeltisi 5-10 dk kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan RNA 30 µl steril su ile çözündürülerek 10 dk 55-60°C' de bekletilmiştir. Kullanılmak üzere -80°C' de saklanmıştır.

İzole edilen RNA'nın, agaroz jel elektroforezi ve Nano Drop/Thermo cihazı kullanılarak kalite ve sağlamlığı kontrol edilmiştir. Elde edilen RNA'nın saflığının A260/A280 oranının 1,9 – 2,1 arasında olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.11.2. DNaz muamelesi

Elde edilen RNA örneklerinin kalitesi belirlenip konsantrasyonu ölçüldükten sonra, DnazI enzimi kullanılarak örneklerde bulunan tek ve çift zincirli DNA fragmentleri ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Tablo 3.3' te verilen miktarlara göre reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. RNA örneklerine DNaz enzimi ile muamelesinde reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Miktar
RNA örnekleri	1 µg
10X Reaksiyon tampon	1 µl
MgCl ₂	1 µl
DNaz I enzimi	1 µl (1u)
DEPC ile muamele edilmiş su	10 µl tamamlanır.
37°C' de 30 dk inkübasyona bırakılır.	
50 mM EDTA	1 µl eklenir
65°C' de 10 dk inkübasyona bırakılır.	

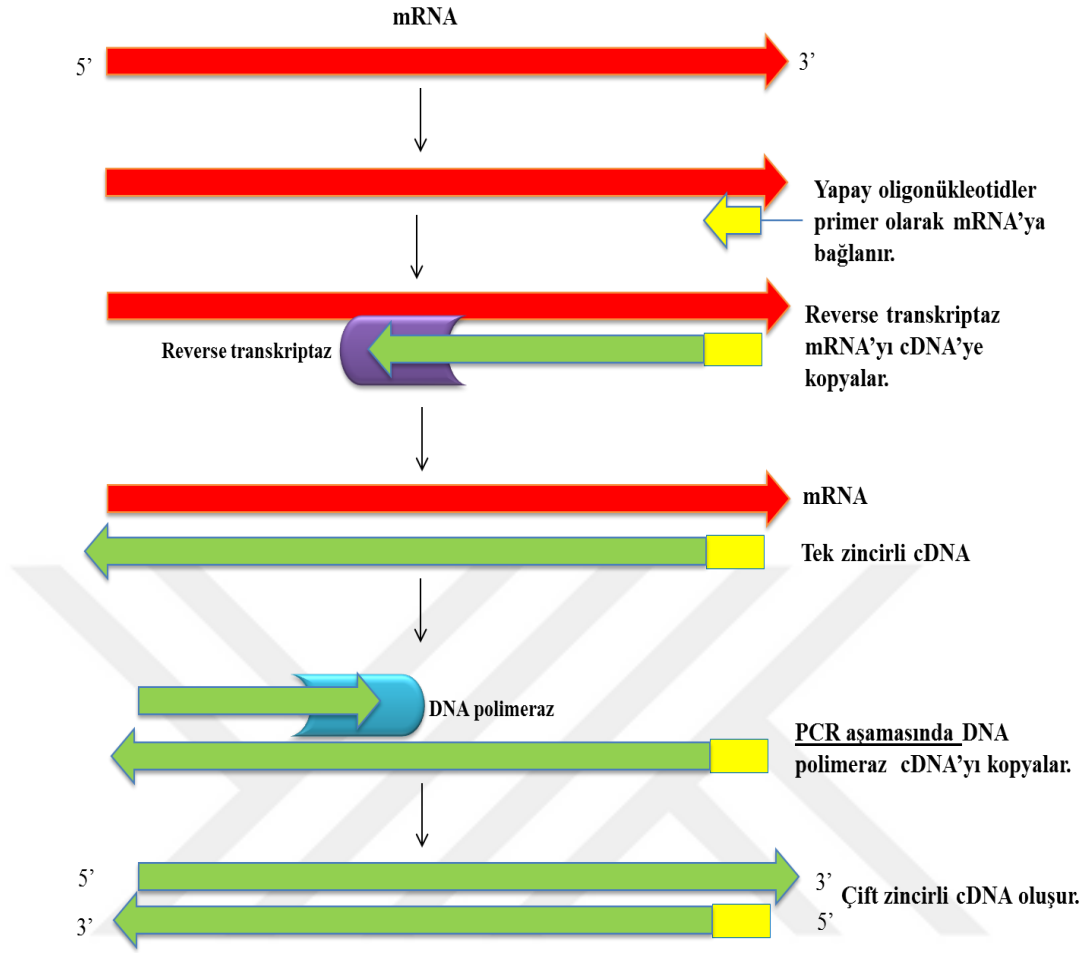
Tüm reaksiyonlardan sonra elde edilen RNA'nın konsantrasyonu ölçülerek bu değerlerle cDNA sentezine gidilmiştir. (Reaksiyondan bir gün önce DEPC'li su sterilize edilmiştir.)

% 0,1'lik DEPC su hazırlama

1 ml DEPC 1000 ml distile suda çözündükten sonra oda sıcaklığında 12 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonrasında 121°C 'da 20 dk otoklavlanmıştır.

3.2.11.3. cDNA sentezi (Komplementer DNA sentezi)

cDNA'nın sentezlenmesi işlemi, mRNA'dan reverse transkriptaz enzimi ile DNA kopyasının oluşturulmasıdır. Yapay oligonükleotitler, mRNA'ya bağlanarak tek zincirli yapay cDNA'yı oluştururlar. Ortama katılacak olan DNA, polimeraz ile tek zincirli formdan çift zincirli forma geçmektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. mRNA'dan cDNA sentezlenme aşaması (Tobin ve Dusheck, 2001)

cDNA sentezi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için ilk aşamada tablo 3.4 'te verilen miktarlar kullanılarak her örnek için ayrı nükleaz içermeyen steril tüplerde reaksiyon hazırlanmıştır.

Tablo 3.4. cDNA sentezinde I. aşamada kullanılan reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Total RNA	1 ile 5 µg arasında
Oligo dT primer	1 µl 50 pmol/µl
RNAze içermeyen su	Toplam hacim 12 µl olacak şekilde ayarlandı.

Reaksiyon hazırlama aşamalarının tümü buz içerisinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon hazırlandıktan sonra karışım 65°C'da 5 dk bekletilerek RNA'nın sekonder yapısı denatüre edilmiştir. Daha sonrasında bu karışım hemen buza alınarak

primerin bağlanması sağlanmıştır. cDNA sentezi için 2. aşamaya geçildiğinde tablo 3.5’ te verilen bileşenler önceden hazırladığımız 12 µl’ lik karışımımıza ilave edilmiştir. Örneklerimiz 42°C’da 1 saat, 70°C’da 5dk olmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. RT reaksiyonunda 42°C’de uzama, 70°C’da ise enzim inaktivasyonu sağlanması amaçlanmıştır.

Tablo 3.5. *cDNA sentezinde II. aşamada kullanılan reaksiyon bileşenleri*

Bileşenler	Miktar
5X Reaksiyon buffer	4 µl
RiboLock RNase inhibitör	1 µl
10 mM dNTP karışımı	2 µl
Revertaid M-MuLV RT	1 µl
Toplam karışım 20 µl olacak şekilde hazırlandı.	

İkinci zincir oluşumu cDNA’nın birinci zincir sentez karışımı uygun sıcaklıklarda primerlerin PZR’ da çoğaltılmasıyla elde edilmiştir. Agaroz jelde ve Nano Drop/Thermo cihazıyla oluşturulan iki zincirli cDNA’ ların kalite ve miktarları tayini yapılmıştır. Elde edilen cDNA’lar eş zamanlı PZR reaksiyonuna kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.11.4. Primer tasarlama

PZR ve eş zamanlı PZR (RT-PZR) analizinde transkriptom verisi sonuçlarına göre her bitki için iki *LEA* geni saptanarak, Primer 5 software programıyla saptanan *LEA* genleri için spesifik primerler tasarlanmıştır. Kavun ve karpuz için tasarlanan genler ve büyüklükleri Tablo 3.6 ve 3.7’ de verilmiştir. Bu çalışmada internal kontrol geni olarak 18SrRNA geni kullanılmıştır (Baloğlu vd., 2014). 18SrRNA geni primer dizileri (GenBank ID:X51542.1) Tablo 3.7’ de verilmiştir.

Tablo 3.6. *Cucumis melo* için tasarlanan PZR primer dizileri

Primer (5'→3')	Sekans	Bağlanma sıcaklığı (T _m)	Primer uzunluğu
<i>CmLEA 42</i> İleri Primer	GGCCGATGTCAGTGGGATTC	60,82°C	161 bç
<i>CmLEA 42</i> Geri Primer	GAATCAGCCCAGCGATCAGT	60,18°C	
<i>CmLEA 43</i> İleri Primer	CCAAGCTCAGCCTCTCACTC	60,11°C	293 bç
<i>CmLEA 43</i> Geri Primer	CTGACACATCGGCAGTCAGT	60,04°C	

Tablo 3.7. *Citrullus lanatus* için tasarlanan PZR primer ve kontrol gen dizileri

Primer (5'→3')	Sekans	Bağlanma sıcaklığı (Tm)	Primer uzunluğu
CILEA 46 İleri primer	ATTCCGTTGCAGAGCAGTCC	60,67°C	81 bç
CILEA 46 Geri primer	ATGGCCTTGAGTTCCGTAGG	59,46°C	
CILEA 48 İleri primer	GTCGAGGAGGGTGTTC AAGA	59,03°C	231 bç
CILEA 48 Geri primer	GGATCGGGTGAGTTTCTCCA	59,10°C	
18SrRNA geni primer dizileri (GenBank ID:X51542.1)			
5'-GTGACGGGTGACGGAGAATT-3'			
5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'			

3.2.11.5. Agaroz jel elektroforezi

Kullanılacağımız örneklerin konsantrasyonları ve çoğaltılan DNA büyüklükleri dikkate alınarak %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır.

Agaroz jel hazırlanışı

Beher içerisinde 2 gr agaroz tartılıp üzerine 100 ml 1X TAE buffer eklenmiş ve mikrodalga (Arçelik) fırında 900W 1-1,5 dk ısıtılmıştır. Hafifçe çalkalanarak homojenizasyonu sağlanmıştır. Boyanın jel içerisinde homojen bir şekilde dağılabilmesi için agaroz elle dokunulacak seviyeye kadar soğutulmuştur. 5 µL jel boyası (İntron Biotechnology) eklenmiştir. Tekrar çalkalama işlemi ile homojenizasyonu tamamlandıktan sonra elektroforez tankına aktarılmıştır. Vakit kaybetmeden taraklar yerleştirilmiştir. 15-20 dk sonra jel katılarak taraklar jelden uzaklaştırılmıştır. Böylelikle yüklemeye hazır bir jel elde edilmiştir.

1X TAE tamponun hazırlanışı

10X TAE tamponu Tablo 3.8' de verilenler kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonrasında 1/10 oranında dilüe edilerek jel hazırlamaya uygun hale getirilmiştir. (100 ml 10X TAE distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.)

Tablo 3.8. 10X TAE tamponun hazırlanışı

Bileşenler	Miktar
TRIS	48,5 gr
Glasiyal asetik asit	11,4 ml
EDTA	0,5M 20 ml (pH:8)
Toplam karışım 800 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözündürüldü ve 1000 ml'ye tamamlandı.	

EDTA hazırlanışı

100 ml distile su içerisinde 14,61 gr EDTA sıcak manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. Çözeltinin homojenizasyonu ve ph ayarlaması için çözeltiye NaOH peletleri eklenmiştir. Böylece çözelti berraklaşarak ph:8'e ayarlanmıştır.

Marker hazırlanışı

Örneklerimizdeki *LEA* genlerinin beklenen aralıkta çoğaltılıp çoğaltılmadığını belirlemek için Tablo 3.9' da verilen miktarlarda oluşturulan marker kullanılmıştır.

Tablo 3.9. *Marker protokolü*

Bileşenler	Miktar
DNA ladder	1 µl
6X loading	1 µl
Deiyonize su	4 µl
Toplamda 6 µl karışım elde edildi.	

3.2.11.6. PZR analizleri

Kavun ve karpuzdan elde edilen cDNA örnekleri Tablo 3.10'daki protokole uygun bir şekilde hazırlanarak optimizasyon yapılmıştır.

Tablo 3.10. *Optimizasyonda kullanılan PZR protokolü*

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
10X reaksiyon buffer	2 µl
dNTP	2 µl
MgCl ₂	3 µl
İleri Primer	1 µl
Geri Primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl
cDNA örneği	(100ng-500ng/1000ul olacak şekilde ayarlandı.)
Toplam reaksiyon 20 µl olacak şekilde steril distile su eklendi.	

Optimizasyon esnasında kullanılan PZR döngüsü aşamaları tablo 3.11’de verilmiştir.

Tablo 3.11. *Optimizasyonda kullanılan PZR döngüsü aşamaları*

Basamaklar	Uygulanan Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
İlk denatürasyon aşaması	95°C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon	95°C	1 dk	35 döngü
Annealing (birleşme)	LEA genleri için optimize edilen sıcaklıklar	1 dk	
Extension (uzama)	72°C	1 dk	
Son uzama	72°C	7 dk	1 döngü

LEA genlerinin optimizasyonu aşamasında Thermal Cycler Isı bloğu (Fotoğraf 3.3) kullanılarak PZR deneyleri yapılmıştır.



Fotoğraf 3.3. Thermal Cycler Isı bloğu (URL-24, 2016)

Elde edilen PZR ürünü, %1’lik agaroz jelde 110 Volt hızla 30-40 dk yürütülerek UV ışığı altında Quantum ST5 cihazı (Vilber Lourmat, France) yardımıyla görüntülenmiştir (Fotoğraf 3.4).



Fotoğraf 3.4. Jel Görüntüleme Sistemi Quantum ST5 (URL-25, 2016)

3.2.12. Eş Zamanlı PZR Analizleri

Primerlerin T_m değerlerine göre uygun RT-PZR koşulları belirlenerek optimize edilmiştir. Her aşamada örnekleme üç kere tekrar yapılmıştır. Eş zamanlı PZR’de kullanılan çalışma programı Tablo 3.12’de verilmiştir.

Tablo 3.12. Eş zamanlı PZR Programı

Program						
Program		Döngü		Analiz modu		
Program Adı	Sıcaklık	Edinim modu	Döngü sayısı	Bekleme süresi (hh:mm:ss)	Sürme Oranı	
Denatürasyon	95°C	Yok	1	00:05:00	4,8	-
Amplifikasyon I	95°C	Yok	45	00:00:10	4,8	-
Amp. II (T_m)	60°C	Yok		00:00:20	2,5	Miktar tayini
Amplifikasyon III	72°C	Tek		00:00:10	4,8	-
Erime I	95°C	Yok	1	00:00:05	-	Erime
Erime II	65°C	Yok		00:60:00	-	-
Erime III	97°C	Devamlı		-	-	-
Soğutma	40°C	Yok	1	00:00:10	0,11	Yok

Light Cycler 480 II (Roche) (Fotoğraf 3.5) cihazıyla SYBR Green I Master boyası kullanılarak RT-PZR deneylerine devam edilmiştir.



Fotoğraf 3.5. Eş zamanlı PZR cihazı (URL-26, 2015)

Eş zamanlı PZR analizi sonuçlarına göre analiz edilen her gen için, kuraklık stresi uygulanan örnekler ve kontrol örneklerine ait pik profilleri saptanmıştır. Bu pik profillerinden yola çıkılarak C_t (Cycle Threshold) değerleri elde edilmiştir. Eş zamanlı PZR analizinde normalizasyon için çeşitli koşullarda ekspresyonunun değişmediği bilinen ya da en az etkilenen bir referans gen kullanılmaktadır (Bustin, 2002; Yüzbaşıoğlu, 2008). Referans olarak 18S rRNA'nın gen ifadesi alınıp bağıl gen ifadesi hesaplanmıştır.

ΔCT (3.2), $\Delta\Delta CT$ (3.3) değerleri hesaplanıp, gen ifadesi seviyesindeki farklılık $2^{\Delta\Delta CT}$ olarak hesaplanmıştır. $\Delta\Delta CT$ (3.3) değeri, stres uygulanan örnekten kontrol örneğinin değeri çıkarılarak elde edilmiştir.

$$\Delta CT = CT_{\text{ÖRNEK}} - CT_{\text{REFERANS}} , \text{ (Baloğlu vd, 2014)} \quad (3.2)$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{STRES}} - \Delta CT_{\text{KONTROL(0.SAAT)}} , \text{ (Baloğlu vd, 2014)} \quad (3.3)$$

Bu çalışmada kavunda *CmLEA-42* ile *CmLEA-43*, karpuzda ise *CILEA-46* ile *CILEA-48* genleri için alınan bitki yaprak ve kök örneklerinde ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

3.2.13. İstatistiksel Analizler

Farklı sürelerde kuraklık stresi uygulanmış kavunda *CmLEA-42*, *43* ve karpuzda *CILEA-46*, *48* genlerine ait ekspresyon profilleri, kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır.

Gen ifade seviyesindeki değişiklikler, her zaman koşulu için 3 tekrara (replikeye) ait Ct değerleri ile bu replikelere ait kontrol Ct değerlerine zaman faktörü dikkate alınarak uygulanan tek yönlü ANOVA testine göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Stres verilmiş örnekler ile kontrol örnekleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak analizinde ise Student T testi kullanılmıştır. P değeri $< 0,01$ ise ilgili *LEA* genindeki ekspresyon farklılığının anlamlı olduğu varsayılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Kavunda *LEA* Genlerinin Belirlenmesi ve Analizleri

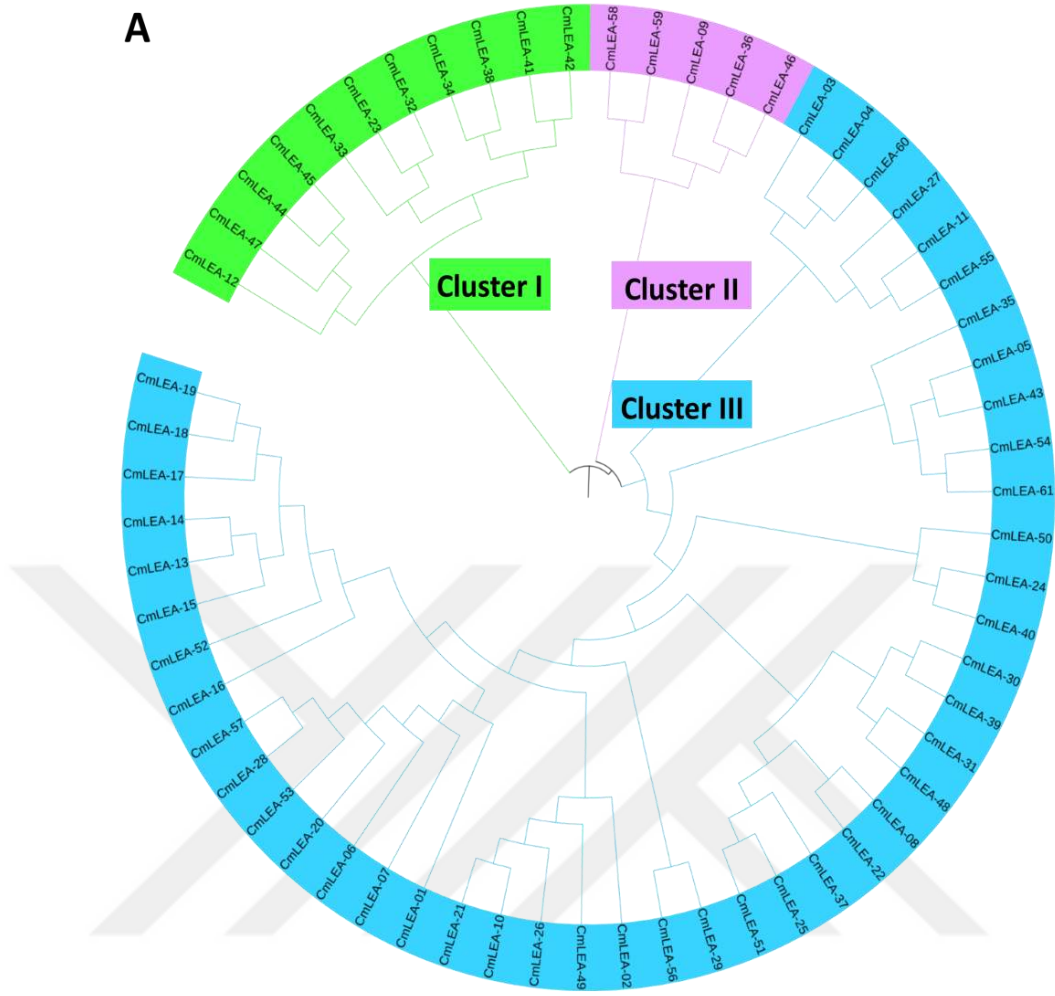
4.1.1. *CmLEA* Genlerinin Biyoinformatik Analizleri

Biyoinformatik analizler sonucunda kavun genomunda 61 adet *LEA* protein ailesi üyesi tespit edilmiştir. Kavunda belirlenen *LEA* proteinleri *CmLEA* olarak adlandırılmıştır. Kavuna ait *LEA* proteinlerinin izoelektronik etki değeri (pI), moleküler ağırlıkları ve değişkenlik durumları saptanmıştır. Elde edilen veriler ek 2’de verilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen *CmLEA* proteinlerinin 14 üyesi bazik (pH>7), 47 üyesi asidik (pH<7) özelliktedir. *CmLEA* proteinlerinin en küçük üyesi 64 aa içermekteyken belirlenen en büyük *LEA* proteini 464 aa içermektedir. *CmLEA* proteinlerinin moleküler ağırlıkları kıyaslandığında ise 6795,4 Da ile 51242 Da arasında değişmektedir. Bu proteinlerin 29 üyesi kararsız, 32 üyesi ise kararlı yapıdadır.

Kavun genomunda *LEA* genlerinin kromozomal yerleşimleri scaffold seviyesinde olduğu için kromozomal dağılımlar elde edilememiştir.

4.1.2. Filogenetik Analizler

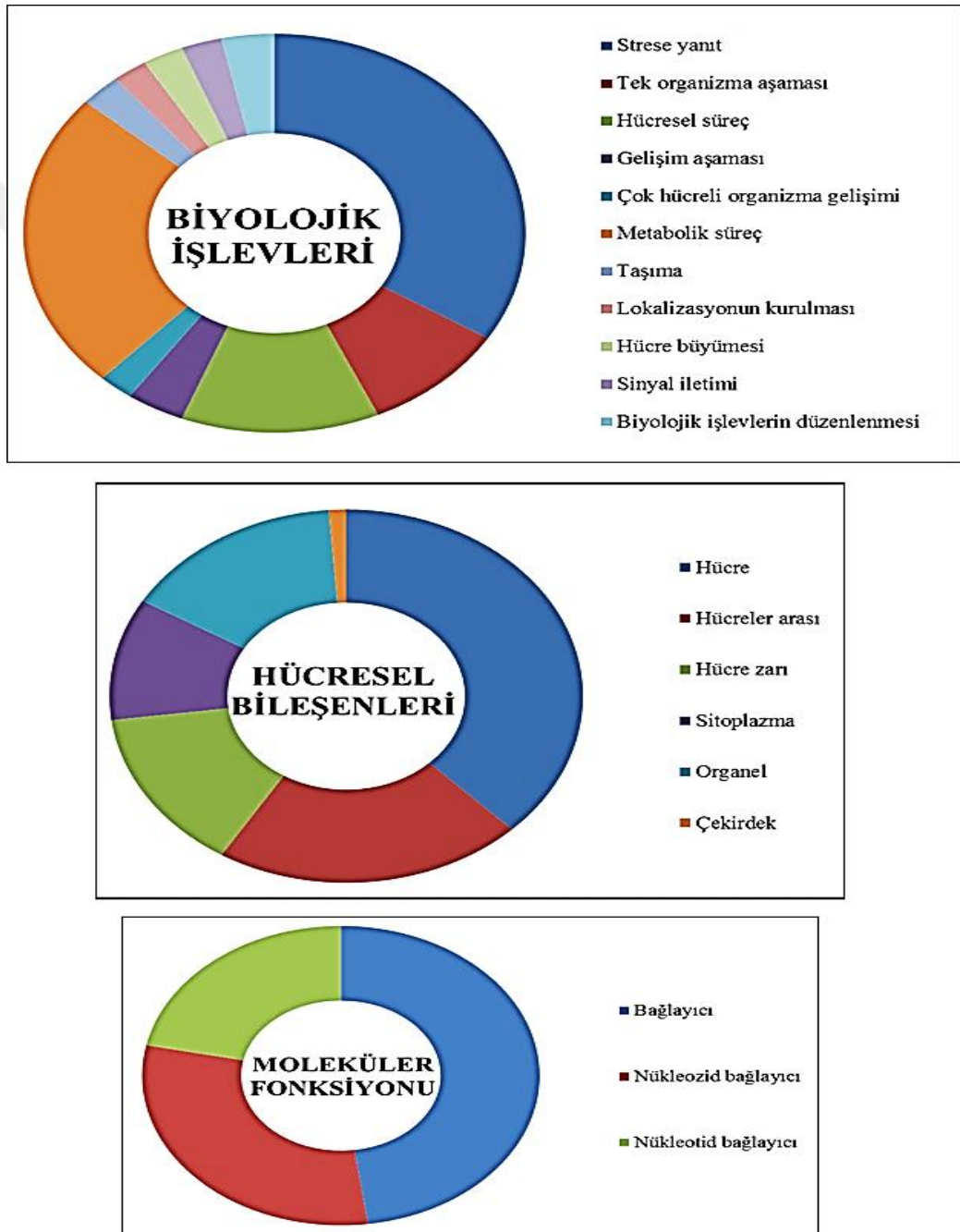
Kavun *CmLEA* genleri için oluşturulan filogenetik ağaç şekil 4.1’ de verilmiştir. *CmLEA* genlerine ait filogenetik ağaçta 3 ana sınıf oluşmuş, bunlar da kendi arasında dallanmıştır. Pfam’daki sınıflandırmaya göre kavunda genellikle grup 2 *LEA* proteinleri görev almaktadır. Sınıf III’ de (mavi renk ile gösterilmiş) 4 protein haricinde (*CmLEA*-4-11-54-60) geri kalanın *LEA*2 grup proteinlerden oluştuğu tespit edilmiştir. Tohum olgunlaşma proteini (SMP) grubuna ait *LEA* proteinlerinin (*CmLEA*-23-32-33), *LEA*3 (*CmLEA*-34-38) ve *LEA*4 (*CmLEA*-12) grup proteinlerin Sınıf I’de (yeşil renk ile gösterilmiş) toplanmış olduğu, *LEA*5 grup proteinlerin (*CmLEA*-58-59) ise Sınıf II’de (mor renk ile gösterilmiş) toplandığı görülmüştür. Bununla birlikte dehidrin grubundaki *LEA* proteinleri (36-46-60) ise Sınıf II ve Sınıf III’ e dağılmış vaziyettedir.



Şekil 4.1. *CmLEA* genlerinin filogenetik ağacı

Ayrıca filogenetik ağacın güvenilirliğini test etmek için *CmLEA* proteinlerinin motif kompozisyonları incelenmiştir. MEME veritabanı kullanılarak 61 adet *CmLEA* proteini için 10 farklı motif belirlenmiştir. Aminoasitlerin korunmuş motifleri ek 3'te gösterilmektedir. LEA4 grubuna dahil olan *CmLEA* 12, LEA5 grubuna dahil olan *CmLEA* 58, 59 ve SMP grubuna ait olan *CmLEA* 23, 32, 33 yalnızca motif 10'u içermektedir. LEA3 grubuna dahil olan *CmLEA* 09' da motif bulunamamıştır. *CmLEA* 11, 41, 44, 45, 47, 60'ta yalnızca motif 9 gözlenmiştir. *CmLEA* 44 ile 45 aynı motif varlığından dolayı benzerdir. *CmLEA* 18, 19, 16, 52, 31, 25, 51, 48, 40, 24, 07, 37, 22, 08 motif 1, 2, 3, 4 ve 5'i içerdikleri için yapıları benzerdir. *CmLEA* 09 sadece motif 6 barındırmaktadır (Ek 4).

Kavun bitkisi için tanımlanan *LEA* genlerine ait biyolojik işlev, hücresel lokalizasyon ve moleküler fonksiyon analizleri Blast2GO programı kullanılarak yapılmıştır. Analiz sonuçları şekil 4.2’ de verilmiştir. *LEA* proteinlerinin lokalizasyonu çoğunlukla en fazla hücre içi ve membranlar olduğu gözlemlenirken, biyolojik fonksiyonda çoğunlukla strese cevap, moleküler fonksiyon da ise çoğunlukla bağlanma fonksiyonu olduğu görülmektedir.



Şekil 4.2. *CmLEA* genlerinin Blast2GO yardımıyla elde edilen fonksiyonel analizleri

Gen duplikasyon olayları, gen ailelerinin dağılımında önemli rol oynamaktadır. (Mehan vd., 2004). Bu açıdan bakıldığında kromozomlarda tandem ve segmental duplikasyonlar belirlenmiştir. Kavun bitkisinde elde edilen verilerde 20 *LEA* geninin (% 32) duplikasyon gösterdiği görülmüştür. Kavun genomunun diğer türlerle olan ortolog gen analizleri sonucunda; %63 ile soyada en yüksek oranda, %11 ile çeltikte en düşük oranda ortolog gen barındırmaktadır. Elde edilen veriler kavun için Tablo 4.1’ de verilmiştir. Ayrıca diğer türlerdeki *CmLEA* ortolog genlerin; Arabidopsiste 15 çift, soyada 39 çift, çeltikte 7 çift, kavakta 26 çift, patatest 20 çift, üzümde 15 çift, mısırd 9 çift olduğu saptanmıştır (Ek 7).

Tablo 4.1. Kavun ile ortolog gen ilişkisi olan türler ve oranları

Türler	Ortolog genlerin oranları
<i>Arabidopsis thaliana</i>	% 24
<i>Glycine max</i>	% 63
<i>Oryza sativa</i>	% 11
<i>Populus trichocarpa</i>	% 42
<i>Solanum tuberosum</i>	% 32
<i>Vitis vinifera</i>	% 24
<i>Zea mays</i>	% 14

LEA gen ailesinin anlaşılabilmesi için kavunda genlerin duplikasyon ve ayrımlarında Darwin’in pozitif seçilim ilişkileri göz önüne alınmıştır. İncelemeler ve hesaplamalar sonucunda (K_a) benzerlik göstermeyenler ile benzerlik (K_s) oranları (K_a/K_s) hesaplanmıştır.

Kavunda *CmLEA* genlerinden duplikasyon gösteren 14 çift kavun *LEA* geni için K_a/K_s oranları ortalaması 0,136’dır (Ek 5). Bu değişimlerin 2 ile 550 milyon yıl önce gerçekleşmiş olabileceği varsayılmaktadır. Kavunda *CmLEA* genlerinin ortolog gen ilişkilerine bakıldığında K_s/K_a oranı Arabidopsis’de, soyada, çeltikte, kavakta, patatest, asmada ve mısırd 0,06- 0,081- 0,02- 0,07- 0,14- 6,65 ve 0,03 ortalaması bulunmuştur (Ek 6). Genlerin ayrılma zamanları karşılaştırıldığı zaman ise en geç ayrılmanın ortalama olarak 240 MYÖ ile çeltikte *LEA* genleri ile olduğu gözlenmiştir. Bunu 235 MYÖ ile mısır, 164 MYÖ ile Arabidopsis, 111 MYÖ ile

patates, 94 MYÖ ile asma, 88 MYÖ ile soya ve 51 MYÖ ile kavak bitkisinin takip ettiği görülmüştür (Ek 6).

İnternet üzerinden hizmet sunan Phyre2 biyoinformatik aracıyla kavun bitkisi LEA proteinleri için homoloji modellemesi yapılmıştır. Bu analizler sonucunda 6 adet CmLEA proteininin (CmLEA-40, 42, 47, 15, 13, 09) PDB (Protein Data Base)'de homolojilerin yüksek olduğu görülmüştür. Modellenme yüzdesi >90% güven düzeyinde 72'den 99'a kadar değişiklik gösteren oranlar tespit edilmiştir (Tablo 4.2). LEA proteinlerinin ikincil yapıları genellikle β tabakalı yapıları olduğu görülürken, CmLEA-47'de yalnızca α -heliks yapı görülmüştür.

Tablo 4.2 Kavunda tanımlanan LEA proteinlerinin benzerlik yüzdesi

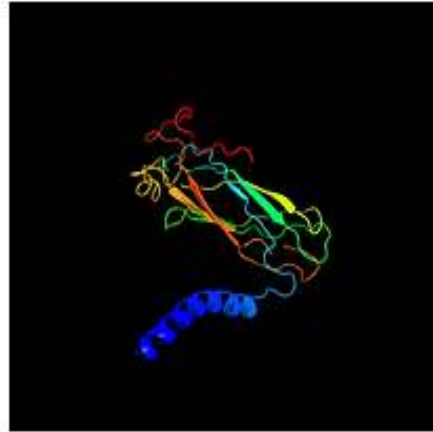
Protein ismi	PDB benzerlik oranları
CmLEA-40	72%
CmLEA-42	77%
CmLEA-47	95%
CmLEA-15	78%
CmLEA-13	76%
CmLEA-09	99%

Benzerlikleri %70'den fazla olduğu tespit edilen LEA proteinlerine ilişkin modellemeler şekil 4.3'de verilmiştir.

CmLEA-09



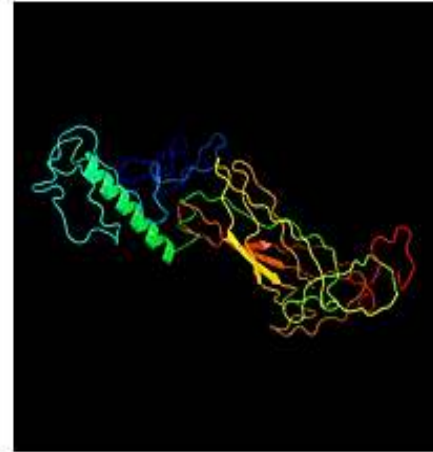
CmLEA-13



CmLEA-15



CmLEA-40



CmLEA-42



CmLEA-47



Şekil 4.3. CmLEA proteinlerinin üç boyutlu tahmini yapısı

4.1.3. CmLEA Hedef Genlerinin miRNA Analizleri

Bitkiler biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kaldığında, hedef genin ifadesinin baskılanmasında miRNA'ları da kullanılmaktadırlar. (Bartel, 2004; Ambros ve Chen, 2007; Khraiwesh vd., 2012; Unver ve Budak, 2009). miRNA'lar, gen sessizleştirme mekanizmasında müdahaleci RNA'ya (RNAi = RNA interference) dayalı, kodlanmayan düzenleyici küçük RNA'lardır (Bodur ve Demirpençe 2010; Xin vd., 2010).

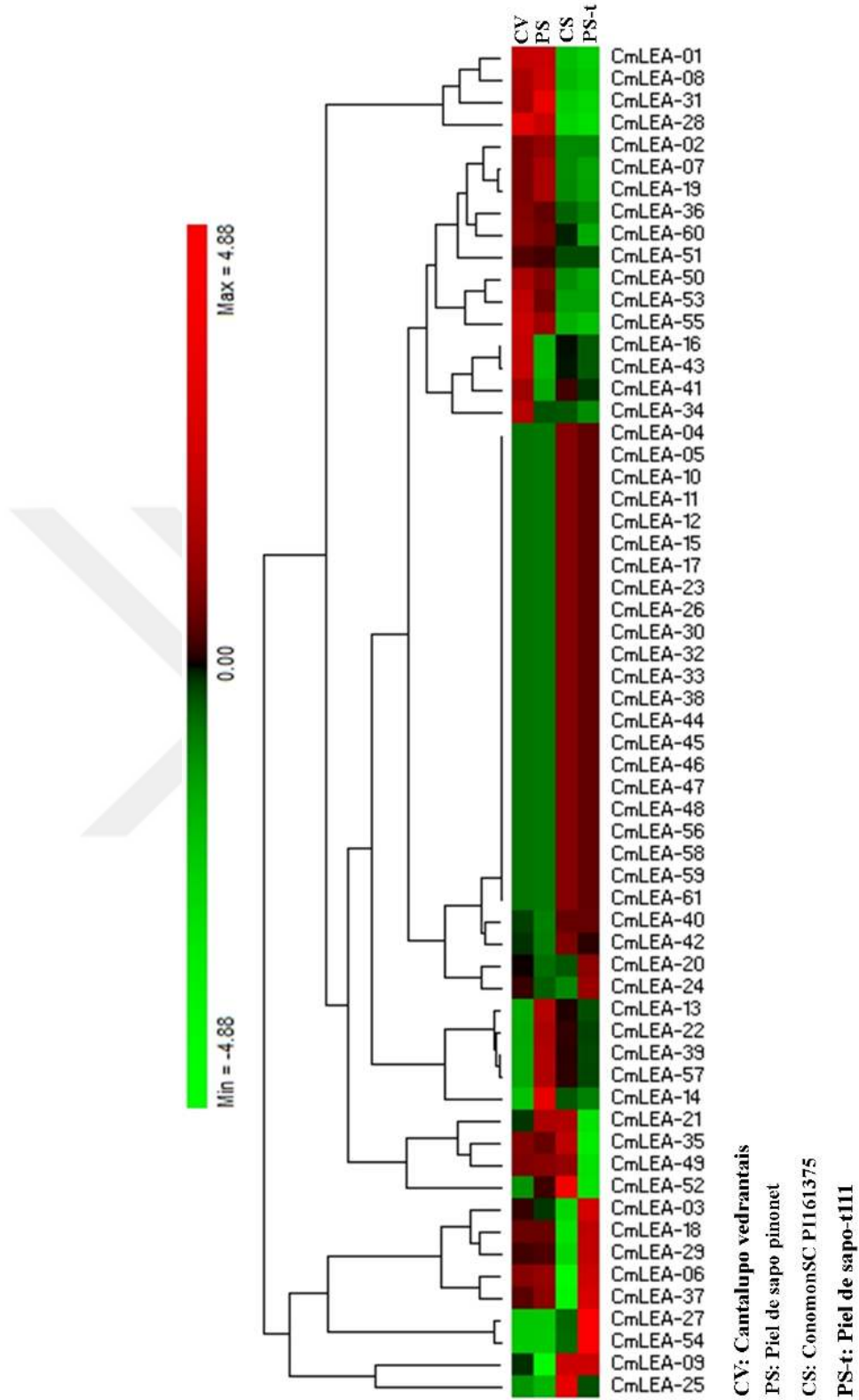
Hedef genlerin tanımlanması işleminde iki parametre kullanılmaktadır.

- İlk parametre threshold skorudur. Bu skorun kabul edilebilirliği en yüksek 3,0 değeridir. Daha yüksek değerler ise göz ardı edilmektedir.
- İkinci parametre ise UPE değeri kullanılmaktadır. Bu değer maksimum enerji değeri olup hedef bölgedeki sekonder yapıların açılması için gereklidir.

Bitki küçük RNA hedef genlerinin hesaplandığı veri tabanından (psRNATarget:A Plant Small RNA Target Analysis Server) hangi genin hedeflendiği belirlenmiştir. Sonuç olarak; kavun bitkisi için yapılan analizlerde 21 farklı miRNA tarafından 21 *CmLEA* (*CmLEA*-03, 04, 10, 16, 18, 19, 20, 26, 27, 29, 30, 35, 37, 40, 41, 48, 49, 52, 55, 56, 60) geninin hedeflendiği belirlenmiştir.

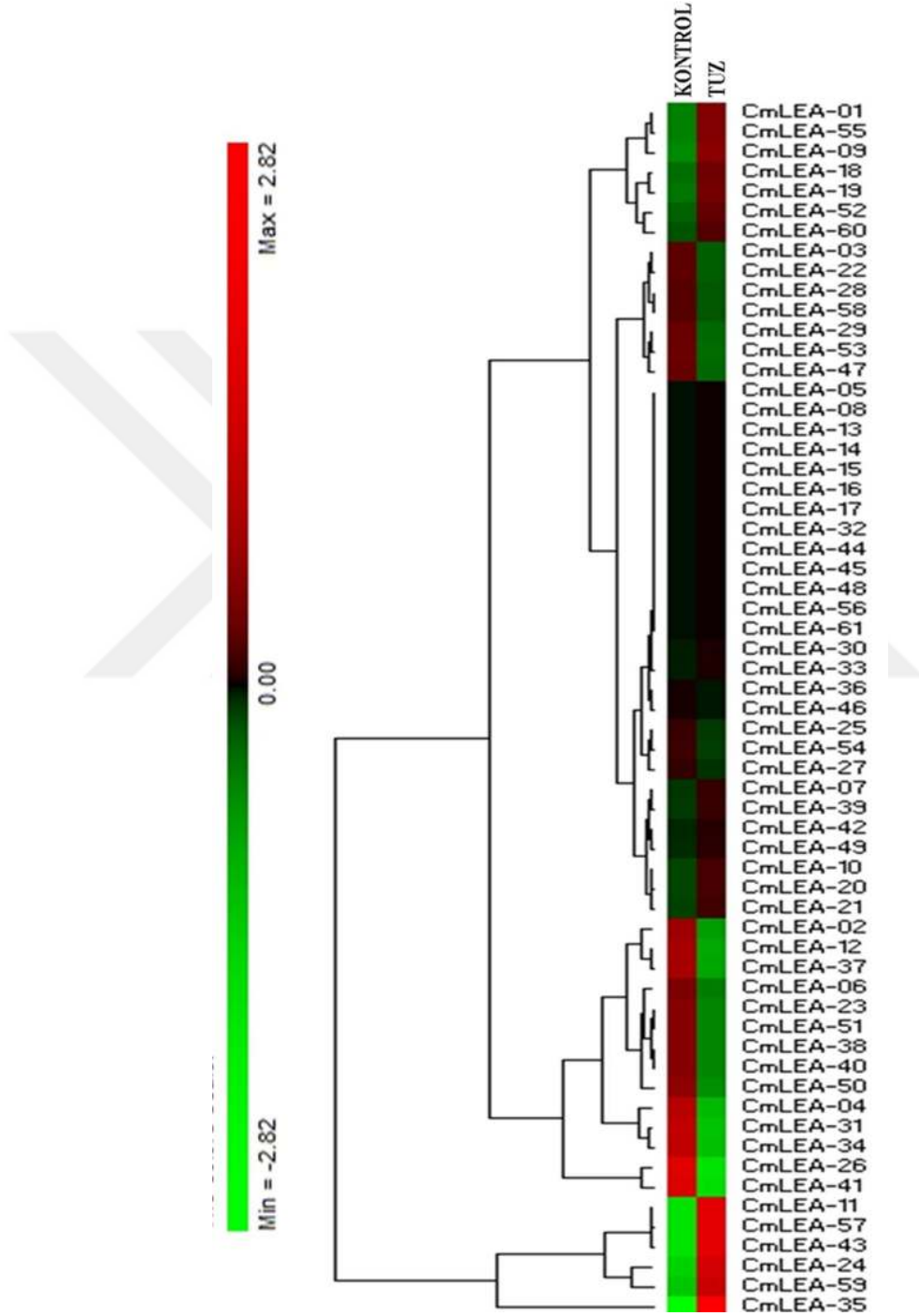
4.1.4. CmLEA Genlerinin Transkriptom Analizi

Kavunda SRA veri tabanından elde edilen farklı kavun çeşitlerinin transkriptom verileri ile tuz stresi altında transkriptom verileri analiz edilmiştir (Şekil 4.4). Bu sonuçlara göre Cantalupo vedrantaïs ve Piel de sapo pinonet çeşitlerinde diğer iki çeşite göre (Conomon SC ve Piel de sapo-t111); *CmLEA*-1-2-7-8-19-28-31-36-50-51-53-55 ve 60'ın gen ifade seviyelerinin arttığı, bunun tam tersi olarak *CmLEA*-4-5-10-11-12-15-17-23-26-30-32-33-38-40-42-44-45-46-47-48-56-58 ve 61'in gen ifadesinin ise Conomon SC ve Piel de sapo-t111 çeşitlerinde diğer iki çeşide göre (Cantalupo vedrantaïs ve Piel de sapo pinonet) arttığı saptanmıştır.



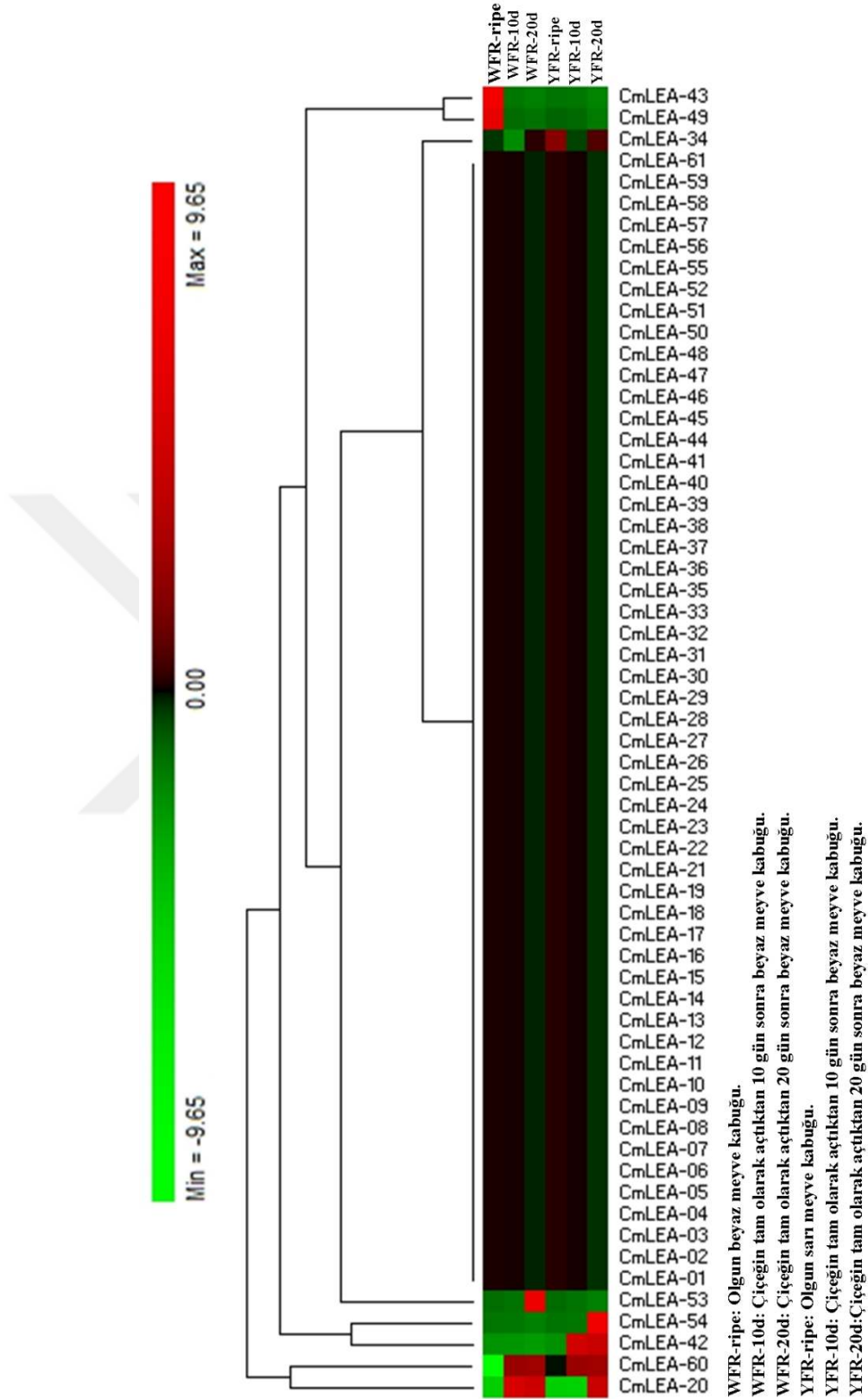
Şekil 4.4. *CmLEA* genleri için Cantalupo vedrantais ve Piel de sapo pinonet çeşitlerinin Conomon SC ve Piel de sapo-t111 ile transkriptom veri analizlerinin karşılaştırılması

Tuz stresi verileri incelendiğinde ise *CmLEA*-2-3-4-6-12-22-23-25-26-27-28-29-31-34-37-38-40-41-47-50-51-53-54-58'in tuz stresi altında ifadelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. *CmLEA*-1-7-9-10-11-18-19-20-21-24-30-35-39-43-52-55-57-59-60'in da tuz stresi sonucu ifadelerinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kontrol ve tuz stresi altındaki *Cucumis melo*'da *CmLEA* genlerinin transkriptom veri analizi

Diğer bir transkriptom analizinde ise *CmLEA* genlerinin olgun beyaz meyve kabuğu ve çiçek açtıktan sonraki 10. ve 20. gündeki gen ifadesi karşılaştırılmıştır. Olgun beyaz meyve kabuğunda ve çiçek açtıktan 10 gün sonraki meyve kabuğunda *CmLEA-61-59-58-57-56-55-52-51-50-48-47-46-45-44-41-40-39-38-37-36-35-33-32-31-30-29-28-27-26-25-24-23-22-21-19-18-17-16-15-14-13-12-11-10-09-08-07-05-04-03-02-01* genleri ifade edilmezken 20. gündeki beyaz meyve kabuğunda bu genlerin ifadesi azalmaktadır. Bu genler sarı meyvede aynı şekilde ifade olunurken olgun meyve kabuğundaki ifadesi yok denecek kadar azdır. *CmLEA-43* ve *49* genlerinin beyaz meyve kabuğundaki ifadesi artarken diğer günlerdeki ifadesi azalır. Olgun sarı meyve dokularında ise genellikle ekspresyon seviyesi düşüktür. *CmLEA-20* ve *60* geninin ifadesi olgun beyaz meyve kabuğunda düşerken, çiçek açtıktan 10 ve 20 gün sonraki meyve kabuğunda ifadesinin artmakta olduğu gözlemlendi. *CmLEA-20* geninin olgun sarı meyve kabuğunda ve çiçek açtıktan 10 gün sonraki meyve kabuğunda ise ifadesi düşerken sadece 20. günde ifadesi artmaktadır. *CmLEA-60* geninin ifadesi sarı meyvenin kabuğunda görülmezken, 10. ve 20. gündeki meyve kabuğunda artmaktadır. *CmLEA-42*, *54* geni olgun beyaz meyve kabuğunda ve çiçek açtıktan 10 ve 20 gün sonra gen ifadesi azalır. Sarı meyve kabuğunda ise *CmLEA-42* geninin ifadesi azalırken, çiçek açtıktan 10 ve 20 gün sonra artmaktadır. *CmLEA-54* geninin ise sarı meyve kabuğunda sadece 20. günde ifadesi artmaktadır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Olgun beyaz ve sarı meyve kabuğu ile çiçek açtıktan sonra 10 ve 20. günlerindeki beyaz ve sarı meyve kabuğundaki *CmLEA* genlerinin transkriptom veri analizlerinin karşılaştırılması

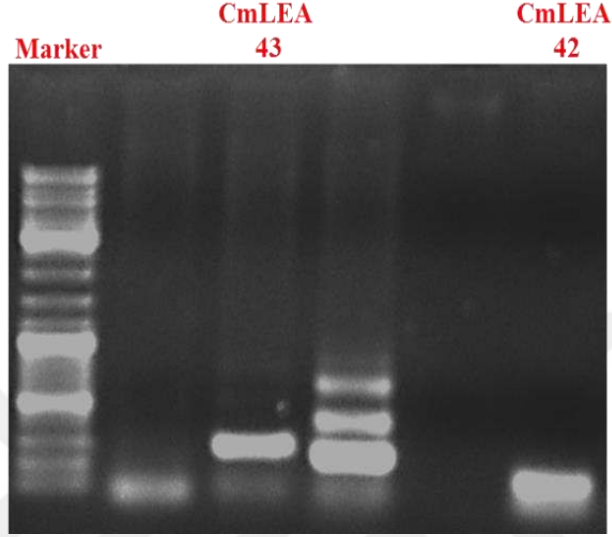
4.1.5. LEA Genlerinin Kuraklık Stresi Altında Gen İfade Analizleri

Kavun örneklerinden elde edilen RNA miktarının (ng/μl) yeterli, saflıklarının da (A260/A280) istenilen aralıklarda olduğu saptanmıştır. Elde edilen spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 4.1’ de verilmiştir.

Tablo 4.1. *Kavun (Cucumis melo) yaprak ve kök örneklerine ait RNA’ların spektrofotometrik ölçümleri*

Örnek adı	ng/μl	A260/A280
Kavun 1.set yaprak 0. saat	4907	2,1
Kavun 1.set yaprak 3. saat	625	2,1
Kavun 1.set yaprak 12. saat	2250	1,9
Kavun 1.set yaprak 24. saat	1087	1,9
Kavun 2.set yaprak 0. saat	837	1,9
Kavun 2.set yaprak 3. saat	882	1,9
Kavun 2.set yaprak 12. saat	980	1,9
Kavun 2.set yaprak 24. saat	4000	1,9
Kavun 3.set yaprak 0. saat	1953	1,9
Kavun 3.set yaprak 3. saat	2425	1,9
Kavun 3.set yaprak 12. saat	2695	1,9
Kavun 3.set yaprak 24. saat	1852	1,9
Kavun 1.set kök 0. saat	2335	2,1
Kavun 1.set kök 3. saat	5720	2,1
Kavun 1.set kök 12. saat	4235	2,1
Kavun 1.set kök 24. saat	6055	2,1
Kavun 2.set kök 0. saat	2010	1,9
Kavun 2.set kök 3. saat	1525	2,1
Kavun 2.set kök 12. saat	2080	2,1
Kavun 2.set kök 24. saat	4635	1,9
Kavun 3.set kök 0. saat	1816	2,0
Kavun 3.set kök 3. saat	2270	2,0
Kavun 3.set kök 12. saat	2208	2,0
Kavun 3.set kök 24. saat	1300	2,1

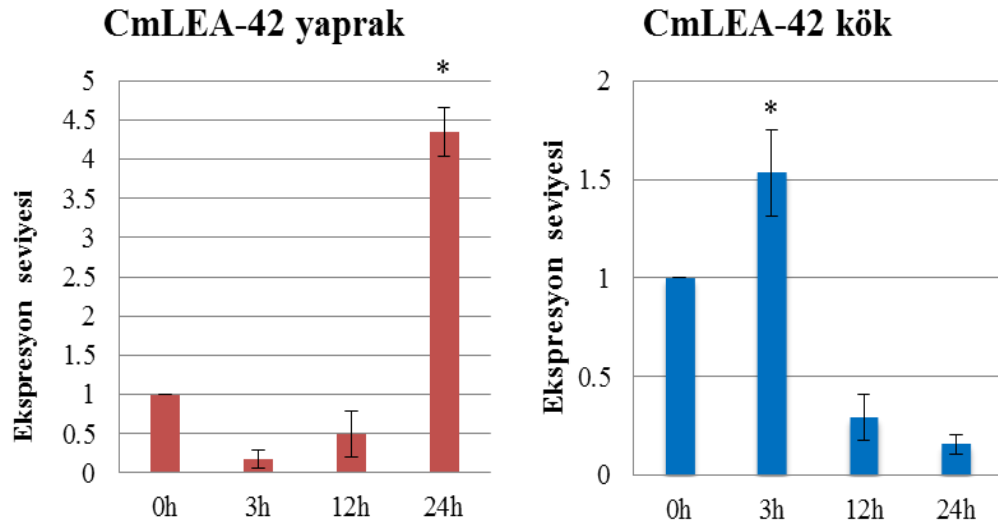
Kavunun RNA örnekleri 200 ng olacak şekilde hesaplanarak cDNA sentezi yapılmıştır. Kavun bitkisi için *CmLEA*-42 geninin optimizasyonu 62°C’da, *CmLEA*-43 geninin ise optimizasyonu 60°C’da sağlanmıştır. Optimizasyonu sağlanan genlerin jel görüntüsü şekil 4.7’ de verilmiştir.



Şekil 4.7. *CmLEA* 42 ve *CmLEA* 43 geninin agaroz jel görüntüsü

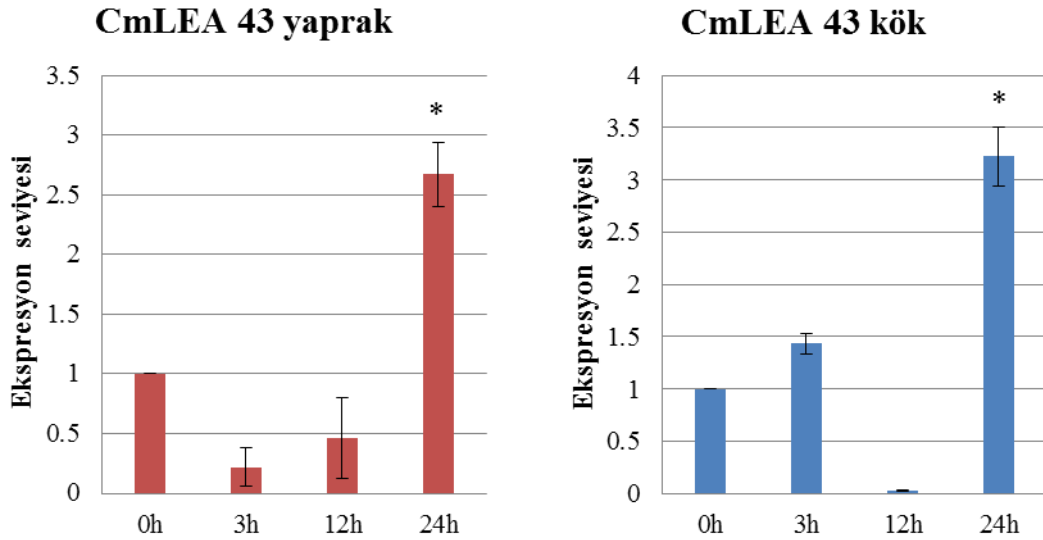
Kavun bitkisinde kuraklığa karşı LEA genlerinin cevaplarının anlaşılabilmesi için, kök ve yaprak dokularında seçilen genler qRT-PZR ile incelenmiştir. Bu genler için amplifikasyon ve erime eğrileri çizilmiştir (Ek 24, Ek 25). Bu amaç doğrultusunda seçilen *CmLEA*-42 ve *CmLEA*-43 genin ifade profilleri incelenerek transkriptom verisi ile karşılaştırılmıştır.

Kavun bitkisi için seçilen *CmLEA*-42 geninin yaprak dokusundaki gen ifadesi 3. ve 12. saatte normal seviyenin altına düşerken 24. saatte maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Aynı genin kavun bitkisinin kök dokusunda ekspresyonu 3. saatte artarken, 12. ve 24. saatte normal seviyenin altına düşmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *CmLEA 42* geninin kuraklık stresi altındaki yaprak ve kök dokusunda zamana bağlı gen ifade seviyesi

Kavunda çalışılan diğer bir gen ise *CmLEA-43*'tür. Bu gen kuraklık stresi altında yaprak dokusunda 3. ve 12. saatte normal şartlar altındaki seviyenin altına inerken, 24. saatte gen ifadesi maksimum seviyelere ulaşmaktadır. Kök dokusunda ise bu gen farklı bir şekilde 3. ve 24. saatte artarken, 12. saatteki ifadesi oldukça düşük bir seviyede gerçekleşmektedir (Şekil 4.9).



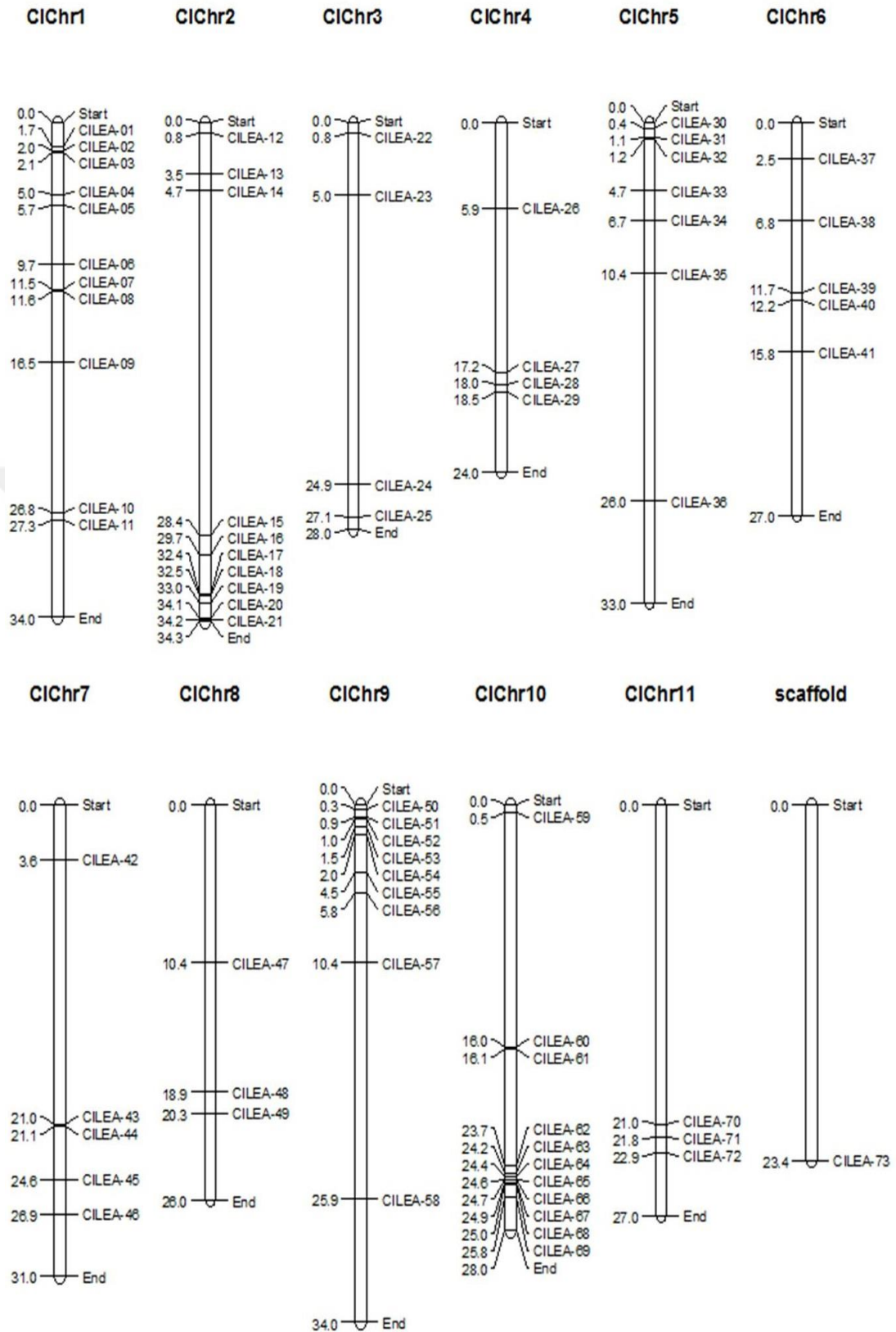
Şekil 4.9. *CmLEA 43* geninin kuraklık stresi altındaki yaprak ve kök dokusunda zamana bağlı gen ifade seviyesi

4.2. Karpuzda *LEA* Genlerinin Belirlenmesi ve Analizleri

4.2.1. *CILEA* Genlerinin Biyoinformatik Analizleri

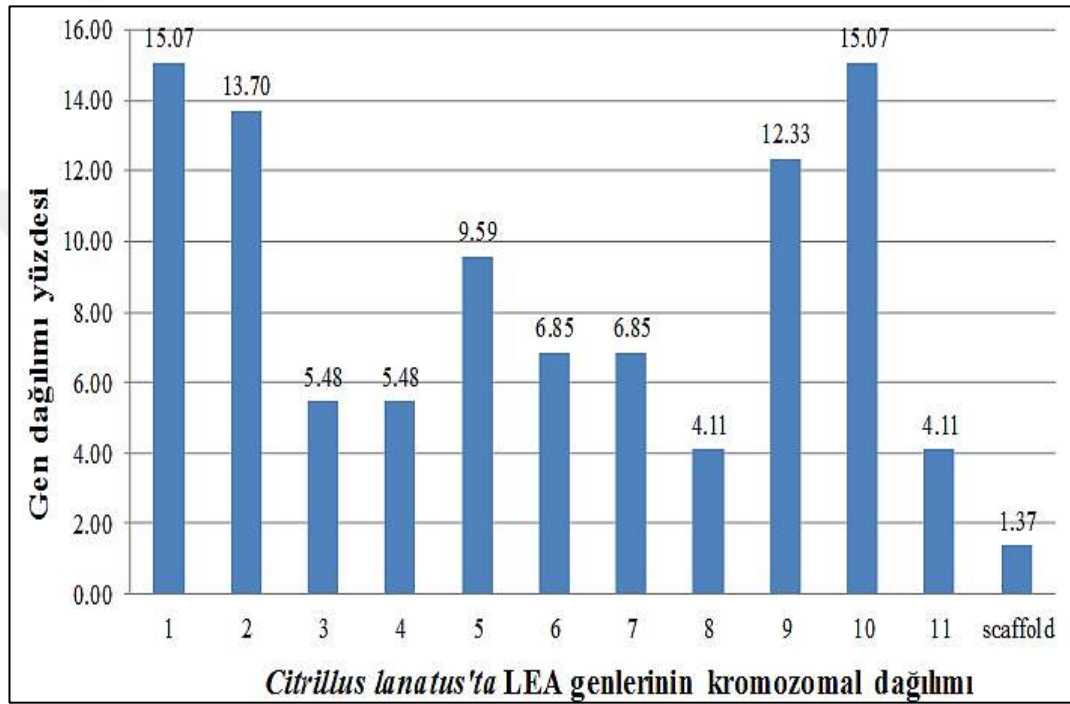
Biyoinformatik taramalar sonucunda karpuz genomuna ait 73 adet *LEA* protein ailesi üyesi tespit edilmiştir. Karpuzda belirlenen *LEA* genleri *CILEA* olarak adlandırılmıştır. Karpuz *LEA* genlerinin izoelektronik etki değeri (pI), moleküler ağırlıkları ve değişkenlik durumları saptanmıştır (Ek 10). Analizler sonucunda elde edilen *CILEA* proteinlerinin 48 üyesi bazik (pH>7), 25 üyesi asidik (pH<7) özelliktedir. Karpuzda ait *LEA* genlerinin aminoasit içerikleri 64 ile 1162 arasında değişirken molekül ağırlıklarının 6779,4 ile 129808,3 Da arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinlerin 35 üyesi kararsız, 38 üyesi ise kararlı yapıdadır.

Karpuzda 11 adet kromozom bulunmaktadır. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda karpuz (*Citrullus lanatus*)’da tanımlanan *LEA* genlerinin kromozomal yerleşimi şekil 4.10’ da verilmiştir. *CILEA* genlerinin 1., 5. ve 9. kromozom üzerinde sıklıkla üst bölgelerde konumlandığı görülürken 2., 7., 10. ve 11. kromozomda ise genellikle alt bölgelerde yerleşim göstermektedir. Ayrıca kavun ve karpuzda *LEA* gen ailesi üyelerine ait genomik sekanslar, veri tabanında henüz yüklü olmadığından ekzon ve intron bölgesi analizleri gerçekleştirilememiştir.



Şekil 4.10. Karpuz (*Citrullus lanatus*)’da tanımlanan LEA genlerinin kromozomal yerleşimi

Karpuzda *CILEA* genleri, kromozomların tamamına dağılmış vaziyettedir. Karpuz kromozomları arasında en çok *CILEA* genine sahip olan kromozom 1 (%15) ve 10 (%15)' dur. Bu kromozomlar 11 *CILEA* genine sahiptirler. En az *CILEA* genine sahip olan karpuz kromozomları ise 8. (%4.1) ve 11. (%4.1) kromozomlardır (Şekil 4.11). İki kromozomda içerisinde 3'er adet *CILEA* geni barındırmaktadır. Scaffold seviyesinde de 1 adet *LEA* geni tespit edilmiştir.

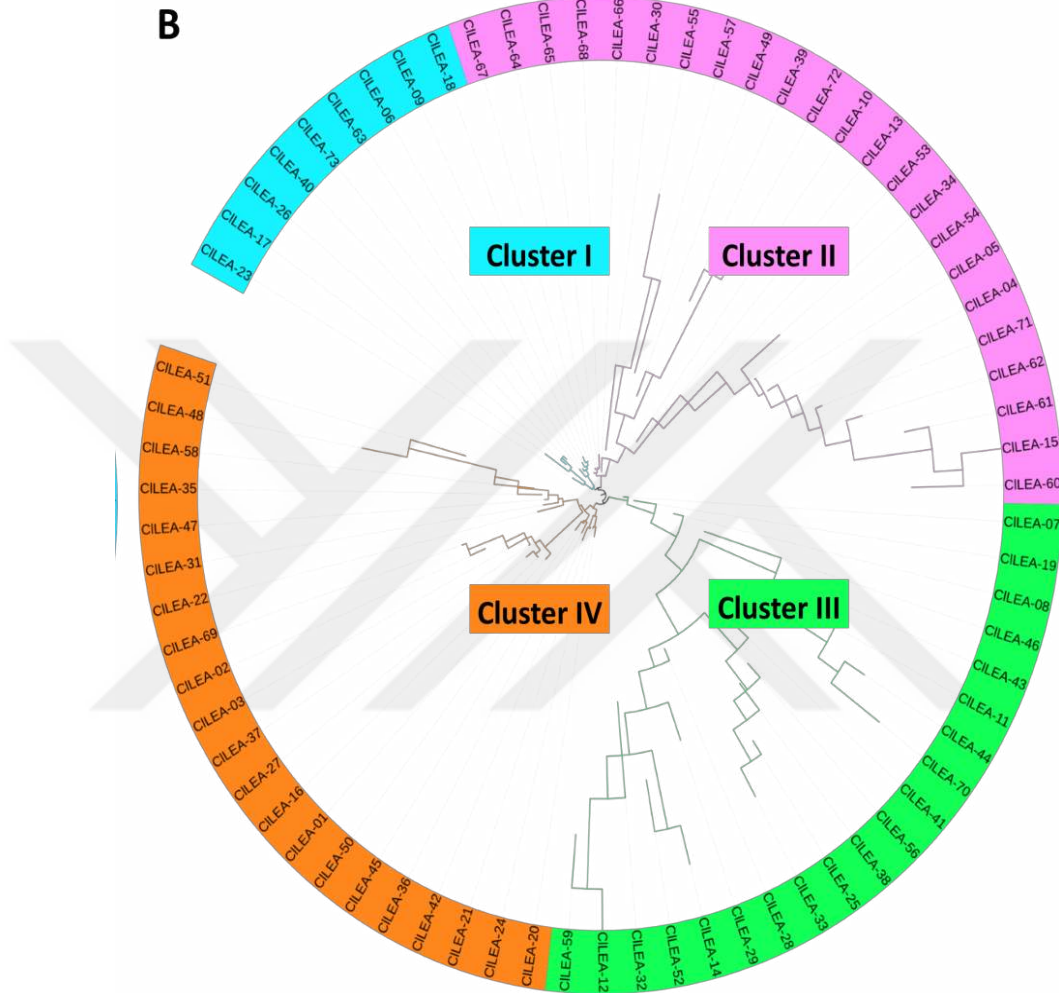


Şekil 4.11. *Citrillus lanatus*'ta *LEA* genlerinin kromozomdaki dağılım yüzdesi

4.2.2. Filogenetik Analizler

Karpuz bitkisinde bulunan *LEA* genlerine ait filogenetik ağaç şekil 4.12' de verilmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaç 4 ana sınıftan oluşmaktadır. Pfam'daki sınıflandırmaya göre karpuzda da sıklıkla grup 2 *LEA* proteinleri bulunduğu saptanmıştır. Tohum olgunlaşma proteini (SMP) (CILEA-25-33-38-56), *LEA* 5 grup proteinleri (CILEA-28-29) ve *LEA*6 grup proteinlerinin (CILEA-11-70) yalnızca Sınıf III'de (yeşil renk ile gösterilmiş) toplandığı belirlenmiştir. *LEA*3 grubuna ait olduğu belirlenen 4 proteinden 3 tanesinin (CILEA-55-60-61) Sınıf II' de (mor renk ile gösterilmiş), bir tanesinin (CILEA-52) ise Sınıf III' de olduğu görülmüştür. *LEA*4 grubuna ait olduğu belirlenen tek bir proteinin de (CILEA-69) Sınıf IV' de (turuncu

renk ile gösterilmiş) yer almaktadır. Dehidrin grubuna ait LEA proteinlerinin ise Sınıf II (CILEA-72), Sınıf III (CILEA-14-43-44) ve Sınıf IV (CILEA-48)’e dağıldığı görülmüştür. Her sınıfta grup 2 LEA proteinlerine rastlanılmıştır.

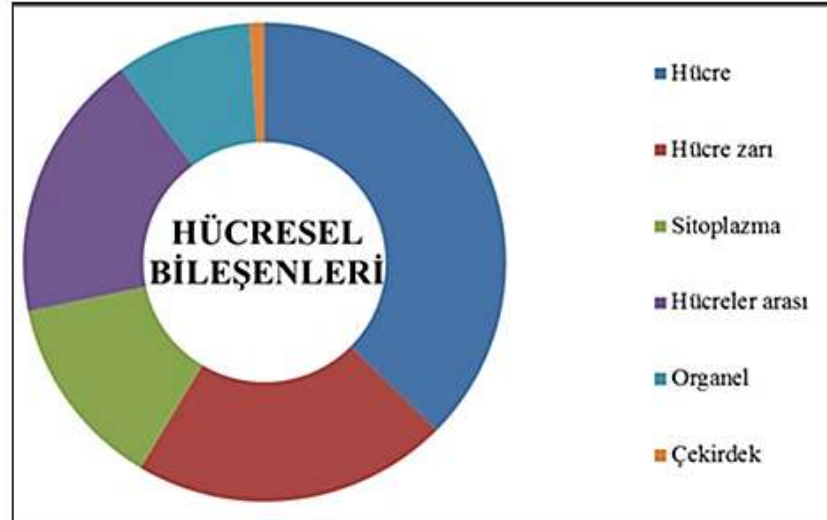
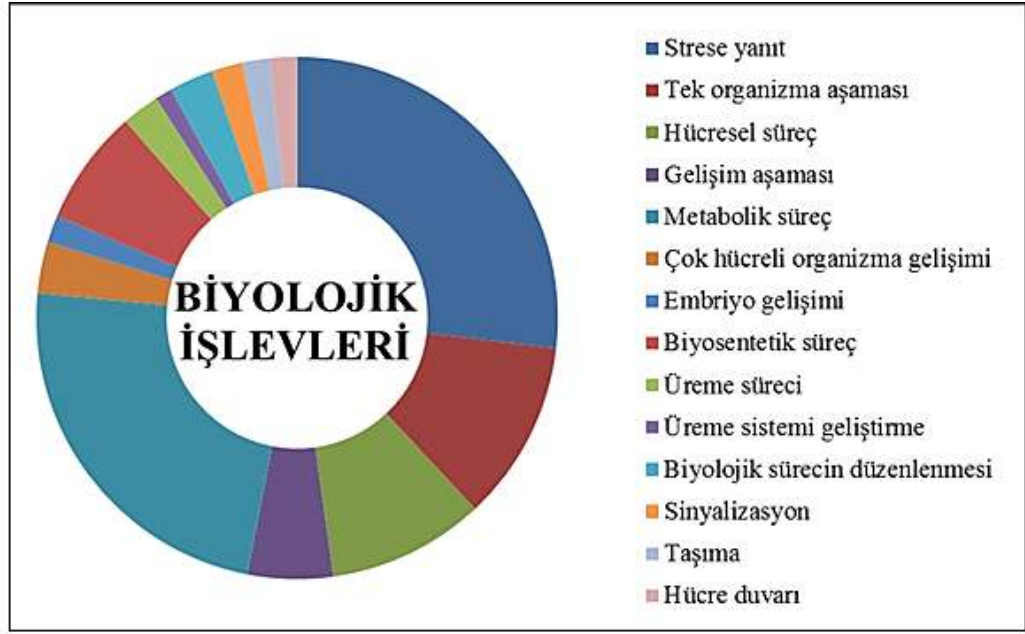


Şekil 4.12. *CILEA* genlerinin filogenetik ağacı

Karpuzda yapılan motif analizinde ise 73 karpuz CILEA proteininde yer alan 10 farklı motif belirlenmiştir. Aminoasitlerin korunmuş motifleri ek 17’de gösterilmektedir. LEA3 grubuna ait olan CILEA-52, 55, 60, 61 ile LEA5 grubuna ait olan CILEA-28 ve 29 sadece motif 10’u içermektedir. LEA4 grubuna ait olan CILEA-69 sadece motif 6’yı barındırmaktadır. SMP grubuna ait olan proteinler ise CILEA-33 hariç CILEA-25, 38 ve 56 sadece motif 5’i içermektedir. CILEA-33 aynı zamanda motif 8’i içermektedir. CILEA-04, 05, 15, 26, 48, 54, 59, 62, 69, 71 sadece motif 6’yı içermektedir. CILEA-04, 05, 71 aynı motifleri içerdiği için yapıları

oldukça benzerdir. CILEA-09, 21, 24, 30, 36, 42, 45, 47, 50, 64, 65 ve 67 yapılarında motif 1, 2, 3, 4, 8'i içermektedir. CILEA-32 hiçbir motif içermemektedir (Ek 18).

Karpuz için tanımlanan *LEA* genlerine ait biyolojik işlev, hücrel lokalizasyon ve moleküler fonksiyon analizleri Blast2GO (URL-15, 2015) programı kullanılarak Go analizi ile yapılmıştır. Analiz sonuçları şekil 4.13' te verilmiştir. Karpuz bitkisi için tanımlanan *CILEA* genlerinin analizinde ise hücrel yerleşimine ilişkin 6 kategori belirlenmiştir. Bunlardan en çok bulunma yerlerinin hücre ve membranda olduğu tespit edilmiştir. Proteinlerin biyolojik işlevlerine bakıldığında ise 10 kategori arasında en fazla strese yanıt ve metabolik süreçte görev aldığı, moleküler fonksiyonun ise en fazla bağlanma etkinliği olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.13. *CILEA* genlerinin Blast2GO yardımıyla elde edilen fonksiyonel analizleri

Karpuzdaki ortolog gen ilişkileri *Arabidopsis thaliana* ile Ek 11' de, soya ile Ek 12' de, kavak ile Ek 13' te, patates ile Ek 14'te, üzüm ile Ek 15'te, mısırdaki Ek 16'da verilmiştir.

LEA gen ailesinin anlaşılabilmesi için kavun ve karpuzda genlerin duplikasyon ve ayrımlarında Darwin'in pozitif seçim ilişkileri göz önüne alınmıştır. İncelemeler ve hesaplamalar sonucunda (K_a) benzerlik göstermeyenler ile benzerlik (K_s) oranları (K_a/K_s) hesaplanmıştır. Karpuz bitkisi için duplikasyon sonuçlarına bakıldığında *CILEA* genlerinde yaklaşık olarak 20 çiftinde segmental duplikasyon (%27,3), 7 çiftinde ise tandem duplikasyon (%9,5) olduğu belirlenmiştir (Ek 21).

Biyoinformatik analizler sonucunda tandem duplikasyon gösteren *CILEA* genlerinde K_a/K_s oranları ortalama olarak 0,20'dir. Bu değişimlerin 3 ile 437 milyon yıl önce gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir (Ek 19). Segmental duplikasyon gösteren *CILEA* genleri için ise K_a/K_s oranları ortalama 0,07 iken, bu değişimlerin 10 ile 600 MYÖ gerçekleşmiş olabileceği varsayılmaktadır. Karpuzda *CILEA* genlerinin ortolog ilişkileri incelendiğinde K_s/K_a oranı *Arabidopsis*'de, soyada, çeltikte, kavakta, patatest, asmada ve mısırdaki sırasıyla 0,05- 0,09- 0,05- 0,15- 0,13- 0,07 ve 0,04 ortalamasını vermiştir. Genlerin ayrılma zamanları karşılaştırıldığında ise en erken ayrılmanın ortalama 237 MYÖ ile mısır *LEA* genleri ile olduğu gözlenmiştir. Bunu 197 MYÖ ile *Arabidopsis*, 196 MYÖ ile çeltik, 137 MYÖ ile soya, 96 MYÖ ile asma, 90 MYÖ ile patates ve 84 MYÖ ile kavak takip etmektedir (Ek 20).

Karpuz genomunun diğer türlerle olan ortolog gen analizleri sonucunda ise; %67 ile soyada en yüksek oranda, %9,5 ile çeltikte en düşük oranda ortolog gen barındırmaktadır (Tablo 4.2). Ayrıca diğer türlerdeki *CILEA* ortolog genleri; *Arabidopsis*'te 26 çift, soyada 49 çift, çeltikte 7 çift, kavakta 52 çift, patatest 30 çift, üzümde 15 çift, mısırdaki ise 11 çift olduğu saptanmıştır (Ek 21).

Tablo 4.2. Karpuz ile ortolog gen ilişkisi olan türler ve oranları

Türler	Ortolog genlerin oranları
<i>Arabidopsis thaliana</i>	% 35
<i>Glycine max</i>	% 67
<i>Oryza sativa</i>	% 9,5
<i>Populus trichocarpa</i>	% 71
<i>Solanum tuberosum</i>	% 41
<i>Vitis vinifera</i>	% 20
<i>Zea mays</i>	% 15

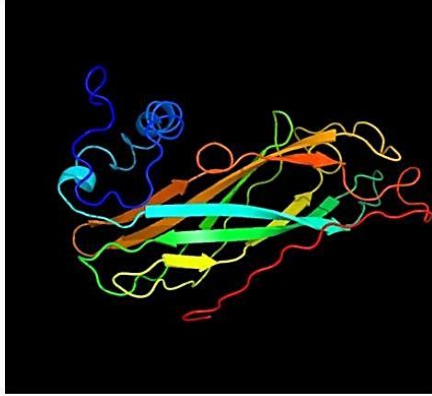
Karpuz için yapılan homoloji modelleme analizlerinde ise 7 adet CILEA proteini (CILEA-18, 31, 32, 37, 41, 54, 58) yüksek homoloji göstermiş ve modellenme yüzdesi >90% güven düzeyinde 73'den 99'a kadar değişiklik gösteren oranlar görülmüştür (Tablo 4.3). Kavunda olduğu gibi karpuzda da baskın yapının β tabakalı yapılar olduğu belirlenmiştir. CILEA-54'de yalnızca α -heliks yapı saptanmıştır.

Tablo 4.3. Karpuzda tanımlanan LEA proteinlerinin benzerlik yüzdesi

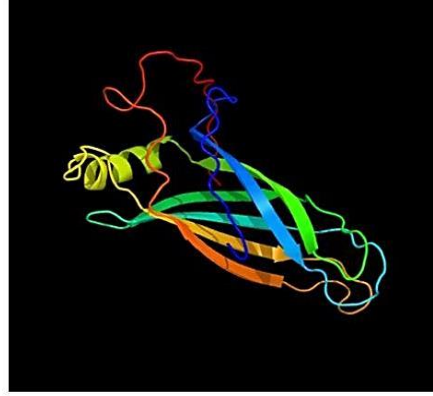
Protein ismi	PDB benzerlik oranları
CILEA-18	%73
CILEA-31	%81
CILEA-32	%99
CILEA-37	%82
CILEA-41	%94
CILEA-54	%74
CILEA-58	%83

Benzerlikleri %70'den fazla olduğu tespit edilen LEA proteinlerine ilişkin modellemeler şekil 4.14'te verilmiştir.

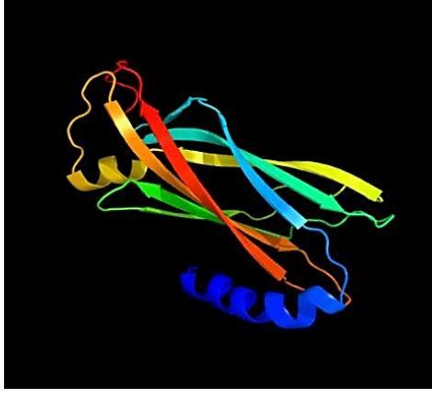
CILEA-18



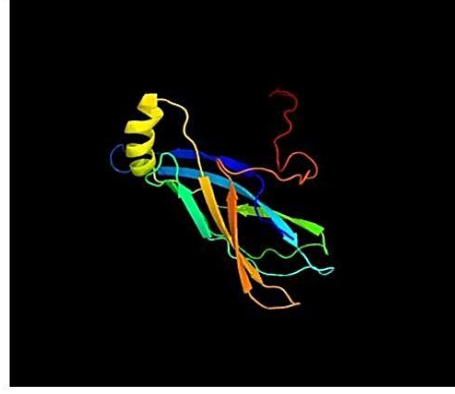
CILEA-31



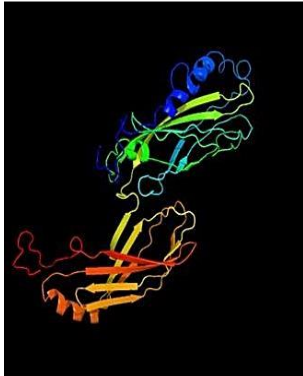
CILEA-32



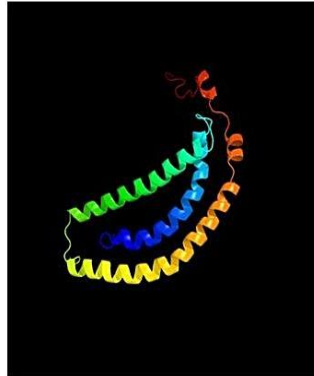
CILEA-37



CILEA-41



CILEA-54



CILEA-58



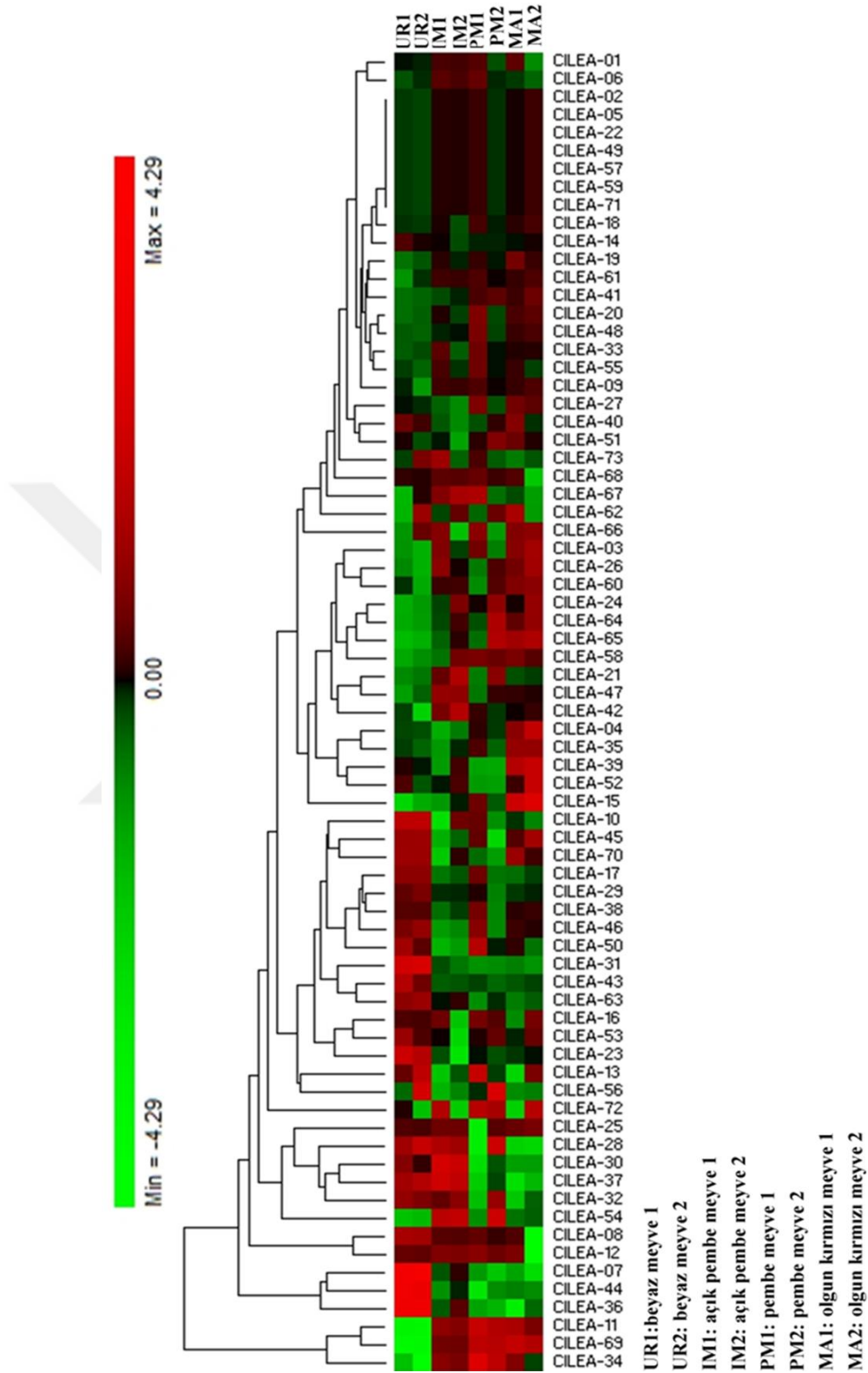
Şekil 4.14. CILEA proteinlerinin üç boyutlu yapısı

4.2.3. *CILEA* Hedef Genlerinin miRNA Analizleri

psRNATarget veri tabanından (A Plant Small RNA Target Analysis Server) bitki küçük RNA hedef genleri saptanmıştır. Sonuç olarak karpuzda 22 farklı miRNA tarafından 21 *CILEA* (*CILEA*-06, 10 11, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 33, 38, 39, 42, 45, 46, 52, 58, 63, 64, 67, 72) geninin hedeflendiği görülmüştür.

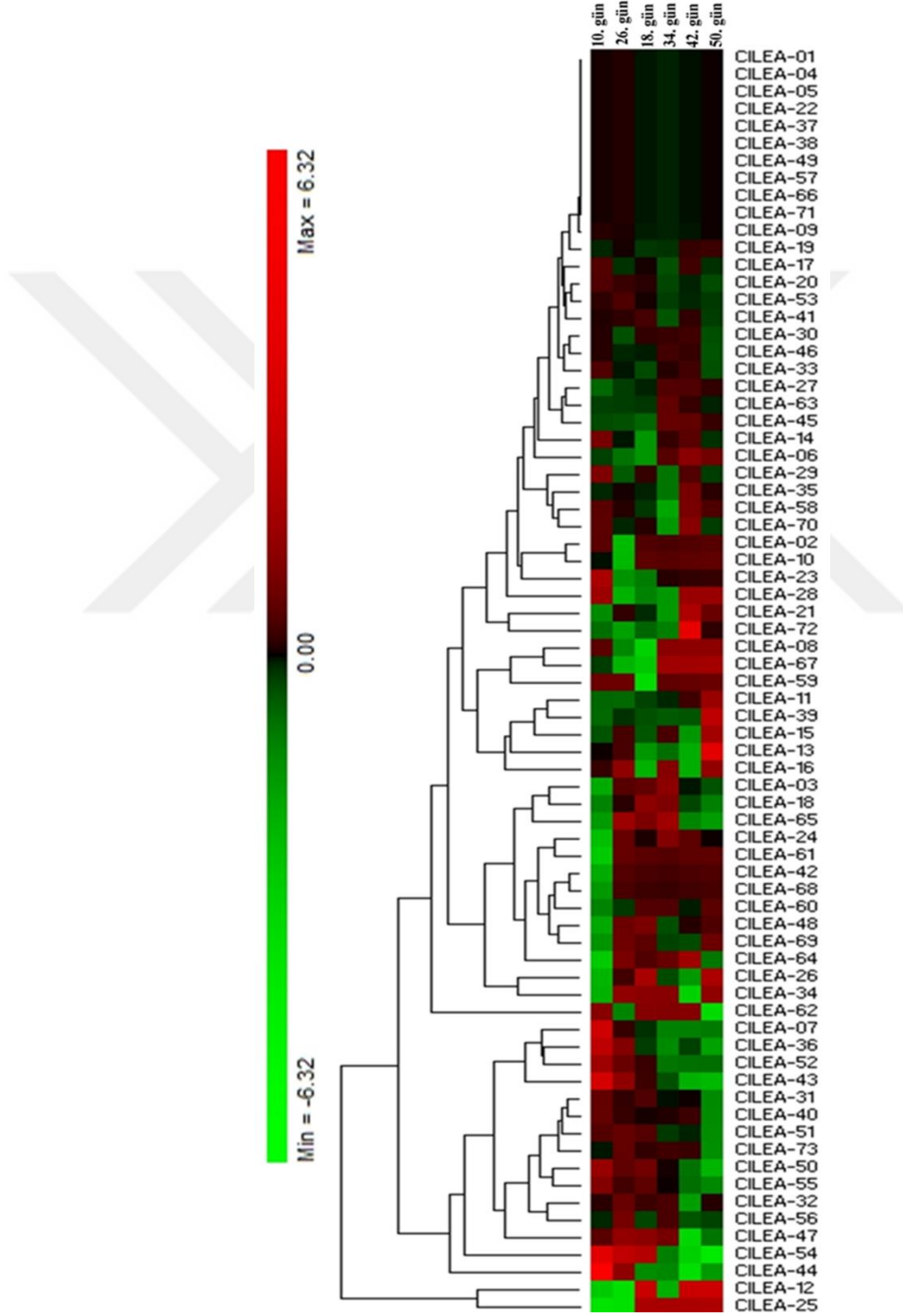
4.2.4. *CILEA* Genlerinin Transkriptom Analizi

Karpuz için SRA veri tabanından döllenenmeden sonra meyve dokularında ve floem ile vasküler dokular arasındaki transkriptom analizine ait veriler elde edilmiştir. Bu analizler sonucunda 10 günlük beyaz meyve aşamasında *CILEA*-7, *CILEA*-36 ve *CILEA*-44'ün gen ifadesi artarken, diğer 18 günlük açık pembe meyve, 28 günlük pembe meyve ve 34 günlük olgun kırmızı meyve aşamalarında ise azalmaktadır. Bununla beraber *CILEA*-10-13-16-17-23-29-31-38-43-45-46-50-53-63 ve 70'in de 10 günlük beyaz meyve aşamasında gen ifadesinin artma yönünde bir eğilimi olduğu diğer aşamalarda azaldığı görülmüştür. Bunun tam tersine *CILEA*-11-34 ve 69'un 10 günlük beyaz meyve safhasında gen ifadesinin azaldığı fakat diğer safhalarda arttığı saptanmıştır. *CILEA*-8-12 ve 68, 34'ün günlük olgun kırmızı meyve aşaması dışında diğer aşamalarda arttığı görülmüştür (Şekil 4.15).



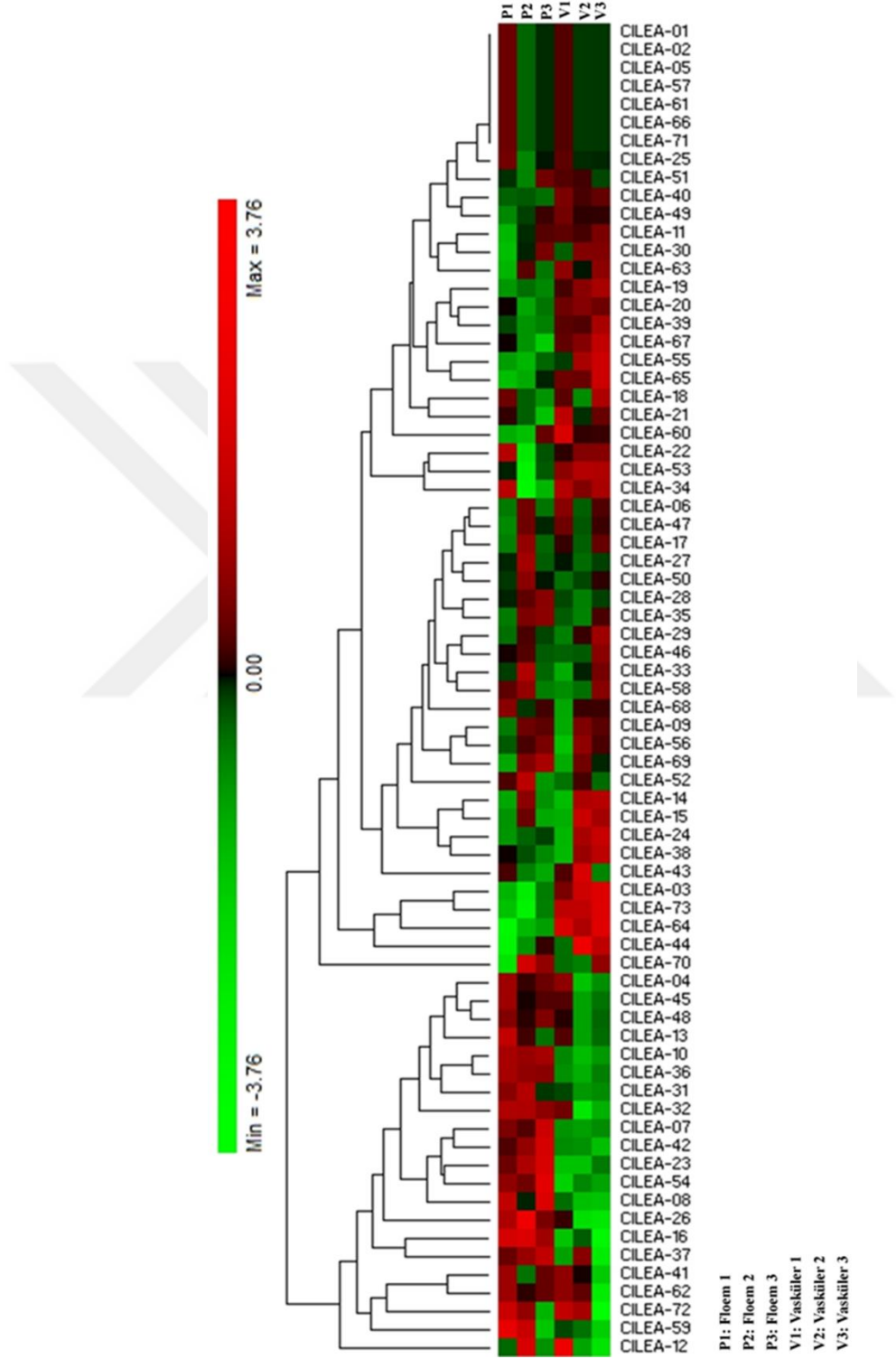
Şekil 4.15. Meyve oluşumu sırasında *CILEA* genlerinin ifadesindeki değişimlerin karşılaştırması

Karpuzun meyve oluşumunun 10, 18. ve 26. günlerinde 42. ve 52. günlere göre *CILEA*-7-31-32-36-40-43-44-47-50-51-52-54-55 ve 73'ün gen ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Sonuçlar içerisinde en dikkat çeken ise *CILEA*-12'nin döllenmeden sonra meyve oluşumunun 18, 42. ve 50. günlerinde en yüksek düzeyde ifade göstermesidir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Döllenmeden sonra 10, 26, 18, 34, 42, 50. günlerdeki meyve oluşumunda *CILEA* genlerinin transkriptom veri analizlerinin karşılaştırılması

Karpuzun floem dokularında *CILEA*-7-8-10-16-23-26-31-32-36-37-42-54-59 ve 72'nin gen ifade seviyelerinin vasküler dokulara göre arttığı saptanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. *CILEA* genlerinin floem ve vasküler dokularda transkriptom analizlerinin karşılaştırılması

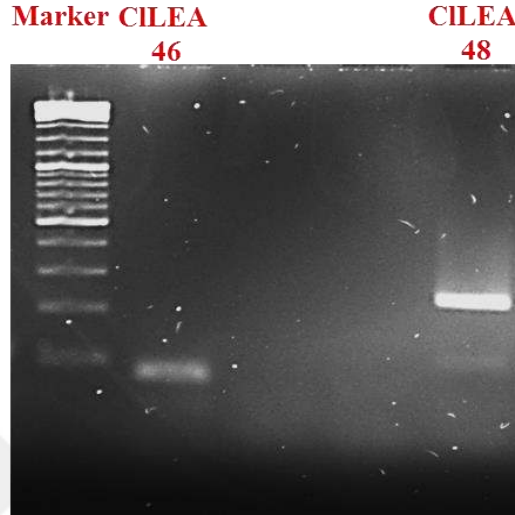
4.2.5. LEA Genlerinin Kuraklık Stresi Altında Gen İfade Analizleri

Karpuz örneklerinden elde edilen RNA miktarının (ng/μl) yeterli, saflıklarında (260/280) istenilen aralıklarda olduğu saptanmıştır. Elde edilen spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 4.4' te verilmiştir.

Tablo 4.4. Karpuz (*Citrullus lanatus*) yaprak ve kök örneklerine ait RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Örnek adı	ng/μl	260/280
Karpuz 1.set yaprak 0. saat	2702	1,9
Karpuz 1.set yaprak 3. saat	2190	1,9
Karpuz 1.set yaprak 12. saat	2578	1,9
Karpuz 1.set yaprak 24. saat	2451	1,9
Karpuz 2.set yaprak 0. saat	6845	1,9
Karpuz 2.set yaprak 3. saat	3095	2,0
Karpuz 2.set yaprak 12. saat	6100	2,1
Karpuz 2.set yaprak 24. saat	6525	2,1
Karpuz 3.set yaprak 0. saat	3958	2,1
Karpuz 3.set yaprak 3. saat	4621	2,0
Karpuz 3.set yaprak 12. saat	4879	2,1
Karpuz 3.set yaprak 24. saat	3625	2,1
Karpuz 1.set kök 0. saat	2500	1,9
Karpuz 1.set kök 3. saat	2730	1,9
Karpuz 1.set kök 12. saat	2655	1,9
Karpuz 1.set kök 24. saat	2717	1,9
Karpuz 2.set kök 0. saat	3880	2,1
Karpuz 2.set kök 3. saat	2600	2,1
Karpuz 2.set kök 12. saat	3250	2,1
Karpuz 2.set kök 24. saat	1810	2,1
Karpuz 3.set kök 0. saat	2347	2,0
Karpuz 3.set kök 3. saat	2304	2,0
Karpuz 3.set kök 12. saat	1689	2,1
Karpuz 3.set kök 24. saat	1672	2,1

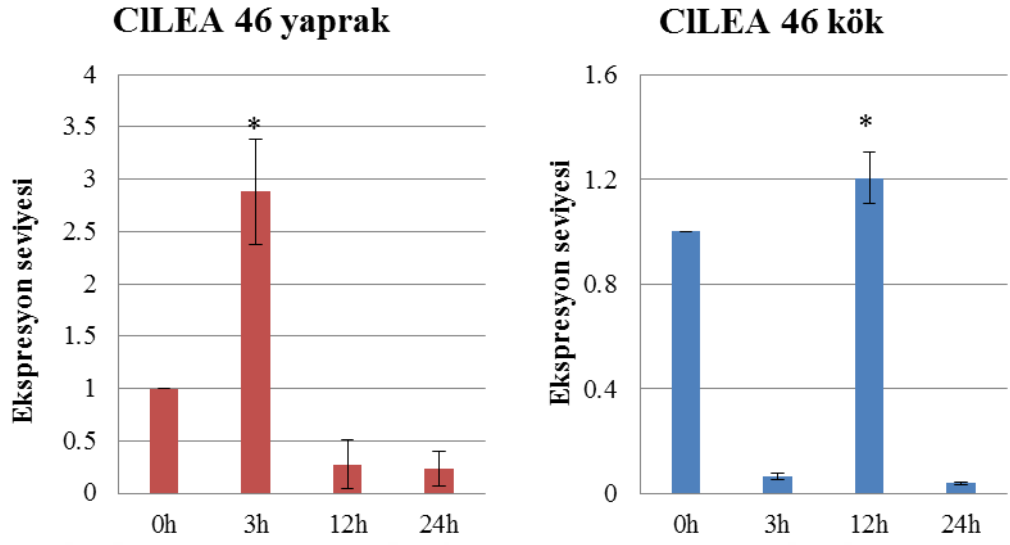
Karpuz bitkisine ait RNA örnekleri 200 ng olacak şekilde hesaplanarak cDNA sentezi yapılmıştır. Karpuz bitkisi için *CILEA-46* ve *CILEA-48* genlerinin 60°C’da optimizasyonu sağlanmıştır. Optimizasyonu sağlanan genlerin jel görüntüsü Şekil 18’de verilmiştir.



Şekil 4.18. *CILEA 46* ve *CmLEA 48* geninin agaroz jel görüntüsü

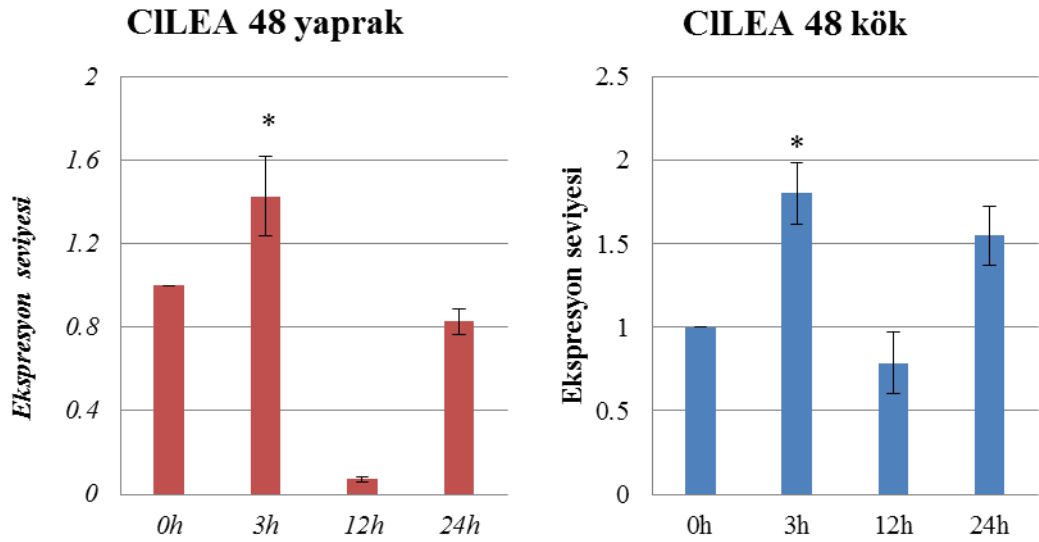
Karpuz bitkisinde kuraklığa karşı *LEA* genlerinin cevaplarının anlaşılabilmesi için, kök ve yaprak dokularında seçilen genler qRT-PZR ile incelenmiştir. Bu genler için amplifikasyon ve erime eğrileri çizilmiştir (Ek 24, Ek 25). Bu amaç doğrultusunda seçilen *CmLEA-46* ve *CmLEA-48* genin ifade profilleri incelenerek transkriptom verisi ile karşılaştırılmıştır.

Karpuz bitkisi için tercih edilen *CILEA-46* genin kontrol grubuna göre kuraklık stresi altındaki gen ifadesi yaprak dokusunda 3. saatte maksimum seviyeye ulaşırken, 12. ve 24 saatte normal seviyesinde altına düşmektedir. Bu gen kök dokusunda ise 12. saatte bir artış gösterirken, 3. ve 24. saatte ekspresyon seviyesi oldukça düşük seyretmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. *CILEA 46* geninin kuraklık stresi altındaki yaprak ve kök dokusunda zamana bağlı gen ifade seviyesi

Karpuz bitkisi için seçilen ikinci gen *CmLEA-48* genidir. Bu genin ifadesi için her iki doku örneğinde 3. saatte bir artış gözlemlenirken, 12. saatte normal seviyesinin altına düşmektedir. 24. saatte ise farklı olarak yaprak dokusundaki gen ifadesi normal şartlardaki seviyeye yakın ve altında kalmaktadır. Kök dokusunda ise 24. saatte bir artış göstermektedir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *CILEA 48* geninin kuraklık stresi altındaki yaprak ve kök dokusunda zamana bağlı gen ifade seviyesi

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Abiyotik ve biyotik tüm stres faktörleri, dünya genelinde birçok tarım alanını etkilemekte buna bağlı olarakta ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına neden olmaktadır (Wang vd., 2003; Ebrahime, 2013). Günümüzde yüksek miktarlarda üretimi yapılan bitkilerin kuraklık toleranslarının artırılması yolunda ciddi adımların acil olarak atılması gerekmektedir (Carnicer vd., 2011; Peng vd., 2011; Williams vd., 2013; Vicente-Serrano vd., 2014; Örs ve Ekinci, 2015). Kuraklık, tarımsal üretimi sınırlandıran en önemli faktörlerden biridir (Kuşvuran vd., 2011). Kuraklık sorunu, kavun yetiştiriciliğinde potansiyel olarak mevcuttur (Günay 1992; Kuşvuran vd., 2008; Kuşvuran, 2010; Kuşvuran vd., 2011). Fakat karpuz için durum çok farklıdır. Karpuz, kuraklık koşullarını kendi bünyesindeki su ile yapraklarında solma dahi olmadan tolere edebilme kabiliyetiyle kuraklığa karşı olan tepkileri bakımından C3 bitkileri için çok uygun bir model oluşturabilir (Yokota vd., 2002; Karipçin, 2009; Örs ve Ekinci, 2015). Karpuz ekonomik açıdan önemli, çevresel streslerden etkilenen bir bitki türü olmasının yanında genomunun da küçük olmasıyla genetik çalışmalarda kullanışlılık arz etmektedir (Güner ve Wehner, 2004; Kim vd., 2015).

Bitkilerde görülmesi beklenen biyolojik stres şiddetindeki artış pek çok araştırmacı tarafından incelenmiş olmasına rağmen karpuz ve kavunda çevresel strese bağlı genlerin fonksiyonları henüz çalışılmamıştır (Carnicer vd., 2011; Peng vd., 2011; Williams vd., 2013; Vicente-Serrano vd., 2014; Kim vd., 2015). Bu nedenle, her iki türün strese bağlı genler ile ilgili geniş kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

LEA proteinlerinin çeşitli taksonlarda geniş bir dağılımı söz konusudur. LEA proteinlerinin tanımlanmasının ardından yapılan çalışmalar sonucunda algler, mantarlar, damarsız ve damarlı bitkilerin yanı sıra protozoalar, nematodlar, kabuklular ve böcekler gibi anhidrobiyotik hayvanlarda da varlığı tespit edilmiştir (Shih vd., 2008). Yapılan pek çok çalışmada LEA proteinlerinin özellikle susuzluk, soğuk stresi ve tuz stresi altında abiyotik stres toleransı ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Close, 1997; Jimenez vd., 2008; Dalal vd., 2009; Wang vd., 2009; He vd., 2011; Park vd., 2011), fakat bu önemli gen ailesinin bitkilerde genom

seviyesinde çalışmaları sınırlıdır. Bununla beraber son yıllarda farklı birçok bitki türünde LEA protein ailesine ait genler tanımlanmaya başlanmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda; Arabidopsiste 51 adet (Hundertmark ve Hinch, 2008), çeltikte 34 tane (Wang vd., 2007), Çin eriğinde 30 adet (Du vd., 2013), domateste 27 adet (Cao ve Li, 2015), patateste 29 adet (Charfeddine vd., 2015), Brachypodium'da 36 adet (Filiz vd., 2013), mısırdaki 32 adet (Li ve Cao, 2015), portakalda 72 adet (Pedrosa vd., 2015) LEA proteinini kodlayan gen belirlenmiştir. Kavun ve karpuzla aynı familyadan olan salatalık genomunda ise 79 adet (Çelik-Altunoğlu vd., 2016) LEA gen ailesi üyesi bulunduğu ortaya çıkmıştır. Bu tez çalışmasında kavunda 61, karpuzda ise 73 adet LEA geni tanımlanmıştır. LEA proteinlerinin bu dağılımı, evrimin bir sonucu olarak osmotik basıncın korunmasında genel bir fonksiyona sahip olabileceğini düşündürmektedir (Shih vd., 2008).

Kavun ve karpuzda LEA genleri arasındaki akrabalık ilişkilerinin değerlendirebilmesi için filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Her iki bitkinin de sahip olduğu LEA proteinlerinin çoğunluğunun LEA2 grup proteinleri olduğu belirlenmiştir. LEA proteinlerinin diğer grupları olan LEA1, LEA3, LEA4, LEA5, LEA6, SMP ve Dehidrin gruplarına ait proteinler az sayıda da olsa tespit edilmiştir. Her iki bitki için oluşturulan filogenetik ağaçlarda genellikle aynı grupta yer alan proteinler ağaçta genellikle aynı sınıfta yer almıştır. Bununla birlikte özellikle karpuzun filogenetik ağacında Dehidrin, LEA1, LEA3 ve LEA4 gruplarına ait proteinlerin farklı sınıflarda yerleştiği gözlenmiştir. Bu farklılığın sebebinin, bu proteinlerin farklı protein motif içerikleri olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca filogenetik ağacın güvenilirliğini test etmek için MEME veritabanında kavun ve karpuz proteinlerinin motif kompozisyonları incelenmiştir. Kavun ve karpuzda 10 adet farklı protein motifi saptanmıştır (Ek 3 ve Ek 17). Bu analizlere göre her iki bitki türünde de Dehidrin grubuna ait proteinlerde genellikle motif gözlenmemiştir. Çelik-Altunoğlu ve arkadaşlarının 2016 yılında salatalıkta yapılan motif çalışmasında da Dehidrin grubuna ait proteinlerde motif gözlenmemesi ile uyumaktadır. Buna karşın patates Dehidrin proteinlerinde K ve Y segmentleri olmak üzere 2 farklı sekans motifi bulunmuştur (Charfeddine vd., 2015). Ayrıca Çin eriği dehidrinlerinde de lizine zengin K segmenti gözlenmiştir (Du vd., 2013). Kavun ve karpuzda LEA1 ve LEA4 grubuna dahil proteinlerin genellikle tek ve aynı motif içerdiği gözlenmiştir. Buna

göre LEA4 ve LEA1 grup proteinlerinin aynı motif içerikleri ve düzeni sebebiyle benzer oldukları söylenebilir. Kavunda LEA3 grubuna ait proteinlerde motif gözlenmezken, karpuzdakilerde sadece tek motif gözlenmiştir. Salatalıkta LEA3 grubuna ait proteinlerden sadece bir tanesinde tek çeşit motif gözlemlenirken diğerlerinde motif bulunamamıştır (Çelik-Altunoğlu vd., 2016). Kavunda ve karpuzda LEA5 grubuna ait proteinler aynı ve tek bir motif içermektedir. LEA5 grubuna dahil olan proteinler çin eriğinde de tespit edilmiş olup birden fazla motif içerdiği saptanmıştır (Du vd., 2013). Kavunda LEA6 grup proteine rastlanmazken, karpuzda ise LEA6 grup proteinlerin motif içermediği görülmüştür. Kavun SMP grup proteinlerinde motif bulunmazken karpuzda SMP proteinlerinin genellikle tek bir motif içerdiği görülmüştür. Her iki bitki için de en çok LEA2 grup proteinlerinde çeşitlilik gözlenmiş ve çoğunlukla birkaç motifi birden içerdikleri belirlenmiştir. Çin eriğinde de LEA2 grubundaki proteinlerin birçok değişken motif içerdiği görülmüştür (Du vd., 2013). Burdan yola çıkılarak aynı LEA grubunda bulunan LEA proteinlerinin genellikle aynı motifleri içerdiği sonucuna varılabilir. LEA2 grup proteinlerin farklı sınıflara dağılmış olmaları, motif içeriklerinin farklı ekler içermesinden kaynaklanabilir.

Blast2GO aracılığıyla yapılan fonksiyonel analizleri sonucunda her iki bitkide tespit edilen *LEA* genlerinin biyolojik işlevlerinin ağırlıklı olarak strese yanıt ve metabolik süreçte görev alma olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç hücre içerisindeki LEA proteinlerinin rolü ile uygunluk göstermiştir. Her iki türün moleküler fonksiyon tahminlerinde ise LEA proteinlerinin çoğunlukla bağlanma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçta tespit edilen LEA proteinlerinin ortamdaki suyun azalması durumunda enzim koruma aktiviteleri ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir (Goyal vd., 2005; Reyes vd., 2008). Bu fonksiyona ek olarak kuraklık veya dondurucu sıcaklıklara karşı membranı korumak amacıyla bu proteinlerin membran stabilizasyon aktivitesiyle bir bağlantısı olabilir (Kosova' vd., 2007; Tolleter vd., 2010). Hücresel lokalizasyon analizi sonucunda ise kavundaki LEA proteinleri çoğunlukla hücre içerisinde, hücreler arası boşlukta ve membranda bulunurken, karpuzda ise çoğunlukla hücre içerisinde ve membranda bulunmaktadır. Çelik-Altunoğlu vd., (2016) tarafından yapılan araştırmada salatalıktaki CsLEA proteinlerinin de hücre içerisinde ve plazma membranında olduğunun saptanması

elde ettiğimiz sonuçlarla uyumluluk arz etmektedir. Bu durum LEA proteinlerinin membran koruma rolleri ile açıklanabilir (Wolkers vd., 2001; Liu vd., 2010).

Benzer genlerin açıklanmasını sağlayan gen duplikasyon olayları, organizmalarda sıklıkla görülmektedir (Mehan vd., 2004). *LEA* genleri üzerine yapılan genom çalışmalarında toplamda domatestede 22 gende (Cao ve Li, 2015), patatestede 8 gende (Charfeddine vd., 2015), *Brachypodium distachyon*'da 8 gende (Filiz et al. 2013), çin eriğinde 17 gende (Du et al. 2013), Arabidopsiste 42 gende (Hundertmark ve Hinch, 2008) segmental ve tandem duplikasyona rastlanmıştır. Salatalık genomunda 55 gende tandem duplikasyon görülmesine rağmen segmental duplikasyon hiç görülmemiştir (Çelik-Altunoğlu vd., 2016). Kavunda *LEA* genlerinin kromozoma dağılımı scaffold seviyesinde olduğu için tespit edilen duplikasyonların tandem veya segmental olup olmadıkları tespit edilemedi. Karpuzda ise gen duplikasyon analiz sonuçları incelendiğinde tandem ve segmental duplikasyonlara rastlanılmıştır. Kavunda 14 çift (%22,9) duplikasyon, karpuzda ise 20 çift segmental (%27,3) ve 7 çift (%9,5) tandem duplikasyon saptanmıştır. Tüm tandem duplikasyonlar, karpuzun genomunda en çok *LEA* geni barındıran 1. ve 10. kromozomda gerçekleşmiştir. Gen ailelerinin genişlemesinin sebeplerinden biri de gerçekleşen bu segmental ve tandem duplikasyon olaylarıdır (Cao vd., 2012; Chen ve Cao, 2014). Oluşan bu duplikasyonlar farklı bitki türlerinde yayılış gösteren *LEA* gen ailesinin varlığını açıklayabilir.

Gen duplikasyon analizleri sonucunda evrimsel olarak kavundan ilk ayrılmanın 240 MYÖ ile çeltik ve 235 MYÖ ile mısırdaki olduğu saptanmıştır. Karpuzda ise ilk ayrılma 237 MYÖ ile mısırdaki gerçekleşmiştir. Bu veriler göz önüne alındığında monokotil ve dikotillerin bir kromozomun duplikasyonu sonucunda yaklaşık olarak 170- 235 MYÖ ayrıldığı bilgisiyle örtüşmektedir (Blanc ve Wolfe, 2004; Cao ve Li, 2015). Kavunun Arabidopsisten 164 MYÖ, karpuzun ise 197 MYÖ ayrıldığı saptanmıştır. Salatalık ile Arabidopsis arasındaki ortolog gen üzerine yapılan çalışmada 176 MYÖ ayrıldığı ortaya çıkarılmıştır (Çelik-Altunoğlu vd., 2016).

Kavun ve karpuzda en geç ayrılmanın sırasıyla 51 MYÖ ve 84 MYÖ olmak üzere kavak bitkisi ile olduğu görülmüştür. Kavundaki *LEA* genlerinin ayrılması ise

karpuzu göre daha geç gerçekleşmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak kavun ve karpuz bitkileri daha kuvvetli bir seleksiyon baskısına uğramış olabilir.

Kavundaki *LEA* genleri ile diğer organizmalardaki gen ortologları karşılaştırıldığında en yüksek ortolog gen oranı %63 (39 çift) ile soyadır. Kavun ve diğer bitki genomlarının sinteni bloklama ile karşılaştırılması sonucunda salatalık ve soyada *Arabidopsis*'den ve çilekten daha fazla sayıda blok bulunmuştur (Garcia-Mas vd., 2012). Bu sonuç, ortolog gen oranı ile örtüşmektedir.

Karpuzdaki *LEA* genleri ile diğer organizmalardaki gen ortologları karşılaştırıldığında karpuz için en yüksek ortolog gen oranının % 71 (52 çift) ile kavakta olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç, 2014'te Baloğlu ve arkadaşlarının salatalık genomunda bZip transkripiyon faktörleri üzerine yapılan çalışmayla uyumluluk arz etmektedir. Salatalık ile kavak genomundaki bZip transkripsiyon faktörleri arasında maksimum ortolog ilişkinin olduğu saptanmıştır. Çelik-Altunoğlu ve arkadaşlarının 2016'da salatalıkta *LEA* genleri üzerine yapılan çalışmayla da benzerlik göstermektedir. Salatalıkla *LEA* genleri üzerine yapılan bu çalışmada en yüksek ortolog gen oranının 64 çiftle kavakta olduğu saptanmıştır. Karpuz bitkisi ile *Arabidopsis* arasında 26 çift ortolog gen barınmaktadır. Aynı familyadan olan salatalık bitkisinin de *Arabidopsis* ile 26 çift ortolog gen içerdiği ortaya çıkmıştır (Çelik-Altunoğlu vd., 2016). Kavun ve karpuzdaki ortolog genler göz önüne alındığında her iki türde de çeltik ile 7 çift ve üzüm ile de 15 çift yani eşit sayıda ortolog gen içerdiği görülmüştür. Kavun ve karpuzun diğer iki türle eşit sayıda ortolog gen içermesi filogenetik akrabalıkları ile açıklanabilir. *LEA* genlerinin evrimi, kavun ve karpuz ile diğer organizmalardaki ortolog genlerinin genetik karşılaştırma haritalarının analizi ile belirlenebilir.

Homoloji modellemesi sonucunda kavunda *LEA* gen ailesi için %70 üzerinde 6 gende benzerlik tespit edilmiştir. En yüksek benzerlik oranı %99'la CmLEA-09'dur. Daha sonra en yüksek benzerlikten en düşük benzerliğe göre sıraladığımızda CmLEA 47, 15, 42, 13, 40'dır. Kavunda *LEA* proteinlerinin ikincil yapıları genellikle β tabakalı yapıları olduğu görülürken, sadece motif 9'dan oluşan CmLEA-47'de yalnızca α -heliks yapı görülmüştür.

Karpuzda 7 gende %70 üzerinde benzerlik tespit edilmiş olup en yüksek oranda benzerlik %99 ile *CILEA*-32 geninde elde edilmiştir. Elde edilen LEA proteinleri çokdan aza sırasıyla *CILEA*-32, 41, 58, 37, 31, 54, 18'dir. Karpuzda da genellikle β tabakalı yapıları ağırlıktayken sadece motif 6 içeren *CILEA*-54 proteini α -heliks yapıdadır. Salatalıkta yapılan analizlerde de %70 üzerinde 6 tane *CsLEA* proteini saptanmış ve bir protein haricinde çoğunlukla yapıları da β tabakalı yapıdadır. Kavunda 61 LEA proteininden sadece 6'sının, karpuzda ise 73 LEA proteininde sadece 7'sinin protein yapısının tespit edilebilmesi LEA proteinleri sulu çözeltilerde doğal olarak düzensiz ve yapılandırılmamış olmasına bağlanabilir (Goyal vd., 2003; Du vd., 2013). Elde edilen bu sonuçlardan yola çıkılarak onların moleküler fonksiyonları hakkında fikir edinilmesine olanak sağlayabilir.

miRNA'lar üzerine son yıllarda yapılan araştırmalarda çok sayıda farklı türleri bulunmuştur. Örneğin, Arabidopsis, çeltik ve mısır için tanımlanmış miRNA sayısı sırasıyla, 187, 353 ve 96'dır. miRNA analizleri sonucunda kavun 21 farklı miRNA'nın 21 *CmLEA* genini hedeflediği belirlenmiştir. Karpuzda ise 22 farklı miRNA tarafından 21 *CILEA* geninin hedeflendiği görülmüştür. Strese tepki ile ilgili miRNA ailelerinin bazıları farklı bitki türlerinde korunmuş olmalarına karşın, türe özgü işlevleri stres ortamına karşı geliştirdiği bir uyum olabilir. Bazı türe özgü miRNA'lar, strese dayanıklılıkla ilgili yolaklarda görev üstlenebilir. Bir miRNA ailesinin üyesi, strese farklı bir şekilde de tepki verebileceği gibi aynı miRNA ailesinin farklı üyeleri de farklı şekillerde işlevlere sahip olabilirler (Lu vd., 2008; Xin vd., 2010; Eren vd., 2014). Yine bazı miRNA dizilerinin farklı bitki türleri arasında korunduğu ve aynı işlevlerde farklı proteinleri hedefledikleri bilinmektedir (Eren vd., 2014).

miRNA analizleri sonucunda kavunda da karpuzda çok çeşitlilik gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar bir miRNA tipinin birden fazla mRNA'nın ekspresyon seviyesini düzenlediği gibi, bir mRNA ekspresyonu birden fazla miRNA tipi tarafından düzenlenebileceği ile değerlendirilebilir (Güzelgöl ve Aksoy, 2015). Kavun için yapılan analizlerde mir414, karpuzda ise mir854 ve mir414 sıklıkla bulunan miRNA'lar olmuştur. Arabidopsis bitkisinde yapılan Go analizlerine göre mir414'ün hedefleri özellikle bitki büyüme, gelişme ve savunma mekanizmalarında

önemli bir göreve sahip olan bZIP, WRKY, MYB, B3, heat shock proteinleri ve TCP transkripsiyonel regülatörleridir (Eulgem vd., 2000; Gurley 2000; Jakoby vd., 2002; Suo vd., 2003; Guo vd., 2007; Romanel vd., 2009; Guleria ve Yadav 2011; Çelik-Altunoğlu vd., 2016). Bir diğer çalışmada çeltikte, kuraklık stresi sonucunda mir854'ün ifade seviyesinde artış gözlenmesine rağmen mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Zhou vd., 2010). mir854 için oligouridilat bağlanma protein 1b (UBP1b) proteininin 3' UTR bölgesinde hedef bölgeleri bulunmaktadır. Öncül mRNA olgunlaşmasına katılan bu protein nükleer RNA bağlanma proteinini kodlamaktadır (Lambermon vd., 2000; Çelik-Altunoğlu vd., 2016). Transkripsiyonel mekanizmanın regülatörü olan mir854 ailesi hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunmuştur (Arteaga -Vazquez vd., 2006; Çelik-Altunoğlu vd., 2016).

Kavunda görülen diğer bir miRNA mir3946'dır. Portakal üzerine yapılmış olan bir çalışmada bor eksikliğinde ortaya çıkan stres durumunda mir3946'nın ekspresyon seviyesini değiştirmektedir. Şöyle ki, bitkide bor eksikliğinde oksin sinyalinin baskılandığı, TR1 seviyesinde azalma görüldüğü ARF aracılıklı gen ekspresyonunu değiştirdiği saptanmıştır (Lu vd., 2015). mir3946'nın oynadığı rol *LEA* genlerinin görevleriyle de uyumaktadır. Burdan yola çıkılarak her iki türde de *LEA* gen ailesine ait miRNA'ların saptanması ile hem kuraklık stresinde hemde diğer stres faktörlerinden etkilenme mekanizmasının ortaya çıkarılmasına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir. Böylelikle *LEA* gen ailesinin stres altında izlediği yollar meydana çıkarılarak gelecekteki moleküler ıslah çalışmalarının da temel taşlarını oluşturacaktır.

Çalışmamız sonrasında elde edilen miRNA'lar tarafından hedeflenen *LEA* genlerinin belirlenmesinin, miRNA'ların görevinin anlaşılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir. Öte taraftan *LEA* proteinlerini hedefleyen miRNA'ların belirlenmesi, daha önce hiç çalışılmamıştır. Bu miRNA'ların yapısının keşfi, doku spesifik miRNA'ların saptanmasını da kolaylaştırabilir.

Elde ettiğimiz bu bilgileri de kullanılarak biyoinformatik yaklaşımlar aracılığıyla kuraklık stresine direnç mekanizmasının genetik ağının (genetic network) tanımlanmasına yardımcı olabileceği de düşünülmektedir.

Kavunda *LEA* gen ifade analizlerine bakılacak olursa *CmLEA-42* geninin yaprak ve kök dokusunda farklı bir şekilde gen ifade mekanizması geliştirdiği düşünülebilir. *CmLEA-42* geni yaprak dokusunda 24. saatte maksimum seviyede artarken, aynı gen kök dokusunda 3. saatte artmıştır. Bu genin kuraklık stresi altında yaprağa göre kökte daha erken bir cevap oluşturduğu söylenebileceği gibi kökün erken cevap oluşturması bitkinin metabolizmasını korumaya yönelik ilk önlemlerin kökte alındığına da işaret edebilir. Transkriptom analizinde ise bu genin beyaz meyve kabuğunda ekspresyonu azalırken açık pembe meyve kabuğunda arttığı görülür ve olgun kırmızı meyve kabuğunda ise *CmLEA-42* geninin ekspresyonu görülmez. Diğer bir transkriptom analizinde ise bu genin floem dokusunda gen ifadesi azalırken, vasküler dokuda artmaktadır. Burdan yola çıkılarak bu genin olgun meyve kabuğunda görülmemesi, vasküler dokuda artması metabolizmayı strese karşı koruyucu bir molekül olarak davranması ile açıklanabilir. *CmLEA-43* genin ekspresyonu incelendiğinde her iki dokuda da 24. saatte yaklaşık olarak benzer bir artış gözlenmiştir. *CmLEA-43* geni kök dokusunda 3. saatte bir artış göstermiştir. Bu gen de *CmLEA-42* geninde olduğu gibi kökte erken bir cevap oluşturma eğilimindedir. *CmLEA-43* geninin ifade seviyelerinin kuraklık stresiyle birlikte 24. saatin sonunda kök dokusunda arttığı görülmüştür, buradan hareketle bu genlerin kuraklığa karşı geç cevap oluşturan genler olduğu düşünülebilir. Bu genin transkriptom veri analizinde tuz stresi altında arttığı görülmüştür. Bu sonuç kullanılan kavun bitkisinin cinsi ile ilişkili olabilir. Bu bakımdan diğer transkripsiyon faktörleri ve stres genleri ile birlikte kuraklığa karşı cevap oluşturduğu düşünülebilir.

Karpuz bitkisinde ise gen ifade analizinde *CILEA-46* geni, yaprak dokusunda 3. saatte bir artış gösterirken, kökte 12. saate bir artış göstermektedir. Bu genin ifadesi kökte daha geç gerçekleşmektedir. Aynı zamanda bu genin ekspresyonu 3. ve 24. saatinde normal seviyenin çok fazla altına düşmektedir. Transkriptom analizlerinde döllenmeden sonraki günlerde *CILEA-46* geni yok denecek kadar azalır ve döllenmeden sonraki 10. ve 34. günde azalırken diğer günlerde ekspresyon artar. Beyaz meyve kabuğu aşamasında ekspresyonu artış gösterirken, açık pembe meyve kabuğunda azalır. Vasküler ve floem dokudaki gen ifadesinde ise farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple bu genin kuraklık stresi için yapılacak çalışmalarda kullanılmasının uygun olmayabileceği fikrini vermiştir. Karpuzda çalışılan diğer bir

gen olan *CILEA-48* geni ise her iki dokuda 3. ve 24. saatte orantılı olarak artış göstermektedir. Transkriptom analizinde floem dokusunda gen ifadesi artarken vasküler dokuda ise gen ifadesi azalır. Bu gen kuraklık stresine verdiği tepkiden dolayı daha geniş çalışmalarda kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında kavun ve karpuz bitkilerinde LEA protein ailesi üyelerinin genomik dağılımı, diğer bitkilerdeki ortolog genleri, tahmini üç boyutlu yapıları, filogenetik analizleri, korunmuş motifleri, tahmini hücrel yerleşimleri ve biyolojik işlevleri tanımlanmıştır. Bunun yanında veritabanlarında ulaşılabilir gen ifade analizleri incelenmiş, ardından kavun ve karpuz da kuraklık stresi altında belirlenen LEA proteinlerinin gen ifadeleri incelenerek, bu genlerin kuraklık stresi ile ilişkileri analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, *LEA* gen ailesinin karakterizasyonu yapılmış olup, elde edilen veriler, kuraklık stresi altındaki LEA proteinlerinin kavun ve karpuzda fonksiyonlarının çözümlenmesine katkı sağlayabilir. Ayrıca moleküler ıslah çalışmaları için tespit edilen *LEA* genleri, kuraklığa toleranslı ve duyarlı uygun gen kombinasyonuna sahip klonların belirlenmesi için kullanılabilir. Bununla beraber kuraklık stresine dirençli bitkilerin geliştirilmesine de olanak sağlayabilir. Bu çalışma ile kuraklık stresinde ifade seviyeleri artan *LEA* genlerinin belirlenmesi ile gelecekte yapılabilecek fonksiyonel klonlama çalışmalarının yani strese karşı hayatta kalabilme şansı yüksek bitkilerin elde edilmesinin de önünün açılacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahuja, I., Vos, R.C., Bones, A.M., Hall, R.D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Science*, 15, 664-674.
- Amara, I., Zaidi, I., Masmoudi, K., Ludevid, M. D., Pagès, M., Goday, A., Brini, F. (2014). Insights into Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins in Plants: From Structure to the Functions. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 3440-3455.
- Ambros, V., Chen, X.M. (2007). The Regulation of Genes And Genomes by Small RNAs. *Development*, 134, 1635-1641. doi:10.1242/dev.002006
- Ansorge, W.J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 25(4), 195-203.
- Aras, S., Soydam-Aydın, S., Fazlıoğlu, A., Cansaran-Duman, D., Büyük, İ., Derici, K. (2015). Bitkilerde RNA interferans. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(3), 255 – 262. DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.13285
- Arteaga-Va'zquez M, Caballero-Pe' rez J, Vielle-Calzada J-P. (2006). A family of microRNAs present in plants and animals. *The Plant Cell*, 18, 3355–3369.
- Bailey, T. L., Elkan, C.(1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, AAAI Press, Menlo Park, California, 28–36.
- Baker, J., Steele, C. and Dure, L. (1988). Sequence and Characterization of 6 Lea Proteins and Their Genes from Cotton. *Plant Molecular Biology*, 11, 277-291. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00027385>
- Baloğlu, M. C., Eldem, V., Hajyzadeh, M., Unver, T. (2014). Genome-wide Analysis of the bZIP Transcription 1 Factors in Cucumber. *PLoS ONE*, 9(4), e96014 DOI:10.1371/journal.pone.0096014
- Barbazuk, W.B., Emrich, S.J., Chen, H.D., Li L., Schnable P.S. (2007). SNP Discovery via 454 Transcriptome Sequencing. *Plant Journal*, 51, 910–918.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell Press*, Cell vol. 116(2), 281 – 297.
- Basu, U. (2012). Identification of Molecular Processes Underlying Abiotic Stress Plants Adaptation Using “Omics” Technologies. In: Benkeblia N. (ed.)

Sustainable Agriculture and New Technologies, Boca Raton CRC Press, 149-172.

- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F. and Covarrubias, A.A. (2008). *The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins*. *Plant Physiology*, 148, 6-24.
- Battaglia, M. and Covarrubias, A.A. (2013). Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins in Legumes. *Front Plant Science*, 25, 190.
- Baxevands, A.D., Oulette, B.F.F., (1998). *Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley-Interscience A John Wiley&Sons, INC., Publication, sf. 52.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., et al. (2000). *The protein data bank*, *Nucleic Acids Res.*, 28, 235-242.
- Bhargava, S., Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breed.*, 132, 21-32.
- Bies-Etheve, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., et al. (2008). Inventory, Evolution and Expression Profiling Diversity of the LEA (Late Embryogenesis Abundant) Protein Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 67, 107-124.
- Bodur, E., Demirpençe, E. (2010). Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 8.
- Borovskii, G.B., Stupnikova, I.V., Antipina, A.I., Vladimirova, S.V., Voinikov, V.K. (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biology*, 2, 5. doi:10.1186/1471-2229-2-5.
- Boswell, L.C., Menze, M.A., Hand, S.C. (2009). Multiple isoforms of late embryogenesis abundant proteins in *Artemia franciscana* embryos. *Integrative Comparative Biology*, 49, E203.
- Boyacıgil, Ş. (2012). Miyeloproliferatif Neoplazilerde (Mpn) Jak2 ve Mpl Gen Mutasyonlarının Patoloji Arşiv Materyalleri Kullanılarak Saptanmasında Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin Yeri Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*. Ankara.
- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218, 443-448.
- Bray, E. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103, 1035 - 1040.

- Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 23–39.
- Bustin, S.A., Mueller, R. (2005). Review: Real-time reverse transcription PCR (qrt-pcr) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109, 365-379.
- Büyük, İ., Aydın, S. ve Aras, S. (2012). Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2), 97-110.
- Büyük İ. (2014). Tuz Ve Kuraklık Stresi Altında Geliştirilmiş Farklı Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Çeşitlerinde Lea-3 Geni mRNA İfade Seviyelerinin Kantitatif Real-Time PCR Yöntemiyle İncelenmesi Doktora tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.
- Candan, F., Kesercioğlu, T.(2012). Kavun (*Cucumis melo* L.) Türünün Kökeni, Yayılışı ile Batı Anadolu’ da Bulunan Doğal Form ve Kültür Varyeteleri *Kırkağaç Araştırmaları Sempozyumu*. Manisa.
- Cao, J., Shi, F., Liu, X., Huang, G., Zhou, M. (2012). Phylogenetic analysis and evolution of aromatic amino acid hydroxylase. *FEBS Letters*, 584, 4775–4782. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.005.
- Cao, J. and Li, X. (2015). Identification and phylogenetic analysis of late embryogenesis abundant proteins family in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 241, 757–772. DOI 10.1007/s00425-014-2215-y
- Carnicer, J., Coll, M., Ninyerola, M., Pons, X., Sánchez, G., Peñuelas, J. (2011). Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108, 1474–1478.
- Chandra Babu, R., Jingxian, Z., Blumc, L. David Hod, T-H., Wue, R., Nguyenf H.T. (2004). HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science*, 166, 855–862.
- Charfeddine, S., Saïdi, M. N., Charfeddine, M., Gargouri-Bouزيد, R. (2015). Genome-wide identification and expression profiling of the late embryogenesis abundant genes in potato with emphasis on dehydrins. *Molecular biology reports*, 1-12.
- Chen, X., Guo, R., Huang, L. and Hong, R., (2002). Evolutionary conservation and DNA binding properties of the Ssh7 proteins from *Sulfolobus shibatae*, *Science China C. Life Sci.*, 45(6), 583-592.

- Chen, Y., Cao, J. (2014). Comparative genomic analysis of the Sm gene family in rice and maize. *Gene*, 539, 238–249.
- Chezen, O., Hartwig, W., Newman, P. M. (1995). The Different Effects of PEG-6000 and NaCl on Leaf Development Are Associated with Differential Inhibition of Root Water Transport, *Plant Cell*, Vol. 18, No. 7, 727-735. doi:10.1111/j.1365-3040.1995.tb00575.x
- Chinnusamy, V., Zhu, J.K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 1-7.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications, *Nucleic Acids Research*, 7, 1717-1723.
- Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., Fuggi, A., Pontecorvo, G., Carillo, P. (2011). Abiotic Stress in Plants- Mechanisms and Adaptations. Prof. Arun Shanker (Eds.), *Plant Genes for Abiotic Stress* (pp. 283- 308). Croatia: InTech.
- Close, T.J. (1997). Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant*, 100, 291-296.
- Cuming, A. (1999). LEA proteins. In R Casey, PR Shewry, eds, Seed Proteins. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 753–780.
- Cushman, J.C. Bohnert, H.J. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 117-24.
- Çakar, A. (2013). Kefir Florasındaki Mikrobiyal Çeşitliliğin Yeni Nesil Dizileme Yöntemi İle Metagenomik Olarak İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul.
- Çelik, A.A., Çelik, M. (2012). Dünya Kavun Pazarında Türkiye'nin Payı ve Bu Payın Geliştirilmesine Yönelik Öneriler. *Kırkağaç Araştırmaları Sempozyumu Bildirileri*, 123-132, Manisa.
- Çelik-Altunoğlu, Y., Baloğlu, P., Yer, E.N., Pekol, S., Baloğlu, C.M. (2016). Identification and expression analysis of LEA gene family members in cucumber genome. *Journal of Plant Growth Regulation*. DOI: 10.1007/s10725-016-0160-4
- Çırak, C., Esendal E. (2006). Soyada kuraklık stresi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(2), 231-237.
- Çoruh, C., Shahid, S. and Axtell, M.J. (2014). Seeing the forest for the trees: annotating small RNA producing genes in plants. *Current opinion in plant biology*, 18, 87-95.

- Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V., Bansal, K.C. (2009). Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from Brassica napus plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of Biotechnology*, 139(2), 137–145. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.09.014
- De Candolle, A. (1882). *Origine des plantes cultivées*. Paris: Germer Baillière.
- Denekamp, N.Y., Reinhardt, R., Kube, M., Lubzens, E. (2010). Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in nondesiccated, encysted, and diapausing embryos of rotifers. *Biology of Reproduction*, 82(4), 714–724. doi:10.1095/biolreprod.109.081091.
- Dolferus, R. (2014). To grow or not to grow: A stressful decision for plants. *Plant Science*, 2229, 247-261.
- Dönmez, D., Şimşek Ö., Aka Kaçar, Y. (2015). Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8 (1), 30-37.
- Du, D., Zhang, Q., Cheng, T., Pan, H., Yang, W., Sun, L. (2013). Genome-wide identification and analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes in *Prunus mume*. *Molecular Biology Reports*, 40(2), 1937–46. doi: 10.1007/s11033-012-2250-3.
- Duque, A.S., Almeida, A.M., Silva, A.B., Silva, J.M., Farinha, A.P., Santos, D., et al. (2013). Abiotic Stress Responses in Plants: Unraveling the Complexity of Genes and Networks to Survive. Kourosh Vahdati and Charles Leslie (Eds.), *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture* (49-101). Croatia: InTech.
- Dure, L., Greenway, S.C., Galau, G.A. (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 20, 4162. doi: 10.1021/bi00517a033
- Dure, L., Crouch, M., Harada, J.J., Ho, T., Mundy, J., Quatrano, R.S., et al. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 12, 475–486.
- Dure, L., (1997). Ctopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse, *Cell*, 12, 91(6), 753-763.
- Ebrahime, M. (2013). Abiotik Stres Aday Genlerinin Üzüm Çeşit Ve Anacında İfade Profillerinin Araştırılması Yüksek lisans tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*. Ankara.

- Egan, A.N., Schlueter, J., David, M., S. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology, *American Journal of Botany*, 99(2), 175–185.
- Eren, H.A., İlhan, E., Erdoğan, C., Erayman, M. (2014). MikroRNA’lar ve Stres Şartlarındaki İşlevleri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (1),25-35, ISSN 1300-9362
- Eriş, A. (1990). Bahçe Bitkileri Fizyolojisi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay. Ders Notları* No: 11, Bursa.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Science*, 5(5), 199-206.
- Filiz, E., Özyiğit, İ.İ., Tombuloğlu, H., Koç, İ. (2013). In silico comparative analysis of LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins in *Brachypodium distachyon* L. *Plant Omics Journal*, 6(6), 433-440 ISSN:1836-3644.
- Fujii, H., Chiou, T.-J., Lin, S.-I., Aung, K., Zhu, J.-K. (2005). A miRNA involved in phosphat starvation response in *Arabidopsis*, *Current Biology*, 15, 2038–2043.
- Galau, G.A., Hughes, D.W., Dure, L. (1986). Absciscic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Leu) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 155-170.
- Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., vd. (2012) The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109(29), 11872–11877. doi: 10.1073/pnas.1205415109
- George, S., Usha, B., Parida, A. (2009). Isolation and characterization of an atypical LEA protein coding cDNA and its promoter from drought-tolerant plant *Prosopis juliflora*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 157(2), 244–253. doi:10.1007/s12010-008-8398-6
- Ginzinger, D.G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30, 503-512.
- Goldberg, R.B., Barker, S.J. and Perez-Grau, L. (1989). Regulation of Gene Expression during Plant Embryogenesis. *Cell*, 56, 149-160.
- Goyal, K., Tisi, L., Basran, A., Browne, J., Burnell, A., Zurdo, J., Tunnacliffe, A. (2003). Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 12977–12984.

- Goyal, K., Walton, L.J., Tunnacliffe, A.(2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemistry*, 388,151–157.
- Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.-H., Grunwald, D., Macherel, D. (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.*, 137,157–167.
- Guleria, P., Yadav, S. K. (2011). Identification of miR414 and expression analysis of conserved miRNAs from *Stevia rebaudiana*. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 9(6), 211-217.
- Guo, A.Y., Zhu, Q. H., Chen, X., Luo, J. C. (2007). GSDS: a 1 gene structure display server. *Yi Chuan* 29, 1023–1026.
- Guo, S., Zhang, J., Sun, H., Salse, J., Lucas, W.J., Zhang, H. et al. (2013). The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nature Genetics*. 45(1), 51-58.
- Gurley, W. B. (2000). HSP101: a key component for the acquisition of thermotolerance in plants. *The Plant Cell*, 12(4), 457-460.
- Günay, A. (1992). *Özel Sebze Yetiştiriciliği*. Cilt 5. Ankara.
- Günel, T., Aydın K. (2009). Real-Time PCR ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2), 43-45, ISSN:1308-0040.
- Güner, N., Wehner, T.C. (2004). The genes of watermelon. *Hortscience*, 39(6), 1175-1182.
- Güneş, R., Aşkın, B. (2016). Karpuz çekirdeği yağının kimyasal özellikleri ve besin içeriği. *GIDA*, 41 (1), 37-44.
- Güzelsoy, F., Aksoy, K (2015). Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24(4), 472-493.
- Hand, S.C., Menze, M.A., Toner, M., Boswell, L. and Moore, D. (2011). LEA Proteins during Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annual Review of Physiology*, 73, 115-134.
- Hansen, A. (2004). Bioinformatik Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler, *Birkhauser Verlag*, 9, Basel-Boston-Berlin.
- Hara, M., Terashima, S., Kuboi, T. (2001). Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *Journal Plant Physiol.*, 158,1333–1339.

- Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., Kuboi, T. (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217(2), 290–298.
- He, J. X., Fu, J. R. (1996). The research progresses in Lea proteins of seeds. *Plant Physiology Communication*, 32(4), 241-246.
- He, S., Tan, L., Hu, Z., Chen, G., Wang, G., Hu, T. (2011). Molecular characterization and functional analysis by heterologous expression in *E. coli* under diverse abiotic stresses for OsLEA5, the atypical hydrophobic LEA protein from *Oryza sativa* L. *Molecular Genetic Genomics*, 287(1), 39–54. doi:10.1007/s00438-011-0660-x
- Higuchi, R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* (NY), 11(9), 1026-30.
- Hoagland, D. R., Arnon, D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.*, 347, 1–32.
- Hong-Bo, S., Zong-Suo, L., Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 10, 45(3-4), 131-5.
- Houde, M., Dallaire, S., N'Dong, D., Sarhan, F. (2004). Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnol.*, J, 2, 381–387.
- Hunault, G., Jaspard, E. (2010). LEAPdb: a database for the late embryogenesis abundant proteins. *Bmc Genomics*, 11, 221. doi: 10.1186/1471-2164-11-221
- Hundertmark, M., Hinch, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bmc Genomics*, 9, 118. doi: 10.1186/1471-2164-9-118
- Hyman, E.D. (1988). A new method of sequencing DNA. *Analytical Biochemistry*, 174, 423–436.
- Ingram, J. and Bartels, D. (1996). The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377-403.
- İnal, B. (2011). Bitki Moleküler Filogenisinde Kullanılan Bazı Gen Ve Yöntemlerin Karşılaştırılması Yüksek Lisans Tezi, *Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Antalya.

- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., et al. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science*, 7(3), 106-111.
- Jeffrey, C. (1975). Further Notes on Cucurbitaceae: III Some African taxa. *Kew Bulletin*, 30, 475-493. doi: 10.2307/4103075
- Jeffrey, C. (2005). A New System of Cucurbitaceae. *Bot. Zhur*, 90, 332-335.
- Jiang, Y., Macdonald S. E., and Zwiazak, J. J. (1995). Effects of Cold Storage and Water Stress on Water Relations and Gas Exchange of White Spruce (*Picea glauca*) Seed-lings. *Tree Physiology*, Vol. 15, No. 4, 267- 273.
- Kalefetoğlu, T., Ekmekçi, Y. (2005). The effect of drought on plants and tolerance mechanisms. *Gazi University Journal of Science*, 18 (4), 723- 740.
- Kapluhan, E. (2013). Türkiye’ de Kuraklık ve Kuraklığın Tarıma Etkisi. *Marmara Coğrafya Dergisi*, Sayı 27, 487-510.
- Karipçin, Z.M. (2009). Yerli ve yabancı karpuz genotiplerinde kuraklığa toleransın belirlenmesi Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.
- Kelley, L.A., Sternberg, M. J. E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, 4, 363-371.
- Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P.D., et al. (1994) TaqStart antibody: hot start PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against. *Taq DNA polymerase BioTechniques*, 61134-1137
- Khraiweh, B., Zhu, J. K., Zuh, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819, 137 – 148.
- Kim, S.J., Huh, Y.C., Ahn, Y. K., Kim, J., Kim D.S., Lee, H.E. (2015). Watermelon (*Citrullus lanatus*) Late-Embryogenesis Abundant group 3 protein, CILEA3-1, Responds to Diverse Abiotic Stresses. *Horticulture Environment Biotechnology*, 56(4), 555-560.
- Koag, M. C., Wilkens, S., Fenton, R. D., Resnik, J., Vo, E., Close, T.J. (2009). The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiol.*, 150, 1503-1514.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prásil I.T. (2007). The role of dehydrins in plant response to cold. *Biol. Plant*, 51, 601–617.

- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M.O., Klíma, M., Roy, A., Prášil, I.T. (2015). Biological Networks Underlying Abiotic Stress Tolerance in Temperate Crops—A Proteomic Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 20913-20942. doi:10.3390/ijms160920913
- Kovacs, D., Agoston, B., Tompa, P. (2008). Disordered plant LEAP as molecular chaperones. *Plant Signal Behav*, 3, 710-713.
- Kömürcü-Bayrak, E., Erginel-Ünaltuna, N. (2011). Gen Anlatımı Analiz Yöntemlerine Genel Bakış. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. Yıl 1, Cilt 1, Sayı 2, 28-35.
- Kubilay, Z. (2014). Karpuz (*Citrullus Vulgaris*) ve Kavun (*Cucumis Melo*) Meyve Sularının Kombucha Mantarı İle Fermantasyon Ürünlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması Yüksek Lisans Tezi, *Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Gaziantep.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects Medicine*, 27, 95-125.
- Kuşvuran, Ş., Daşgan H.Y., Abak, K. (2008). Farklı bamya genotiplerinin kuraklık stresine tepkileri. *VII. Sebze Tarımı Sempozyumu*, 26-29 Ağustos, 329-333. Yalova.
- Kuşvuran, Ş. (2010). Kavunlarda kuraklık ve tuzluluğa toleransın fizyolojik mekanizmaları arasındaki bağlantılar. Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.
- Kuşvuran, Ş., Daşgan H.Y., Abak, K. (2011). Farklı Kavun Genotiplerinin Kuraklık Stresine Tepkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(3), 209-219.
- Kutlu, İ. (2010). Tahıllarda Kuraklık Stresi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 3(1), 35-41.
- Lan, T., Gao, J., Zeng, Q-J (2013). Genome-wide analysis of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Populus trichocarpa*. *Tree Genetics & Genomes*, 9, 253–264. DOI 10.1007/s11295-012-0551-2
- Lambermon, M.H., Simpson, G.G., Wiczeorek Kirk, D.A., Hemmings- Mieszcza M., Klahre, U., Filipowicz, W. (2000). UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *EMBO Journal*, 19, 1638–1649.
- Larcher, W. (1995). Gas exchange in plants. *Physiological Plant Ecology*. Berlin: Springer, 506.

- Lay, M.J., Wittwer, C.T. (1997). Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid- cycle PCR. *Clinical Chemistry*, Dec;43(12):2262-7.
- Levitt, J., (1980). Responses of Plants to environmental Stresses. *Acedemic Press, Inc.* London.
- LI, D., Galau, G.A. (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination XIII. Regulation of biosynthesis of principal storage proteins. *Plant Physiol.*, 68(1), 187–194.
- Li, D., He, X. (2009). Desiccation induced structural alterations in a 66-amino acid fragment of an anhydrobiotic nematode late embryogenesis abundant (LEA) protein. *Biomacromolecules*, 10, 1469-1477.
- Li, X. and Cao, J. (2015). Late Embryogenesis Abundant (LEA) Gene Family in Maize: Identification, Evolution, and Expression Profiles. *Plant Molecular Biology Rep.* Volume 34, Issue 1,15-28. doi:10.1007/s11105-015-0901-y
- Liang, J., Zhou, M.Q., Zhou, X., Jin, Y.J., Xu, M. and J. Lin. (2013). JcLEA, a Novel LEA-Like Protein from *Jatropha curcas*, Confers a High Level of Tolerance to Dehydration and Salinity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 8, e83056.
- Lichtenhaler, H. K. (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148, 4-14.
- Liu, Y.L., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*, 31, 777–786.
- Liu, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Wang, W., Li, R. (2010). Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of *Escherichia coli* and stabilization of enzyme activity under diverse stresses. *Curr. Microbiology*, 60, 373–378.
- Liu, Y., Wang, L., Xing, X., Sun, L., Pan, J., Kong, X., et al. (2013). ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol.* 54, 944–959.
- Lu, S., Sun, Y.H., Chiang, V.L., (2008). Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *Plant Journal*, 55, 131–151.
- Lu, Y.B., Qi, Y.P., Yang, L.T., Guo, P., Li, Y., Chen, L.S. (2015) Boron-deficiency-responsive microRNAs and their targets in *Citrus sinensis* leaves. *BMC Plant Biol.*, 15, 271. doi: 10.1186/s12870-015-0642-y
- Lynch, M., Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290, 1151–1155.

- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S. Bemben, L.A., et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376–380.
- McKersie, B.D., Leshem, Y. (1994). *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands: Springer.
- Mehan, M.R., Freimer N.B., Ophoff R.A. (2004). A genome-wide survey of segmental duplications that mediate common human genetic variation of chromosomal architecture. *Hum. Genomics*, 1(5), 335-344.
- Milli Eğitim Bakanlığı (2008). Karpuz yetiştiriciliği. *Bahçecilik*, MEGEP. Ankara
- Milli Eğitim Bakanlığı (2011). Kavun yetiştiriciliği. *Bahçecilik*, 621EEH061. Ankara
- Monteiro Costa C.Dn., Santa Brigida A. B., BdN Borges, de Menezes Neto ,M.A., Castelo Branco Carvalho, L.J., Batista de Souza, C.R. (2011). Levels of MeLEA3, a cDNA sequence coding for an atypical late embryogenesis abundant protein in Cassava, increase under in vitro salt stress treatment. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 29(4), 997–1005. doi:10.1007/s11105-011-0292-7.
- Muthamilarasan, M., Theriappan, P., Prasad, M. (2013). Recent advances in crop genomics for ensuring food security. *Curr. Sci.*, 105, 155-158
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M.. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling, *Science*, 312, 436–439.
- Ndong, K., Ka, R., Sow, A.I., Mongo, N.M., Ndour, C.T., Diop, D., Soumboumou, S., Cisse, M.F. and Samb, A., (2003), Antibiotic resistance of the most frequently isolated germs at the Fann University Teaching Hospital between January 1999 and December 2000, *Dekar Med*, 48(2), 87-91.
- Nozawa, M., Miura, S., Nei, M. (2012). Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome biology and evolution*, 4, 230-239.
- Nyren, P., Lundin, A. (1985). Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Analytical Biochemistry*, 151, 504–509.
- Oliveira, E., Amara, I., Bellido, D., Odena, M.A., Dominguez, E., Page`s, M., Goday, A. (2007) LC-MSMS identification of Arabidopsis thaliana heat-stable seed proteins: enriching for LEA-type proteins by acid treatment. *Journal Mass Spectrometry*, 42, 1485–1495.
- Olvera-Carrillo, Y., Campos, F., Luis Reyes, J., Garcarrubio, A., Covarrubias, A.A. (2010). Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 154(1), 373–390. doi:10.1104/pp.110.158964

- O'meara, D., Wilbe, K., Leitner, T., Hejdeman, B., Albert, J., Lundeberg, J. (2001). Monitoring Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors by Pyrosequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 39, No. 2, 464–473. DOI: 10.1128/JCM.39.2.464–473.2001
- Örs, S., Ekin, M. (2015). Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. *Derim*, 32 (2), 237-250. DOI: 10.16882/derim.2015.90060
- Özgür, M. (1995). Kavun ve karpuz yetiştiriciliği. G., Can, *Sebzecilik*, Anadolu Üniversitesi.
- Öztur, Z. N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W., Gozukirmizi, et al. (2002). Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and saltstressed barley. *Plant Molecular Biol.*, 48 (5–6), 551–573. doi:10.1023/a:1014875215580
- Öztürk, N.Z. (2015). Bitkilerin Kuraklık Stresine Tepkilerinde Bilinenler ve Yeni Yaklaşımlar, *Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology*, 3(5), 307-315.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., et al. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.*, 33, W116–W120.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. (2002). Carpel factory, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12(17), 1484-95.
- Park, S.-C., Kim, Y.-H., Jeong, J.C., Kim, C.Y., Lee, H.-S., Bang, J.-W., et al. (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. doi:10.1007/s00425-010-1326-3
- Pedrosa, A. M., Martins, C. P. S., Gonçalves, L. P. (2015). Late Embryogenesis Abundant (LEA) Constitutes a Large and Diverse Family of Proteins Involved in Development and Abiotic Stress Responses in Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) *PloS one*, 10(12), e0145785. doi:10.1371/journal.pone.0145785.
- Pekmezci, M.Y. (2015). Yabani zeytinde (*olea europaea* l. Subsp. Oleaster) yüksek verimli rna dizilemesi ile yaprak ve pedisel dokularındaki korunmuş ve yeni miRNA ve hedef genlerinin karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, *Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Çankırı.
- Peng, C., Ma, Z., Lei, X., Zhu, Q., Chen, H., Wang, W., Liu, S., Li, W., Fang, X., & Zhou, X., (2011). A drought-induced pervasive increase in tree mortality across Canada's boreal forests. *Nature Climate Change*, 1, 467–71.

- Puhakainen, T., Hess, M.W., Makela, P., Svensson, J., Heino, P., Palva, E.T. (2004). Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. *Plant Molecular Biol.*, 54, 743–753.
- Reyes, J.L., Campos, F., Wei, H., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D.T., et al (2008). Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant Cell Environ.*, 31, 1781–1790.
- Robinson, R.W. and Decker- Walters, D.C. (1997). *Cucurbits*. CAB International: New York.
- Roche. (2015). LightCycler® 480 SYBR Green I Master. 0815.047349800011.
- Romanel, E. A., Schrago, C. G., Couñago, R. M., Russo, C. A., Alves-Ferreira, M. (2009). Evolution of the B3 DNA binding superfamily: new insights into REM family gene diversification. *PloS one*, 4(6), e5791.
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11 (1), 3-11.
- Rorat, T. (2006). Plant dehydrins–tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11, 536-556.
- Sairam, R. K. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86(3).
- Sairam, R. K. & Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86, 407–421.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, 4, 406–425
- Sarı, N., Kaçar, Y.A., Mendi, Y.Y., Solmaz, İ., Aktaş, H.(2007). Karpuz Genetik Kaynaklarının Morfolojik ve Genetik Karakterizasyonu. *Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu*. Proje numarası: 104O073.
- Sarılu, E.M.T (2011). Kabak (Cucurbita pepo) Bitkisinde Agrobacterium Rhizogenes Aracılığıyla Rol Genlerin Aktarılması Yüksek lisans tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Konya.
- Saygılı, S. (2005). Kavun Yetiştiriciliği. Samsun Valiliği, İl Tarım Müdürlüğü. No: S/9.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J.M., Al-Niemi, T., Dyer, W.E., Ho, T.D., et al. (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science*, 155, 1–9.

- Shih, M.D., Lin, S.C., Hsieh, J.S., Tsou, C.H., Chow, T.Y., Lin, T.P., et al. (2004). Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Molecular Biol.* 56(5), 689–703.
- Shih, M.D., Hoekstra, F.A., Hsing, Y.C. (2008). *Late Embryogenesis Abundant Proteins*. 24/02/2016 tarihinde <http://www.researchgate.net/publication/40789881> adresinden alınmıştır.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki K. (1997). Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol.*, 115(2), 327-34.
- Skriver, K. and Mundy, J. (1990) Gene Expression in Response to Abscissic Acid and Osmotic Stress. *Plant Cell*, 2, 503-512. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.2.6.503>
- Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125, 27-58.
- Smith, J.C., Osborn, A.M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *Federation of European Microbiological Societies*, 67, 6–20. DOI:10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x
- Solval, K.M., Sundararajan, S., Alfaro, L., Sathivel, S. (2012). Development of Cantaloupe (*Cucumis melo*) Juice Powders Using Spray Drying Technology. *LWT -Food Science and Technology*, 46, 287-293.
- Stanton, L.W. (2001). Methods to profile gene expression. *Trends Cardiovascular Medicine*, 11, 49-54.
- Stacy, R.A., Aalen, R.B. (1998). Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late embryogenesis- abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, 206(3), 476–478. doi:10.1007/s004250050424
- Steponkus, P.L., Uemura, M., Joseph, R.A., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1998) Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Science*, 95, 14570–14575.
- Sunkar, R., Zhu, J.K. (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 16, 2001–2019.
- Sunkar, R., Zhou, X., Zheng, Y., Zhang, W., Zhu, J.-K. (2008). Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC Plant Biology*, 8, 25.
- Suo, J., Liang, X., Pu, L., Zhang, Y., Xue, Y. (2003). Identification of GhMYB109 encoding a R2R3 MYB transcription factor that expressed specifically in

- fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1630(1), 25-34.
- Suyama, M., Torrents, D., Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.*, 34, W609–W612.
- Şanlıdilek, D.S. (2009). Light Cyler Real Time PCR Teknolojisi ile Faktör V Geninde Yeni Mutasyon Taranması Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*. Ankara.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010). Responses and adaptations to abiotic stress. *In: Plant Physiology*, Fifth Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 755-778.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. et al. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*, 28, 2731–2739.
- Tanyolaç, B., Kaya H.B., Soya, S., Akkale C. (2012). Biyoteknoloji ve Biyoinformatik, AUTHORS: H. B. Kaya, S. Soya, C. Akkale, B. Tanyolaç, *Moleküler Biyoloji*, Edition 2, Chapter 16.
- Taşkaya, B., Keskin, G. (2004). Kavun-Karpuz. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü*. Sayı 6, Nüsha 9.
- Teuling, A.J., Van Loon, A., Seneviratne, S.I., Lehner, I., Aubinet, M., Heinesch, B., Bernhofer, C., Grünwald, T., Prasse, H., & Spank, U. (2013). Evapotranspiration amplifies European summer drought. *Geophysical Research Letters*, 40 (10), 2071-2075.
- Tobin, A. J., Dusheck J. (2001). *Asking about Life* kitabından 2/e figüre 13.7'den uyarlanılmıştır.
- Tollete, D., Jaquinod, M., Mangavel, C., Passirani, C., Saulnier, P., Stephen Manon, et al. (2007). Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell*, 19, 1580-1589.
- Tollete, D., Hinch, D. K., Macherel, D. (2010). A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *Biochim Biophys.*, 1798, 1926–1933.
- Tunnacliffe, A., Lapinski, J. and McGee, B. (2005). A Putative LEA Protein, but No Trehalose, Is Present in Anhydrobiotic Bdelloid rotifers. *Hydrobiologia*, 546, 315-321.

- Türktaş, M. (2011). DNA Dizi Analizi. *Floresan Temelli Yeni nesil genetik analiz uygulamaları: DNA dizi analizi, moleküler markörler uygulamaları ve çoklu gen anlatım analizleri uygulamalı eğitimi kitapçığı*, TÜBİTAK.
- Türktaş, M., Kurtoğlu, K.Y., Dorado, G., Zhang, B., Hernandez, P., Unver, T. (2014). Sequencing of plant genomes—a review. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 1-39.
- Van Kappel, A. L., Steghens, J. P., Zeleniuch-Jacquotte, A., Chajes, V., Toniolo, P., Riboli, E. (2001). Serum carotenoids as biomarkers of fruit and vegetable consumption in the New York Women's health study. *Public Health Nutrition*, 4(3), 829-835.
- Vicente-Serrano, S.M., Lopez-Moreno, J., Beguería, S., Lorenzo-Lacruz, J., Sanchez-Lorenzo, A., García-Ruiz, J.M., et al. (2014). Evidence of increasing drought severity caused by temperature rise in southern Europe. *Environmental Research Letters*, 9, 044001, doi:10.1088/1748-9326/9/4/044001
- Vouldoukis, I., Lacan, D., Kamate, C., Coste, P., Calenda, A., Mazier, D. (2004). Antioxidant and anti-inflammatory properties of a Cucumis melo LC. Extract rich in superoxide dismutase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 67-75.
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Plant Biotechnology*, 17(2), 113–122.
- URL-1. FAOSTAT Web Sitesi, 04/01/2016 tarihinde <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> adresinden alınmıştır.
- URL-2. Çetiner, S. Türkiye ve Dünyada Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvencesi: Sorunlar ve Öneriler, 11/11/2015 tarihinde <http://students.sabanciuniv.edu/~sedakaya/index.php> adresinden alınmıştır.
- URL-3. Vegetable MD Online, Cucurbit, 01/01/2016 tarihinde <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/DiagnosticKeys/CucurWlt/CucWltKey.htm> adresinden uyarlanarak alınmıştır.
- URL-4. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı, 01/01/2016 tarihinde <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> adresinden alınmıştır.
- URL-5. Tarım Kütüphanesi, Kavun Tarımı, 01/01/2016 tarihinde http://www.tarimkutuphanesi.com/KAVUN_TARIMI_01734.html adresinden alınmıştır.

- URL-6. Bahçesel, KARPUZ Botanik Özellikleri, 21/01/2016 tarihinde <http://www.bahcesel.net/forumsel/genel-ve-ozel-sebzecilik-profdratila-gunay/18817-karpuz-botanik-ozellikleri/> adresinden alınmıştır.
- URL-7 United States Department of Agriculture Plant Data Base, Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum. & Nakai var. lanatus watermelon 21/01/2016. tarihinde <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CILAL> adresinden alınmıştır.
- URL-8. Late Embryogenesis Abundant Proteins DataBase, <http://forge.info.univ-angers.fr/~gh/Leadb/index.php> 02/09/2015 tarihinde adresinden ulaşılmıştır.
- URL-9. Pfam 29.0 Database, <http://pfam.sanger.ac.uk/> 02/05/2015 tarihinde adresinden ulaşılmıştır
- URL-10. Late Embryogenesis Abundant Proteins DataBase , <http://forge.info.univ-angers.fr/~gh/Leadb/index.php?action=0&mode=0> 02/05/2015 tarihinde adresinden ulaşılmıştır.
- URL-11. Cucurbit Genomics Database, 20/04/2015 tarihinde <http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/tool/blast.cgi> adresinden alınmıştır.
- URL-12. Melonomics kavun genomu veri tabanı, 26/05/2015 tarihinde <https://melonomics.net/tools/blast/run/> adresinden alınmıştır.
- URL-13. ExPASy SIB Bioinformatics Resource Portal veri tabanı, 20/04/2015 tarihinde <http://web.expasy.org/protparam> adresinden alınmıştır.
- URL-14. Multiple Em for Motif Elicitation, 29/09/2015 tarihinde <http://meme-suite.org/tools/meme> adresinden alınmıştır.
- URL-15. Blast2go programı, 10/10/2015 tarihinde <http://www.blast2go.com> adresinden alınmıştır.
- URL-16. Phytozome the plant genomics resource, 09/08/2015 tarihinde www.phytozome.net adresinden alınmıştır.
- URL-17. Clustal Omega multiple sequence alignment, 05/08/2015 tarihinde <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> adresinden alınmıştır.
- URL-18. PAL2NAL, 05/08/2015 tarihinde <http://www.bork.embl.de/pal2nal/> adresinden alınmıştır.
- URL-19. The microRNA database, 20/10/2015 tarihinde <http://www.mirbase.org/> adresinden alınmıştır.
- URL-20. PMRD: plant microRNA database, 20/10/2015 tarihinde <http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD/> adresinden alınmıştır.

- URL-21. A Plant Small RNA Target Analysis Server, 20/10/2015 tarihinde <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/> adresinden alınmıştır.
- URL-22. Protein Homology/Analog/YRecognition Engine, 10/08/2015 tarihinde <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2> adresinden alınmıştır.
- URL-23. BM Laboratuvar sistemleri Web Sitesi, 04/01/2016 tarihinde [http://www.bmlabosis.com/Urunler/1292/Mikrosantrifuj-Tupu-20ml-olculundirme-cizgili#prettyPhoto\[product-gallery\]/0/](http://www.bmlabosis.com/Urunler/1292/Mikrosantrifuj-Tupu-20ml-olculundirme-cizgili#prettyPhoto[product-gallery]/0/) ependorf resminden uyarlanmıştır.
- URL-24. Techne, Prime Thermal Cyclers, 04/01/2016 tarihinde <http://www.techne.com/product.asp?dsl=925> adresinden alınmıştır.
- URL-25. Fisher biotec. Gel Documentation System - QUANTUM ST5. 04/01/2016 tarihinde http://www.fisherbiotec.com.au/shop/product/gel_documentation_system-quantum_st5/48 adresinden alınmıştır.
- URL-26. Biotechnology Center, qPCR Service at the Gene Expression Center 04/01/2016 tarihinde <https://www.biotech.wisc.edu/services/gec/productsservices/rochelghtcyclerservices> adresinden alınmıştır.
- Ünver, T., Bozkurt, O., Akkaya, M.S. (2008). Identification of differentially expressed genes of a boron tolerant plant, *Gypsophila perfoliata* L., under toxic boron levels., *Plant Cell Reports* (ISI) , 27 (8), 1411-1422.
- Ünver, T., Budak, H. (2009). Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*, *Planta* (ISI) , 230 (4), 659-669.
- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., Çakiris, A. (2011). Yeni Nesil DNA Dizileme. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, Cilt 1, Sayı 1, 11-18.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wang, S., Zhu, Q.H., Guo, X., Gui, Y., Bao, J., Helliwell, C. et al. (2007). Molecular evolution and selection of a gene encoding two tandem microRNAs in rice. *FEBS Letters*, 581, 4789-4793.
- Wang, L., Li, X., Chen, S., Liu, G. (2009). Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* plants with constitutively expressed wheat TaLEA (3). *Biotechnology Letters*, 31(2), 313–319. doi: 10.1007/s10529-008-9864-5
- Warner, A.H., Miroshnychenko, O., Kozarova, A., Vacratsis, P.O., MacRae, T.H., Kim, J., et al. (2010). Evidence for multiple group 1 late embryogenesis

- abundant proteins in encysted embryos of *Artemia* and their organelles. *Journal Biochemistry*, 148(5), 581–592. doi: 10.1093/jb/mvq091
- Whitaker, T.W. and Davis, G.N. (1962). *Cucurbits: Botany, Cultivation and Utilization*. London: Leonard Hill.
- Williams, A.P., Allen, C.D., Macalady, A. K., Griffin, D., Woodhouse, C.A., Meko, D.M., et al. (2013). Temperature as a potent driver of regional forest drought stress and tree mortality. *Nature Climate Change*, 3, 292–297.
- Wise, M.J. (2002). The POPPs: clustering and searching using peptide probability profiles. *Bioinformatics* (Suppl 1), 18, 38–45.
- Wise, M.J. (2003). LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics*, 4, 52.
- Wise, M.J. and Tunnacliffe, A., (2004). POPP the question: what do LEA proteins do?, *Trends in Plant Science*, 9, 13–17.
- Wolkers, W.F., McCready, S., Brandt, W.F., Lindsey, G.G., Hoekstra, F.A. (2001). Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochim Biophys., Acta* 1544, 196–206.
- Wong, M. L. and Medrano, J. F. (2005). Review: Real Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Wu, G., Zhang, H., Sun, J., Liu, F., Ge, X., Chen, W. H., et al. (2011). Diverse LEA (late embryogenesis abundant) and LEAlike genes and their responses to hypersaline stress in post-diapause embryonic development of *Artemia franciscana*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 160(1), 32–39. doi:10.1016/j.cbpb.2011.05.005
- Xin, W., Wang, Y., Yao, Y., Xie, C., Peng, H., Ni, Z. et al. (2010). Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 10, 123.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T., Wu, R. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110, 249–257
- Yang, Z., Gu, S., Wang, X., Li, W., Tang, Z., et al. (2008). Molecular evolution of the cyp2 like gene family in plants: insights from comparative genomics of *Arabidopsis* and rice. *Journal Molecular Evolution*, 67, 266–277.

- Yokota, A., Kawasaki, S., Iwano, M., Nakamura, C., Miyake, C., Akashi, K. (2002). Citrulline and DRIP-1 protein in drought tolerance of wild watermelon. *Annals of Botany*, 89, 825–832.
- Yüzbaşıoğlu A. (2008). Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*. Ankara.
- Zegzouti, H., Jones, B., Marty, C., Lelièvre, J.M., Latché, A., Pech, J.C. et al. (1997). ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding, *Plant Molecular Biology*, vol. 35, no. 6, 847–854,
- Zhang, Y. (2005). miRU: an automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Res* 33, W701–4.
- Zhang, Y., Skolnick, J. (2005). The protein structure prediction problem could be solved using the current PDB library. *Proc. Natl. Acad. Science*, 102(4), 1029-34.
- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., et al. (2007). Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 354, Issue 2, 585–590. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.022
- Zhao, P., Liu, F., Ma, M., Gong, J., Wang, Q., Jia, P., et al (2011). Overexpression of AtLEA3-3 confers resistance to cold stress in Escherichia coli and provides enhanced osmotic stress tolerance and ABA sensitivity in Arabidopsis thaliana. *Mol. Biol*, 45(5), 785–796. doi:10.1134/s0026893311050165
- Zhou, X., Wang, G., Zhang, W. (2007). UV-B responsive microRNA genes in Arabidopsis thaliana, *Mol. Syst. Biol.*, 3, 103.
- Zhou, X., Wang, G., Sutoh, K., Zhu, J.-K., Zhang, W. (2008). Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis, *Biochim. Biophys. Acta*, 780–788.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in Oryza sativa. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4157-4168.

EKLER

- EK 1 HOAGLAND ÇÖZELTİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİ
- EK 2 KAVUNDA (*Cucumis melo*) TANIMLANAN LEA GENLERİ
- EK 3 CMLEA AMİNOASİTLERİNİN MOTİF ÖZELLİKLERİ
- EK 4 CMLEA AMİNOASİTLERİNİN MOTİF KOMPOZİSYONU
- EK 5 CMLEA GENLERİNİN SEGMENTAL DUPLİKASYONLARI İLE HOMOLOG VE HOMOLOG OLMAYAN DEĞİŞİM SONUÇLARI
- EK 6 CMLEA GENLERİNİN DİĞER TÜRLERLE ORTOLOG DUPLİKASYONLARININ PROTEİN KODLAMA VE BİRBİRLERİNDEN AYRILMA ORANLARI
- EK 7 CMLEA GENLERİNİN SEGMENTAL DUPLİKASYONLARI VE BİRBİRLERİNDEN AYRILMA ORANLARININ ORTALAMASI
- EK 8 KAVUNDA PSRNATARGET VERİTABANINDAN ELDE EDİLEN MİRNA HEDEFLERİ
- EK 9 KAVUNDA ÇALIŞILAN GENLERİN PROTEİN VE MRNA SEKANSI
- EK 10 KARPUZDA (*Citrullus lanatus*) TANIMLANAN LEA GENLERİ
- EK 11 KARPUZ (*Citrullus lanatus*) VE *Arabidopsis thaliana* ORTOLOG GENLERİNİN GÖSTERİMİ
- EK 12 KARPUZ (*Citrullus lanatus*) VE *Glycine max* ORTOLOG GENLERİNİN GÖSTERİMİ
- EK 13 KARPUZ (*Citrullus lanatus*) VE *Populus trichocarpa* ORTOLOG GENLERİNİN GÖSTERİMİ
- EK 14 KARPUZ (*Citrullus lanatus*) VE *Solanum tuberosum* ORTOLOG GENLERİNİN GÖSTERİMİ
- EK 15 KARPUZ (*Citrullus lanatus*) VE *Vitis vinifera* ORTOLOG GENLERİ GÖSTERİMİ
- EK 16 KARPUZ (*Citrullus lanatus*) VE *Zea mays* ORTOLOG GENLERİNİN GÖSTERİMİ
- EK 17 CLLEA AMİNOASİTLERİNİN MOTİF ÖZELLİKLERİ
- EK 18 CLLEA AMİNOASİTLERİNİN MOTİF KOMPOZİSYONU
- EK 19 CILEA GENLERİNİN TANDEM VE SEGMENTAL DUPLİKASYONLARI İLE HOMOLOG VE HOMOLOG OLMAYAN DEĞİŞİM SONUÇLARI

EK 20 *CILEA* GENLERİNİN DUPLİKASYONLARI VE BİRBİRİNDEN AYRILMA ORANLARI

EK 21 *CLLEA* GENLERİNİN DİĞER TÜRLERLE ORTOLOG DUPLİKASYONLARININ PROTEİN KODLAMA VE BİRBİRLERİNDEN AYRILMA ORANLARININ ORTALAMASI

EK 22 KARPUZDA PSRNATARGET VERİ TABANINDAN ELDE EDİLEN MİRNA HEDEFLERİ

EK 23 KARPUZDA ÇALIŞILAN GENLERİN PROTEİN VE CODİNG SEKANSI

EK 24

EK 25 CMLEA VE CLLEA GENLERİNİN EŞ ZAMANLI PZR SONUCUNDA KÖK VE YAPRAK DOKULARINDAKİ ERİME EĞRİ GRAFİKLERİ



EK 1 Hoagland çözeltisinin kimyasal içeriği

Kimyasal içerik	mg/L
Amonyum fosfat	115,03
Borik asit	2,86
Kalsiyum nitrat	656,4
Bakır Sulfat, Pentahidrat	0,08
EDTA, Disodyum Salt	3,35
Demir Sulfat, Heptahidrat	2,50
Magnezyum Sulfat, Anhydrous	240,76
Manganez klorür, Tetrahidrat	1,81
Molibden trioksit	0,016
Potasyum nitrat	606,6
Çinko Sülfat, Heptahidrat	0,22

(Kaynak: <http://phytotechlab.com/index.php/hoagland-modified-basal-salt-mixture.html>)

EK 2 Kavunda (*Cucumis melo*) tanımlanan LEA genleri

Gen Adları	Phytozome adı	Cucumis genomundaki fiziksel pozisyonu			Protein uzunluğu (aa)	pI	Moleküler ağırlığı (Da)	Kararsızlık indeksi	Kararsızlık durumu
		Kromozom	Başlangıç pozisyonu (bç)	Bitiş pozisyonu (bç)					
CmLEA-01	MELO3C002486P1	scaffold00001	3857 803	3858489	228	9,51	25730,5	44,1	Kararsız
CmLEA-02	MELO3C004861P1	scaffold00004	4202918	4203511	197	9,76	22357	46,22	Kararsız
CmLEA-03	MELO3C005720P1	scaffold00005	7246374	7247003	209	9,3	23001	45,2	Kararsız
CmLEA-04	MELO3C005721P1	scaffold00005	7248042	7248656	204	9,70	22757,8	28,35	Stabil
CmLEA-05	MELO3C005722P1	scaffold00005	7250408	7251183	217	9,41	23935,8	29,21	Stabil
CmLEA-06	MELO3C005920P1	scaffold00005	8717053	8717691	212	9,98	23761,8	102,5	Kararsız
CmLEA-07	MELO3C005927P1	scaffold00006	16032	16700	222	9,89	24806,1	52,73	Kararsız
CmLEA-08	MELO3C006056P1	scaffold00006	820498	821238	246	9,82	27557,3	58,66	Kararsız
CmLEA-09	MELO3C006079P1	scaffold00006	914241	914899	152	4,64	16297,6	15,77	Stabil
CmLEA-10	MELO3C007566P1	scaffold00007	3712393	3714638	321	10,21	35111,2	55,14	Kararsız
CmLEA-11	MELO3C008930P1	scaffold00010	3149542	3150379	170	8,08	17218,8	17,37	Stabil
CmLEA-12	MELO3C009418P1	scaffold00011	2015509	2017042	361	6,58	39809,7	25,57	Stabil
CmLEA-13	MELO3C009525P1	scaffold00011	2840739	2841320	193	9,49	22182,7	25,72	Stabil
CmLEA-14	MELO3C009526P1	scaffold00011	2847348	2847926	192	9,17	21517,8	21,65	Stabil
CmLEA-15	MELO3C009527P1	scaffold00011	2849328	2849711	127	9,51	14681,3	31,01	Stabil
CmLEA-16	MELO3C009528P1	scaffold00011	2852075	2852716	213	9,44	24175,1	31	Stabil
CmLEA-17	MELO3C009529P1	scaffold00011	2854255	2854914	219	9,71	24983,1	32,38	Stabil
CmLEA-18	MELO3C009530P1	scaffold00011	2857220	2857888	222	9,75	25224,3	32,38	Stabil
CmLEA-19	MELO3C009531P1	scaffold00011	2861663	2862331	222	9,71	25389,5	41,5	Kararsız

EK 2'nin devamı, Kavunda (*Cucumis melo*) tanımlanan LEA genleri

<i>CmLEA-20</i>	MELO3C009532P1	scaffold00011	2866943	2867578	211	9,88	23958,1	37,18	Stabil
<i>CmLEA-21</i>	MELO3C010846P1	scaffold00014	1205645	1206761	319	9,98	35173,2	59,48	Kararsız
<i>CmLEA-22</i>	MELO3C011673P1	scaffold00015	5587958	5590489	253	9,56	28040,9	46,73	Kararsız
<i>CmLEA-23</i>	MELO3C012653P1	scaffold00017	3428182	3430241	264	4,71	27467,5	32,19	Stabil
<i>CmLEA-24</i>	MELO3C012699P1	scaffold00017	4362313	4368521	270	9,77	29658,1	41,84	Kararsız
<i>CmLEA-25</i>	MELO3C013058P1	scaffold00018	5227013	5227774	253	10,26	27546,2	45,17	Kararsız
<i>CmLEA-26</i>	MELO3C013305P1	scaffold00019	3847910	3855168	315	9,11	35573,8	61,93	Kararsız
<i>CmLEA-27</i>	MELO3C014499P1	scaffold00022	3532939	3533490	183	8,71	20017	30,67	Stabil
<i>CmLEA-28</i>	MELO3C014516P1	scaffold00022	3640636	3641271	211	8,44	23457,2	35,14	Stabil
<i>CmLEA-29</i>	MELO3C014517P1	scaffold00022	3646428	3647174	248	9,95	27736,4	55,19	Kararsız
<i>CmLEA-30</i>	MELO3C014705P1	scaffold00022	5141995	5142732	245	10,07	27812,8	34,38	Stabil
<i>CmLEA-31</i>	MELO3C014709P1	scaffold00022	5166318	5167094	258	9,63	28714,6	40,33	Kararsız
<i>CmLEA-32</i>	MELO3C015395P1	scaffold00025	1324583	1326121	262	5,53	27060,1	39,65	Stabil
<i>CmLEA-33</i>	MELO3C015816P1	scaffold00026	2258093	2259889	258	4,64	26518,4	30,95	Stabil
<i>CmLEA-34</i>	MELO3C015995P1	scaffold00026	3950309	3950708	105	9,41	10978,4	44,84	Kararsız
<i>CmLEA-35</i>	MELO3C016302P1	scaffold00027	3499913	3500515	200	7,77	21331,6	42,03	Kararsız
<i>CmLEA-36</i>	MELO3C016402P1	scaffold00027	4364779	4365772	162	6,63	17225,3	37,3	Stabil
<i>CmLEA-37</i>	MELO3C016872P1	scaffold00029	2748606	2749379	257	10,03	28119,5	30,72	Stabil
<i>CmLEA-38</i>	MELO3C017949P1	scaffold00031	3354825	3355296	114	6,28	12279,9	48,29	Kararsız
<i>CmLEA-39</i>	MELO3C018746P1	scaffold00034	2563915	2564631	238	9,25	26363,5	32,06	Stabil
<i>CmLEA-40</i>	MELO3C019499P1	scaffold00038	2059671	2062514	300	9,56	32652,3	59,21	Kararsız
<i>CmLEA-41</i>	MELO3C019755P1	scaffold00039	3235643	3237046	467	5,17	51242	36,09	Stabil
<i>CmLEA-42</i>	MELO3C020416P1	scaffold00043	1935292	1937108	316	4,77	35163	20,76	Stabil
<i>CmLEA-43</i>	MELO3C021179P1	scaffold00047	299613	300272	219	10,38	24575,3	25,37	Stabil

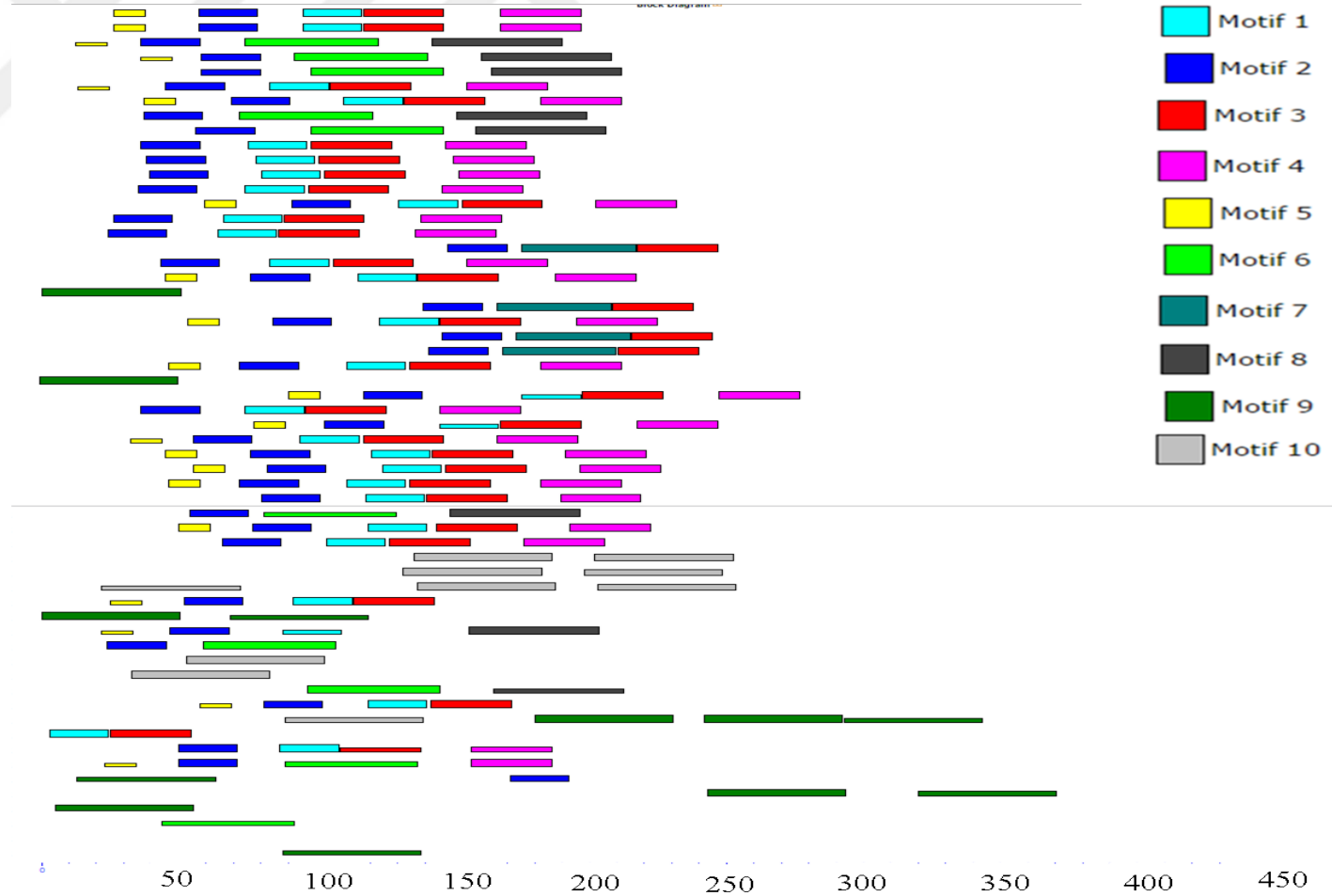
EK 2'nin devamı, Kavunda (*Cucumis melo*) tanımlanan LEA genleri

<i>CmLEA</i> -44	MELO3C022079P1	scaffold00051	1186118	1186510	64	6,54	6821,5	42,26	Kararsız
<i>CmLEA</i> -45	MELO3C022080P1	scaffold00051	1188648	1189727	65	4,93	6795,4	34,49	Stabil
<i>CmLEA</i> -46	MELO3C023323P1	scaffold00059	1435261	1436337	158	8,89	16901,5	41,11	Kararsız
<i>CmLEA</i> -47	MELO3C023399P1	scaffold00060	266317	266797	143	8,71	15437	6,02	Stabil
<i>CmLEA</i> -48	MELO3C023868P1	scaffold00063	791244	792316	238	9,53	26665,7	51,41	Kararsız
<i>CmLEA</i> -49	MELO3C024247P1	scaffold00067	206022	207584	311	9,76	34093,9	62,87	Kararsız
<i>CmLEA</i> -50	MELO3C024316P1	scaffold00067	658372	659872	224	9,43	25457,4	36,32	Stabil
<i>CmLEA</i> -51	MELO3C024389P1	scaffold00067	1226625	1227416	263	9,89	28703,3	42,56	Kararsız
<i>CmLEA</i> -52	MELO3C024581P1	scaffold00068	1163964	1164695	243	9,05	26792,8	49,12	Kararsız
<i>CmLEA</i> -53	MELO3C024583P1	scaffold00068	1173574	1174200	208	9,85	23183	35,87	Stabil
<i>CmLEA</i> -54	MELO3C025270P1	scaffold00076	1152315	1152967	202	9,86	21654,4	39,04	Stabil
<i>CmLEA</i> -55	MELO3C025331P1	scaffold00077	1061508	1063587	215	9,22	23884,6	32,99	Stabil
<i>CmLEA</i> -56	MELO3C025576P1	scaffold00080	1053618	1054265	215	9,66	23796,4	48,64	Kararsız
<i>CmLEA</i> -57	MELO3C025577P1	scaffold00080	1084625	1086198	213	8,99	24018,9	38,38	Stabil
<i>CmLEA</i> -58	MELO3C026001P1	scaffold00086	153889	154971	93	5,44	9935,7	50,15	Kararsız
<i>CmLEA</i> -59	MELO3C026002P1	scaffold00086	157214	157641	113	5,32	12270,3	52,7	Kararsız
<i>CmLEA</i> -60	MELO3C026550P1	scaffold00096	514869	516048	237	4,95	26429,2	63,23	Kararsız
<i>CmLEA</i> -61	MELO3C026872P1	scaffold00113	99531	100124	197	9,51	21068	20,12	Stabil

EK 3 CmLEA aminoasitlerinin motif özellikleri

Motif sayısı	Yeri	E-value	Aminoasit Dizisi Bileşim Motifi	Genişlik (aa)
Motif 1	27	4.5e-154	RNPNGRIGIYYDTIEVYAMYK	21
Motif 2	41	3.3e-158	WLVFRPHKPKQFHVQDVQLTQF	21
Motif 3	32	1.1e-124	QRLCTGWLPPFYQGHKNTTVWSPHFEGQQ	29
Motif 4	26	1.2e-118	ELNVEFDGRVRWKMGGWKMGRYKPKVNCE	29
Motif 5	13	7.0e-031	CWRCCCCCFCL	11
Motif 6	7	7.2e-029	VSVRNPNMASFNYSNSTMQIFYHGMVIGEAQTPGGRVEARGTQYMNVT	48
Motif 7	4	1.1e-023	DFTGVATDLMSLNSTVKLIERNPATFFGVHVSSTPIDLHYS	41
Motif 8	7	1.8e-020	GQMSISSYARIPGKVKLLHVFKEHHVSKMSCSMNIDISSHSIQDQWC	47
Motif 9	4	7.2e-019	DNSQKMSYHAGEAKGQTQEKVSNMMDTASEKAQEAKKEYAQETGQQM MEKA	50
Motif 10	5	4.6e-025	EALIEIAHQAGEKPVEQSDAEAYQEMERRATGSNMIPGGIRAEQSAET	50

EK 4 CmLEA aminoasitlerinin motif bileşenleri



Proteinler sırasıyla CmLEA-18, 19, 61, 05, 43, 16, 52, 35, 03, 20, 28, 57, 53, 31, 14, 13, 21, 06, 25, 26, 51, 10, 49, 48, 44, 40, 02, 24, 07, 37, 22, 39, 29, 54, 08, 01, 33, 23, 32, 17, 47, 04, 27, 59, 58, 55, 30, 12, 15, 56, 50, 42, 41, 09, 34, 60'dır.

EK 5 *CmLEA* genlerinin duplikasyonları ile homolog ve homolog olmayan değişim sonuçları

<i>CmLEA</i> Genlerinde Duplikasyonlar					
Gen adı	Gen adı	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -10	<i>CmLEA</i> -21	17,26	0,25	0,015	132 770
<i>CmLEA</i> -13	<i>CmLEA</i> -14	0,33	0,13	0,394	2 572
<i>CmLEA</i> -17	<i>CmLEA</i> -19	1,03	0,38	0,372	7 902
<i>CmLEA</i> -17	<i>CmLEA</i> -18	1,34	0,38	0,287	10 293
<i>CmLEA</i> -18	<i>CmLEA</i> -19	0,53	0,05	0,099	4 068
<i>CmLEA</i> -18	<i>CmLEA</i> -16	1,46	0,27	0,184	11 205
<i>CmLEA</i> -20	<i>CmLEA</i> -28	11,67	0,42	0,036	89 788
<i>CmLEA</i> -20	<i>CmLEA</i> -53	71,61	0,31	0,004	550 814
<i>CmLEA</i> -21	<i>CmLEA</i> -49	12,14	0,45	0,037	93 362
<i>CmLEA</i> -23	<i>CmLEA</i> -33	41,83	0,32	0,008	321 784
<i>CmLEA</i> -24	<i>CmLEA</i> -40	2,16	0,27	0,123	16 625
<i>CmLEA</i> -28	<i>CmLEA</i> -57	4,17	0,28	0,067	32 055
<i>CmLEA</i> -51	<i>CmLEA</i> -25	1,63	0,34	0,209	12 538
<i>CmLEA</i> -53	<i>CmLEA</i> -28	6,19	0,43	0,070	47 650
Ortalama		12,38	0,31	0,136	95 245

EK 6 *CmLEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

<i>Cucumis melo ile Arabidopsis thaliana</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -09	AT1G01470.1	1	5,61	0,24	0,04	43 131
<i>CmLEA</i> -21	AT1G45688.2	1	20,80	0,23	0,01	160 027
<i>CmLEA</i> -24	AT2G01080.1	2	53,46	0,20	0,00	411 253
<i>CmLEA</i> -26	AT5G42860.1	5	2,94	0,53	0,18	22 613
<i>CmLEA</i> -26	AT1G45688.1	1	3,76	0,52	0,14	28 896
<i>CmLEA</i> -26	AT1G45688.2	1	50,83	0,53	0,01	390 978
<i>CmLEA</i> -27	AT3G44380.1	3	4,78	0,20	0,04	36 798
<i>CmLEA</i> -42	AT2G44060.1	2	4,14	0,15	0,04	31 871
<i>CmLEA</i> -44	AT5G38760.1	5	45,45	0,22	0,00	349 621
<i>CmLEA</i> -46	AT1G20440.1	1	15,67	0,99	0,06	120 509
<i>CmLEA</i> -58	AT2G40170.1	2	4,96	0,14	0,03	38 166
<i>CmLEA</i> -58	AT3G51810.1	3	5,81	0,13	0,02	44 663
<i>CmLEA</i> -59	AT3G51810.1	3	19,72	0,10	0,01	151 672
<i>CmLEA</i> -60	AT1G76180.1	1	78,68	0,48	0,01	605 253
<i>CmLEA</i> -60	AT2G21490.1	2	3,42	1,19	0,35	26 324
Ortalama			21,34	0,39	0,06	164 118

<i>Cucumis melo-Glycine max</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -09	Glyma.18G238700.1	18	2,53	0,18	0,072	19 454
<i>CmLEA</i> -09	Glyma.16G031300.1	16	2,49	0,23	0,094	19 136
<i>CmLEA</i> -09	Glyma.07G064700.1	7	51,66	0,20	0,004	397 359
<i>CmLEA</i> -10	Glyma.05G094300.1	5	2,61	0,20	0,077	20 091
<i>CmLEA</i> -11	Glyma.03G144400.1	3	4,18	0,23	0,055	32 135
<i>CmLEA</i> -11	Glyma.19G147200.1	19	2,90	0,27	0,094	22 302
<i>CmLEA</i> -24	Glyma.08G184000.1	8	3,34	0,23	0,069	25 662
<i>CmLEA</i> -24	Glyma.15G048800.1	15	4,10	0,23	0,055	31 504
<i>CmLEA</i> -26	Glyma.09G179400.1	9	4,69	0,47	0,101	36 038
<i>CmLEA</i> -26	Glyma.05G242600.1	5	49,10	0,44	0,009	377 723
<i>CmLEA</i> -26	Glyma.07G099500.1	7	5,35	0,48	0,089	41 185
<i>CmLEA</i> -27	Glyma.11G182400.1	11	24,31	0,15	0,006	187 022
<i>CmLEA</i> -35	Glyma.08G023500.1	8	12,82	0,16	0,013	98 611
<i>CmLEA</i> -35	Glyma.05G217500.1	5	15,75	0,17	0,011	121 183
<i>CmLEA</i> -35	Glyma.01G226100.1	1	5,28	0,21	0,040	40 605
<i>CmLEA</i> -35	Glyma.09G145300.1	9	22,11	0,67	0,031	170 091
<i>CmLEA</i> -38	Glyma.15G149600.1	15	3,60	0,71	0,198	27 725
<i>CmLEA</i> -40	Glyma.08G184000.1	8	30,35	0,23	0,008	233 436
<i>CmLEA</i> -40	Glyma.15G048800.1	15	33,45	0,27	0,008	257 306

Ek 6'nın devamı, *CmLEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

<i>Cucumis melo-Glycine max</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -42	Glyma.20G044800.1	20	2,50	0,12	0,047	19 260
<i>CmLEA</i> -42	Glyma.02G277300.1	2	2,62	0,12	0,046	20 182
<i>CmLEA</i> -42	Glyma.02G277300.2	2	2,62	0,12	0,046	20 182
<i>CmLEA</i> -42	Glyma.14G037300.1	14	2,88	0,12	0,043	22 140
<i>CmLEA</i> -44	Glyma.18G278700.1	18	6,48	0,18	0,027	49 838
<i>CmLEA</i> -44	Glyma.19G040000.1	19	0,74	0,19	0,263	5 662
<i>CmLEA</i> -44	Glyma.13G050000.2	13	0,93	0,23	0,252	7 132
<i>CmLEA</i> -45	Glyma.18G278700.1	18	1,04	0,16	0,158	8 018
<i>CmLEA</i> -45	Glyma.19G040000.1	19	1,10	0,22	0,199	8 474
<i>CmLEA</i> -45	Glyma.13G050000.2	13	1,15	0,26	0,225	8 815
<i>CmLEA</i> -46	Glyma.12G235800.1	12	3,07	0,55	0,179	23 625
<i>CmLEA</i> -46	Glyma.08G048900.1	8	44,67	0,85	0,019	343 600
<i>CmLEA</i> -48	Glyma.20G216300.1	20	1,61	0,34	0,211	12 409
<i>CmLEA</i> -48	Glyma.10G174100.1	10	1,93	0,31	0,160	14 838
<i>CmLEA</i> -49	Glyma.15G015800.1	15	1,65	0,15	0,091	12 690
<i>CmLEA</i> -58	Glyma.01G119600.1	1	6,35	0,19	0,029	48 815
<i>CmLEA</i> -58	Glyma.03G056000.1	3	6,13	0,20	0,032	47 144
<i>CmLEA</i> -58	Glyma.16G097900.1	16	4,85	0,30	0,062	37 292
<i>CmLEA</i> -58	Glyma.07G152400.1	7	61,24	0,48	0,008	471 094
<i>CmLEA</i> -59	Glyma.18G203500.1	18	16,98	0,15	0,009	130 650
Ortalama			11,57	0,28	0,081	88 985

<i>Cucumis melo-Oryza sativa</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -30	LOC Os07g44100.1	7	43,50	0,93	0,02	334 589
<i>CmLEA</i> -33	LOC Os03g53610.1	3	47,91	0,35	0,01	368 561
<i>CmLEA</i> -42	LOC Os03g62620.2	3	18,44	0,19	0,01	141 879
<i>CmLEA</i> -46	LOC Os01g50700.1	1	23,78	0,58	0,02	182 892
<i>CmLEA</i> -58	LOC Os05g28210.1	5	3,50	0,19	0,06	26 888
<i>CmLEA</i> -59	LOC Os05g28210.1	5	6,24	0,17	0,03	47 992
<i>CmLEA</i> -60	LOC Os11g26750.1	11	75,53	0,88	0,01	580 993
Ortalama			31,27	0,47	0,02	240 542

Ek 6'nın devamı, *CmLEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

<i>Cucumis melo- Populus trichocarpa</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -10	Potri.007G045000.1	7	3,79	0,17	0,05	29 190
<i>CmLEA</i> -21	Potri.002G124600.1	2	2,27	0,13	0,06	17 477
	Potri.014G026800.1	14	2,32	0,13	0,06	17 818
<i>CmLEA</i> -24	Potri.001G208000.1	1	2,11	0,20	0,10	16 242
<i>CmLEA</i> -26	Potri.014G026800.1	14	5,96	0,46	0,08	45 840
<i>CmLEA</i> -26	Potri.002G124600.2	2	6,14	0,46	0,07	47 231
<i>CmLEA</i> -27	Potri.001G218400.1	1	26,92	0,19	0,01	207 078
<i>CmLEA</i> -35	Potri.003G141200.1	3	3,69	0,15	0,04	28 399
<i>CmLEA</i> -40	Potri.001G208000.1	1	2,64	0,19	0,07	20 290
<i>CmLEA</i> -42	Potri.007G146300.1	7	2,41	0,10	0,04	18 536
<i>CmLEA</i> -44	Potri.004G107500.1	4	6,06	0,23	0,04	46 625
	Potri.004G107300.1	4	8,03	0,25	0,03	61 755
	Potri.004G107700.1	4	7,28	0,25	0,03	56 025
	Potri.004G107100.1	4	7,28	0,25	0,03	56 011
	Potri.004G107900.1	4	7,28	0,25	0,03	56 021
	Potri.004G107800.1	4	7,29	0,25	0,03	56 039
	Potri.017G108400.1	17	4,74	0,24	0,05	36 479
	Potri.017G108300.1	17	5,25	0,23	0,04	40 416
	Potri.004G107600.1	4	45,39	0,51	0,01	349 128
<i>CmLEA</i> -46	Potri.002G013200.1	2	7,22	1,04	0,14	55 525
<i>CmLEA</i> -47	Potri.001G172900.1	1	2,75	0,65	0,24	21 183
<i>CmLEA</i> -48	Potri.004G067100.1	4	1,37	0,29	0,21	10 554
	Potri.017G154000.1	17	1,59	0,29	0,18	12 199
<i>CmLEA</i> -49	Potri.001G183600.1	1	1,53	0,15	0,10	11 785
	Potri.003G052900.1	3	1,47	0,16	0,11	11 315
<i>CmLEA</i> -58	Potri.010G187100.1	10	2,37	0,16	0,07	18 239
Ortalama			6,74	0,28	0,07	51 823

<i>Cucumis melo- Solanum tuberosum</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -09	PGSC0003DMT400000221	1	5,06	0,21	0,04	38 905
<i>CmLEA</i> -11	PGSC0003DMT400029761	10	41,67	0,51	0,01	320 575
<i>CmLEA</i> -24	PGSC0003DMT400076587	1	7,90	0,16	0,02	60 780
<i>CmLEA</i> -27	PGSC0003DMT400067714	11	34,03	0,16	0,00	261 746
<i>CmLEA</i> -32	PGSC0003DMT400057862	1	43,67	0,41	0,01	335 941
<i>CmLEA</i> -40	PGSC0003DMT400076587	1	2,93	0,21	0,07	22 502
<i>CmLEA</i> -41	PGSC0003DMT400051428	7	7,51	0,65	0,09	57 802
<i>CmLEA</i> -42	PGSC0003DMT400035650	8	3,54	0,12	0,03	27 211
<i>CmLEA</i> -42	PGSC0003DMT400016543	12	6,08	0,16	0,03	46 745

Ek 6'nın devamı, *CmLEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

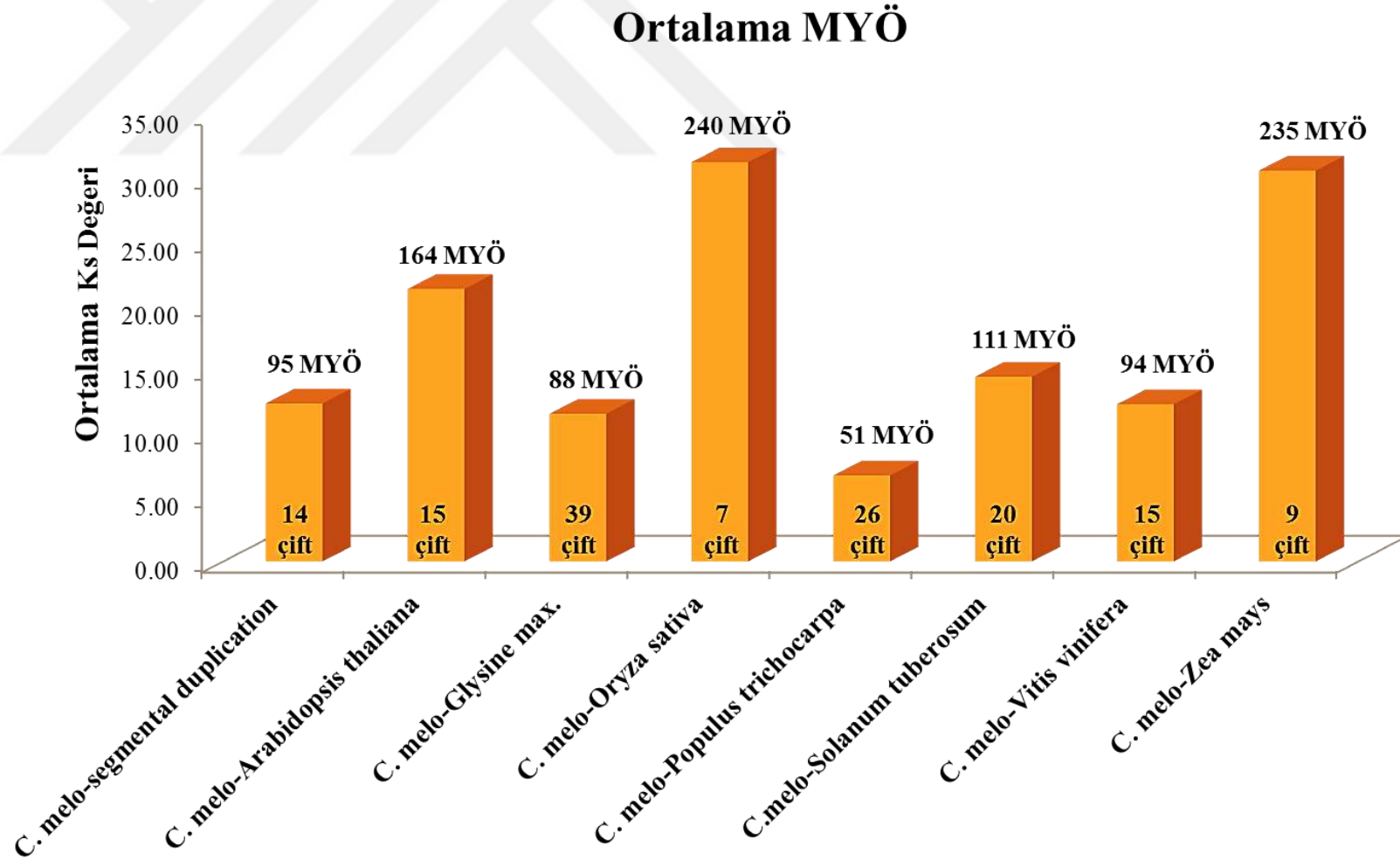
<i>Cucumis melo- Solanum tuberosum</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -44	PGSC0003DMT400026057	2	1,07	0,22	0,20	8 211
<i>CmLEA</i> -44	PGSC0003DMT400026056	2	1,62	0,24	0,15	12 445
<i>CmLEA</i> -44	PGSC0003DMT400048312	3	30,41	0,23	0,01	233 924
<i>CmLEA</i> -44	PGSC0003DMT400026054	2	1,36	0,27	0,20	10 469
<i>CmLEA</i> -45	PGSC0003DMT400048312	3	10,61	0,25	0,02	81 583
<i>CmLEA</i> -45	PGSC0003DMT400026057	2	0,73	0,29	0,39	5 588
<i>CmLEA</i> -45	PGSC0003DMT400026054	2	1,58	0,34	0,21	12 137
<i>CmLEA</i> -46	PGSC0003DMT400009070	2	11,80	13,35	1,13	90 768
<i>CmLEA</i> -58	PGSC0003DMT400017025	6	2,34	0,19	0,08	18 004
<i>CmLEA</i> -58	PGSC0003DMT400021902	9	55,43	0,36	0,01	426 365
<i>CmLEA</i> -59	PGSC0003DMT400021902	9	20,10	0,26	0,01	154 582
Ortalama			14,47	0,93	0,14	111 314

<i>Cucumis melo- Vitis vinifera</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -12	GSVIVT01033739001	8	44,60	0,41	0,01	343 073
<i>CmLEA</i> -21	GSVIVT01009475001	18	1,61	0,14	0,09	12 348
<i>CmLEA</i> -24	GSVIVT01029690001	12	2,67	0,11	0,04	20 545
<i>CmLEA</i> -26	GSVIVT01009475001	18	7,52	0,47	0,06	57 854
<i>CmLEA</i> -27	GSVIVT01036107001	6	40,54	0,17	0,00	311 879
<i>CmLEA</i> -34	GSVIVT01028033001	7	1,94	0,37	0,19	14 914
<i>CmLEA</i> -35	GSVIVT01027151001	15	55,65	0,25	0,00	428 070
<i>CmLEA</i> -40	GSVIVT01029690001	12	8,64	0,09	0,01	66 465
<i>CmLEA</i> -40	GSVIVT01012274001	3	0,14	13,47	98,98	1 047
<i>CmLEA</i> -42	GSVIVT01038264001	5	2,25	0,13	0,06	17 318
<i>CmLEA</i> -49	GSVIVT01017064001	9	1,83	0,16	0,08	14 103
<i>CmLEA</i> -58	GSVIVT01032796001	13	1,54	0,14	0,09	11 811
<i>CmLEA</i> -58	GSVIVT01032795001	13	3,40	0,19	0,06	26 165
<i>CmLEA</i> -58	GSVIVT01011188001	8	4,12	0,22	0,05	31 725
<i>CmLEA</i> -59	GSVIVT01032796001	13	8,42	0,11	0,01	64 780
Ortalama			12,32	1,10	6,65	94 806

Ek 6'nın devamı, *CmLEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

<i>Cucumis melo- Zea mays</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CmLEA</i> -30	GRMZM2G113057 T01	9	18,02	0,97	0,05	138 607
<i>CmLEA</i> -34	GRMZM2G146004 T01	8	6,71	0,86	0,13	51 619
<i>CmLEA</i> -38	GRMZM2G146004 T01	8	45,01	0,83	0,02	346 205
<i>CmLEA</i> -42	GRMZM2G352415 T03	1	62,23	0,18	0,00	478 700
<i>CmLEA</i> -42	GRMZM2G352415 T02	1	62,15	0,18	0,00	478 057
<i>CmLEA</i> -42	GRMZM2G352415 T01	1	62,14	0,18	0,00	478 025
<i>CmLEA</i> -42	GRMZM2G053637 T01	7	6,62	0,25	0,04	50 910
<i>CmLEA</i> -58	AC233879,1 FGT002	6	7,43	0,18	0,02	57 132
<i>CmLEA</i> -59	GRMZM2G162659 T01	6	5,14	0,21	0,04	39 575
Ortalama			30,61	0,43	0,03	235 426

EK 7 *CmLEA* genlerinin duplikasyonları ve birbirinden ayrılma oranlarının ortalaması



EK 8 Kavunda psRNATarget veritabanından elde edilen miRNA hedefleri

miRNA adı	Hedef gen	Olasılık	UPE	miRNA başlangıç	miRNA bitiş	Hedef başlangıç	Hedef bitiş	miRNA fragment dizisi	Hedef fragment dizisi	İnhibisyon
<i>Arabidopsis lyrata</i>										
aly-miR834-5p	<i>CmLEA-30</i>	3	42,198	1	21	715	736	ACCACAGCUUC-UGCUACGAAC	GAUCAUAGCAUGAAGCUGUGGU	Bölünme
aly-miR838-3p	<i>CmLEA-41</i>	3	11,698	1	20	161	180	UUUUCUUCUUCUUCUUGCAC	GUGCAAGUGGAGGGAGGAAA	Bölünme
aly-miR838-3p	<i>CmLEA-60</i>	2,5	12,274	1	20	343	362	UUUUCUUCUUCUUCUUGCAC	GUAGAAGAAGAAGAAGAAGA	Bölünme
aly-miR842-5p	<i>CmLEA-29</i>	2,5	15,054	1	20	290	309	AUGAUGGAUCCGACCAUGAU	AUCAUCGUCGUAUUCAUCAU	Translasyon
<i>Aquilegia caerulea</i>										
aqc-miR477d	<i>CmLEA-10</i>	3	19,551	1	20	317	336	CUCUUCUCAAAGGCUUCUA	UCGACGCCAUUGAAGAAGAG	Bölünme
<i>Arabidopsis thaliana</i>										
ath-miR414	<i>CmLEA-26</i>	2,5	16,009	1	20	366	385	UCAUCUUCAUCAUCAUCGUC	GAUGAUGAUGAUGAGGAAGA	Bölünme
ath-miR5021	<i>CmLEA-03</i>	2,5	16,259	1	20	2	21	UGAGAAGAAGAAGAAGAAAA	UCUUCUUCUUCUUCUUCUUC	Bölünme
ath-miR5021	<i>CmLEA-52</i>	2,5	14,715	1	20	686	705	UGAGAAGAAGAAGAAGAAAA	UCUUCUUCUUCUUCUUCUUC	Bölünme
ath-miR5021	<i>CmLEA-37</i>	2,5	0,24	1	20	65	84	UGAGAAGAAGAAGAAGAAAA	UUUCCUUCUUCUUCUUCUUC	Bölünme
ath-miR5021	<i>CmLEA-35</i>	2,5	12,474	1	20	902	921	UGAGAAGAAGAAGAAGAAAA	UCUUCUUCUUCUUCUUCUUC	Bölünme
ath-miR837-3p	<i>CmLEA-49</i>	3	17,696	1	20	1321	1340	AAACGAACAAAAACUGAUG	GAUUGUUUUUUUGUUCGUUU	Bölünme
ath-miR854a	<i>CmLEA-20</i>	2	13,773	1	20	178	197	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translasyon
ath-miR854b	<i>CmLEA-20</i>	2	13,773	1	20	178	197	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translasyon
ath-miR854c	<i>CmLEA-20</i>	2	13,773	1	20	178	197	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translasyon
ath-miR854d	<i>CmLEA-20</i>	2	13,773	1	20	178	197	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translasyon
ath-miR854e	<i>CmLEA-20</i>	2	13,773	1	20	178	197	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translasyon
<i>Bruguiera cylindrica</i>										
bcy-miR529	<i>CmLEA-37</i>	3	0,388	1	20	59	78	GAAGAAGAGAGAUGGUAGAG	CUCUACUUCCUUCUUCUUC	Translasyon

EK 8'in devamı, Kavunda psRNATarget veritabanından elde edilen miRNA hedefleri

miRNA adı	Hedef gen	Olasılık	UPE	miRNA başlangıç	miRNA bitiş	Hedef başlangıç	Hedef bitiş	miRNA fragment dizisi	Hedef fragment dizisi	İnhibisyon
<i>Brachypodium distachyon</i>										
bdi-miR5180b	<i>CmLEA-19</i>	3	19,291	1	21	566	586	UAAGUGUCUCAGUUUUGAACU	AGUUCAUGGUGAGACACUUG	Bölünme
<i>Bruguiera gymnorhiza</i>										
bgy-miR529	<i>CmLEA-37</i>	3	0,388	1	20	59	78	GAAGAAGAGAGAUGGUAGAG	CUCUACUUUCCUUCUUCUUC	Translasyon
<i>Citrus sinensis</i>										
csi-miR3946	<i>CmLEA-26</i>	3	8,745	1	23	1061	1083	UUGUAGAGAAAGAGAAGAGAGCA	UUCUCUUUUUUCUCUUUUUACAA	Translasyon
csi-miR3948	<i>CmLEA-40</i>	2,5	10,533	1	24	189	212	UGGAGUGGGAGUGGGAGUAGGGUG	CACUCUAUUCUUACUCUCACUUCA	Bölünme
csi-miR3951	<i>CmLEA-27</i>	3	11,032	1	20	704	723	UAGAUAAAAGAUAGAGAGAAAA	UUUUCUUCUAUUUUUAUUUA	Bölünme
<i>Ectocarpus siliculosus</i>										
esi-miR3454d-3p	<i>CmLEA-16</i>	3	19,441	1	21	622	642	CUUCCAUCGGAGCUCGUCAGA	UCCGUUGAGUCCGAUGGAAG	Bölünme
esi-miR3454g-3p	<i>CmLEA-16</i>	3	19,441	1	21	622	642	CUUCCAUCGGAGCUCGUCAGA	UCCGUUGAGUCCGAUGGAAG	Bölünme
<i>Glycine max</i>										
gma-miR1514b	<i>CmLEA-04</i>	3	11,077	1	21	393	413	UUCAUUUUUAAAAUAGACAUU	GAAGUUUAUUGUAAAAGUGAA	Translasyon
gma-miR4383	<i>CmLEA-52</i>	3	11,981	1	20	661	680	UAUUGGAUCUCAGUUGAACCC	GGUUCCUUUGAGAUCAAUA	Bölünme
gma-miR4993	<i>CmLEA-56</i>	2,5	10,822	1	21	215	235	GAGCGGCGGCGUGGAGGAUG	CCUCCGCCGCCGCCGCCGCUC	Bölünme
<i>Medicago truncatula</i>										
mtr-miR2626	<i>CmLEA-48</i>	3	9,815	1	20	235	254	AACGUCGGGAUUUAGGGUGU	AAGCCCAAGAUCCCGACGUU	Bölünme
mtr-miR2629a	<i>CmLEA-55</i>	3	19,437	1	21	425	445	AGUUUUCUCGUGUAGUUAACU	GGUUGGCUACCGGGAAGACG	Bölünme
mtr-miR2629b	<i>CmLEA-55</i>	3	19,437	1	21	425	445	AGUUUUCUCGUGUAGUUAACU	GGUUGGCUACCGGGAAGACG	Bölünme
mtr-miR2629c	<i>CmLEA-55</i>	3	19,437	1	21	425	445	AGUUUUCUCGUGUAGUUAACU	GGUUGGCUACCGGGAAGACG	Bölünme
mtr-miR2629d	<i>CmLEA-55</i>	3	19,437	1	21	425	445	AGUUUUCUCGUGUAGUUAACU	GGUUGGCUACCGGGAAGACG	Bölünme
mtr-miR2629e	<i>CmLEA-55</i>	3	19,437	1	21	425	445	AGUUUUCUCGUGUAGUUAACU	GGUUGGCUACCGGGAAGACG	Bölünme
mtr-miR2629f	<i>CmLEA-55</i>	3	19,437	1	21	425	445	AGUUUUCUCGUGUAGUUAACU	GGUUGGCUACCGGGAAGACG	Bölünme

EK 8'in devamı, Kavunda psRNATarget veritabanından elde edilen miRNA hedefleri

miRNA adı	Hedef gen	Olasılık	UPE	miRNA başlangıç	miRNA bitiş	Hedef başlangıç	Hedef bitiş	miRNA fragment dizisi	Hedef fragment dizisi	İnhibisyon
<i>Oryza sativa</i>										
osa-miR2928	<i>CmLEA-55</i>	3	10,092	1	20	144	163	AAGAAGACGACAUUUUGUUG	CAACAAAACGUCGUCGUUUU	Bölünme
osa-miR414	<i>CmLEA-26</i>	2	16,009	1	21	365	385	UCAUCCUCAUCAUCGUCC	GGAUGAUGAUGAGGAAG A	Bölünme
<i>Physcomitrella patens</i>										
ppt-miR414	<i>CmLEA-26</i>	3	16,009	1	21	365	385	UCAUCCUCAUCCUCGUCC	GGAUGAUGAUGAGGAAG A	Bölünme
<i>Vitis vinifera</i>										
vvi-miR3627-5p	<i>CmLEA-18</i>	3	16.99	1	20	92	111	UUGUCGCAGGAGAGACGGCA	UGCCGUCCUCCUCCGGCAA	Bölünme

EK 9 Kavunda alışılan genlerin protein ve mRNA sekansı

<i>CmLEA-42</i> Protein sekansı
>MASSDKPEIVERGDKGKDHKEDEGEGKGGFLDKVKDFIHDIGEKIEETIGFGKPTADVSAI HIPSISLEKAEIVVDVLIKNPNVPIPLVDIDYLIESDGRKLIAGLIPDAGTIHAHGEETVKIPV KLVFDDIRNTYHDIKPGSIIPYRIKVDLIVDVPVFGRLTLPLEKTGEIPIPYKPDVDIEKIQFQR FSFEETVAILHLKLENKNDFELGLKDLDCVWLSVDSIGSADLSEFTPIDKNGISYVDLPITF RPKDFGSALWDMIRGRGTGYTIKGNIHVETPFGQMKLPIVKEGGTTRLKKNKEDGEDDDDD EE
<i>CmLEA-42</i> mRNA sekansı
>TTTACTTTATCATCCAATTGCATCCTTTTCATTTTACAAACCCGAATGAATATGAGAA TGGTTCATAATTTTGCATTTGTAATTTGCAATGAAGTTATGGCGTCTTCTGATAAGCC TGAGATCGTGGAAGAGGTGACAAAGGCAAGACCACAAGGAAGATGAAGGTGAAG GGAAGGGTGGATTCTTGACAAAGTGAAAGATTTTCATTCACGACATCGGTGAAAAGA TTGAAGAAACGATCGGTTTTGGGAAACCGACGGCCGATGTTAGTGCATTTCATATTCC ATCCATCAGTCTTGAGAAGGCTGAGATTGTTGTTGATGTTCTGATTAATAAACCCCAAT CCTGTTCTATTCCCCTAGTTGACATTGACTATTTGATAGAGAGTGATGGCAGGAAACT GATCGCTGGGCTGATTCCCGATGCTGGAACAATTCATGCTCATGGAGAGGAGACTGTC AAAATTCCTGTGAAGTTGGTTTTTGATGATATAAGGAACACATATCATGACATTAAAC CTGGCAGTATCATTCCTTACAGGATCAAGGTTGATCTGATTGTGGATGTCCTGTTTTT GGTAGGTTGACATTGCCACTTGAGAAAACCTGGAGAGATCCCTATTCTTACAAGCCCG ATGTTGATATTGAAAAGATACAGTTTCAGAGATTTTCTTTTGAAGAACTGTTGCCATT CTCCATTTAAAATTGGAGAATAAGAATGACTTTGAGTTGGGATTGAAGGACCTAGACT GTGAAGTCTGGCTCTCTGATGTTAGTATCGGAAGTGCGGATCTCTCCGAATTTACACCC ATTGATAAAAAATGGTATCAGTTACGTTGACTTACCCATCACCTTCAGGCCAAAGGACT TCGGTTCTGCACTTTGGGATATGATTAGAGGAAGAGGCACTGGCTACACCATAAAAGG GAATATTCATGTCGAGACACCTTTTGGTCAGATGAAGTTGCCCATTTGTTAAAGAGGGT GGTACTACTCGCCTCAAGAAGAATAAAGAAGATGGCGAAGATGATGACGACGAGGAG TAAACAGAAGGCGCATCATCTGGCTATAGTGGGTAGTTTCTTTTCTTTCTCATAAAA AGAAGTATGATGTTGTTCCATACATATGTTTCAGGAATTGTTTGAGTGAACCTTTGGTTA CTTTGATTGTATAGTCACCGTGTAACGACTCTTCCTTTTCGTTTTTAAATGCTTAGTTT TGGCACTGACTTTGGGTGGTGAATTTGATGTGTTTTGAAGATACTGTTTAAATATAGTC ATTATTAGCCATTATATAAAAGTCTATTGTTTCGC
<i>CmLEA-43</i> Protein sekansı
>MVGKDQAQPLTPATLDRLSSDNGETELHLKRIQRKRFIKCCSFIAALLIPTIVIIILMFTLF QIKDPIRMNRSVITKLELINNVIPKPGSNVSLTADVSVKNPNMASFKYSNTTTTLFINETVI GEVRGPPGKAKARQTVRMNVTIDIVADRVLSNLNNDVSLGKVRLRSFSRIPGKVKLLHLIG RNVVVKMNCTFVINIFSIESDQKCKRKMKM
<i>CmLEA-43</i> mRNA sekansı
>ACTGTTCCATAACCAATATGGTGGGCAAGGACCAAGCTCAGCCTCTCACCCCAGCCA CCCTCGATCGTTTGAGTAGCGACAACGGCGAAACAGAACTACATCTAAAGAGAATCC AACGAAAAAGATTCATAAAATGTTGCAGTTTCATAGCAGCTCTTCTCATAATACCCAC GATAGTAATCATCATCATCTTGATGTTCACTCTATTTCAAATCAAGGATCCCATAATCC GAATGAATAGAGTTTCAATCACAAAACCTCGAGTTGATCAACAATGTCATACCAAAGCC AGGATCCAACGTGTCACTGACTGCCGATGTGTGCGGTAAAAAATCCCAACATGGCATCG TTCAAGTATAGTAATACTACTACAACCTCTATTTCATCAATGAGACAGTGATAGGGGAGG TACGAGGGCCGCCGGGGAAAGCCAAGGCAAGACAAACAGTGCGAATGAATGTCACTA TTGACATCGTTGCCGATCGAGTCTTGTCGAACCTCAACAACGACGTGAGCTTGGGGAA GGTGAGACTGAGAAGCTTTTCAAGGATCCCAGGAAAAGTGAAGTTGTTGCATCTTATA GGGAGAAATGTTGTTGTGAAGATGAATTGTACATTCGTGATCAATATATTTCAGTAAGT CAATTGAGGATCAGAAATGCAAGAGGAAGATGAAGATGTAG

EK 10 Karpuzda (*Citrillus lanatus*) tanımlanan LEA genleri

Gen Adları	Phytozome adı	Citrullus genomundaki fiziksel pozisyonu			Protein uzunluğu (aa)	pI	Moleküler ağırlığı (Da)	Kararsızlık indeksi	Kararsızlık durumu
		Kromozom	Başlangıç pozisyonu (bç)	Bitiş pozisyonu (bç)					
CILEA-01	Cla011406	1	2015266	2016058	218	9,20	23902,8	30,36	Stabil
CILEA-02	Cla011407	1	2022858	2023472	204	9,41	22582,8	35,87	Stabil
CILEA-03	Cla011408	1	2026356	2026988	210	9,33	23265,5	48,47	Kararsız
CILEA-04	Cla003644	1	5702558	5702938	67	6,54	7023,7	30,2	Stabil
CILEA-05	Cla003646	1	5706251	5706668	67	5,67	7072,8	40,75	Kararsız
CILEA-06	Cla008398	1	9710238	9710864	208	9,89	23207,1	33,55	Stabil
CILEA-07	Cla001045	1	11493846	11494439	197	9,82	22249,8	40,83	Kararsız
CILEA-08	Cla001049	1	11583377	11585762	207	9,92	23084,7	41,52	Kararsız
CILEA-09	Cla011041	1	16528528	16529828	213	9,01	24011,8	37,1	Stabil
CILEA-10	Cla000706	1	26764900	26767123	236	10,18	25987,4	32,93	Stabil
CILEA-11	Cla014004	1	27264803	27265072	89	5,80	9786,6	66,6	Kararsız
CILEA-12	Cla007744	2	792498	796397	776	6,45	88659,1	42,62	Kararsız
CILEA-13	Cla015784	2	3493562	3496952	314	8,94	35471,7	68,54	Kararsız
CILEA-14	Cla015906	2	4697231	4699224	210	5,91	21884,8	36,65	Stabil
CILEA-15	Cla013527	2	28377745	28379250	501	5,36	55302,4	39,72	Stabil
CILEA-16	Cla013411	2	29655873	29656445	190	7,63	20431,1	30,71	Stabil
CILEA-17	Cla008639	2	32356960	32357511	183	9,07	20059,1	33,47	Stabil
CILEA-18	Cla008622	2	32467021	32467656	211	7,76	23374,6	37,13	Stabil

EK 10'un devamı, Karpuzda (*Citrillus lanatus*) tanımlanan LEA genleri

CILEA-19	Cla008621	2	32473985	32474728	247	9,95	27479,2	56,99	Kararsız
CILEA-20	Cla003144	2	34125124	34132870	1162	9,38	129808,3	44,38	Kararsız
CILEA-21	Cla003142	2	34154299	34155078	259	9,51	28731,5	44,91	Kararsız
CILEA-22	Cla008093	3	783,40	790,77	245	8,37	27577,8	48,03	Kararsız
CILEA-23	Cla019408	3	4961573	4962253	226	9,71	25577,3	47,19	Kararsız
CILEA-24	Cla011071	3	24864575	24865339	254	9,99	28081,6	45,16	Kararsız
CILEA-25	Cla011279	3	27083221	27085415	265	5,07	26858,7	43,19	Kararsız
CILEA-26	Cla011668	4	5852307	5852980	172	9,13	17504,2	21,49	Stabil
CILEA-27	Cla012059	4	17194748	17195380	210	9,67	22775,4	33,37	Stabil
CILEA-28	Cla018093	4	18536135	18536692	127	6,44	13990,3	49,04	Kararsız
CILEA-29	Cla018094	4	18538531	18539768	91	5,44	9790,6	50,19	Kararsız
CILEA-30	Cla021058	5	374,39	381,04	221	9,97	24572,8	49,54	Kararsız
CILEA-31	Cla021187	5	1097112	1097570	152	9,03	16582,8	49,03	Kararsız
CILEA-32	Cla021202	5	1191697	1192313	152	4,76	16267,6	11,68	Stabil
CILEA-33	Cla021624	5	4742546	4745670	260	4,82	27307,2	42,76	Kararsız
CILEA-34	Cla021833	5	6700169	6701398	237	5,35	25755,2	31,28	Stabil
CILEA-35	Cla013056	5	10421956	10423131	270	9,91	29612	58,15	Kararsız
CILEA-36	Cla020877	5	26012865	26013659	264	10,10	28636,1	32,1	Stabil
CILEA-37	Cla006636	6	2515885	2516328	147	10,19	16399,1	31,29	Stabil
CILEA-38	Cla009416	6	6843175	6843913	205	4,85	21441	37,24	Stabil
CILEA-39	Cla010625	6	11745954	11747827	262	8,84	29371,8	40,29	Kararsız
CILEA-40	Cla010651	6	12226786	12228116	307	9,63	34199,9	65,86	Kararsız
CILEA-41	Cla002025	6	15842696	15843646	316	4,91	35256,2	19,06	Stabil
CILEA-42	Cla004004	7	3579362	3580567	241	9,75	26866	42,8	Kararsız
CILEA-43	Cla014571	7	21000968	21001285	105	6,64	11924	24,32	Stabil

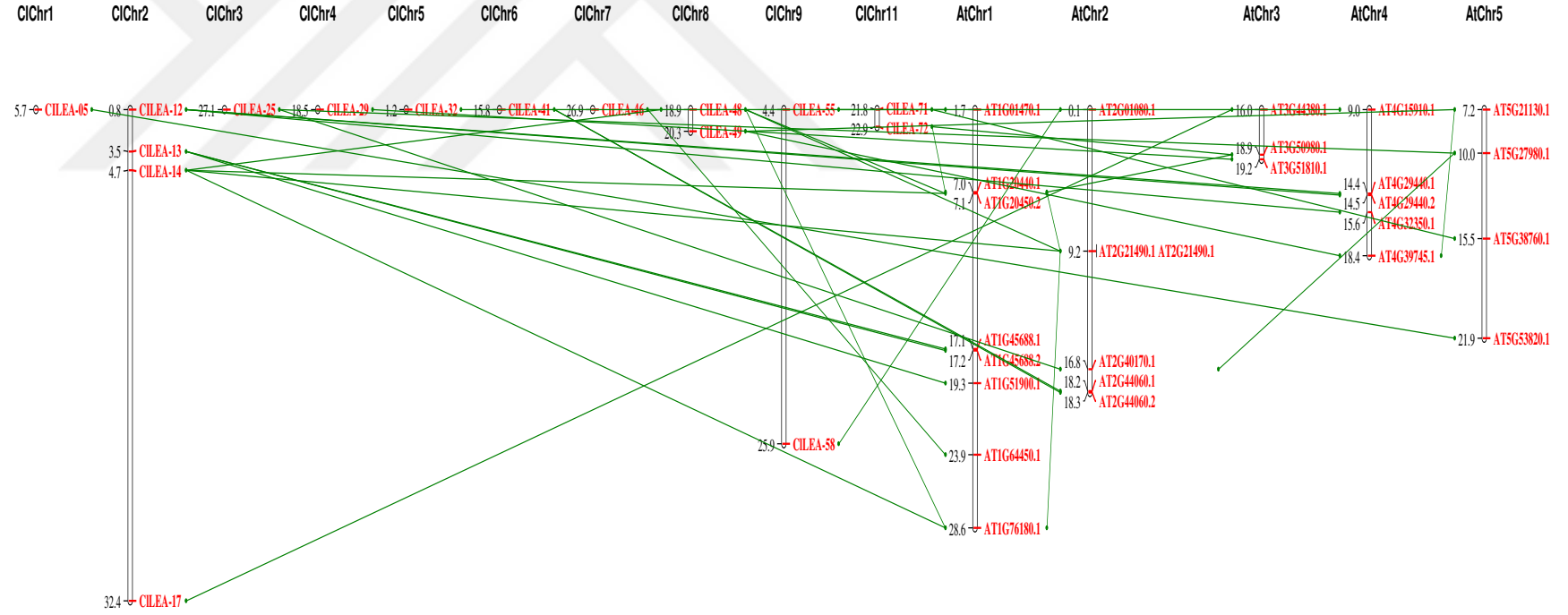
EK 10'un devamı Karpuzda (*Citrillus lanatus*) tanımlanan LEA genleri

CILEA-44	Cla014570	7	21004481	21005681	181	6,87	19291,6	28,94	Stabil
CILEA-45	Cla012611	7	24551225	24551998	257	10,30	27913,5	48,73	Kararsız
CILEA-46	Cla012811	7	26901333	26901929	198	8,87	21359,6	36,48	Stabil
CILEA-47	Cla002040	8	10401090	10401935	281	9,68	31537,9	50,17	Kararsız
CILEA-48	Cla021949	8	18885137	18886008	228	5,20	25580,3	58,51	Kararsız
CILEA-49	Cla022087	8	20286947	20287669	240	10,74	27401,1	65,24	Kararsız
CILEA-50	Cla015580	9	277,152	277,937	261	9,84	28429,2	38,66	Stabil
CILEA-51	Cla015516	9	863,84	865,522	231	8,74	25864,4	39,39	Stabil
CILEA-52	Cla015510	9	913018	913401	95	9,48	10779,4	32,41	Stabil
CILEA-53	Cla015446	9	1488053	1489706	312	9,62	34098,8	62,52	Kararsız
CILEA-54	Cla015386	9	2003843	2004637	148	6,33	15810,1	15,99	Stabil
CILEA-55	Cla015092	9	4438957	4439374	105	9,75	11004,3	50,6	Kararsız
CILEA-56	Cla014774	9	5781619	5783766	257	4,53	26417,3	25,8	Stabil
CILEA-57	Cla016278	9	10429686	10430309	207	9,26	23264,6	44,64	Kararsız
CILEA-58	Cla001975	9	25862035	25862382	115	10,12	12589,6	24,76	Stabil
CILEA-59	Cla008793	10	537005	538058	120	9,87	13243,2	34,23	Stabil
CILEA-60	Cla017401	10	16117940	16118313	82	8,89	9082,5	49,67	Kararsız
CILEA-61	Cla017398	10	16138455	16138877	100	6,73	11024,6	40,23	Kararsız
CILEA-62	Cla017538	10	23737961	23739264	106	8,05	11274,4	22,7	Stabil
CILEA-63	Cla017636	10	24765546	24766181	211	9,73	23946,1	35,18	Stabil
CILEA-64	Cla017637	10	24771438	24772106	222	9,62	25283,3	45,83	Kararsız
CILEA-65	Cla017638	10	24776163	24776831	222	9,51	24895	35,99	Stabil
CILEA-66	Cla017639	10	24783219	24783863	214	9,81	24809	43,39	Kararsız
CILEA-67	Cla017640	10	24786346	24786981	211	9,6	23985,9	39,09	Stabil
CILEA-68	Cla017641	10	24788698	24789276	192	9,22	22145,8	22,82	Stabil

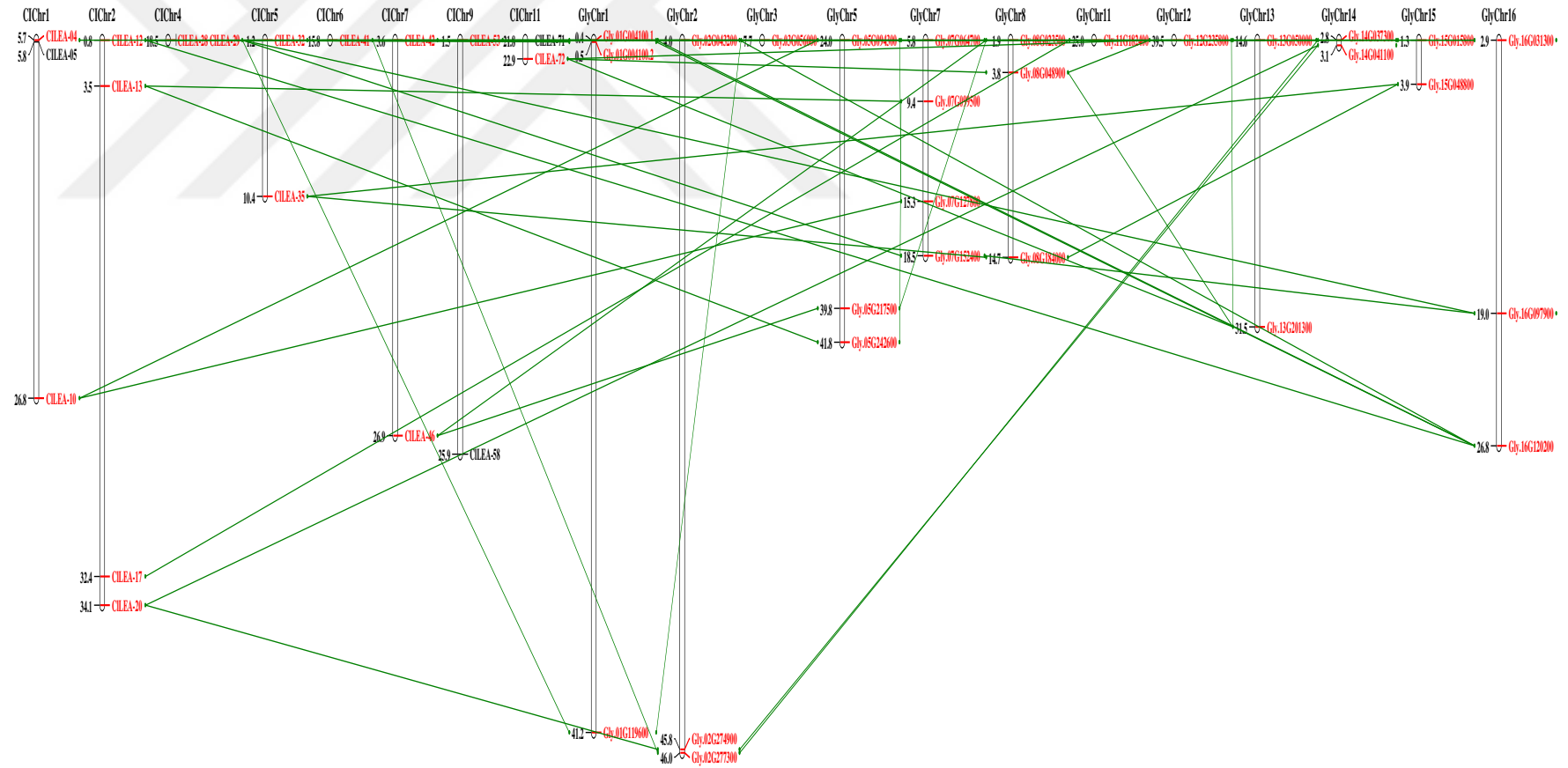
EK 10'un devamı Karpuzda (*Citrillus lanatus*) tanımlanan LEA genleri

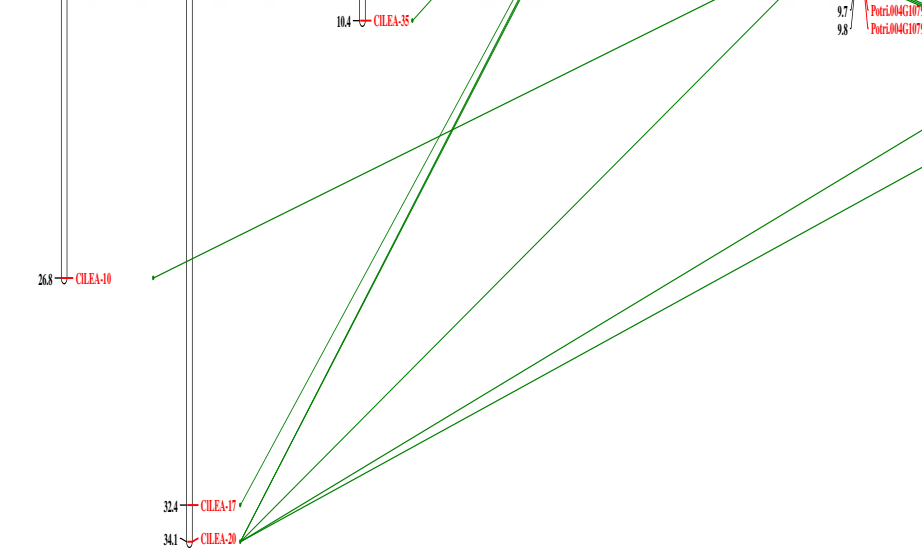
<i>CILEA</i> -69	Cla017745	10	25806588	25808479	445	5,59	48948,5	31,33	Stabil
<i>CILEA</i> -70	Cla023470	11	20973774	20974064	96	5,14	10486,7	66,62	Kararsız
<i>CILEA</i> -71	Cla016476	11	21754144	21754640	64	5,69	6779,4	26,17	Stabil
<i>CILEA</i> -72	Cla016586	11	22898755	22901186	180	8,05	19392,2	34,23	Stabil
<i>CILEA</i> -73	Cla000305	scaffold	23353648	23354283	211	9,83	23530,6	46,34	Kararsız

EK 11 Karpuz (*Citrullus lanatus*) ve *Arabidopsis thaliana* ortolog genlerinin gösterimi

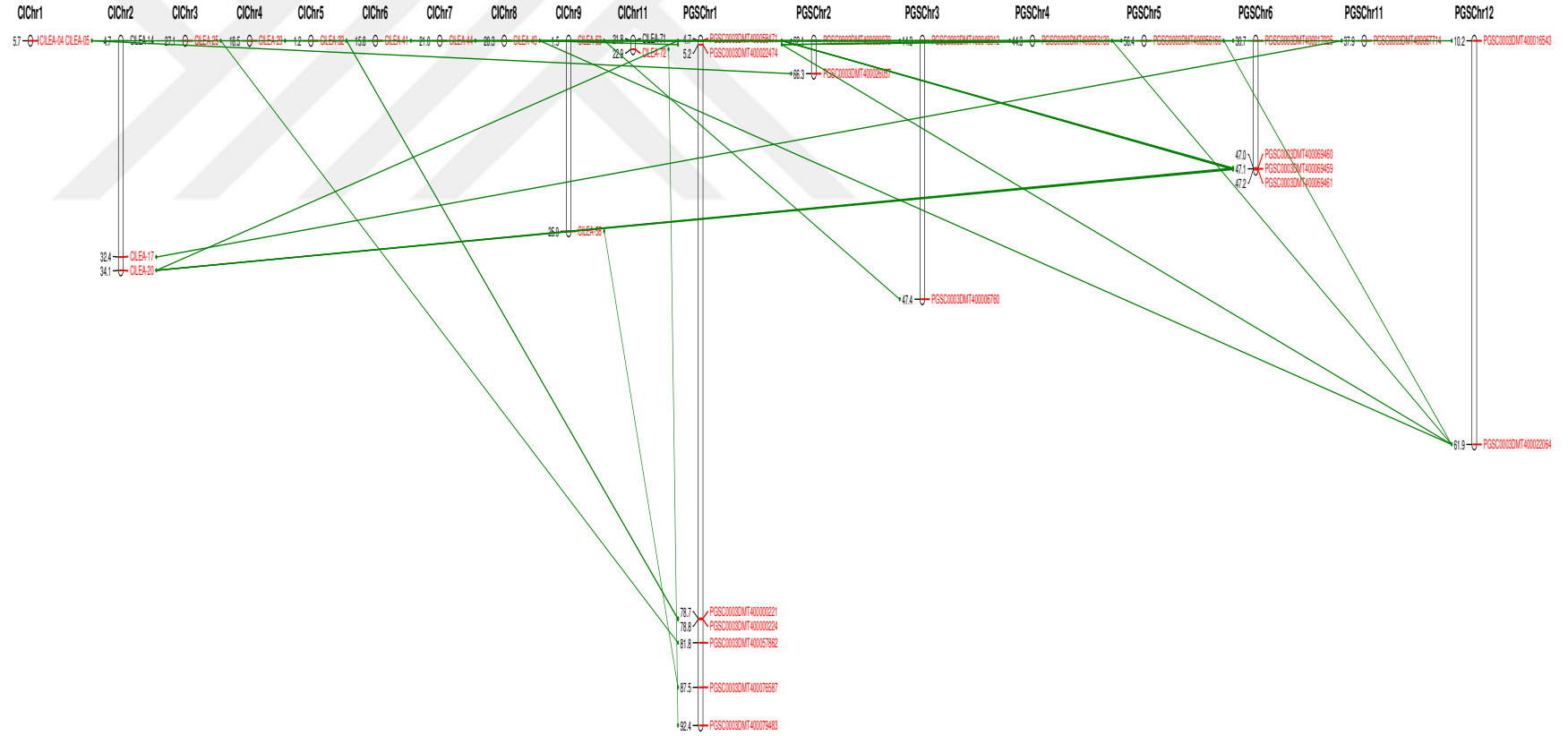


EK 12 Karpuz (*Citrullus lanatus*) ve *Glycine max* ortolog genlerinin gösterimi

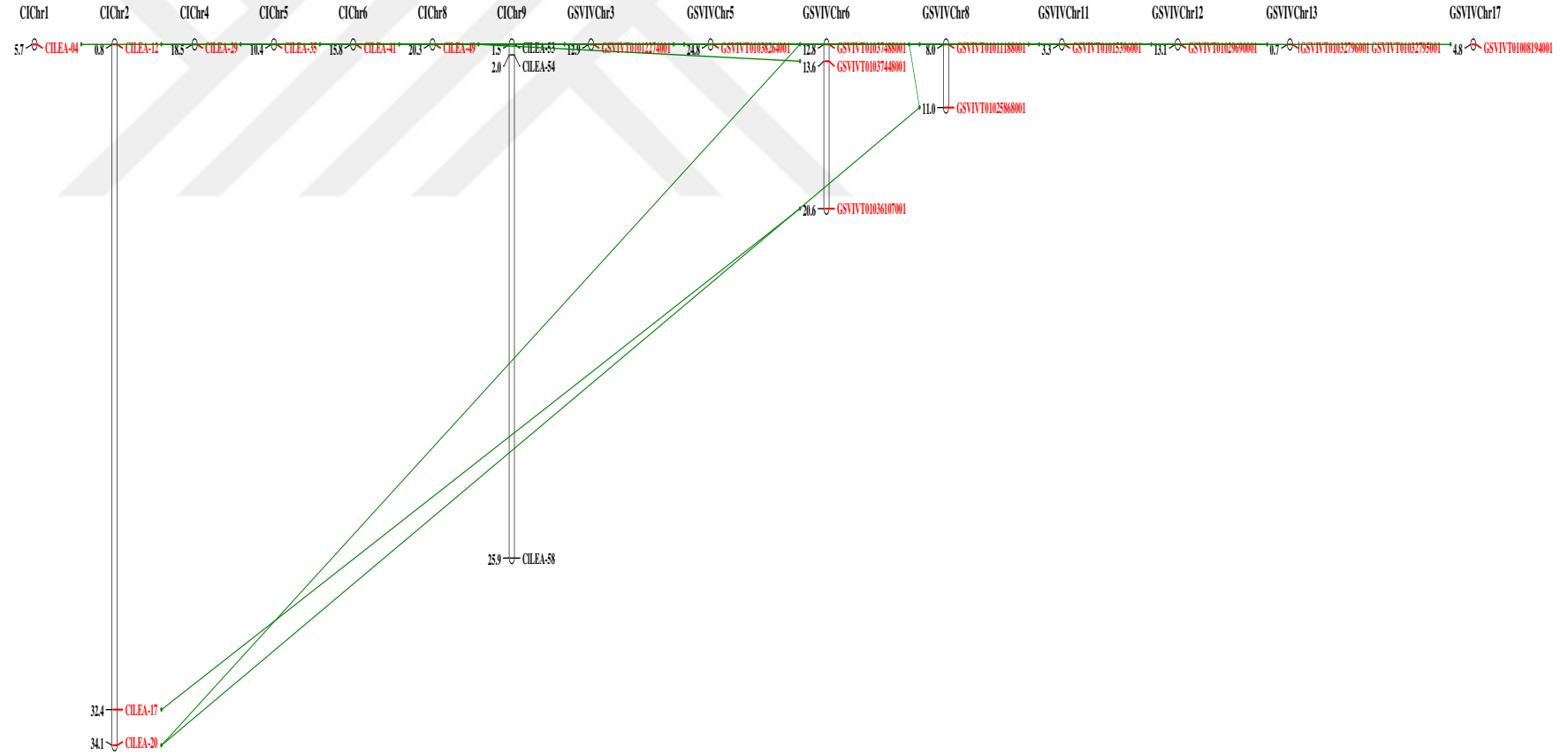




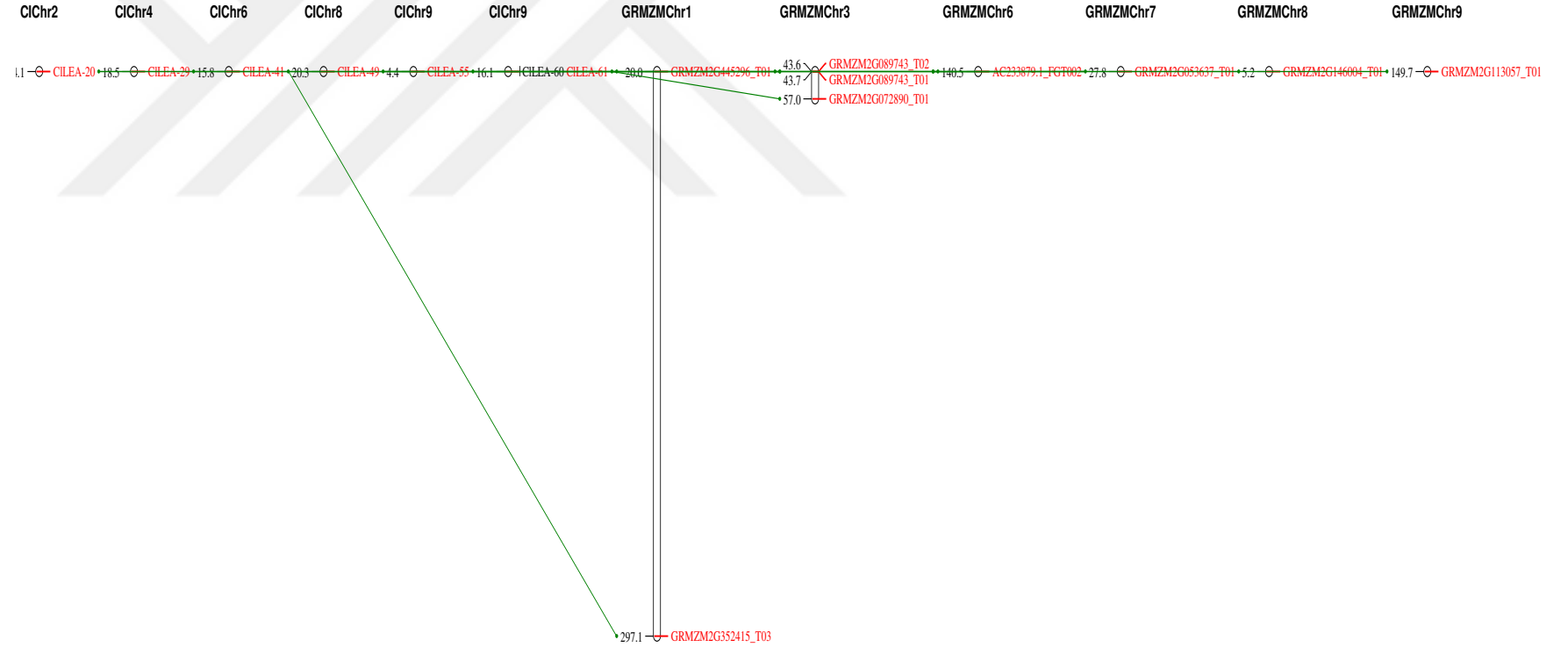
EK 14 Karpuz (*Citrullus lanatus*) ve *Solanum tuberosum* ortolog genlerinin gösterimi



EK 15 Karpuz (*Citrullus lanatus*) ve *Vitis vinifera* ortolog genleri gösterimi



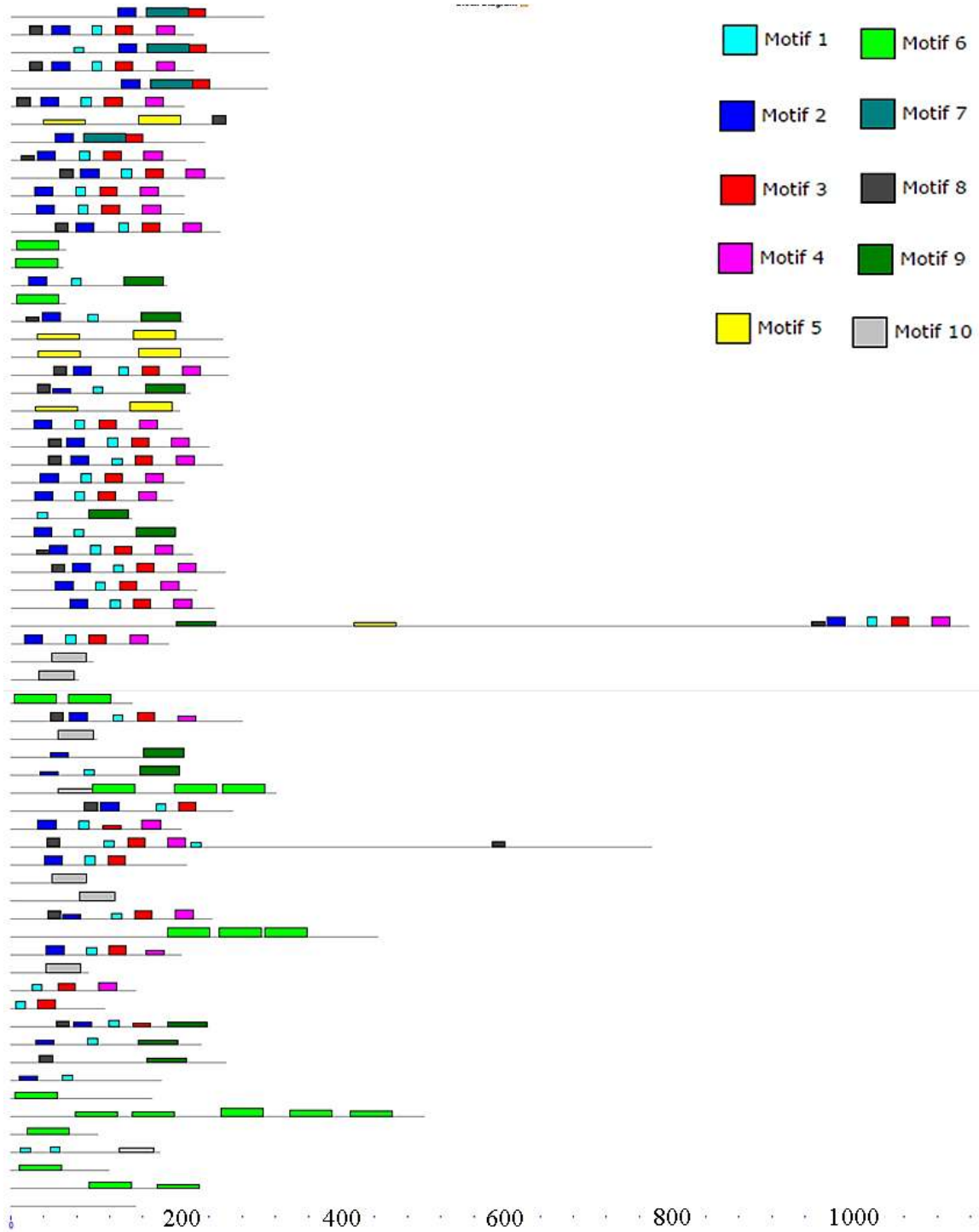
EK 16 Karpuz (*Citrullus lanatus*) ve *Zea mays* ortolog genlerinin gösterimi



EK 17 CILEA aminoasitlerinin motif özellikleri

Motif sayısı	Yeri	E-value	Aminoasit Dizisi Bileşim Motifi	Genişlik (aa)
Motif 1	41	7.9e-115	NPNKRIGIYYD	11
Motif 2	32	3.9e-144	FLVGLAVLILWLVRPHKQF	21
Motif 3	32	1.1e-096	LPPFYQGHKNTTVWSPFLSG	20
Motif 4	24	1.5e-090	GRVRWKVGWWKTWRYRIHVNC	21
Motif 5	4	1.5e-040	KPVEQSDAAAIQAAEV RATGQNVII PGGIAATAQSAATFNT RMMRDEDKI	50
Motif 6	6	5.1e-042	KMSYHAGEAKGQAQEKASNMMDKASDAAQEAKESMQEMGQQAQKAQGAA	50
Motif 7	4	5.5e-029	GSDSTGVPTKLLTLNCTLRITYHNPATFFGIHVSSSPIQLMYSQIQIASG	50
Motif 8	16	6.2e-027	HCHWHRCCCCCCCCW	15
Motif 9	7	3.3e-031	GTMNISSYARIPGRVRLLHIFKHHVVSTMSCSMTIDISNHSIQDQWC	47
Motif 10	6	1.1e-029	MGHEEYQEMTEKGGWMPDPMTGYYPENHGDEIDEAELRTK	41

EK 18 CILEA aminoasitlerinin motif bileşenleri



EK 19 CILEA genlerinin tandem ve segmental duplikasyonları ile homolog ve homolog olmayan değişim sonuçları

CILEA Genlerinde Tandem Duplikasyonlar					
Gen adı	Gen adı	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CILEA-06	CILEA-09	56,83	0,36	0,006	437 142
CILEA-64	CILEA-65	0,43	0,07	0,166	3 276
	CILEA-67	1,08	0,24	0,225	8 334
	CILEA-66	1,04	0,35	0,338	8 008
CILEA-65	CILEA-67	1,10	0,20	0,187	8 428
	CILEA-66	0,94	0,35	0,374	7 231
	CILEA-68	2,85	0,38	0,132	21 950
Ortalama		9,18	0,28	0,204	70 620

CILEA Genlerinde Segmental Duplikasyonlar					
Gen adı	Gen adı	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CILEA-06	CILEA-63	78,09	0,30	0,0038	600 684
	CILEA-18	54,60	0,39	0,0072	420 032
CILEA-09	CILEA-18	4,58	0,25	0,0544	35 222
	CILEA-63	65,38	0,41	0,0063	502 952
CILEA-13	CILEA-10	50,68	0,52	0,0102	389 837
	CILEA-53	50,26	0,57	0,0114	386 581
	CILEA-40	20,81	0,55	0,0262	160 086
CILEA-16	CILEA-27	3,15	0,33	0,1044	24 232
CILEA-18	CILEA-63	54,86	0,42	0,0077	421 994
CILEA-21	CILEA-42	3,06	0,41	0,1325	23 533
CILEA-24	CILEA-20	1,81	0,41	0,2266	13 898
CILEA-25	CILEA-56	7,17	0,47	0,0655	55 118
CILEA-33	CILEA-38	4,38	0,35	0,0792	33 656
	CILEA-56	9,58	0,46	0,0480	73 655
CILEA-36	CILEA-45	2,93	0,52	0,1768	22 573
CILEA-38	CILEA-56	4,04	0,32	0,0801	31 045
CILEA-40	CILEA-53	52,03	0,21	0,0041	400 206
	CILEA-10	2,96	0,59	0,2007	22 775
CILEA-45	CILEA-50	1,39	0,35	0,2503	10 696
CILEA-53	CILEA-10	6,32	0,58	0,0924	48 625
Ortalama		23.90	0.42	0.0794	183 870

EK 20 CILEA genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

ARABİDOPSİS-WATERMELON						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CILEA-05	AT5G53820.1	5	49,14	0,27	0,005	377 965
CILEA-12	AT1G51900.1	1	4,66	0,93	0,200	35 866
	AT4G29440.1	4	8,14	1,05	0,129	62 645
	AT4G29440.2	4	5,22	1,10	0,210	40 184
	AT4G32350.1	4	11,52	1,00	0,087	88 581
CILEA-13	AT1G45688.1	1	53,54	0,45	0,008	411 877
	AT1G45688.2	1	54,26	0,43	0,008	417 367
CILEA-14	AT2G21490.1	2	3,93	0,78	0,199	30 215
CILEA-17	AT3G44380.1	3	2,80	0,19	0,068	21 531
CILEA-25	AT5G27980.1	5	12,32	0,34	0,027	94 750
CILEA-29	AT2G40170.1	2	3,98	0,12	0,031	30 642
	AT3G51810.1	3	3,40	0,13	0,037	26 182
CILEA-32	AT1G01470.1	1	8,29	0,22	0,027	63 806
CILEA-41	AT2G44060.1	2	5,57	0,14	0,025	42 869
	AT2G44060.2	2	5,57	0,14	0,025	42 870
CILEA-46	AT1G64450.1	1	6,78	0,21	0,032	52 191
CILEA-48	AT1G20450.2	1	4,30	0,64	0,149	33 096
	AT1G76180.1	1	95,48	0,36	0,004	734 432
	AT2G21490.1	2	50,45	1,49	0,030	388 091
CILEA-49	AT5G21130.1	5	46,24	0,87	0,019	355 704
	AT4G39745.1	4	46,24	0,87	0,019	355 713
CILEA-55	AT4G15910.1	4	43,40	0,61	0,014	333 852
CILEA-58	AT2G01080.1	2	26,00	0,19	0,007	199 982
CILEA-71	AT5G38760.1	5	32,79	0,16	0,005	252 195
CILEA-72	AT3G50980.1	3	57,44	0,52	0,009	441 825
	AT1G20440.1	1	26,67	1,09	0,041	205 162
Ortalama			25,70	0,55	0,054	197 677

Citrullus lanatus- Glycine max						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CILEA-04	Glyma.13G050000.2	13	21,86	0,17	0,008	168 181
	Glyma.19G040000.1	19	8,42	0,18	0,022	64 785
	Glyma.18G278700.1	18	4,53	0,22	0,049	34 808
CILEA-05	Glyma.13G050000.2	13	15,03	0,15	0,010	115 609
	Glyma.18G278700.1	18	2,52	0,20	0,078	19 362
	Glyma.19G040000.1	19	13,38	0,17	0,012	102 886
CILEA-10	Glyma.05G094300.1	5	2,55	2,90	1,138	19 609
	Glyma.17G172900.1	17	2,14	2,68	1,252	16 445

Ek 20'nin devamı, *CILEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

<i>Citrullus lanatus- Glycine max</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CILEA-12</i>	Glyma.01G004100.1	1	62,58	0,88	0,014	481 353
	Glyma.02G043200.1	2	38,63	0,91	0,024	297 175
	Glyma.16G120200.1	16	56,91	0,87	0,015	437 788
	Glyma.01G004100.2	1	63,66	0,99	0,015	489 658
<i>CILEA-13</i>	Glyma.09G179400.1	9	48,79	0,43	0,009	375 319
	Glyma.05G242600.1	5	51,70	0,43	0,008	397 723
	Glyma.05G094300.1	5	53,95	0,43	0,008	415 028
	Glyma.07G099500.1	7	46,01	0,43	0,009	353 937
<i>CILEA-17</i>	Glyma.11G182400.1	11	5,69	0,13	0,023	43 757
<i>CILEA-20</i>	Glyma.02G274900.1	2	3,02	0,11	0,038	23 198
	Glyma.14G041100.1	14	2,99	0,12	0,039	23 007
	Glyma.20G052500.1	20	2,29	0,13	0,057	17 584
<i>CILEA-28</i>	Glyma.18G203500.1	18	7,80	0,11	0,014	59 987
	Glyma.07G152400.1	7	60,14	0,17	0,003	462 590
	Glyma.16G097900.1	16	61,69	0,12	0,002	474 546
<i>CILEA-29</i>	Glyma.01G119600.1	1	1,73	0,16	0,090	13 305
	Glyma.03G056000.1	3	2,04	0,16	0,080	15 675
	Glyma.16G097900.1	16	3,39	0,18	0,054	26 089
	Glyma.07G152400.1	7	41,97	0,39	0,009	322 844
<i>CILEA-32</i>	Glyma.18G238700.2	18	2,19	0,16	0,074	16 852
	Glyma.18G238700.1	18	2,14	0,17	0,079	16 437
	Glyma.16G031300.1	16	2,16	0,23	0,108	16 595
	Glyma.07G064700.1	7	2,10	0,18	0,087	16 178
<i>CILEA-35</i>	Glyma.08G184000.1	8	10,99	0,24	0,022	84 505
	Glyma.15G048800.1	15	47,77	0,26	0,005	367 472
<i>CILEA-41</i>	Glyma.20G044800.1	20	2,85	0,12	0,041	21 888
	Glyma.02G277300.1	2	3,46	0,12	0,034	26 645
	Glyma.14G037300.1	14	3,34	0,12	0,035	25 658
	Glyma.02G277300.2	2	3,47	0,12	0,033	26 676
<i>CILEA-42</i>	Glyma.20G216300.1	20	1,31	0,30	0,231	10 065
	Glyma.10G174100.1	10	2,17	0,32	0,149	16 694
<i>CILEA-46</i>	Glyma.08G023500.1	8	10,91	0,14	0,013	83 890
	Glyma.05G217500.1	5	11,07	0,15	0,014	85 134
<i>CILEA-49</i>	Glyma.14G041700.1	14	5,48	0,98	0,179	42 172
<i>CILEA-53</i>	Glyma.15G015800.1	15	1,37	0,15	0,109	10 553
<i>CILEA-58</i>	Glyma.08G184000.1	8	8,83	0,17	0,020	67 892
	Glyma.15G048800.1	15	9,04	0,17	0,019	69 528
<i>CILEA-71</i>	Glyma.18G278700.1	18	3,32	0,14	0,043	25 537

Ek 20'nin devamı, *CILEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

<i>Citrullus lanatus- Glycine max</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CILEA-72</i>	Glyma.13G201300.1	13	2,64	0,46	0,173	20 283
	Glyma.12G235800.1	12	2,80	0,45	0,161	21 538
	Glyma.08G048900.1	8	51,51	0,65	0,013	396 199
	Glyma.13G201300.1	13	2,64	0,46	0,173	20 283
	Glyma.12G235800.1	12	2,80	0,45	0,161	21 538
Ortalama			17,88	0,40	0,096	137 564

<i>Citrullus lanatus- Oryza sativa</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CILEA-20</i>	LOC Os03g09160.1	3	8,90	0,99	0,11	68 432
	LOC Os07g44100.1	7	45,88	0,83	0,02	352 918
<i>CILEA-29</i>	LOC Os05g28210.1	5	3,99	0,15	0,04	30 698
<i>CILEA-34</i>	LOC Os03g07180.1	3	44,50	4,02	0,09	342 282
<i>CILEA-41</i>	LOC Os03g62620.2	3	18,43	0,17	0,01	141 785
<i>CILEA-56</i>	LOC Os03g53610.1	3	50,19	0,36	0,01	386 096
<i>CILEA-72</i>	LOC Os01g50700.1	1	6,84	0,61	0,09	52 587
Ortalama			25,53	1,02	0,05	196 40

<i>Citrullus lanatus ile Populus trichocarpa</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CILEA-04</i>	Potri.004G107500.1	4	4,12	0,15	0,037	31 683
	Potri.004G107700.1	4	6,18	0,16	0,027	47 528
	Potri.004G107100.1	4	6,18	0,16	0,027	47 530
	Potri.004G107900.2	4	6,18	0,16	0,027	47 529
	Potri.004G107900.1	4	6,18	0,16	0,027	47 528
	Potri.004G107800.1	4	6,18	0,16	0,027	47 525
	Potri.004G107300.1	4	5,22	0,16	0,031	40 134
	Potri.017G108300.1	17	1,59	0,16	0,097	12 262
	Potri.004G107600.1	4	3,88	0,41	0,106	29 823
<i>CILEA-05</i>	Potri.004G107500.1	4	16,51	0,14	0,008	127 013
	Potri.004G107300.1	4	21,54	0,15	0,007	165 725
	Potri.004G107700.1	4	22,31	0,15	0,007	171 642
	Potri.004G107100.1	4	22,38	0,15	0,007	172 144
	Potri.004G107900.1	4	22,41	0,15	0,007	172 405
	Potri.004G107800.1	4	22,19	0,15	0,007	170 712
	Potri.017G108300.1	17	2,59	0,14	0,056	19 908
	Potri.017G108400.1	17	2,98	0,15	0,052	22 927
	Potri.004G107600.1	4	6,58	0,40	0,061	50 651

Ek 20'nin devamı, *CILEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

<i>Citrullus lanatus</i> ile <i>Populus trichocarpa</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CILEA-12	Potri.004G038600.1	4	2,53	0,81	0,322	19 436
	Potri.007G059800.1	7	22,23	0,89	0,040	171 022
	Potri.018G079500.1	18	50,42	0,92	0,018	387 879
CILEA-10	Potri.007G045000.1	7	3,17	17,55	5,540	24 369
CILEA-13	Potri.014G026800.1	14	49,67	0,42	0,008	382 085
	Potri.002G124600.2	2	50,07	0,41	0,008	385 115
	Potri.002G124600.1	2	50,05	0,41	0,008	385 031
CILEA-17	Potri.001G218400.1	1	4,97	0,19	0,038	38 240
CILEA-20	Potri.001G219700.2	1	2,12	0,09	0,043	16 275
CILEA-20	Potri.001G219700.1	1	2,12	0,09	0,043	16 275
CILEA-20	Potri.016G024200.1	16	3,29	0,17	0,053	25 307
	Potri.006G025900.1	6	2,94	0,17	0,059	22 620
	Potri.001G219700.3	1	2,21	0,11	0,048	17 031
	Potri.017G067100.1	17	49,83	0,61	0,012	383 321
CILEA-25	Potri.T122000.1	Scaffold	2,30	0,26	0,114	17 669
CILEA-29	Potri.010G187100.1	10	2,59	0,13	0,050	19 952
CILEA-32	Potri.014G090800.1	14	2,20	0,21	0,095	16 895
CILEA-35	Potri.001G208000.1	1	2,62	0,18	0,068	20 174
	Potri.T165600.1	Scaffold	3,59	0,19	0,054	27 581
CILEA-41	Potri.007G146300.1	7	2,83	0,09	0,033	21 778
	Potri.007G146300.2	7	2,90	0,10	0,034	22 335
	Potri.007G146300.3	7	2,90	0,10	0,034	22 335
CILEA-46	Potri.003G141200.1	3	3,05	0,13	0,043	23 435
CILEA-56	Potri.T122000.1	Scaffold	20,06	0,26	0,013	154 302
CILEA-58	Potri.T165600.1	Scaffold	7,42	0,17	0,023	57 095
	Potri.001G208000.1	1	8,64	0,19	0,021	66 435
CILEA-71	Potri.004G107500.1	4	4,04	0,17	0,042	31 095
	Potri.004G107300.1	4	4,33	0,18	0,042	33 342
	Potri.004G107700.1	4	3,47	0,18	0,052	26 687
	Potri.004G107100.1	4	3,47	0,18	0,052	26 687
	Potri.004G107900.2	4	3,47	0,18	0,052	26 687
	Potri.004G107800.1	4	3,47	0,18	0,052	26 687
	Potri.017G108300.1	17	2,09	0,19	0,090	16 108
	Potri.004G107600.1	4	3,91	0,61	0,156	30 045
Ortalama			10,97	0,58	0,153	84 346

Ek 20'nin devamı, *CILEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

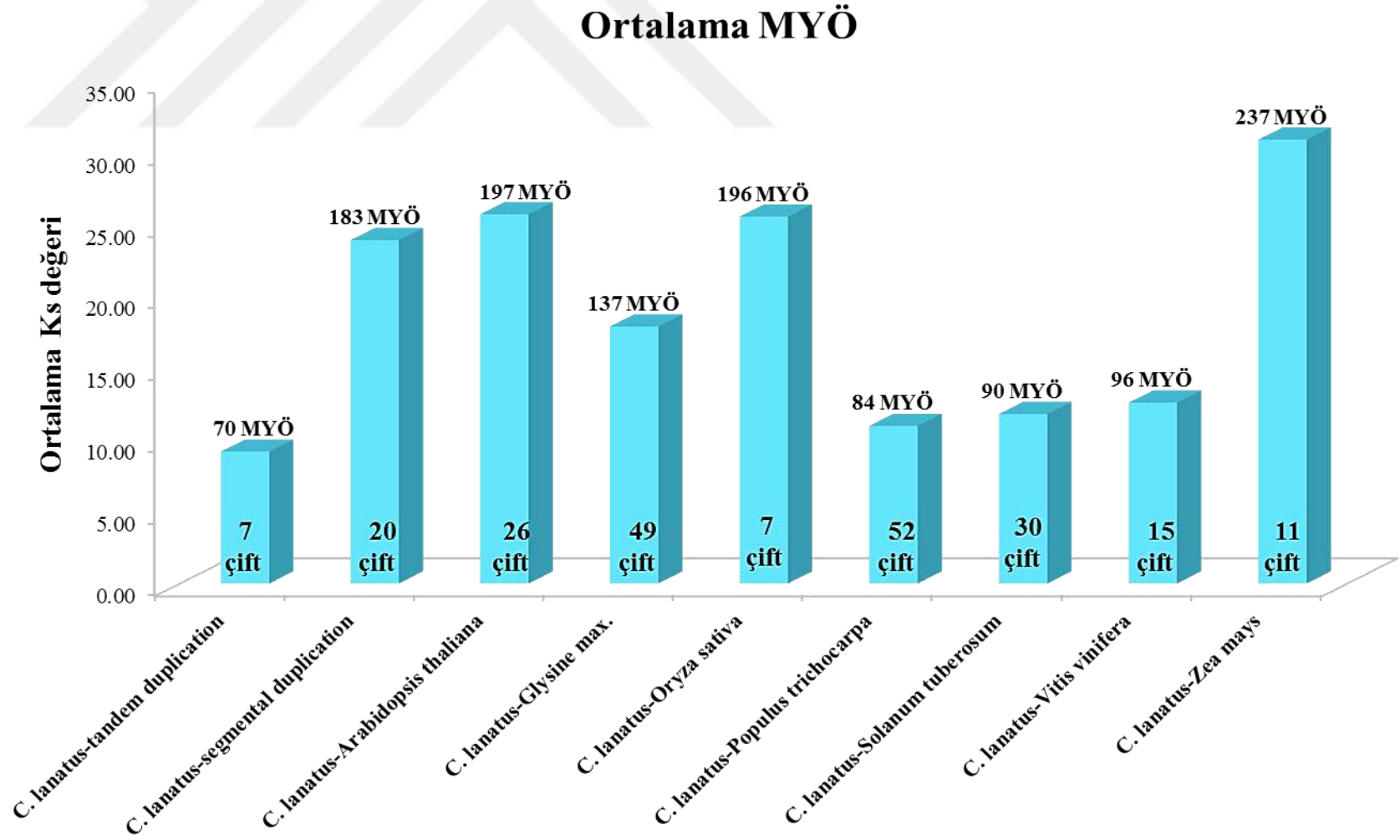
<i>Citrullus lanatus- Solanum tuberosum</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CILEA-04</i>	PGSC0003DMT400026057	2	2,29	0,22	0,09	17 621
	PGSC0003DMT400048312	3	31,73	0,27	0,01	244 100
<i>CILEA-05</i>	PGSC0003DMT400026057	2	6,16	0,21	0,03	47 388
<i>CILEA-12</i>	PGSC0003DMT400047266	7	2,26	0,84	0,37	17 389
<i>CILEA-14</i>	PGSC0003DMT400079483	1	3,03	0,69	0,23	23 296
<i>CILEA-17</i>	PGSC0003DMT400067714	11	27,69	0,14	0,01	212 991
<i>CILEA-20</i>	PGSC0003DMT400069460	6	3,21	0,12	0,04	24 728
	PGSC0003DMT400069459	6	3,21	0,12	0,04	24 728
	PGSC0003DMT400058471	1	3,52	0,12	0,03	27 102
	PGSC0003DMT400069461	6	3,63	0,14	0,04	27 891
<i>CILEA-25</i>	PGSC0003DMT400057862	1	15,24	0,31	0,02	117 230
<i>CILEA-26</i>	PGSC0003DMT400029760	10	16,05	0,37	0,02	123 482
<i>CILEA-29</i>	PGSC0003DMT400017025	6	2,41	0,14	0,06	18 570
	PGSC0003DMT400021902	9	7,79	0,30	0,04	59 920
<i>CILEA-32</i>	PGSC0003DMT400000222	1	1,87	0,25	0,14	14 358
	PGSC0003DMT400000224	1	1,92	0,25	0,13	14 759
	PGSC0003DMT400000221	1	4,57	0,20	0,04	35 189
<i>CILEA-41</i>	PGSC0003DMT400035650	8	3,68	0,12	0,03	28 277
	PGSC0003DMT400016543	12	6,77	0,16	0,02	52 088
<i>CILEA-44</i>	PGSC0003DMT400009070	2	15,73	12,46	0,79	120 962
<i>CILEA-49</i>	PGSC0003DMT400022064	12	7,01	0,73	0,10	53 934
	PGSC0003DMT400053139	4	49,38	0,77	0,02	379 823
	PGSC0003DMT400056160	5	51,61	0,88	0,02	397 018
	PGSC0003DMT400022474	1	3,87	0,97	0,25	29 802
<i>CILEA-53</i>	PGSC0003DMT400006760	3	1,81	0,18	0,098	13 899
<i>CILEA-58</i>	PGSC0003DMT400076587	1	49,71	0,20	0,00	382 359
<i>CILEA-71</i>	PGSC0003DMT400048312	3	9,82	0,17	0,02	75 559
	PGSC0003DMT400026057	2	1,45	0,15	0,10	11 158
<i>CILEA-72</i>	PGSC0003DMT400079483	1	3,09	0,38	0,12	23 786
	PGSC0003DMT400009070	2	13,35	12,92	0,97	102 671
Ortalama			11,80	1,16	0,13	90 736

Ek 20'nin devamı, *CILEA* genlerinin diğer türlerle ortolog duplikasyonlarının protein kodlama ve birbirlerinden ayrılma oranları

<i>Citrullus lanatus ile Vitis vinifera</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CILEA</i> -04	GSVIVT01008194001	17	46,94	0,25	0,005	361 075
<i>CILEA</i> -12	GSVIVT01015396001	11	8,27	1,01	0,122	63 642
<i>CILEA</i> -17	GSVIVT01036107001	6	2,57	0,16	0,062	19 793
<i>CILEA</i> -20	GSVIVT01037488001	6	2,07	0,09	0,044	15 938
	GSVIVT01025868001	8	2,98	0,15	0,050	22 943
<i>CILEA</i> -29	GSVIVT01032796001	13	1,83	0,12	0,064	14 082
	GSVIVT01032795001	13	2,94	0,14	0,048	22 650
	GSVIVT01011188001	8	2,93	0,17	0,059	22 555
<i>CILEA</i> -35	GSVIVT01029690001	12	8,71	0,11	0,013	66 976
	GSVIVT01012274001	3	5,50	1,26	0,229	42 343
<i>CILEA</i> -41	GSVIVT01038264001	5	2,65	0,12	0,044	20 379
<i>CILEA</i> -49	GSVIVT01037448001	6	5,68	0,97	0,171	43 690
<i>CILEA</i> -53	GSVIVT01017064001	9	1,61	0,14	0,089	12 397
<i>CILEA</i> -54	GSVIVT01017248001	9	42,32	1,64	0,039	325 538
<i>CILEA</i> -58	GSVIVT01029690001	12	51,87	0,21	0,004	399 001
Ortalama			12,59	0,44	0,070	96 867

<i>Citrullus sativus ile Zea mays</i>						
Gen adı	Gen adı	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>CILEA</i> -20	GRMZM2G089743 T02	3	32,84	0,15	0,005	252 603
	GRMZM2G089743 T01	3	53,61	0,16	0,003	412 349
	GRMZM2G007936 T01	7	49,51	1,04	0,021	380 839
<i>CILEA</i> -29	AC233879.1 FGT002	6	53,71	0,13	0,002	413 175
<i>CILEA</i> -41	GRMZM2G352415 T03	1	62,85	0,18	0,003	483 468
	GRMZM2G053637 T01	7	7,96	0,22	0,027	61 213
<i>CILEA</i> -49	GRMZM2G113057 T01	9	6,45	0,84	0,130	49 585
	GRMZM2G445296 T01	1	8,00	0,86	0,107	61 572
<i>CILEA</i> -55	GRMZM2G146004 T01	8	7,76	0,72	0,093	59 708
<i>CILEA</i> -60	GRMZM2G146004 T01	8	49,57	0,57	0,011	381 295
<i>CILEA</i> -61	GRMZM2G072890 T01	3	7,49	0,72	0,096	57 603
Ortalama			30,89	0,51	0,045	237 583

EK 21 *CILEA* genlerinin duplikasyonları ve birbirinden ayrılma oranlarının ortalaması



EK 22 Karpuzda psRNA Target veri tabanından elde edilen miRNA hedefleri

miRNA adı	Hedef gen	Olasılık	UPE	miRNA başlangıç	miRNA bitiş	Hedef başlangıç	Hedef bitiş	miRNA fragment dizisi	Hedef fragment dizisi	İnhibisyon
<i>Arabidopsis lyrata</i>										
aly-miR838-3p	CILEA-14	2,5	9,734	1	20	423	442	UUUUCUUCUUCUUCUUGCAC	GAGUGAGAAGAAGAAGAAGA	Bölünme
aly-miR842-5p	CILEA-42	3	20,717	1	21	201	221	AUGAUGGAUCCGACCAUGAUG	UAUCAUCGUCGGAGCCGUCGU	Bölünme
<i>Aquilegia caerulea</i>										
aqc-miR477d	CILEA-11	3	19,322	1	20	317	336	CUCUUCUUCAAAGGCUUCUA	UCGACGCCAUUGAAGAAGAG	Bölünme
<i>Arabidopsis thaliana</i>										
ath-miR414	CILEA-13	3	23,896	1	20	304	323	UCAUCUUCUUCUUCUUCGUC	GACGAUGAUGAGGAGGAAGA	Translation
ath-miR414	CILEA-52	3	17,139	1	20	93	112	UCAUCUUCUUCUUCUUCGUC	GAUGGUGGUGAGGAAGGUGA	Translation
ath-miR5658	CILEA-19	3	14,175	1	20	199	218	AUGAUGAUGAUGAUGAUGAA	AUCAUCGUCGUCUUCUUCUUC	Bölünme
ath-miR854a	CILEA-63	2	13,363	1	20	92	111	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translation
ath-miR854b	CILEA-63	2	13,363	1	20	92	111	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translation
ath-miR854c	CILEA-63	2	13,363	1	20	92	111	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translation
ath-miR854d	CILEA-63	2	13,363	1	20	92	111	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translation
ath-miR854e	CILEA-63	2	13,363	1	20	92	111	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translation
<i>Brachypodium distachyon</i>										
bdi-miR156d-3p	CILEA-33	3	16,856	1	20	653	672	GCUCACUGCUCUGUCUGUCA	CGACAGACAAGGCGGUGAGC	Translation
bdi-miR5175a	CILEA-58	2	18,603	1	20	94	113	AAGAAUUUAGGAACGGAGGG	GCCUCCGUUCCUGGAUUCUU	Bölünme
bdi-miR5180a	CILEA-64	2,5	24,007	1	21	476	496	UAAGUGUCUCAGUUUUGAACU	AGUUCAACACGGAGACACUUG	Translation
bdi-miR5180b	CILEA-64	2,5	24,007	1	21	476	496	UAAGUGUCUCAGUUUUGAACU	AGUUCAACACGGAGACACUUG	Translation
bdi-miR7756-3p	CILEA-45	3	3,744	1	23	339	361	UGGAGAUGUUGGCAUUGAAUUGG	CAAGUUCGAUCUCAACGUCUCCA	Bölünme
<i>Cucumis melo</i>										
cme-miR854	CILEA-63	1	13,363	1	20	92	111	GAUGAGGAUAGUGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC	Translation
cme-miR854	CILEA-06	2,5	12,754	1	20	89	108	GAUGAGGAUAGUGAGGAGGA	UCCUCCUCACUACCUCCUA	Bölünme

EK 22'nin devamı, Karpuzda psRNA Target veri tabanından elde edilen miRNA hedefleri

miRNA adı	Hedef gen	Olasılık	UPE	miRNA başlangıç	miRNA bitiş	Hedef başlangıç	Hedef bitiş	miRNA fragment dizisi	Hedef fragment dizisi	İnhibisyon
cme-miR854	CILEA-67	3	9,597	1	20	92	111	GAUGAGGAUAGUGAGGAGGA	UCCUCAUCGCUAUCUCAUC	Bölünme
<i>Dictyostelium discoideum</i>										
ddi-miR-1176	CILEA-20	2,5	18,97	1	20	2126	2145	CCAAUUUUUAUCAAGGAAAG	AGUUCUUGAUGAAAAUUGG	Bölünme
<i>Ectocarpus siliculosus</i>										
esi-miR3454d-3p	CILEA-67	3	22,90	1	21	564	584	CUUCCAUCGGAGCUCGUCAGA	UCCGUUGAGUCCGAUGGAAG	Bölünme
esi-miR3454g-3p	CILEA-67	3	22,90	1	21	564	584	CUUCCAUCGGAGCUCGUCAGA	UCCGUUGAGUCCGAUGGAAG	Bölünme
<i>Gossypium raimondii</i>										
gra-miR482	CILEA-15	3	9,692	1	20	1311	1330	UCUUUCCAAUCCUCCCAU	AUUGGGGGCAAUUGGAGAGA	Bölünme
<i>Lotus japonicus</i>										
lja-miR7538	CILEA-17	3	20,64	1	20	469	488	UCAACGGAGAGCUUGCUGUC	GACAGCCAUCACCGUUGA	Bölünme
<i>Medicago truncatula</i>										
mtr-miR2673a	CILEA-15	1	11,02	1	20	1425	1444	CCUCUUCCUCUCCUCUCC	GGAAGAGGGAGAGGGAGAGG	Bölünme
mtr-miR2673a	CILEA-72	2	11,559	1	22	336	357	CCUCUUCCUCUCCUCUCCAC	GAGGAGGAGGAAGAAGAAGGGG	Bölünme
mtr-miR2673b	CILEA-15	1	11,02	1	20	1425	1444	CCUCUUCCUCUCCUCUCC	GGAAGAGGGAGAGGGAGAGG	Bölünme
mtr-miR2673b	CILEA-72	2	11,559	1	22	336	357	CCUCUUCCUCUCCUCUCCAC	GAGGAGGAGGAAGAAGAAGGGG	Bölünme
mtr-miR5292a	CILEA-10	3	10,926	1	19	1776	1795	AUUCAGAUGAUA-GCAACAA	UUGUUGCCUAUCAUCUGAAC	Bölünme
<i>Nicotiana tabacum</i>										
nta-miR6020b	CILEA-10	3	20,329	1	20	1039	1058	AAAUGUUCUUCGAGUAUCUU	AAGCUGUUCGAGGAGCAUUU	Bölünme
<i>Oryza sativa</i>										
osa-miR2875	CILEA-39	2,5	17,908	1	20	723	742	AUUUACAGUCAUAUACAGUU	UGCUGAAUAUGACUGUAAA	Bölünme
osa-miR395w	CILEA-73	3	8,737	1	21	18	38	GUGAAGUGUUUGGGGAUUCU	AAAAUCCCCAAACACUGCGC	Bölünme
osa-miR414	CILEA-13	2,5	23,896	1	20	304	323	UCAUCCUCAUCAUCGUC	GACGAUGAUGAGGAGGAAGA	Bölünme

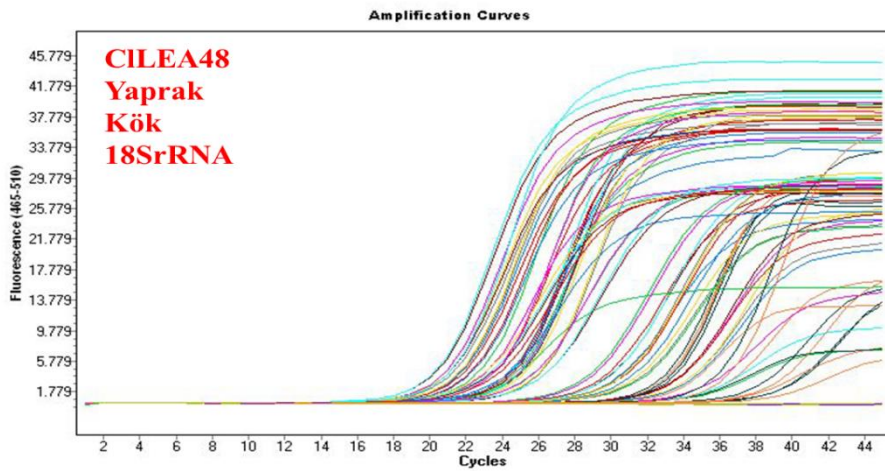
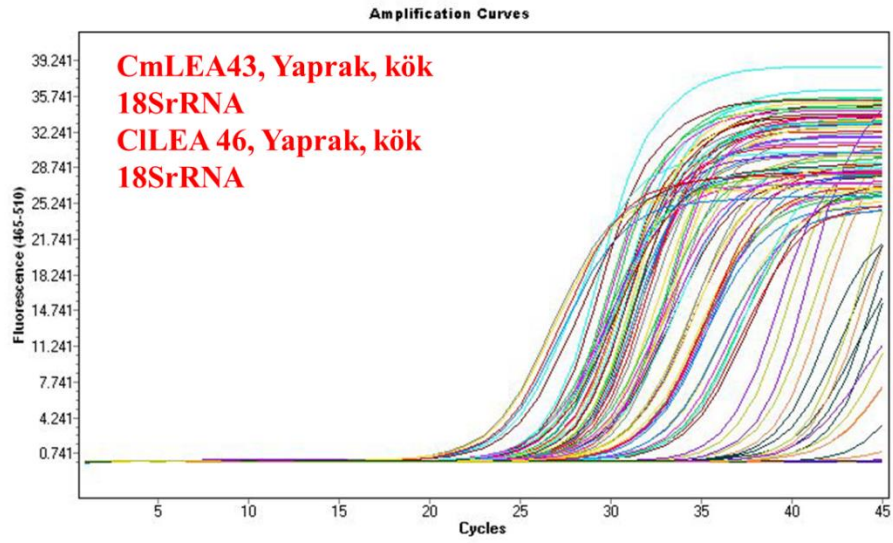
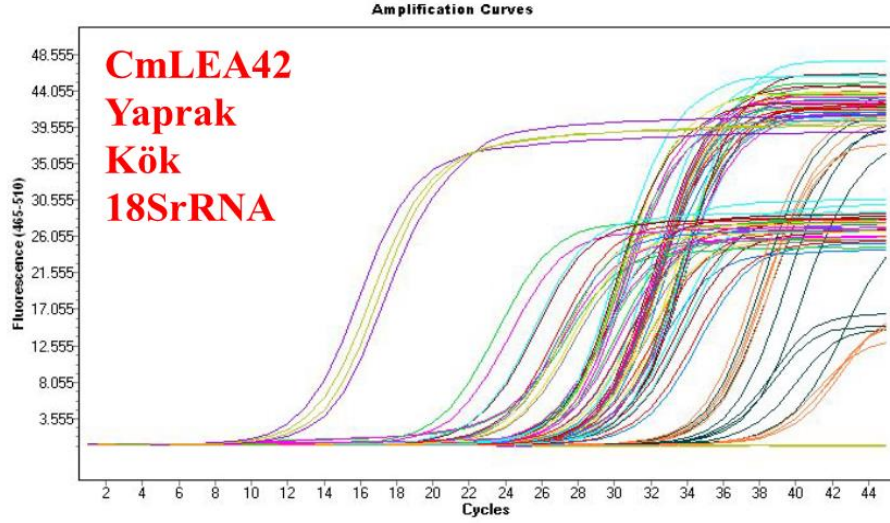
EK 22'nin devamı, Karpuzda psRNATarget veri tabanından elde edilen miRNA hedefleri

miRNA adı	Hedef gen	Olasılık	UPE	miRNA başlangıç	miRNA bitiş	Hedef başlangıç	Hedef bitiş	miRNA fragment dizisi	Hedef fragment dizisi	İnhibisyon
osa-miR414	<i>CILEA-14</i>	3	23,53	1	20	235	254	UCAUCCUCAUCAUCAUCGUC	GGUGGUGGUGGUGAGGAUGG	Bölünme
osa-miR5488	<i>CILEA-19</i>	3	13,80	1	20	196	214	UGAAGGCGACUGAUGAUUUC	GGAAUCAUC-GUCGUCUUCA	Translation
<i>Physcomitrella patens</i>										
ppt-miR2082	<i>CILEA-72</i>	3	7,192	1	20	384	403	UGUGUGUUCGCUUCUUCUU	AACAGGAAGCGGAAAACACA	Bölünme
<i>Populus trichocarpa</i>										
ptc-miR7839	<i>CILEA-38</i>	3	16,05	1	20	53	72	AGUGGCAUUGGAGGUAUCCC	GGGACAUUUUCAUGUCACU	Bölünme
<i>Selaginella moellendorffii</i>										
smo-miR1099	<i>CILEA-46</i>	3	24,42	1	20	545	564	UAUAGCAAUGGUGUUUUUGU	GCAGAAUCGCCAUUGCUGUA	Bölünme
<i>Solanum tuberosum</i>										
stu-miR8035	<i>CILEA-20</i>	3	12,83	1	22	3320	3341	UCCAUCUCAAUAUCACUUCU	GGGAAAUGAGAUUGAAGGUGGA	Bölünme
stu-miR8035	<i>CILEA-45</i>	2	18,82	1	20	604	623	UCCAUCUCAAUAUCACUUU	AAGGUGAAAUUGAAGAUGGG	Bölünme

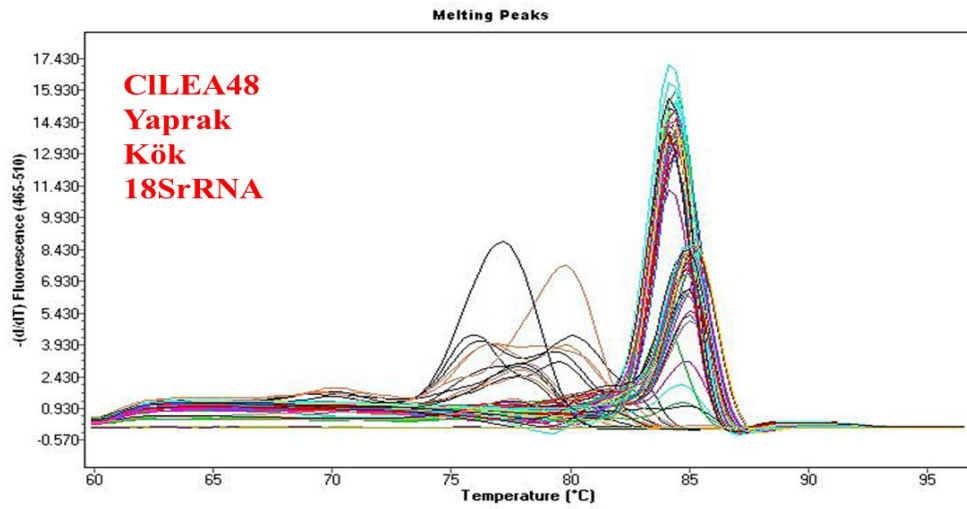
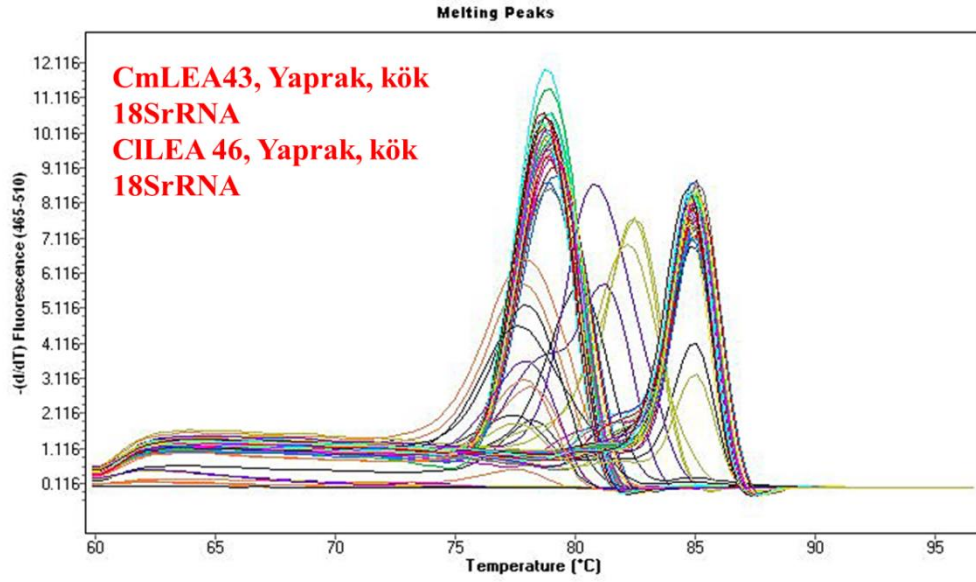
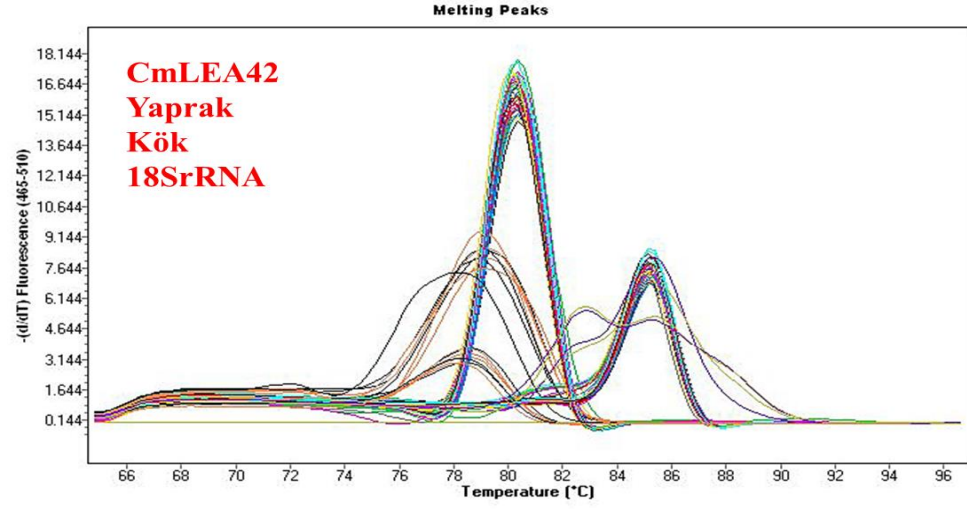
EK 23 Karpuzda çalışılan genlerin protein ve mRNA sekansı

CILEA-46 Protein sekansı
>MSKPHGHHPPSGRTNLA SCIVATIFLIFLVIVVLIVFFTVFKPQDPKIAVSAVQLPSFS VAHGTFINFTFSQYVSVRNPNKASFHYDSSVQLLYSGSQIGFMFIPASKIDAGQTQY MVATFSVQSFPLAAPVTAVGAGPTFSEGMNGYRIGPTLEIESKMDMAGRVRVLHFF THHVEATSSCRIAIAVSDGSVLGFHC
CILEA-46 mRNA sekansı
>ATGAGCAAACCCACGGCCACCACCCGCCGTCCGGCCGCACGAACTTGGCGTC ATGTATAGTCGCCACGATCTTCTTAATCTTCCTCGTCATCGTCGTTCTCATCGTC TTCTTCACCGTCTTCAAGCCTCAGGATCCGAAGATCGCCGTTTCCGCGGTCCAGT TGCCGTCCTTCTCCGTCGCTCATGGCACCATCAATTTCACTTTCTCTCAGTACGT CTCCGTCAGGAACCCTAACAAAGCTTCTTTCTCTCACTACGACAGTTCGGTTCA GCTCCTCTACTCCGTTCTCAAATTGGATTGATTGTTTATTCCCGCCAGTAAAATC GACGCCGCTCAGACGCAGTACATGGTAGCAACCTTCTCCGTCCAGTCATTCCCG TTGGCCGCTCCAGTCACCGCCGTTGGAGCTGGACCGACCTTCTCGGAAGGAATG AACGGGTACAGAATCGGACCGACGCTGGAGATTGAATCGAAGATGGATATGGC CGGTAGGGTTAGGGTATTGCACTTCTTCACTCACCATGTGGAGGCCACATCGAG TTGCAGAATCGCCATTGCTGTAAGTGATGGATCTGTGTTAGGTTTCCACTGCTA A
CILEA-48 Protein sekansı
>MAEYENKKIEEGVQESGVEATDRGLFDLFGKKKKEEEEKPHVAAPEEEVVVVTEHF EKVEVSEPPPPVHKVEEEEKKPSLLEKLTRSDSSSSSSSDEEEGENGKKKKKKGLK EKLKEKLGGEERKEEAKEHEHEAVAIPEKVDAAHPPEKKGFLEKIKEKLPGYHAKKEEKHKE EAASH
CILEA-48 mRNA sekansı
>ATGGCGGAGTACGAGAACAAGAAGATCGAGGAGGGAGTTCAAGAGAGTGGC GTCGAGGCCACGGATCGTGGGCTGTTTGATTTTTTGGGAAAGAAGAAGGAGGA AGAAGAGAAGCCCCATGTTGCAGCTCCGGAGGAGGAGGTGGTCGTCGTTACTG AACACTTTGAGAAAGTTGAAGTTTCTGAACCTCCACCACCGGTCCACAAGGTTG AAGAAGAAGAGAAGAAACCTAGTCTCTTGGAGAAGCTCACCCGATCCGATAGC AGCTCTAGCTCTTCTAGCGATGAGGAGGAAGGAGAAAACGGAGAGAAGAAGA AGAAAAAGAAGGGACTAAAGGAGAAGTTGAAGGAGAAGCTAGGAGGAGGAGA AGAGGAAAGGAAGGAAGAAGCTAAAGAACATGAACACGAAGCAGTAGCCATC CCAGTTGAGAAGGTGGACGATGCCGCACATCCTGAGGAAAAGAAAGGATTTCCT AGACAAGATCAAGGAGAAGCTTCCAGGACACAACAAGAAGCCGGAGGAAGCG GCTCCGGAGGCGGCACCGTGCGCTGGCGAGGCTGCTCCTCATCATCATGAAGA AGATCAAGGAAAGGAAAAGAAGGGATTTTTGGAGAAGATCAAGGAGAAGCTC CCAGGTTACCATGCTAAGGAGGAAGAGAAGCATAAGGAGGAGGCAGCTTCTCA TTGA

EK 24 *CmLEA* ve *CILEA* genlerinin eş zamanlı PZR sonucunda kök ve yaprak dokularına ait amplifikasyon eğrileri



EK 25 *CmLEA* ve *CILEA* genlerinin eş zamanlı PZR sonucunda kök ve yaprak dokularındaki erime eğri grafikleri



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sibel Kara
Doğum Yeri ve Yılı: Bakırköy-1989
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce (B1)
E-posta : sibelalbatros@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Akşemsettin Lisesi
Önlisans : Anadolu Üniversitesi, Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü
Lisans : Kastamonu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Kastamonu Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik

Yayımları

- Kara, S. 2014. Kumarinler, Benzefononlar, Ksantonlar, Stilbenler. *Bitkisel Fenolik Bileşikler*. Editör: Altuner EM (p.151). Ankara: Gözde Matbaacılık.
- Pekol, S., Yer, E.N., Kara, S., Baloğlu, P., Altunoğlu-Çelik, Y., Baloğlu M.C. (2015). Identification and phylogeny analysis of LEA genes in watermelon. *Society for Experimental Biology (SEB) Prague*, 30 June- 3 July 2015, Prague, Czech Republic.
- Altunoğlu, Y.Ç., Kara, S., Yer, E. N., Baloğlu, P., Baloğlu, M.C. (2015). Kavunda (*Cucumis melo* L.) LEA Protein karakterizasyonu. *18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya.
- Turfan, N., Özdemir T., Kara S. (2015). Hava Kirliliğinin Bitkilerde Fotosentetik Pigmentler, Relatif Su Kontanenti, Mitotik Aktivite ve Çimlenme Oranı Üzerine Etkileri. *Ekoloji Sempozyumu*, Sinop.