

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CUCURBITA PEPO* BİTKİSİNDE BİYOTİK STRES İLE
İLİŞKİLİ MİKRORNA'LARIN TANIMLANMASI VE
FONKSİYONEL KARAKTERİZASYONU**

Mert ÖZKULUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

İkinci Danışman

Prof. Dr. Sevgi MARAKLI

Ocak, 2026

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CUCURBITA PEPO* BİTKİSİNDE BİYOTİK STRES İLE
İLİŞKİLİ MİKRORNA'LARIN TANIMLANMASI VE
FONKSİYONEL KARAKTERİZASYONU**

Mert ÖZKULUZ tarafından hazırlanan tez çalışması 29.01.2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Sevgi MARAKLI
Yıldız Teknik Üniversitesi
İkinci Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Emre YÖRÜK, Üye
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Doç. Dr. Hilal AY, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Semiha ERİŞEN ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Sevgi MARAKLI sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “*Cucurbita pepo* Bitkisinde Biyotik Stres ile İlişkili MikroRNA’ların Tanımlanması ve Fonksiyonel Karakterizasyonu” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Mert ÖZKULUZ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve raporlanması süreçlerinde; engin bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, karşılaştığım problemlerde çözüm önerileriyle ufkumu açan, sabır ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen değerli danışman hocalarım Semiha ERİŞEN ve Sevgi MARAKLI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, eğitim hayatım süresince her zaman yanımda olan, sevgileri ve sabırlarıyla bana güç veren annem ve babama minnettarım ve sabırları için teşekkür ederim.

Mert ÖZKULUZ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Çalışmanın Amacı.....	3
1.3 Hipotez	4
2 GENEL BİLGİLER	1
2.1 <i>Cucurbita pepo</i>	1
2.1.1 Küresel Çapta Kabakgil Üretimi ve Tüketimi	3
2.2 Biyotik Stres.....	4
2.2.1 Kabakgil Türlerini Etkileyen Başlıca Biyotik Stres Unsurları	5
2.2.2 Bitkilerde Biyotik Strese Direnç Mekanizmaları	13
2.3 MikroRNA'lar ve Düzenleyici Roller.....	14
2.3.1 Bitkilerde miRNA Sentezi	15
2.3.2 MikroRNA'ların Etki Mekanizması	15
3 MATERYAL VE METOT	17
3.1 Genom Verisinin ve miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi.....	18
3.2 BLAST Analizleri	19
3.3 Aday Dizilerin Filtrelenmesi.....	20
3.4 Öncül miRNA'ların İkincil Yapılarının Oluşturulması	20
3.5 Filogenetik Analizler.....	21
3.6 miRNA Hedef Gen Analizi.....	21
3.7 Fonksiyonel Anotasyon ve Yolak Analizi	22
4 BULGULAR VE TARTIŞMA	23

4.1	miRNA Dizilerinin İncelenmesi	23
4.2	Tespit Edilen Öncül miRNA'ların İkincil Yapıları.....	32
4.3	miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi.....	42
4.4	miRNA Dizileri Arasındaki Evrimsel İlişkinin Belirlenmesi	42
4.4.1	miR156 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	43
4.4.2	miR157 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	44
4.4.3	miR160 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	45
4.4.4	miR166 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	46
4.4.5	miR167 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	47
4.4.6	miR168 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	48
4.4.7	miR171 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	49
4.4.8	miR172 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	50
4.4.9	miR390 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	51
4.4.10	miR395 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	52
4.4.11	miR397 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	53
4.4.12	miR398 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	54
4.4.13	miR399 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki	55
4.5	Bulunan miRNA'ların psRNATarget Sonuçları	56
4.6	Hedef Genlerin GO ve KEGG Analizleri	60
4.7	Tartışma.....	81
5	SONUÇ	89
5.1	Gelecek Perspektifi	89
	KAYNAKÇA	92
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	101

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa (Varyasyon veya istatistiksel parametre)
E	Beklenen değer (Expect value - BLAST parametresi)
β	Beta (Varyasyon veya istatistiksel parametre)
5'	Beş üssü ucu
min	Dakika (Zaman birimi)
2n	Diploid kromozom sayısı
-	Eksi işareti (Negatif değerleri ifade etmek için)
Kb	Kilobaz (Dizi uzunluğu)
Kcal	Kilokalori (Enerji birimi)
$\leq$	Küçük veya eşittir
Mb	Megabaz (Genom büyüklüğü birimi)
miRNA	MikroRNA
miRNA*	MikroRNA yolcu (star) ipliği
mm	Milimetre (Uzunluk birimi)
mol	Mol (Madde miktarı birimi)
nm	Nanometre (Uzunluk birimi)
nt	Nükleotid
p	Olasılık (p-değeri) veya mesafe parametresi (p-distance)
H	Saat (Zaman birimi)
Sec	Saniye (Zaman birimi)
3'	Üç üssü ucu
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ABA	Absisik Asit
ARF	Auxin Response Factor (Oksin Yanıt Faktörü)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
CMV	Cucumber Mosaic Virus (Salatalık Mozaik Virüsü)
CYSDV	Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus (Kabak Sarı Bodurluk Bozukluğu Virüsü)
EST	Expressed Sequence Tags (İfade Edilen Dizi Etiketleri)
ET	Etilen
ETI	Effector-Triggered Immunity (Efektör Tetikli Bağışıklık)
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
GO	Gene Ontology
HR	Hypersensitive Response (Hipersensitif Yanıt)
ISR	Induced Systemic Resistance (İndüklenmiş Sistemik Direnç)
JA	Jasmonik Asit
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MFE	Minimum Free Energy (Minimum Serbest Enerji)
MFEI İndeksi)	Minimum Folding Energy Index (Minimum Katlanma Enerji
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Messenger RNA (Haberci RNA)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
NJ	Neighbour-Joining
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern (Patojenle İlişkili Moleküler Kalıp)
PHO2	Phosphate 2
POD	Peroksidaz
PR	Pathogenesis-Related (Patojenezle İlişkili)

öncül miRNA	Prekürsör mikro RNA
PRR	Pattern Recognition Receptor (Desen Tanıma Reseptörü)
PTI	PAMP-Triggered Immunity (PAMP Tetikli Bağışıklık)
RNA-Seq	RNA Sequencing (RNA Dizileme)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
SA	Salisilik Asit
SAR	Systemic Acquired Resistance (Sistemik Edinilmiş Direnç)
SCL	Scarecrow-Like
SLCV	Squash Leaf Curl Virus (Kabak Yaprak Kıvrılma Virüsü)
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPL	Squamosa Promoter Binding Protein-Like
SSR	Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarı)
TAS3	Trans-acting siRNA 3
TMK1	Transmembrane Kinase 1
TOE	Target of Eat
UBC24	Ubiquitin-Conjugating Enzyme 24
UPE	Unpaired Energy (Eşleşmemiş Enerji)
ZYMV	Zucchini Yellow Mosaic Virus (Kabak Sarı Mozaik Virüsü)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Kabakgil üretiminin ülkelere göre dağılımı	4
Şekil 2.2	<i>Xanthomonas cucurbitae</i> 'nin kabakgil türlerinde neden olduğu belirtiler (A) ve (a) Yapraklar üzerinde görülen küçük, köşeli, sarımsı veya bej renkli lezyonlar (B) ve (C) Hastalığın yaprak dokusu üzerindeki daha yakın ve ilerlemiş safhaları (D) Yeşil bir balkabağı meyvesi üzerinde oluşan, batık ve dairesel karakteristik "leke" (spot) belirtileri.	7
Şekil 2.3	Enfekte <i>C. pepo</i> bitkisinin sarmaşığının gösterdiği tipik sistemik solgunluk belirtileri.....	8
Şekil 2.4	Kabak küllemesi belirtileri	8
Şekil 2.5	Antraknoz mantarının bir <i>C. pepo</i> yaprağında yarattığı lezyonlar	9
Şekil 2.6	<i>F. oxysporum</i> 'un balkabağı üzerindeki etkisi.....	10
Şekil 2.7	<i>C. pepo</i> 'da <i>Septoria cucurbitacearum</i> 'un neden olduğu yaprak lekesi ..	10
Şekil 2.8	Balkabağında siyah meyve çürüklüğü.....	11
Şekil 2.9	ZYMV'nin bir kavun bitkisi yaprağındaki etkisi	12
Şekil 2.10	CMV'nin <i>C. pepo</i> yaprakları üzerinde etkisi	12
Şekil 2.11	SLCV enfeksiyonunun neden olduğu damar şişmesi semptomları.....	13
Şekil 4.1	cpe-miR156a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi.	32
Şekil 4.2	cpe-miR156b-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	33
Şekil 4.3	cpe-miR157a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi.	33
Şekil 4.4	cpe-miR157a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi.	34
Şekil 4.5	cpe-miR160a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi.	34
Şekil 4.6	cpe-miR166a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi.	35
Şekil 4.7	cpe-miR166a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi.	35
Şekil 4.8	cpe-miR167a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi.	36
Şekil 4.9	cpe-miR168a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi.	36
Şekil 4.10	cpe-miR168a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	37
Şekil 4.11	cpe-miR171a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	37
Şekil 4.12	cpe-miR172a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	38

Şekil 4.13 cpe-miR390a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	38
Şekil 4.14 cpe-miR390a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	39
Şekil 4.15 cpe-miR395a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	39
Şekil 4.16 cpe-miR397a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	40
Şekil 4.17 cpe-miR398a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	40
Şekil 4.18 cpe-miR399a-3p'ya ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	41
Şekil 4.19 cpe-miR399b-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi	41
Şekil 4.20 miR156 ailesinin hizalama sonucu	43
Şekil 4.21 miR156 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	43
Şekil 4.22 miR157 ailesinin hizalama sonucu	44
Şekil 4.23 miR157 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	44
Şekil 4.24 miR160 ailesinin hizalama sonucu	45
Şekil 4.25 miR160 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	45
Şekil 4.26 miR166 ailesinin hizalama sonucu	46
Şekil 4.27 miR166 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	46
Şekil 4.28 miR167 ailesinin hizalama sonucu	47
Şekil 4.29 miR167 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	47
Şekil 4.30 miR168 ailesinin hizalama sonucu	48
Şekil 4.31 miR168 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	48
Şekil 4.32 miR171 ailesinin hizalama sonucu	49
Şekil 4.33 miR171 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	49
Şekil 4.34 miR172 ailesinin hizalama sonucu	50
Şekil 4.35 miR172 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	50
Şekil 4.36 miR390 ailesinin hizalama sonucu	51
Şekil 4.37 miR390 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	51
Şekil 4.38 miR395 ailesinin hizalama sonucu	52
Şekil 4.39 miR395 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	52
Şekil 4.40 miR397 ailesinin hizalama sonucu	53
Şekil 4.41 miR397 ailesinin filogenetik ağaç çizimi	53
Şekil 4.42 miR398 ailesinin hizalama sonucu	54

Şekil 4.43 miR398 ailesinin filogenetik ağaç çizimi.....	54
Şekil 4.44 miR399 ailesinin hizalama sonucu.....	55
Şekil 4.45 miR399 ailesinin filogenetik ağaç çizimi.....	55
Şekil 4.46 miR156'nın hedeflediği genlerin GO analizleri.....	65
Şekil 4.47 miR157'nin hedeflediği genlerin GO analizleri.....	66
Şekil 4.48 miR160'ın hedeflediği genlerin GO analizleri.....	67
Şekil 4.49 miR166'nın hedeflediği genlerin GO analizleri.....	68
Şekil 4.50 miR167'nin hedeflediği genlerin GO analizleri.....	69
Şekil 4.51 miR171'in hedeflediği genlerin GO analizleri.....	70
Şekil 4.52 miR172'nin hedeflediği genlerin GO analizleri.....	71
Şekil 4.53 miR395'in hedeflediği genlerin GO analizleri.....	72
Şekil 4.54 miR397'nin hedeflediği genlerin GO analizleri.....	73
Şekil 4.55 miR398'in hedeflediği genlerin GO analizleri.....	74
Şekil 4.56 miR399'un hedeflediği genlerin GO analizleri.....	75

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Farklı kabakgil türlerinin temel kullanım alanları	1
Tablo 3.1 Bitkilerde miRNA analizi için kullanılan biyoinformatik araçlar ve işlevleri	17
Tablo 4.1 Literatürdeki olgun miRNA dizileri	24
Tablo 4.2 <i>C. pepo</i> 'da biyotik strese rol oynadığı tahmin edilen miRNA dizileri ve bunların düzenlediği tahmin edilen gen yanıtlarına ait enzim ve proteinler	27
Tablo 4.3 Bulunan miRNA'lara ait psRNATarget verileri	56
Tablo 4.4 miR156 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar	76
Tablo 4.5 miR157 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu fonksiyonel kategoriler.....	77
Tablo 4.6 miR160 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.....	77
Tablo 4.7 miR166 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.....	78
Tablo 4.8 miR171 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.....	79
Tablo 4.9 miR172 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.....	79
Tablo 4.10 miR395 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.....	80
Tablo 4.11 miR399 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.....	81

***Cucurbita pepo* Bitkisinde Biyotik Stres ile İlişkili MikroRNA'ların Tanımlanması ve Fonksiyonel Karakterizasyonu**

Mert ÖZKULUZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

İkinci Danışman: Prof. Dr. Sevgi MARAKLI

Biyotik stres faktörleri, *Cucurbita pepo* bitkisinde verim kaybına yol açan temel çevresel kısıtlayıcılar arasında yer almaktadır. Bitkilerin biyotik stres etmenlerine karşı geliştirdiği savunma yanıtlarında, gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesinde görev alan mikroRNA'lar (miRNA'lar) önemli bir role sahiptir. Stresle ilişkili genlerin düzenlenmesinde miRNA'ların işlevsel mekanizmalarının aydınlatılması, bitki savunma süreçlerinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, *C. pepo*'da biyotik stresle ilişkili miRNA'ların tanımlanması ve düzenleyici işlevlerinin biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak kapsamlı biçimde analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, *C. pepo*'ya ait kamuya açık genom ve transkriptom veri setleri analiz edilmiştir. Potansiyel miRNA'ların tespiti için miRBase referans veri tabanı ile homoloji tabanlı arama, miRDeep2 yazılımı ile RNA-Seq verilerinden *de novo* tahmin ve BLAST ile doğrulama stratejileri uygulanmıştır. Tanımlanan miRNA adaylarının ikincil yapıları RNAFold ve UGENE, filogenetik analizi MEGA ve hedef genleri ise psRNATarget sunucusu aracılığıyla belirlenmiştir. Son olarak,

hedef genlerin biyolojik rolleri ve ilişkili metabolik yollar, Gene Ontology (GO) ve KEGG analizleri ile aydınlatılmıştır.

Analizler sonucunda, *C. pepo*'da; *miR156*, *miR157*, *miR160*, *miR166*, *miR167*, *miR168*, *miR171*, *miR172*, *miR390*, *miR395*, *miR397*, *miR398* ve *miR399* ailelerine ait 19 anlamlı miRNA tanımlanmıştır. Fonksiyonel anotasyon bulguları, bu miRNA'ların savunma yanıtı, programlı hücre ölümü, hormon sinyalizasyonu ve redoks dengesiyle ilişkili 40 farklı hedef geni potansiyel olarak düzenlediğini göstermiştir. Hedef genlere ilişkin GO analizi; *miR397* (%33,3), *miR166* (%23,3), *miR398* (%23), *miR399* (%13), *miR160* (%12,1) ve *miR172* (%11) ailelerinin biyotik stres yanıtıyla en yüksek ilişkili miRNA'lar olduğunu ortaya koymuştur. KEGG analizi sonuçları ayrıca bu genlerin, bitkilerde biyotik stres tepkisiyle yakından ilişkili olan flavonoid biyosentezi, fenilpropanoid biyosentezi, alfa-linolenik asit metabolizması ve bitki hormonu sinyal iletimi de dahil olmak üzere 25 farklı metabolik yolda yer aldığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, *C. pepo*'nun biyotik strese yanıtında rol oynayan moleküler düzenleyici ağlara yönelik mevcut bilgi birikimine katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Cucurbita pepo*, miRNA, biyotik stres, biyoinformatik analiz, gen düzenlemesi.

ABSTRACT

Identification and Functional Characterization of MicroRNAs Associated with Biotic Stress in *Cucurbita pepo*

Mert ÖZKULUZ

Department of Molecular Biology and Genetics
Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Co-supervisor: Prof. Dr. Sevgi MARAKLI

Biotic stress factors significantly reduce productivity in squash (*Cucurbita pepo*) by impairing growth and metabolic balance. MicroRNAs (miRNAs) are key post-transcriptional regulators in plant defense and play central roles in stress-responsive gene expression. This study aimed to identify miRNAs associated with biotic stress responses in *C. pepo* and to characterize their potential regulatory functions using comprehensive bioinformatic analyses.

Publicly available genome and transcriptome datasets of *C. pepo* were processed through miRBase-derived reference miRNA comparison, RNA-Seq based miRNA prediction using miRDeep2 software, and BLAST based validation. Putative miRNA candidates were analyzed for precursor structure using RNAFold algorithm and UGENE software, phylogenetic relationships using MEGA software, and target interactions using psRNATarget. Target genes were further examined through GO and KEGG pathway analyses.

A total of biologically relevant 19 miRNAs including *miR156*, *miR157*, *miR160*, *miR166*, *miR167*, *miR168*, *miR171*, *miR172*, *miR390*, *miR395*, *miR397*, *miR398* and *miR399* families were identified in *C. pepo*. Functional annotation revealed that these miRNAs potentially regulate 40 different genes involved in defense response, programmed cell death, signal transduction, secondary metabolite biosynthesis, hormone signaling and redox balance. These pathways collectively represent core components of biotic stress tolerance. According to GO analysis of the target genes, *miR397* (33.3%), *miR166* (23.3%), *miR398* (23%), *miR399* (%13), *miR160* (%12,1) and *miR172* (%11) were the most prominent miRNAs associated with the biotic stress response. KEGG results also revealed that these genes are involved in 25 different metabolic pathways including flavonoid biosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis, alpha-linolenic acid metabolism and plant hormone signal transduction, which are highly related to biotic stress response in plants. The findings provide insight into the molecular defense network of *C. pepo* and other genetically close plant species.

Keywords: *Cucurbita pepo*, microRNA, biotic stress, psRNATarget, functional annotation.

1.1 Literatür Özeti

Son yıllarda moleküler biyoloji alanında kaydedilen gelişmeler ve özellikle yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin yaygınlaşması, bitkilerin genomik ve transkriptomik düzeyde ayrıntılı olarak incelenmesine olanak sağlamıştır. Ekonomik değeri yüksek bir tür olan *Cucurbita pepo* (sakız kabağı) üzerine yürütülen çalışmalar, bu türe ait referans genom dizisinin oluşturulması, virüs ve mantar gibi biyotik stres etmenlerine karşı geliştirilen savunma mekanizmalarının aydınlatılması ve gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyen mikroRNA'ların (miRNA) karakterizasyonu üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu bölümünde, *Cucurbita* cinsine ait genomik verilerin elde edilmesiyle başlayan araştırma süreci kapsamında miRNA kimliklendirme çalışmaları ile biyotik stres koşulları altında bitki savunma yanıtlarını ele alan güncel literatür sunulmaktadır.

Montero-Pau ve ark. [1], *C. pepo* türünün genomunu yüksek çözünürlüklü olarak dizilemiş ve bu türün evrimsel süreçte bir tam genom duplikasyonu geçirdiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, oluşturdukları referans genom haritası sayesinde, biyotik stres direnciyle ilişkili gen ailelerinin (özellikle NBS-LRR genleri) genomdaki dağılımını belirlemişlerdir. Bu çalışma, *Cucurbita* cinsinde yapılacak moleküler ve biyoinformatik analizler için temel bir referans oluşturmuştur [1].

Jagadeeswaran ve ark. [2], *C. pepo* (sakız kabağı), *Cucurbita moschata* (bal kabağı), *Lagenaria siceraria* (su kabağı) ve *Citrullus lanatus* (karpuz) türlerini kapsayan karşılaştırmalı çalışmalarında, bu türlere ait yaprak ve meyve dokularından elde edilen küçük RNA kütüphanelerini analiz etmişlerdir. Yüksek verimli dizileme yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde, *C. pepo* transkriptomunda evrimsel olarak korunmuş 13 miRNA ailesi ve türe özgü miRNA

adayları tanımlanmıştır. Çalışma, *Cucurbita* türleri arasındaki miRNA ifade farklılıklarını ve bunların meyve gelişimiyle olan ilişkisini ortaya koyan ilk kapsamlı transkriptomik verilerden biridir [2].

Amoroso ve ark. [3], *C. pepo* bitkisinde Kabak Sarı Mozaik Virüsü (ZYMV) enfeksiyonuna karşı gelişen transkriptomik yanıtları incelemişlerdir. RNA-Seq analizi sonucunda, virüs enfeksiyonunun bitkideki fotosentez, hücre duvarı biyosentezi ve savunma sinyal yollarında (özellikle Salisilik Asit ve Jasmonik Asit) görev alan genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirdiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışma, *C. pepo*'nun patojenlere karşı geliştirdiği moleküler savunma mekanizmalarının karmaşıklığını göstermesi bakımından önemlidir [3].

Bitkilerde miRNA'lar, patojen saldırılarına karşı savunma mekanizmalarını gen ifadesini post-transkripsiyonel düzeyde baskılayarak düzenleyen kritik moleküllerdir. Biyotik stres altında seviyeleri değişen bu moleküller, direnç genlerinin kontrol edilmesinde ve antiviral yanıtın yönetilmesinde anahtar rol oynarlar. Bu moleküler etkileşimlerin anlaşılması, *C. pepo* gibi ekonomik değeri yüksek türlerde virüs enfeksiyonlarına karşı dirençli çeşitlerin geliştirilmesi için temel oluşturur.

- miR393 ve PAMP-tetiklemeli bağışıklık (PTI): Biyotik stres literatüründe miRNA aracılı savunmanın ilk ve en önemli örneği miR393'tür. *Pseudomonas syringae* gibi bakteriyel patojenlerin flagellin (flg22) proteini bitki tarafından algılandığında, miR393 ifadesi hızla artar. miR393, oksin reseptörleri olan *TIR1* (Transport Inhibitor Response 1) ve *AFB* (Auxin Signaling F-Box) genlerini hedefler. Oksin sinyalinin baskılanması, bitkinin büyüme fazından savunma fazına geçmesini sağlar ve patojenin yayılmasını kısıtlar [4].
- miR482/miR2118 süper ailesi ve NBS-LRR genleri: Bitkilerde hastalığa direnç genlerinin (R genleri) büyük bir kısmını Nükleotid Bağlanma Bölgesi-Lösin Zengin Tekrar (NBS-LRR) proteinleri oluşturur. Bu proteinler, patojen efektörlerini tanıyarak güçlü bir savunma yanıtı (ETI) başlatır. Sağlıklı koşullarda, miR482 ve miR2118 ailesi, NBS-LRR genlerini hedefleyerek susturur; bu sayede bitkinin gereksiz yere enerji harcaması ve otoimmünite geliştirmesi önlenir. Ancak bir virüs veya mantar saldırısı sırasında bu miRNA'ların seviyesi düşer, NBS-LRR üretimi artar ve aktif savunma başlar.

Bu mekanizma, *Solanaceae* ve *Cucurbitaceae* familyalarında oldukça korunmuştur [5].

- miR168 ve ARGONAUTE1 (AGO1) dengesi: Biyotik stres, özellikle viral enfeksiyonlar sırasında, bitkinin miRNA mekanizmasının kendisi de saldırı altındadır. miR168, miRNA yolunun en kritik enzimi olan AGO1 proteinini düzenler. Birçok bitki virüsü, bitkinin savunmasını kırmak için AGO1'i hedef alır. Buna karşılık bitki, miR168 seviyesini değiştirerek AGO1 homeostazını sağlamaya ve antiviral RNA susturma (VIGS) mekanizmasını ayakta tutmaya çalışır. Bu denge, virüs direncinde hayati öneme sahiptir [6].
- miR398 ve oksidatif patlama (ROS Burst): Patojen saldırısına karşı bitkilerin verdiği ilk yanıtlardan biri, enfeksiyon bölgesinde Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üreterek hücre ölümünü (Hipersensitif Yanıt - HR) tetiklemektir. miR398, bakır/çinko süperoksit dismutaz (CSD) enzimlerini hedefler. Biyotik stres altında miR398 ifadesinin azalması, CSD seviyelerinin artmasına veya ROS birikiminin modüle edilmesine yol açarak, patojenin hapsedildiği nekrotik alanların oluşumunu düzenler [7].
- miR319/miR159 ve semptom gelişimi: Özellikle yaprak kıvrılması ve mozaik virüslerinin (örneğin *Cucurbita* türlerini etkileyen ZYMV) neden olduğu semptomlar, genellikle *TCP* ve *MYB* transkripsiyon faktörlerinin düzensizleşmesiyle ilişkilidir. miR319 ve miR159, bu transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek yaprak morfolojisini kontrol eder. Patojen enfeksiyonları sırasında bu miRNA'ların ifadesindeki sapmalar, enfekte bitkilerde görülen karakteristik yaprak deformasyonlarının moleküler temelini oluşturur [8].

1.2 Çalışmanın Amacı

Biyotik stres, bitkilerin büyüme ve gelişimini olumsuz etkileyen patojenler ve zararlılar tarafından tetiklendiğinden, bitkilerin bu stres koşullarına karşı verdikleri moleküler yanıtların anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında *C. pepo* bitkisine ait genomik ve transkriptomik verilerden yararlanılarak biyotik stres koşulları altında ifade edilen miRNA'ların belirlenmesi, bu miRNA'ların potansiyel hedef genlerinin biyoinformatik analizlerle tahmin edilmesi ve miRNA–

hedef gen etkileşimlerinin bitki savunma mekanizmaları çerçevesinde yorumlanması amaçlanmaktadır.

Elde edilen veriler, bu bitkinin stres toleransı mekanizmalarını daha iyi anlamamıza ve potansiyel olarak bu türlerin biyotik streslere karşı dirençli çeşitlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Böylece, hem bitki biyolojisi alanında bilgi birikimine hem de tarımsal üretimde biyolojik stres ile mücadele için alternatif stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlanması beklenmektedir.

Her ne kadar *Arabidopsis* ve domates gibi model organizmalarda miRNA-stres ilişkisi detaylıca çalışılmış olsa da, *C. pepo* özelinde biyotik stres yanıtını yöneten miRNA ağlarının tam haritası henüz tam anlamıyla çıkarılmamış veya *in silico* yöntemlerle doğrulanmaya muhtaçtır. Bu tez çalışması, biyoinformatik yöntemler kullanarak bu boşluğu doldurmayı ve *C. pepo*'nun savunma mekanizmasındaki potansiyel miRNA düzenleyicilerini ortaya çıkarmayı amaçlamaktadır.

1.3 Hipotez

Bitkilerde gen anlatımının düzenlenmesinde kilit rol oynayan miRNA'ların, *C. pepo* bitkisinin biyotik stres faktörlerine karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarında da etkin bir görev aldığı öngörülmektedir.

Bu doğrultuda;

- Evrimsel korunum hipotezi: Diğer model bitki türlerinde (*A. thaliana*, *Cucumis sativus* vb.) biyotik stres yanıtında görev aldığı bilinen evrimsel olarak korunmuş miRNA ailelerinin (Örn: miR156, miR169, miR398), *C. pepo* genomunda da bulunduğu ve benzer stres koşullarında savunma genlerini hedefleyerek regülasyon sağladığı öngörülmektedir.
- Türe özgü miRNA hipotezi: *C. pepo*'nun genomik yapısının karmaşıklığı ve çevresel adaptasyon yeteneği göz önüne alındığında; mevcut veritabanlarında (miRBase) kaydı bulunmayan, ancak bu türe özgü olan ve biyotik stres altında indüklenen yeni miRNA adaylarının transkriptomda yer aldığı varsayılmaktadır.
- Hedef gen regülasyonu hipotezi: Tespit edilen miRNA'ların, rastgele genleri değil; bitki savunma sisteminde doğrudan rol oynayan transkripsiyon faktörlerini (MYB, WRKY, NAC ailesi), hastalık direnç genlerini (NBS-LRR)

ve hormon sinyal yolaklarını (oksin, jasmonik asit) hedef alarak, bitkinin patojenlere karşı direncini moleküler düzeyde modüle ettiği düşünölmektedir.

- Metodolojik geçerlilik hipotezi: Laboratuvar ortamındaki maliyetli ve zaman alıcı validasyon süreçleri öncesinde; yeni nesil dizileme (NGS) verilerinin *in silico* yöntemlerle (miRDeep2, RNAfold, psRNATarget) analiz edilmesinin, gerçek miRNA moleküllerini yüksek doğrulukla (%80 üzeri güvenilirlikle) tahmin edebileceği ve deneysel çalışmalar için sağlam bir altyapı oluşturacağı hipotez edilmiştir.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 *Cucurbita pepo*

Kabakgiller (*Cucurbitaceae*), dünya genelinde ekonomik değeri en yüksek bitki ailelerinden biridir. Bu aile, genellikle tek yıllık, sarılıcı veya sürüngen karakterli bitkilerden oluşur [9]. Kabakgiller ailesi, dünya çapında yaklaşık 95-100 cins ve 950'den fazla türü kapsar. Çoğunlukla tropik ve subtropik bölgelerde yayılış gösterebilirler de *C. pepo* gibi türler ılıman iklimlere çok iyi uyum sağlamıştır [10]. Aşağıdaki tabloda bu türlerin bilimsel isimleri ve temel kullanım alanları verilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Farklı kabakgil türlerinin temel kullanım alanları [11]

Tür	Bilimsel Adı	Temel Kullanım
Sakız Kabağı	<i>Cucurbita pepo</i>	Yemeklik Sebze
Kestane Kabağı	<i>Cucurbita maxima</i>	Tatlı ve Çorba
Karpuz	<i>Citrullus lanatus</i>	Taze Meyve
Salatalık	<i>Cucumis sativus</i>	Salata ve Turşu
Kudret Narı	<i>Momordica charantia</i>	Tıbbi / Gıda Takviyesi
Su Kabağı	<i>Lagenaria siceraria</i>	El Sanatları / Eşya

C. pepo, *Cucurbitaceae* (Kabakgiller) familyasının tarımsal ve ekonomik açıdan en önemli üyelerinden biri olup, kökeni Kuzey Amerika ve Meksika'ya dayanan tek yıllık, otsu bir kültür bitkisidir [12]. Bitkinin gövdesi tipik olarak beş köşeli, içi boş ve kaba tüylerle (trikomlarla) kaplıdır; tırmanıcı çeşitlerde yaprak koltuklarından çıkan çok parçalı sülükler (tendriller) yardımıyla tutunma sağlar [13]. Yapraklar oldukça iri, basit, palmat loblu (genellikle 3-5 loblu) ve tabanı yürekli (kordat) bir yapıya sahip olup, hem üst hem de alt yüzeyleri batıcı tüylerle karakterizedir [14]. Bitki monoik bir çiçek yapısına sahiptir; yani büyük, sarı veya turuncu renkli, huni

şeklindeki erkek ve dişi çiçekler aynı bitki üzerinde farklı konumlarda bulunur [15]. Botanik açıdan "pepo" olarak adlandırılan meyveleri; şekil, boyut ve renk bakımından (silindirik, küresel, siğilli veya düz yüzeyli) ekstrem bir çeşitlilik sergilerken, meyve sapı genellikle sert ve beş köşeli bir yapıdadır [16]. Tohumlar ise yassı, oval, krem veya beyaz renkli olup, kenarları belirgin bir halka ile çevrilidir [17].

Diploid ($2n=40$) kromozom yapısına sahip olan bu tür, fenotipik plastisitesi ve yüksek morfolojik polimorfizmi (meyve şekli, boyutu ve rengindeki aşırı çeşitlilik) ile bitkiler alemindeki en değişken türlerden biri olarak kabul edilmektedir [9]. Üreme biyolojisi bakımından monoik (tek evcikli) yapıdadır; yani erkek ve dişi üreme organları aynı bitki üzerinde fakat farklı çiçeklerde bulunur, bu özellik bitkiyi çapraz tozlaşmaya (allogami) oldukça açık hale getirmektedir. *Cucurbita* cinsi içerisinde soğuğa en dayanıklı ve coğrafi adaptasyon yeteneği en yüksek tür olan *C. pepo*; ticari değeri yüksek birçok varyeteyi bünyesinde barındırmakta olup gıda, tıp ve kozmetik endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir [18].

Binlerce yıl boyunca bu tür Amerika kıtasında evcilleştirilmiştir [19]. Özellikle gıda kaynağı olarak, ürolojik rahatsızlıklarda, prostat hastalıklarının tedavisinde, anti-diyabetik ve anti-paraziter olarak kullanılmaktadır [20].

- Ürolojik rahatsızlıklar ve prostat sağlığı: *C. pepo*'nun tıbbi alanda en çok çalışılmış ve kanıtlanmış etkisi budur. İçerdiği yüksek orandaki Delta-7-steroller ve çinko, dihidrotestosteronun (DHT) prostat hücrelerine bağlanmasını engelleyerek prostatın büyümesini yavaşlatmaya yardımcı olur. Ayrıca mesane kaslarını güçlendirerek sık idrara çıkma (noktüri) semptomlarını hafifletir [21].
- Antiparaziter etki: Halk tıbbında yüzyıllardır bağırsak parazitlerine karşı kullanılmaktadır. Tohumların içerdiği Cucurbitine (bir amino asit türevi) maddesinin, özellikle tenya (*Taenia* sp.) gibi bağırsak şeritlerini felç ederek vücuttan atılmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir. Toksik olmaması nedeniyle çocuklar ve hamilelerde güvenli bir geleneksel ilaç olarak kabul edilir [22].
- Antidiyabetik ve hipoglisemik etki: Tip 2 diyabetin yönetiminde diyetin bir parçası olarak önerilir. *C. pepo* polisakkaritleri ve pektin içeriği, glikoz toleransını artırabilir ve insülin direncini düşürmeye yardımcı olabilir. Pankreas

beta hücrelerinin rejenerasyonuna katkı sağladığına dair hayvan çalışmaları mevcuttur [23].

- Anti-enflamatuar ve antioksidan etki: Yüksek oranda içerdiği karotenoidler (beta-karoten, lutein) ve E vitamini, oksidatif stresi azaltarak hücrel hasarı önler. Bu özellik, artrit (eklem iltihabı) gibi enflamatuar hastalıkların semptomlarını hafifletmede destekleyicidir [24].
- Sitotoksik ve antikanser potansiyel (Kukurbitasinler): *Cucurbitaceae* ailesine acı tadı veren Kukurbitasin bileşikler, bitkinin böceklerle karşı geliştirdiği bir savunma mekanizmasıdır. Ancak tıbbi araştırmalarda, bu maddelerin kanser hücrelerinde hücre döngüsünü durdurarak apoptozu (programlı hücre ölümü) tetiklediği gösterilmiştir [25].

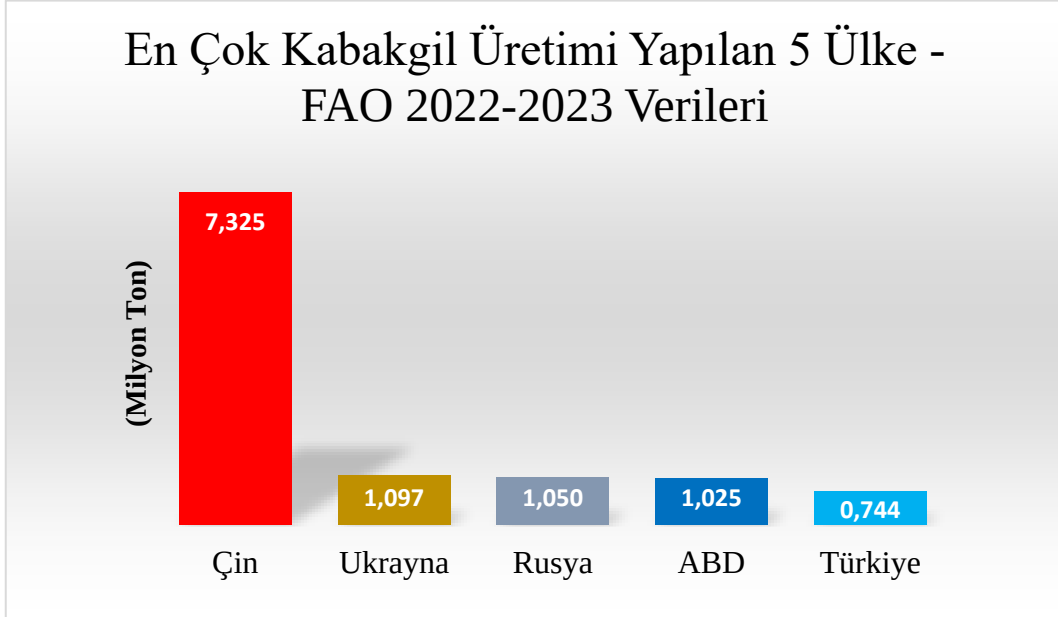
2.1.1 Küresel Çapta Kabakgil Üretimi ve Tüketimi

C. pepo tüm ılıman bölgelere iyi uyum sağlamış ve çoğunlukla yaz kabağı olarak da bilinen olgunlaşmamış meyvelerinin kullanımı için yetiştirilmektedir. Aynı zamanda tarihsel olarak Amerika kıtasına özgü bir bitki olup, zamanla dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilmiştir. Bugün, bu bitki özellikle Amerika, Avrupa, Asya ve Afrika kıtalarında geniş çapta üretilmektedir. Üretim miktarları ülke ve bölgeye göre değişiklik gösterse de kabakgil türlerinin tarımı büyük ölçüde ticari olarak yapılmaktadır. Özellikle ABD, Meksika, İspanya, İtalya, Çin, Hindistan gibi ülkelerde önemli üretim merkezleri bulunmaktadır. Kabaklar, farklı tüketim amaçlarına göre çeşitli formlarda yetiştirilir ve pazarlanır. Örneğin, genç kabaklar taze olarak tüketilirken, olgunlaşmış kabaklar işlenmiş gıda ürünleri olarak satılabilir. Balkabağı gibi büyük meyvelerin de özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa'da bu türlerin tarımı yaygındır. Bu meyveler genellikle dekoratif amaçlar için de yetiştirilir ve mevsimsel festivallerde popülerdir [26].

Üretimdeki başlıca zorluklar arasında hastalıklar, zararlılar ve iklim koşulları yer alır. Ancak modern tarım teknikleri ve tohum ıslahı çalışmaları sayesinde *C. pepo* çeşitleri daha dayanıklı ve verimli hale getirilmeye çalışılmaktadır.

Sonuç olarak, *C. pepo* küresel ölçekte önemli bir tarım ürünüdür ve besin değeri, ticari değeri ve dekoratif özellikleriyle dünya genelinde geniş bir üretim ve tüketim

ağına sahiptir. Aşağıdaki görselde kabakgil türlerinin üretiminin ülkelere göre yıllık bazda dağılımı verilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Kabakgil üretiminin ülkelere göre dağılımı [26]

2.2 Biyotik Stres

Doğal ekosistemlerde ve tarımsal alanlarda bitkiler, büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyen çok sayıda çevresel faktöre maruz kalmaktadır. Bitkilerin sesil (hareketsiz) yaşam formları, onları bu stres faktörlerinden kaçamaz hale getirmekte ve hayatta kalabilmeleri için güçlü adaptasyon mekanizmaları geliştirmelerini zorunlu kılmaktadır. Bitkisel stresi oluşturan unsurlar, sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik faktörler ile canlı organizmaların neden olduğu biyotik faktörler olarak iki ana kategoride incelenir. Biyotik stres faktörleri; virüsler, bakteriler, mantarlar (funguslar), nematodlar, böcekler ve parazitik bitkiler gibi patojen veya zararlı organizmaların saldırılarını kapsamaktadır [27]. Küresel ölçekte yapılan tarımsal analizler, biyotik stres kaynaklı ürün kayıplarının yıllık %20 ile %40 arasında değiştiğini göstermekte olup, bu durum küresel gıda güvenliği açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır [28].

2.2.1 Kabakgil Türlerini Etkileyen Başlıca Biyotik Stres Unsurları

Bitkilerde tarımsal üretimde oldukça şiddetli verim kayıplarına yol açabilen bazı biyotik stres unsurları bulunmaktadır. Bunlar aynı zamanda kabakgillerde de hastalık yapabilmektedir. Bu unsurlar arasında şunlar sayılabilir;

- Zararlı böcekler: Kabak bitkileri, birçok zararlı böceğin hedefi olabilir. Örneğin, kabak biti, beyaz sinekler, kabak güvesi gibi böcekler bitkinin yapraklarını, çiçeklerini veya meyvelerini zarar verebilir ve büyümelerini olumsuz etkileyebilir [29].
- Nematodlar: Kök lekelerine, köklerin şişmesine sebep olan veya köklerin fonksiyonunu bozan nematodlar, kabak bitkileri için önemli bir biyotik stres
- Yabancı ot baskısı: Yabancı otlar, kabak bitkilerinin su ve besin kaynaklarını rekabet ederek azaltabilir. Bu durum, kabak bitkilerinin büyümesini sınırlayabilir ve verimini düşürebilir [30].
- Hastalıklar: Fungal, bakteriyel veya virüs hastalıkları kabak bitkilerinde önemli biyotik stres faktörleridir. Örneğin, mildiyö (funguslar tarafından oluşturulan bir hastalık), kabak yapraklarında lekeler ve çürümeye neden olabilir [31].

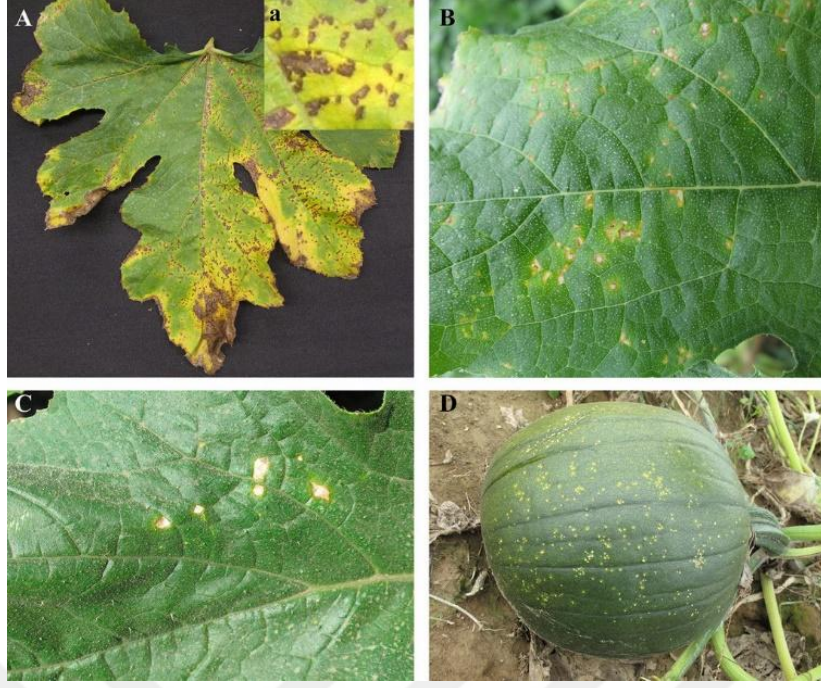
2.2.1.1 Bakteriyel Zararlılar

Bakteriyel zararlılar, balkabağı bitkilerinde zararlı etkileri olan patojenler arasında yer almakla birlikte virüs veya fungal kökenli hastalıklara göre daha düşük orandadır. Bu zararlılar genellikle bitki dokularında lezyonlar oluşturur, bitkinin besin alımını ve büyümesini engeller ve meyve kalitesini olumsuz etkiler. Ayrıca, bakteriyel hastalıkların kontrol altına alınması zor olabilir ve bu durum, tarımsal üretimde sürdürülebilirliği tehlikeye atabilir. Aşağıda yer verilen bakteriler, *Cucurbitaceae* (kabakgiller) familyasındaki bütün bitki türlerinde hastalık yapabilmektedir [32].

- *Pseudomonas syringae*: kutupsal flagellalara sahip, çubuk şeklinde ve Gram-negatif bir bakteridir. Kabakların yapraklarına, saplarına, gövdelerine ve meyvelerine etki eder. İlk önce küçük, dairesel lekeler ortaya çıkar ve kısa süre sonra yapraklarda büyük, açısız ve düzensiz, su dolu alanlar gelişir. Yağışlı havalarda, yaprağın alt taraflarındaki lekelerden bakteri sızıntısı damlacıkları sızar ve beyazımsı bir kabuk halinde kurur. Daha sonra enfekte alanlar griye

döner, ölür ve küçülür, sıklıkla sağlıklı dokudan kopar, düşer ve yapraklarda büyük, düzensiz delikler bırakır. Duyarlı çeşitlerde lezyonların kenarları genellikle sarıdır. Bazı dirençli çeşitlerde lezyonlar daha küçüktür ve sarı kenarları yoktur. Enfekte olmuş meyvelerde genellikle yüzeysel olan küçük, neredeyse dairesel lekeler görülür, ancak etkilenen dokular öldüğünde beyaza döner, çatlayarak açılır ve bakterilerin içeri girmesine ve meyvenin tamamının çürümesine neden olur [33].

- *Xanthomonas campestris*: Bitki hastalıklarıyla ilişkili yaygın olarak bilinen bir bakteri grubu olan *Xanthomonas* cinsine ait Gram-negatif, zorunlu aerobik bir bakteridir [34]. *X. campestris* çeşitli bitkilerde hastalık yapabilen bir bakteri türüdür, ancak genellikle *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* adı altında kabakgil bitkilerinde hastalığa neden olan alt türü vardır. Bu bakteri kabakgil bitkilerinde özellikle yaprak lekeleri ve yanıklarına sebep olabilir. Hastalık genellikle yapraklarda su dolu lekeler ve sonrasında lekelerin kahverengileşmesiyle kendini gösterir.
- *Xanthomonas cucurbitae*: Bakterinin enfekte ettiği kabak meyveleri üzerinde de belirtiler görülebilir. Meyvelerde su dolu lekeler, çürüme ve kalite kaybı olabilir. Hastalık, özellikle seralarda veya sık bitki dönüşümü yapılan alanlarda daha yaygın olarak görülür ve bitki materyalleriyle, sulama suyuyla veya böceklerle yayılabilir. Kabakgil yetiştiriciliğinde hastalık yönetimi için önleme stratejileri ve kültürel uygulamalar önemlidir. Bu, hastalığın yayılmasını ve etkilerini azaltabilir. Ayrıca, hastalık belirtileri görüldüğünde erken tanı ve tedavi önemlidir. Bu sayede hastalığın yayılması kontrol altında tutulabilir ve hasat verimi korunabilir [35]. Aşağıdaki dört parçalı görselde bu bakterinin kabakgillerde neden olduğu belirtiler gösterilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 *Xanthomonas cucurbitae*'nin kabakgil türlerinde neden olduğu belirtiler (A) ve (a) Yapraklar üzerinde görülen küçük, köşeli, sarımsı veya bej renkli lezyonlar (B) ve (C) Hastalığın yaprak dokusu üzerindeki daha yakın ve ilerlemiş safhaları (D) Yeşil bir balkabağı meyvesi üzerinde oluşan, batık ve dairesel karakteristik "leke" (spot) belirtileri [36].

- *Erwinia tracheiphila*: Kabak bitkilerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olan bakteriyel bir hastalık olan "bakteriyel solgunluk" hastalığına yol açan bir bakteridir. Bu hastalık, özellikle Kuzey Amerika'da yaygındır ve kabak yetiştiriciliğinde büyük bir sorundur [37]. Hastalık genellikle yaz aylarında sıcak ve nemli havalarda yayılır. *E. tracheiphila* bakterisi kabak bitkisine genellikle böcekler aracılığıyla (özellikle kabak böceği *Acalymma vittatum*) veya mekanik yaralanmalar sonucu girer. Bakteri, bitkinin damar sisteminde çoğalır ve buradan bitkinin diğer kısımlarına yayılır [37]. Aşağıdaki görselde enfekte olmuş *C. pepo* bitkisinin sarmaşığının gösterdiği solgunluk belirtileri görülmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Enfekte *C. pepo* bitkisinin sarmaşığının gösterdiği tipik sistemik solgunluk belirtileri [37]

2.2.1.2 Fungal Hastalıklar

C. pepo, ekildiği alanda birçok fungal stres faktörü ile karşılaşabilir ve bunlardan kabak küllemesi (*Podosphaera xanthii* ve *Erysiphe cichoracearum* gibi mantarlar), kabak antraknozu (*Colletotrichum orbiculare* ve *Colletotrichum lagenarium*), kabak fusaryum solgunluğu (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*), kabak septoryozu (*Septoria cucurbitacearum*) ve kabak siyah meyve çürüklüğü (*Phytophthora capsici* ve diğer *Phytophthora* türleri) gibi önemli fungal hastalıklara duyarlıdır [38].

- Kabak küllemesi: Genellikle kabak yapraklarının üst yüzeyinde beyaz tozumsu bir tabaka olarak belirir. Bu mantar hastalığı yapraklarda lekeler oluşturabilir ve bitkinin fotosentez yeteneğini azaltabilir [39]. Aşağıdaki şekilde yaprakların üzerinde bu hastalığın etkisi görülmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Kabak küllemesi belirtileri [39]

- Kabak antraknozu: Kabakgil bitkilerinde görülen bir diğer fungal hastalıktır. Genellikle meyvelerde kahverengi lekeler oluşturur ve zamanla yayılır. Meyvelerde çürümeye ve kalite kaybına neden olabilir. Hastalık sıklıkla ağaçların yapraklarında ve dallarında başladığından bazen yaprak, sürgün veya dal yanıklığı olarak da adlandırılır. Antraknoza neden olan mantarların listesi çok geniştir; en önemlileri *Colletotrichum orbiculare* veya *Colletotrichum lagenarium* gibi *Colletotrichum* cinsi mantarlardır [40]. Aşağıdaki şekilde antraknoz mantarının *C. pepo* yaprağında yarattığı lezyonlar görülmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Antraknoz mantarının bir *C. pepo* yaprağında yarattığı lezyonlar [41]

- Kabak *Fusarium* solgunluğu: *Fusarium* solgunluğu, *Verticillium* solgunluğuna benzer semptomlar gösteren yaygın bir vasküler solgunluk mantar hastalığıdır. Bu hastalık bu yüzyılın başlarından beri kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. *Fusarium* solgunluğuna neden olan patojen *F. oxysporum*'dur [42]. Toprakta yaşayan *Fusarium* türleri, özellikle sıcak havalarda kabak bitkilerinde solgunluk hastalığına neden olabilir. Bitkilerin damar sistemini etkileyerek su ve besin iletimini engeller [42]. Aşağıda bu mantarın bir balkabağı üzerindeki etkisi görülmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 *F. oxysporum*'un balkabağı üzerindeki etkisi [42]

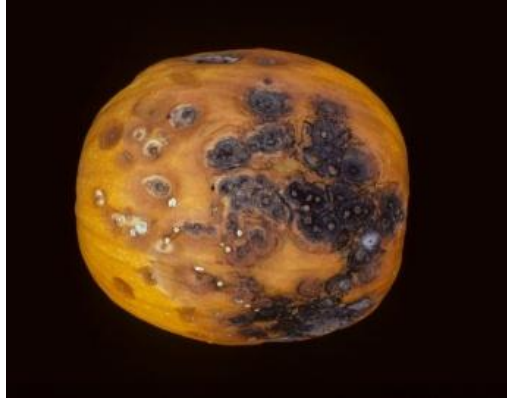
- Kabak septoryozu: *Septoria* türleri kabak yapraklarında küçük, kahverengi lekeler oluşturur. Bu lekeler zamanla büyüyerek yaprakların sararmasına ve dökülmesine yol açabilir. Hastalığa *Septoria* cinsi mantarlar ve özellikle *Septoria cucurbitacearum* isimli bir mantar neden olur. Hastalık kabakgillerin tüm konukçularında benzer semptomlara neden olur. Nemli koşullar altında, lezyonlar ilk önce çapı 1-2 mm olan küçük, koyu kahverengi, suya batırılmış lekeler halinde görünür. Kuru koşullar altında yuvarlak veya bazen düzensiz şekilli ve bej ile neredeyse beyaz renktedirler. Lezyonlar kavun, balkabağı ve kış kabağı yapraklarında çok fazladır; yaz kabaklarında daha az yaygındır. Meyve enfeksiyonunda antraknoz gibi hastalıklar söz konusu olmadığı sürece, bu mantarın meyve çürüklüklerine neden olması muhtemel değildir [43]. Bu mantarların *C. pepo* yapraklarında neden olduğu lekeler aşağıda görülmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 *C. pepo*'da *Septoria cucurbitacearum*'un neden olduğu yaprak lekesi [43]

- Kabak siyah meyve çürüklüğü: Kara çürüklüğe *Didymella bryoniae* mantarı neden olur. Connecticut'ta kış kabağı ve balkabağı meyvelerinde ciddi bir çürümeye neden olur. Bu mantar ayrıca, Güneydoğu ABD gibi daha tropikal iklimlerde karpuz, salatalık ve kavun yapraklarında ve gövdelerinde "sakızlı

gövde yanıklığı" olarak bilinen hastalığa da neden olur. Bu hastalık ilk olarak 1891 yılında Fransa'da tanımlanmıştır [44]. Aşağıda bu hastalığın bir balkabağında yarattığı etki gösterilmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Balkabağında siyah meyve çürüklüğü [44]

2.2.1.3 Viral Zararlılar

C. pepo, özellikle çeşitli virüsler tarafından etkilenen bir türdür. Virüsler, bitkide farklı sorunlara yol açarak büyüme, gelişme ve verim üzerinde olumsuz etkiler yaratabilir. Bu virüsler, genellikle böcekler (özellikle yaprak bitleri ve beyaz sinekler) tarafından taşınır ve bitkiler arasında hızla yayılabilir. Virüslerle başa çıkmak için, enfekte bitkilerin temizlenmesi, virüs taşıyıcı böceklerin kontrolü ve hastalığa dayanıklı çeşitlerin kullanılması gibi önlemler alınabilir.

- **Kabak Sarı Mozaik Virüsü:** Kabak Sarı Mozaik Virüsü (ZYMV), yaprak biti kaynaklı bir potyvirüstür ve dünyanın bu mahsullerin yetiştirildiği çoğu bölgesinde kabakgillerin önemli bir patojeni olarak kabul edilir. ZYMV, balkabağı, kabak, sebze kabakları, kabak, kavun, karpuz, salatalık, kornişon ve kabak başta olmak üzere çeşitli su kabakları dahil olmak üzere tüm kabakgilleri etkilemektedir [45]. Etkileri şiddetli yaprak mozaiği, sararma ve sonunda yaprakların tamamen kurumasıdır. Meyveler bodurlaşır, bükülür ve çıkıntılar nedeniyle deforme olur, bu da verimi azaltır ve bazı kültürlerde onları pazarlanamaz hale getirir. Kabak sarı mozaik virüsüne (ve karpuz mozaik virüsüne) direnmek için biyoteknolojik bir sarı eğri boyunlu kabak geliştirilmiştir. Bu kabak, virüslerin kaplama proteini genlerini içermektedir [46]. Aşağıdaki görselde bu virüsün bir kavun yaprağındaki etkisi gösterilmiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 ZYMV'nin bir kavun bitkisi yaprağındaki etkisi [47]

- Salatalık Mozaik Virüsü: Salatalık Mozaik Virüsü (CMV), *Bromoviridae* familyasından bitki patojenik bir virüstür. Bu virüs dünya çapında bir dağılıma ve çok geniş bir konukçu yelpazesine sahiptir; bilinen herhangi bir bitki virüsü arasında en geniş konukçu aralığına sahiptir [48]. Bu virüs ilk olarak 1934 yılında mozaik belirtileri gösteren salatalıklarda tanımlandı, bu nedenle Salatalık Mozaik Virüsü adı verildi [49]. O zamandan beri, çok çeşitli diğer bitkileri enfekte ettiği bulunmuştur. Bunlar kabak, kavun, biber, patlıcan, domates, fasulye, havuç, kereviz, marul, ıspanak, pancar gibi diğer sebzeleri, Nergis gibi pek çok süs bitkisini ve çeşitli yabani otları içerir [50]. Aşağıdaki şekilde de CMV'nin *C. pepo* yaprakları üzerindeki etkisi görülmektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 CMV'nin *C. pepo* yaprakları üzerinde etkisi [51]

- Kabak Yaprak Kıvrılma Virüsü: Kabak yaprağı kıvrılma hastalığı, Kabak Yaprak Kıvrılma Virüsü'nden (SLCV) kaynaklanır. Hastalık ilk kez 1977 ve 1978 yıllarında ABD'nin güneyi ve Meksika'nın kuzeyindeki kışlık ve yazlık kabak bitkilerinde gözlemlendi. Kabak yaprağı kıvrılma virüsü *Cucurbitaceae* familyasındaki konakçıları enfekte edebilir. Kabak yaprağı kıvrılmasından

kaynaklanan en ciddi kayıplar kabak ve karpuzda meydana gelir. Aşağıdaki şekilde SLCV enfeksiyonunun sebep olduğu yaprakta damarların şişme semptomları gösterilmiştir (Şekil 2.11). Salatalık ve kavundaki kayıplar genellikle küçüktür [52].



Şekil 2.11 SLCV enfeksiyonunun neden olduğu damar şişmesi semptomları [47]

- Kabak Sarı Bodurluk Virüsü: Kabak Sarı Bodurluk Virüsü (CYSDV), dolaşımında olmayan, beyaz sinek *Bemisia tabaci* tarafından yarı kalıcı olarak iletilen bir crinivirüstür. Kabakgil bitki türlerinde çoğalır ancak böcek vektörünün içinde çoğalmaz [53]. CYSDV kabak üretim bölgelerinde en yaygın olan virüslerden biridir. Virüs ilk olarak Birleşik Arap Emirlikleri'nde tanımlanmıştır ancak artık birçok tropikal ve subtropikal üretim alanında yaygındır [54].

2.2.2 Bitkilerde Biyotik Strese Direnç Mekanizmaları

Kabakgil türleri, biyotik streslere karşı oldukça aktif bir savunma sistemine sahiptir. *C. pepo* türü de biyolojik strese karşı hem yapısal hem de moleküler savunma mekanizmaları geliştirmiştir [55].

- Tanıma aşaması (pathogen recognition): Bitki hücreleri, patojenleri tanımak için yüzeyinde PRR (pattern recognition receptor) proteinleri bulundurur. Bu proteinler, patojenlerin yaygın moleküler yapıları olan PAMP (pathogen-associated molecular pattern) yapılarını algılar.
- PTI ve ETI aktiveleştirme: PTI (PAMP-Triggered immunity): İlk savunma hattıdır. Hücre duvarı kalınlaşması, ROS (reaktif oksijen türleri) üretimi gibi tepkiler başlatılır.

- ETI (Effector-Triggered Immunity): Patojen efektörlerine karşı daha güçlü bir savunma. Genellikle hipersensitif yanıt (HR) ile sonuçlanır.
- Savunma ile ilişkili genlerin aktivasyonu: PR (pathogenesis-related) proteinleri sentezlenir (örneğin: kitinaz, β -1,3-glukanaz). Fenilpropanoid yolu aktive olur; lignin ve flavonoid üretimi artar. JA (jasmonik asit) ve SA (salicylic acid) gibi savunma hormonları devreye girer.
- RNA seviyesinde yanıt: Biyotik stresle ilişkili olarak bazı miRNA'lar ve transkripsiyon faktörleri (WRKY, MYB, NAC) farklı düzeyde ifade edilir. Bunlar, gen ekspresyonunu baskılayarak veya artırarak bitkinin stresle başa çıkmasını sağlar.
- Yapısal savunmalar: Trikom yoğunluğu artışı, epidermis kalınlaşması, kalloz birikimi gibi fiziksel bariyerler oluşturur.

2.3 MikroRNA'lar ve Düzenleyici Roller

Ökaryotik organizmalarda gen ifadesinin düzenlenmesi, hücresel homeostazın korunması, büyüme, gelişme ve çevresel streslere adaptasyon süreçleri için hayati öneme sahiptir. Son yıllarda yapılan genomik çalışmalar, protein kodlamayan RNA'ların (non-coding RNA - ncRNA) bu düzenleyici ağlarda kritik roller üstlendiğini ortaya koymuştur. Bu moleküller arasında en çok çalışılan grup, yaklaşık 20-24 nükleotid uzunluğunda, tek iplikli ve endojen kaynaklı küçük RNA molekülleri olan mikroRNA'lardır [56].

miRNA'ların bilim dünyasındaki serüveni, ilk kez 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* nematodunda Lee ve arkadaşları tarafından keşfedilen lin-4 geni ile başlamıştır. lin-4'ün protein kodlamadığı, bunun yerine lin-14 mRNA'sının 3' uç bölgesine (3'-UTR) bağlanarak translasyonu baskılayan küçük bir RNA ürünü sentezlediği anlaşılmıştır [57]. Başlangıçta bu durumun nematodlara özgü istisnai bir mekanizma olduğu düşünülse de, 2000 yılında ikinci bir miRNA olan *let-7*'nin keşfi ve bu molekülün evrimsel süreçte birçok türde korunduğunun gösterilmesi, RNA interferans (RNAi) dünyasında yeni bir çağ açmıştır [58].

2.3.1 Bitkilerde miRNA Sentezi

Bitkilerde miRNA sentezi, hayvanlardakine kıyasla bazı enzimatik farklılıklar gösterir ve süreç büyük oranda çekirdek (nükleus) içinde gerçekleşir. Biyogenez süreci temel olarak şu adımları izler:

- **Transkripsiyon:** miRNA genleri, RNA Polimeraz II enzimi tarafından transkribe edilerek, kendi üzerinde katlanabilen ve "firkete" (hairpin) yapısı oluşturan birincil miRNA (pri-miRNA) transkriptlerine dönüştürülür. Pri-miRNA'lar tıpkı mRNA'lar gibi 5' başlığına (cap) ve 3' poli-A kuyruğuna sahiptir [59].
- **İşleme (processing):** Hayvan hücrelerinde görülen Drosha/Dicer ikilisinin aksine, bitkilerde işleme adımını tek bir enzim üstlenir. Çekirdek içerisinde bulunan ve bir RNase III enzimi olan Dicer-Like 1 (DCL1), pri-miRNA'yı keserek daha kısa olan öncül miRNA'ya (öncül miRNA) ve ardından miRNA/miRNA* dubleksine dönüştürür. DCL1, bu süreçte HYL1 (Hyponastic Leaves 1) ve SE (Serrate) proteinleri ile bir kompleks oluşturarak kesim işleminin doğruluğunu sağlar [60].
- **Metilasyon:** Oluşan miRNA/miRNA* dubleksi, kararlılığını artırmak amacıyla HEN1 enzimi tarafından metillenir. Ardından, HASTY (HST) adı verilen bir taşıyıcı protein (Exportin-5 homologu) aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya aktarılır [60].
- **RISC kompleksine yükleme:** Sitoplazmada, dubleksin işlevsel olan ipliği (rehber iplik), ARGONAUTE1 (AGO1) proteini liderliğindeki RNA-İndüklenen Susturma Kompleksi'ne (RISC) yüklenir. Diğer iplik ise genellikle yıkıma uğrar [60].

2.3.2 MikroRNA'ların Etki Mekanizması

RISC kompleksine yüklenen olgun miRNA, hedef mRNA dizisi ile baz eşleşmesi yaparak gen ifadesini iki ana yolla susturur:

- **mRNA yıkımı (cleavage):** Bitkilerde miRNA ile hedef mRNA arasındaki eşleşme genellikle mükemmel yakındır (yüksek komplementerlik). Bu tam eşleşme, AGO1 proteininin "dilimleyici" (slicer) aktivitesini tetikler ve hedef mRNA parçalanır. Bitkilerdeki baskın mekanizma budur [61].

- Translasyonel baskılama: Eşleşmenin kısmi olduğu durumlarda (hayvanlarda daha yaygındır, ancak bitkilerde de görülür), ribozomun mRNA üzerindeki ilerleyişi engellenerek protein sentezi durdurulur [61].



3

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada *C. pepo* genomunda bulunan biyotik stres ile ilişkili miRNA'ların tanımlanması ve karakterizasyonunun yapılması amacıyla aşağıda verilen veri tabanları ve programlar kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Bitkilerde miRNA analizi için kullanılan biyoinformatik araçlar ve işlevleri

Biyoinformatik Araç	Temel İşlevi	Referans
miRDeep2	Bilinen ve Yeni miRNA Tanımlanması	Friedländer ve ark. [62]
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	Dizi Hizalama ve Homoloji Arama	Altschul ve ark. [63]
RNAfold (Vienna RNA)	İkincil Yapı Tahmini	Zuker [64]
psRNATarget	Hedef Gen Analizi	Dai ve ark. [65]
Clustal Omega	Çoklu Dizi Hizalama	Thompson ve ark. [66]
miRBase / CuGenDB	Veri Tabanı	Kozomara ve ark. [67]
MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)	Filogenetik Ağaç Oluşturma	Tamura ve ark. [68]
BLAST2GO	İşlevsel Anotasyon ve GO Analizi	Conesa ve ark. [69]
KAAS (KEGG Automatic Annotation Server)	Metabolik Yolak Analizi	Moriya ve ark. [70]

Analiz sürecinin ilk adımında; *C. pepo* referans genom verileri CuGenDB [71] veritabanından, referans miRNA dizileri ise miRBase'den [67] temin edildi. Elde edilen veriler, bu alandaki en güvenilir algoritmalarından biri olan miRDeep2 [72] ile analiz edilerek potansiyel miRNA adayları belirlendi.

Bu adayların doğruluğunu pekiştirmek amacıyla NCBI BLAST araçlarıyla homoloji filtrelemesi uygulandı. Hemen ardından, adayları evrimsel olarak sınıflandırmak için Clustal Omega [66] ile çoklu dizi hizalaması yapıldı ve MEGA X [68] programı aracılığıyla filogenetik ağaçlarını oluşturarak aile (family) atamaları gerçekleştirildi.

Aday dizilerin, fonksiyonel bir miRNA için zorunlu olan kararlı saç tokası (hairpin) yapısı ve termodinamik uygunluğu RNAfold [73] algoritmasıyla test edildi. Hedef gen analizinde ise, *C. pepo* cDNA kütüphanesinin kısıtlı olması nedeniyle, yakın akraba tür olan *Cucumis melo* (Kavun) veritabanı referans alınarak psRNATarget [65] sunucusu kullanıldı. Son aşamada, tespit edilen hedef genlerin biyolojik yollardaki rolleri KEGG [74] ve GO [69] analizleri ile aydınlatıldı.

3.1 Genom Verisinin ve miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi

C. pepo türünün genomik verisi, 2018 yılında Montero-Pau ve ark. [1] tarafından *C. pepo* bitkisinin referans genomu olarak tanımlanan veriden elde edildi. Bu genomik veri, CuGenDB (Cucurbit Genomics Database) üzerinden [71] FASTA formatında indirildi ve kullanıldı.

Öncelikle CuGenDB (Cucurbit Genomics Database) veri tabanı [71] kullanılarak *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* (MU-CU-16) kùltivarına ait Zucchini (sakız kabağı) çeşidinin 20 kromozomdan oluşan ve 263 Mb büyüklüğündeki tüm genom bilgisi, *Aphis gossypii* ile enfekte edilmiş 24. saat *C. pepo* yaprak sRNA okumaları ve ayrıca miRBase üzerinde yer alan referans bitkilerin veri tabanına [75] ait miRNA dizileri de FASTA formatında indirildi. Daha sonra, FASTQ formatında indirilmiş olan *C. pepo*'ya ait RNA-Seq verileri, *C. pepo* türündeki ham okumalara ait Cpepo_A24 örnek isimli sRNA dizileri ve FASTA formatındaki referans genom miRDeep2 yazılımına [72] aktararak hizalama ve analize başlandı. Analiz öncesinde yapılması gereken adaptör temizleme işlemi miRDeep2 yazılımının mapper.pl komutu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu aşamanın

gerçekleştirilmesindeki temel amaç, RNA dizileme cihazlarından elde edilen ham nükleotid dizilerini (reads) referans genom üzerindeki fiziksel konumlarına haritalayarak, *C. pepo*'ya özgü olası miRNA adaylarını yüksek doğrulukla tespit etmektir. miRDeep2 algoritması, hizalanan bu dizilerin karakteristik saç tokası (hairpin) ikincil yapılarını ve termodinamik kararlılıklarını analiz ederek, gerçek miRNA öncüllerini (öncül miRNA) diğer kodlamayan RNA parçalarından veya yıkım ürünlerinden istatistiksel olarak ayırt edebilmek amacıyla kullanıldı.

Çalışmada miRNA dizileri elde edildikten sonra BLAST yöntemiyle mevcut veri tabanlarıyla karşılaştırılarak doğrulama yapıldı. Bu aynı zamanda yeni miRNA keşfi açısından da yapılması gereken bir adımdır.

3.2 BLAST Analizleri

Kabakgiller (*Cucurbitaceae*) familyası içerisinde genetik yakınlığı bulunan *C. pepo* ve *C. melo* türlerine ait Expressed Sequence Tag (EST) verileri, referans miRNA dizileriyle kıyaslanmak üzere NCBI veri tabanından temin edildi. Homoloji tespiti sürecinde NCBI bünyesindeki BLASTN algoritması kullanılarak, her iki bitkiye ait tür veya cins seviyesindeki EST sekansları tarandı. Bu karşılaştırmalı analizler, aşağıda detaylandırılan spesifik parametre setleri ışığında tamamlandı.

Homoloji tabanlı miRNA belirleme çalışmaları kapsamında, Expressed Sequence Tags (EST) veri tabanı üzerinden karşılaştırmalı analizler yürütüldü. Bu süreçte hedef organizmalar olarak *Cucurbita pepo* (Taxid: 3663), *Cucumis melo* (Taxid: 3656) ve *Cucumis sativus* (Taxid: 3659) seçildi. Analiz parametreleri, kısa nükleotid dizilerinin hassas bir şekilde yakalanabilmesi amacıyla; 'somewhat similar sequences' algoritması, 7 birimlik kelime büyüklüğü (word size) ve 1000 beklenen eşik değeri (e-value threshold) olarak konfigüre edildi. Hizalanan maksimum dizi sayısı ise 1000 ile sınırlandırıldı.

BLAST analizleri, Altschul ve ark. [63] tarafından belirtilen algoritma temel alınarak, kısa ve düşük benzerlik gösteren dizilerin (somewhat similar sequences) tespiti için optimize edilmiş parametrelerle (Word Size: 7) gerçekleştirildi.

Elde edilen diziler, referans miRNA dizileriyle karşılaştırılarak kontrol edildi. Referans miRNA'larla eşleşen EST dizileri arasındaki benzerliklerde, maksimum 7

adet yanlış eşleşme ve/veya indel (insersiyon/delesyon) içerenler, bir sonraki adım olan eleme süreci için değerlendirmeye alındı.

3.3 Aday Dizilerin Filtrelenmesi

Yeni miRNA'ların *in silico* analizlerle tanımlanmasında, kullanılan programlar ve bu programlara ait parametreler sürecin tüm aşamalarında büyük önem arz etmektedir. Analiz sürecinin başlangıcında, veri setinin tutarlılığını sağlamak amacıyla aynı gen veya EST (Expressed Sequence Tag) kaynaklı mükerrer dizilerin ayıklanması gerçekleştirilmiştir. BLAST sorgulamaları sonucunda, tek bir miRNA dizisinin NCBI veri tabanında farklı erişim numaralarıyla (accession numbers) kayıtlı, ancak aslında aynı genetik bölgeyi temsil eden birden fazla diziyle eşleştiği saptanmıştır. Bu tür tekrarlanan kayıtların analizden temizlenmemesi, sonuçların yapay olarak çoğalmasına ve istatistiksel değerlendirmenin sapmasına yol açabileceği için veriler tekilleştirilmiştir.

Bu elemelerde, BLASTN yazılımının [76] varsayılan parametreleri kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Bu işlemler sırasında, aynı aileye ait olsalar dahi nükleotit dizisi veya genomik lokusu farklılık gösteren izoformlar (örneğin a ve b varyantları) korunarak analize dahil edildi.

Eleme sürecinin bir diğer kritik aşaması ise protein kodlayan miRNA adaylarının ayıklanmasıdır. Bu aşamada, FASTA formatındaki miRNA dizileri, NCBI'da yer alan protein veri tabanı ile BLASTX programı aracılığıyla karşılaştırıldı. Yapılan analiz sonucunda, protein kodlama potansiyeli taşıyan tüm diziler elendi. Protein veri tabanındaki dizilerle benzerlik göstermeyen diziler ise potansiyel miRNA adayları olarak değerlendirilmek üzere seçildi.

3.4 Öncül miRNA'ların İkincil Yapılarının Oluşturulması

Tespit edilen aday miRNA'ların karakteristik saç tokası (hairpin) benzeri ikincil yapı konformasyonları, ViennaRNA Yazılım Paketi (Sürüm 2.4.17) bünyesindeki RNAfold Web Sunucusu [73] aracılığıyla tahmin edildi. Bu modelleme sürecinde, termodinamik kararlılığı temsil eden 'Minimum Serbest Enerji' (MFE) algoritmasından [77] yararlanıldı. Analiz sonucunda ortaya çıkan yapısal

formasyonlar, literatürde kabul görmüş biyoenformatik standartlar ve belirli yapısal parametreler çerçevesinde detaylıca süzgeçten geçirildi.

Aday miRNA'ların değerlendirilmesinde kullanılan yapısal filtreler şu şekildedir: Öncelikle dizinin hairpin konformasyonu üzerinde uygun bir bölgeye yerleşmiş olması ve olgun miRNA'nın bu yapının sadece bir kolunda bulunması şartı arandı. miRNA ve miRNA* dupleksi arasında herhangi bir simetri bozukluğu, halka (loop) veya yapısal kırılma bulunmaması temel kriterlerden biridir. Termodinamik stabilite açısından ise Minimum Katlanma Enerji İndeksi (MFEI) değerinin 0,85'ten büyük, Minimum Serbest Enerji (MFE) düzeyinin ise $-18 \text{ kcal mol}^{-1}$ değerine eşit veya bu değerden düşük olması beklendi. Son olarak, olgun dizi üzerindeki nükleotid etkileşimlerinde en az 12 adet Watson-Crick veya G/U baz eşleşmesinin varlığı doğrulandı.

3.5 Filogenetik Analizler

C. pepo türünde tanımlanan olgun miRNA dizileri ile miRBase veri tabanındaki homolog referanslar arasındaki evrimsel yakınlığı belirlemek amacıyla, Clustal Omega [78] yazılımı kullanılarak çoklu dizi hizalamaları gerçekleştirildi. Bu hizalama verileri temel alınarak, MEGA [79] programı aracılığıyla filogenetik projeksiyonlar oluşturuldu. Ağaç inşasında Neighbour-Joining (NJ) algoritması ve p-distance modeli tercih edildi; sonuçların istatistiksel güvenilirliği ise 1000 yinelemeli bootstrap analizi ile test edildi. Bu analizlerle, olgun diziler üzerinden miRNA aile üyelerinin sekans korunumu (sequence conservation) ve yapısal benzerlikleri aydınlatıldı.

3.6 miRNA Hedef Gen Analizi

Tespit edilen miRNA'ların belirli genlerin anlatımlarını nasıl düzenlediğini anlamaya yönelik yapılan bir araştırma sürecidir. MiRNA'lar, hedef genlerin mRNA'larına bağlanarak bu mRNA'ların stabilitesini azaltabilir veya translasyonlarını engelleyebilir. Mi-RNA hedef gen analizi yapmak, miRNA'nın etki ettiği genlerin hangisi olduğunu belirlemek ve bu etkileşimlerin biyolojik süreçler üzerindeki etkilerini anlamak için kullanılır.

Bu çalışmada önceki başlıkta bahsedilen yöntemlerle elde edilen miRNA'ların potansiyel hedef genlerini belirlemek için uygun miRNA dizileri psRNATarget yazılımına [80] girilerek hangi genlerin miRNA'lar tarafından düzenlendiği tespit edildi. Bu aşamada psRNATarget veri tabanında *C. pepo* türüne ait cDNA kütüphanesi yer almadığından genetik açıdan yakın iki tür olan *C. sativus* ve *C. melo* arasından *C. melo* türünün 'Melonomics Project, version 4' projesine ait cDNA kütüphanesi kullanıldı. Çıkan analiz sonuçlarında 'Expect Value' değerinin 3.0 altında olmasına dikkat edildi. Bu sayede en anlamlı sonuçların elde edilmesi amaçlandı.

3.7 Fonksiyonel Anotasyon ve Yolak Analizi

Bu çalışmada hedef genler belirlendikten sonra yapılan fonksiyonel anotasyon uygulaması sayesinde biyotik stres ile ilişkili genlerin tespit edilmesi amaçlandı.

Bunun için daha önceden elde edilmiş miRNA dizileri Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) üzerinde yer alan BLASTX yazılımı ile *C. pepo*'ya ait protein veri tabanı ile *C. melo* veri tabanı kullanılarak karşılaştırıldı. Fonksiyonel anotasyon işlemlerinde hatalı pozitif sonuçların önlenmesi ve yüksek güvenilirlikli homoloji tespiti amacıyla, literatürdeki standart homoloji çıkarım prensipleri gözetilerek Pearson [81] tarafından önerilen yaklaşımlar doğrultusunda benzerlik eşik değeri %80 olarak belirlendi. Belirlenen hedef genlerin GO (gen ontoloji) analizleri (E değeri ≤ 0), BLAST2GO programı kullanılarak gerçekleştirildi [82].

Sonraki aşamada KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) yolak veri tabanı kullanılarak [74] dizilerin rolleri belirlendi ve metabolik yol analiz edildi. Bu analiz için de gen dizilerinin fonksiyonel anotasyonu ve ilgili KEGG Ortoloji (KO) gruplarına atanması işlemi, web tabanlı KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) aracı üzerinden, SBH (Single-direction Best Hit) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi [70].

C. pepo'ya ait RNA-Seq verilerinin referans genom ile hizalanması ve miRDeep2 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen *de novo* analizler sonucunda, başlangıçta çok sayıda potansiyel saç tokası (hairpin) yapısı tespit edildi. Elde edilen ham aday diziler, yüksek güvenilirlik sağlamak amacıyla bir dizi eleme kriterine tabi tutuldu. İlk aşamada, miRDeep2 skor değeri düşük olan ve karakteristik miRNA yapısı göstermeyen diziler elendi. Takiben yapılan homoloji analizleri (BLASTN) ile, bilinen diğer kodlamayan RNA türleri (rRNA, tRNA, snRNA) ve protein kodlayan gen bölgeleriyle eşleşen diziler analiz dışı bırakıldı. Tüm filtreleme ve doğrulama aşamalarının ardından, *C. pepo* genomunda 19 adet yüksek güvenilirliğe sahip olgun miRNA dizisi tanımlandı. Bu miRNA'ların hedefleri incelendiğinde hedef genlerinin anlatımlarının çeşitli biyotik stres zararlılarına (*P. xanthii*, *P. syringae*, CMV, ZYMV, SLCV, *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *Phytophthora capsici*, beyaz sinekler, yaprak bitleri) karşı etkili rol oynayan genler (*ARF*, *PLL*, *NAC*, *GRAS*, *ATHB-8*, *ATHB-15*, *TMK1*, *GILP*, *Laccase*, Cupredoxin-like proteinler, *SBT3.18*, *SCL6*) olduğu belirlendi.

4.1 miRNA Dizilerinin İncelenmesi

Belirtilen MirBase verilerine göre [75] 21 miRNA ailesi içerisinde yer alan 74 bitki türünde toplam 7.474 öncül miRNA ve 9.168 olgun miRNA dizisi tanımlanmıştır. Bu dizilerin taksonomik dağılımı incelendiğinde; 5.704 öncül miRNA ve 6.746 olgun miRNA'nın dikotiledon türlerine, 1.770 öncül miRNA ve 2.422 olgun miRNA'nın ise monokotiledon türlerine ait olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Literatürdeki olgun miRNA dizileri

Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Dizi Sayısı
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Salicornia europaeae</i>	31 öncül dizi, 31 olgun dizi
<i>Araliaceae</i>	<i>Panax ginseng</i>	29 öncül dizi, 32 olgun dizi
<i>Asteraceae</i>	<i>Cynara cardunculus</i>	48 öncül dizi, 57 olgun dizi
	<i>Helianthus annuus</i>	6 öncül dizi, 7 olgun dizi
	<i>Helianthus argophyllus</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
	<i>Helianthus ciliaris</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
	<i>Helianthus exilis</i>	2 öncül dizi, 2 olgun dizi
	<i>Helianthus paradoxus</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
	<i>Helianthus petiolaris</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
	<i>Helianthus tuberosus</i>	16 öncül dizi, 16 olgun dizi
<i>Brassicaceae</i>	<i>Arabidopsis lyrata</i>	205 öncül dizi, 385 olgun dizi
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	326 öncül dizi, 430 olgun dizi
	<i>Brassica napus</i>	90 öncül dizi, 92 olgun dizi
	<i>Brassica oleracea</i>	10 öncül dizi, 11 olgun dizi
	<i>Brassica rapa</i>	96 öncül dizi, 157 olgun dizi
	<i>Camelina sativa</i>	91 öncül dizi, 112 olgun dizi
<i>Caricaceae</i>	<i>Carica papaya</i>	79 öncül dizi, 81 olgun dizi
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis melo</i>	120 öncül dizi, 120 olgun dizi
	<i>Cucumis sativus</i>	5 öncül dizi, 5 olgun dizi
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	5 öncül dizi, 5 olgun dizi
	<i>Manihot esculenta</i>	174 öncül dizi, 175 olgun dizi
	<i>Ricinus communis</i>	63 öncül dizi, 63 olgun dizi
<i>Fabaceae</i>	<i>Acacia auriculiformis</i>	7 öncül dizi, 7 olgun dizi
	<i>Arachis hypogaea</i>	23 öncül dizi, 32 olgun dizi
	<i>Acacia mangium</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
	<i>Glycine max</i>	684 öncül dizi, 756 olgun dizi
	<i>Glycine soja</i>	13 öncül dizi, 13 olgun dizi
	<i>Lotus japonicus</i>	299 öncül dizi, 365 olgun dizi
	<i>Medicago truncatula</i>	672 öncül dizi, 790 olgun dizi
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	8 öncül dizi, 10 olgun dizi
	<i>Vigna unguiculata</i>	18 öncül dizi, 18 olgun dizi

Tablo 4.1 Literatürdeki olgun miRNA dizileri (devamı)

Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Dizi Sayısı
<i>Lamiales</i>	<i>Avicennia marina</i>	2 öncül dizi, 3 olgun dizi
	<i>Digitalis purpurea</i>	13 öncül dizi, 13 olgun dizi
	<i>Rehmannia glutinosa</i>	32 öncül dizi, 37 olgun dizi
	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	1 öncül dizi, 1 olgun dizi
	<i>Salvia sclarea</i>	18 öncül dizi, 18 olgun dizi
<i>Linaceae</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	124 öncül dizi, 124 olgun dizi
<i>Malvaceae</i>	<i>Gossypium arboreum</i>	1 öncül dizi, 1 olgun dizi
	<i>Gossypium herbaceum</i>	1 öncül dizi, 1 olgun dizi
	<i>Gossypium hirsutum</i>	78 öncül dizi, 80 olgun dizi
	<i>Gossypium raimondii</i>	296 öncül dizi, 296 olgun dizi
	<i>Theobroma cacao</i>	82 öncül dizi, 82 olgun dizi
<i>Myrtaceae</i>	<i>Eugenia uniflora</i>	39 öncül dizi, 74 olgun dizi
<i>Paeoniaceae</i>	<i>Paeonia lactiflora</i>	15 öncül dizi, 15 olgun dizi
<i>Ranunculaceae</i>	<i>Aquilegia caerulea</i>	45 öncül dizi, 45 olgun dizi
<i>Rhizophoraceae</i>	<i>Bruguiera cylindrica</i>	4 öncül dizi, 4 olgun dizi
	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	4 öncül dizi, 4 olgun dizi
<i>Rosaceae</i>	<i>Fragaria vesca</i>	118 öncül dizi, 131 olgun dizi
	<i>Malus domestica</i>	308 öncül dizi, 322 olgun dizi
	<i>Prunus persica</i>	180 öncül dizi, 214 olgun dizi
<i>Rutaceae</i>	<i>Citrus clementina</i>	5 öncül dizi, 5 olgun dizi
	<i>Citrus reticulata</i>	4 öncül dizi, 4 olgun dizi
	<i>Citrus sinensis</i>	151 öncül dizi, 252 olgun dizi
	<i>Citrus trifoliata</i>	6 öncül dizi, 6 olgun dizi
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus euphratica</i>	4 öncül dizi, 8 olgun dizi
	<i>Populus trichocarpa</i>	352 öncül dizi, 401 olgun dizi
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	162 öncül dizi, 164 olgun dizi
	<i>Solanum lycopersicum</i>	112 öncül dizi, 147 olgun dizi
	<i>Solanum tuberosum</i>	224 öncül dizi, 343 olgun dizi
<i>Vitaceae</i>	<i>Vitis vinifera</i>	163 öncül dizi, 186 olgun dizi

Tablo 4.1 Literatürdeki olgun miRNA dizileri (devamı)

Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Dizi Sayısı
Monokotiledonlar	<i>Asparagus officinalis</i>	101 öncül dizi, 101 olgun dizi
	<i>Aegilops tauschii</i>	88 öncül dizi, 175 olgun dizi
	<i>Brachypodium distachyon</i>	317 öncül dizi, 536 olgun dizi
	<i>Elaeis guineensis</i>	6 öncül dizi, 6 olgun dizi
	<i>Festuca arundinacea</i>	15 öncül dizi, 15 olgun dizi
	<i>Hordeum vulgare</i>	69 öncül dizi, 72 olgun dizi
	<i>Oryza sativa</i>	604 öncül dizi, 757 olgun dizi
	<i>Zea mays</i>	174 öncül dizi, 326 olgun dizi
	<i>Saccharum officinarum</i>	16 öncül dizi, 16 olgun dizi
	<i>Saccharum sp.</i>	19 öncül dizi, 20 olgun dizi
	<i>Triticum aestivum</i>	122 öncül dizi, 125 olgun dizi
	<i>Triticum turgidum</i>	1 öncül dizi, 1 olgun dizi

Çalışma sonucunda elde edilen ve biyotik strese rol oynadığı tahmin edilen miRNA dizileri Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Tabloda aynı zamanda bu dizilere ait NCBI veri tabanına ait hedef genler ve erişim numaraları da verilmiştir. Bu çalışmada tanımlanan miRNA’ların isimlendirilmesi, miRBase veri tabanının (Sürüm 22.1) kayıtları esas alınarak yapılmıştır. Veri tabanında kaydı bulunmayan yeni izoformlar, standart nomenklatur kuralları çerçevesinde isimlendirilmiştir (Tablo 4.2).

Öncül miRNA ikincil yapılarının karakterizasyonu aşamasında, miRNA ve miRNA* dizileri arasında minimum 12 baz eşleşmesi bulunması kriteri esas alındı. Yapısal stabiliteyi teyit etmek amacıyla, MFE (Minimum Serbest Enerji) değerinin -18 kcal/mol veya daha düşük, MFEI (Minimum Serbest Enerji İndeksi) değerinin ise 0,85’ten büyük olması kuralına bağlı kalınarak analizler gerçekleştirildi. Elde edilen öncül miRNA dizilerinde MFEI değerlerinin 0,85 ile 1,25 arasında değiştiği ve ortalamalarının 0,93 olduğu belirlendi. Diğer bir önemli parametre olan MFE değerinin ise -49.50 ile -23.90 arasında değiştiği ve ortalamasının -35.69 olduğu tespit edildi. Dizilerin %GC oranları incelendiğinde ise %36,67 ile %57,97 arasında olduğu ve ortalamalarının %45,27 olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 *C. pepo*'da biyotik strese rol oynadığı tahmin edilen miRNA dizileri ve bunların düzenlediği tahmin edilen gen yanıtlarına ait enzim ve proteinler

miRNA Dizisi	Konum	GC %	MFEI	MFE	Hedef Gen ve Aksiyon Numarası
GCUCUCUAUGCUUCUGUCAUC (cpe-miR156a-3p)	3'	37,29	1,10	-44,40	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g26790 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008445684.3 Pectate Lyase-like (<i>Cucumis melo</i>) XM_008458237
UGACAGAAGAGAGUGAGCAC (cpe-miR156b-5p)	5'	44,57	1,21	-49,50	Squamosa Promoter Binding-Like Protein 16 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008461629.3 Squamosa Promoter-Binding-Like Protein 13A (<i>Cucumis melo</i>) XM_008466192.3
GCUCUCUAUGCUUCUGUCAUCA (cpe-miR157a-3p)	3'	36,67	1,10	-44,80	Zinc Finger CCHH Domain-Containing Protein ZFN-Like (<i>Cucumis melo</i>) XM_051081450.1
UGACAGAAGAUAGAGAGCAC (cpe-miR157a-5p)	5'	36,67	1,10	-44,82	Squamosa Promoter-binding-like Protein 13A (<i>Cucumis melo</i>) XM_008451896.3 Cationic Amino Acid Transporter 8, Vacuolar (<i>Cucumis melo</i>) XM_008453564.3 Squamosa Promoter-binding-like Protein 9 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008444850.3

Tablo 4.2 *C. pepo*'da biyotik strese rol oynadığı tahmin edilen miRNA dizileri ve bunların düzenlediği tahmin edilen gen yanıtlarına ait enzim ve proteinler (devamı)

miRNA Dizisi	Konum	GC %	MFEI	MFE	Hedef Gen ve Aksiyon Numarası
UGCCUGGCGUCCUGUAUGCCA (cpe-miR160a-5p)	3'	57,50	0,96	-44,20	Auxin Response Factor 16-like (<i>Cucumis melo</i>) XM_008458263.3 Auxin Response Factor 18 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008465730.3
UCGGAUCAGGCUUCAUUCGCC (cpe-miR166a-3p)	3'	51,95	0,91	-36,50	Homeobox-Leucine Zipper Protein ATHB-15 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008464214.3 Homeobox-Leucine Zipper Protein ATHB-14 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008446985.3
GGAAUGUUGUCUGGCGGAGG (cpe-miR166a-5p)	5'	49,33	0,91	-36,50	Uncharacterized LOC103500217 (<i>Cucumis melo</i>) XM_051085265.1 Protein METHYLENE BLUE SENSITIVITY 1 (<i>Cucumis melo</i>) XR_007819125.1
UCAAGCUGCCAGCAUGAUCUA (cpe-miR167a-5p)	5'	38,10	0,96	-30,70	Auxin Response Factor 8 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008464905.2 Auxin Response Factor 6 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008446512.3
UCGCUUGGUGCAGGUGGGGAA (cpe-miR168a-5p)	5'	46,96	0,86	-46,80	Dihydrofolate Synthetase (<i>C. pepo</i>) XM_023697772.1 Pseudo Histidine-Containing Phosphotransfer Protein 5 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008460561.3 Uncharacterized LOC111800659 (<i>C. pepo</i>) XM_023684469.1

Tablo 4.2 *C. pepo*'da biyotik strese rol oynadığı tahmin edilen miRNA dizileri ve bunların düzenlediği tahmin edilen gen yanlılarına ait enzim ve proteinler (devamı)

miRNA Dizisi	Konum	GC%	MFEI	MFE	Hedef Gen ve Aksiyon Numarası
CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU (cpe-miR168a-3p)	3'	46,96	0,86	-46,80	Uncharacterized LOC103489892 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008449225.3 Isolate PI 511890 chromosome 11 (<i>Cucumis melo</i>) CP136111.1
UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC (cpe-miR171a-3p)	3'	37,33	1,25	-35,10	scarecrow-like protein 6 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008450640.3 scarecrow-like protein 15 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008455503.3 GRAS24 protein (<i>Cucumis melo</i>) MW417854.1
AGAAUCUUGAUGCUGCAG (cpe-miR172a-3p)	3'	37	1,12	-35,90	ethylene-responsive transcription factor RAP2-7 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008465658.3 APETALA2-like protein 3 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008451062.3
AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC (cpe-miR390a-5p)	5'	50,00	0,90	-36,80	Receptor protein kinase TMK1 (<i>C. pepo</i>) XM_023693954.1 Isolate PI 511890 chromosome 9 (<i>Cucumis melo</i>) CP136112.1

Tablo 4.2 *C. pepo*'da biyotik strese rol oynadığı tahmin edilen miRNA dizileri ve bunların düzenlediği tahmin edilen gen yanıtlarına ait enzim ve proteinler (devamı)

miRNA Dizisi	Konum	GC%	MFEI	MFE	Hedef Gen ve Aksiyon Numarası
GCGCUAUCCAUCUGAGUUUC (cpe-miR390a-3p)	3'	50,00	0,90	-36,80	Isolate PI 511890 chromosome 5 (<i>Cucumis melo</i>) CP136110.1 Nuclear poly(A) polymerase 4-like (<i>C. pepo</i>) XM_023658368.1
UGAAGUGUUUGGGGAACUC (cpe-miR395a-3p)	3'	40,00	1,10	-32,90	ATP sulphurylase 1, chloroplastic (<i>Cucumis melo</i>) XM_008451088.3 Low Affinity Sulfate Transporter 3 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008462265.3
UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG (cpe-miR397a-5p)	5'	39,44	0,85	-23,90	Laccase-11 (<i>Cucumis melo</i>) XP_008449246.1 Laccase-17-Like (<i>Cucumis melo</i>) XM_008444310.3 Laccase-4-Like (<i>Cucumis melo</i>) XM_008450958.3
UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG (cpe-miR398a-3p)	3'	57,97	1,01	-40,70	Cupredoxin-like protein (<i>Cucumis melo</i>) XM_008458647.3 Uclacyanin-3-Like (<i>Cucumis melo</i>) XM_008458657.3

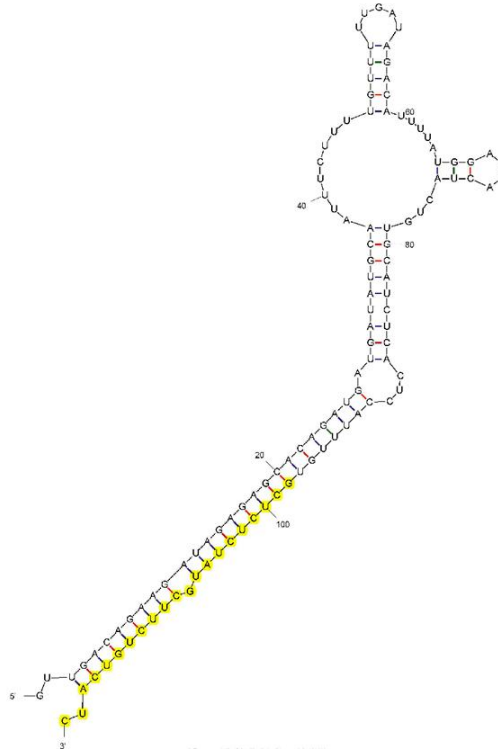
Tablo 4.2 *C. pepo*'da biyotik strese rol oynadığı tahmin edilen miRNA dizileri ve bunların düzenlediği tahmin edilen gen yanıtlarına ait enzim ve proteinler (devamı)

miRNA Dizisi	Konum	GC%	MFEI	MFE	Hedef Gen ve Aksiyon Numarası
UGUGUUCUCAGGUGGCCCCUG (cpe-miR398a-3p)	3'	57,97	1,01	-40,70	Cupredoxin-like protein (<i>Cucumis melo</i>) XM_008458647.3 Uclacyanin-3-Like (<i>Cucumis melo</i>) XM_008458657.3
CUGCCAAACGAGAUUUGCCC (cpe-miR399a-3p)	3'	49,25	0,91	-26,60	Probable Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 24 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008441632.3
UGCCAGAGGAGAGUUGCCCU (cpe-miR399b-3p)	3'	52,78	0,86	-33,00	Peroxidase P7-Like (<i>Cucumis melo</i>) XM_008457075.2 Probable Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 24 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008441632.3 Suppressor Protein SRP40 (<i>Cucumis melo</i>) XM_008467221.3

4.2 Tespit Edilen Öncül miRNA'ların İkincil Yapıları

Bu çalışmada aday öncül miRNA dizilerinin ikincil yapıları RNAfold [73] algoritması kullanılarak tahmin edilmiştir. RNAfold [73] çıktıları doğrultusunda elde edilen dot-bracket notasyonları, UGENE [83] ve RNACanvas [84] gibi görselleştirme araçları ile analiz edilmiştir. Her bir öncül miRNA dizisinin saç tokası (hairpin) benzeri yapılar oluşturma potansiyeli, bu yapılar üzerinde olgun miRNA dizilerinin konumlandırılmasıyla değerlendirilmiştir. Olgun miRNA dizileri UGENE [83] yazılımı ile ilgili öncül miRNA dizileri içerisinde aranmış ve eşleşen bölgeler dizi üzerinde işaretlenmiştir. Elde edilen yapı bilgisi RNACanvas [84] aracına aktarılmış, olgun miRNA dizisinin ikincil yapı üzerindeki konumu renkli olarak vurgulanmıştır. Bu yöntem sayesinde, klasik saç tokası yapısına sahip ve olgun miRNA dizisini içeren aday öncül miRNA'lar belirlenmiş, bu yapıların stabilitesi ise MFE değerleri ile desteklenmiştir.

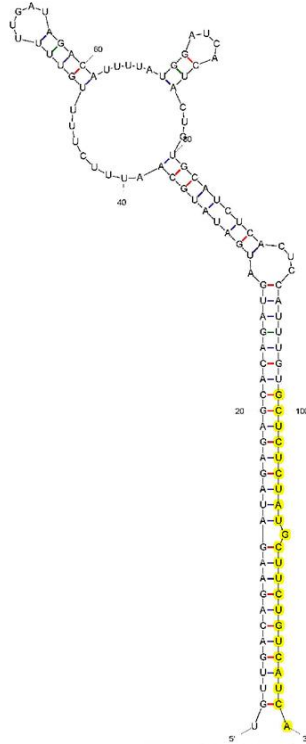
Aşağıda, sırasıyla bulunan 100 - 150 nt dizi sayısı aralığındaki öncül miRNA adaylarının iki boyutlu yapıları verilmiş ve yapı içindeki olgun miRNA'nın yer aldığı dizi işaretlenmiştir (Şekil 4.1 – Şekil 4.19).



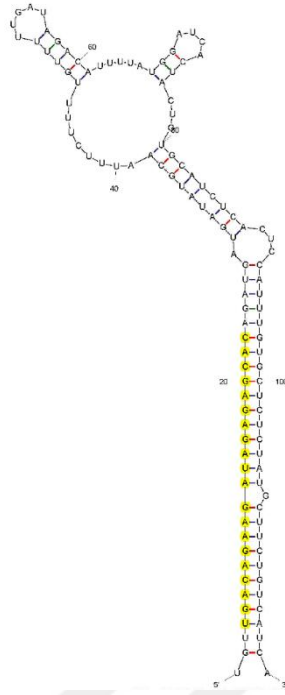
Şekil 4.1 cpe-miR156a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



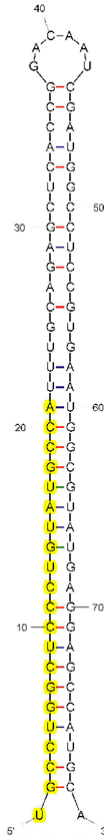
Şekil 4.2 cpe-miR156b-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



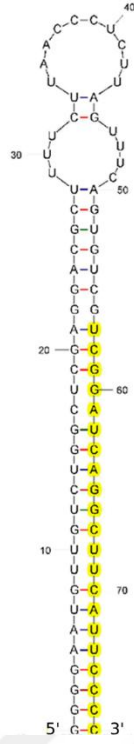
Şekil 4.3 cpe-miR157a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



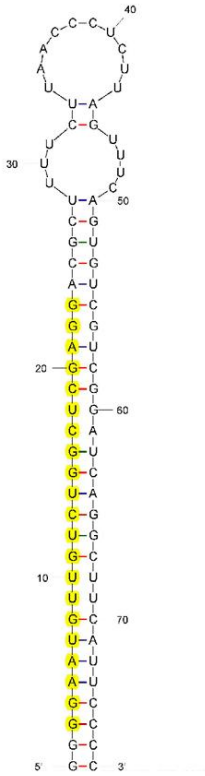
Şekil 4.4 cpe-miR157a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



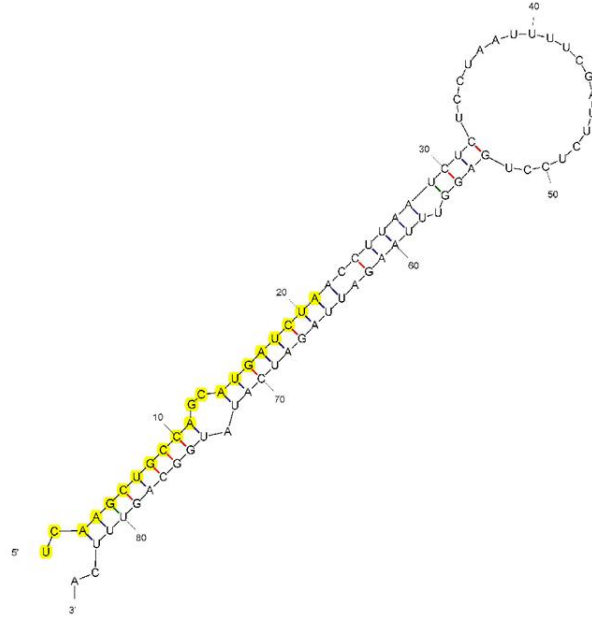
Şekil 4.5 cpe-miR160a-5p'ya ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



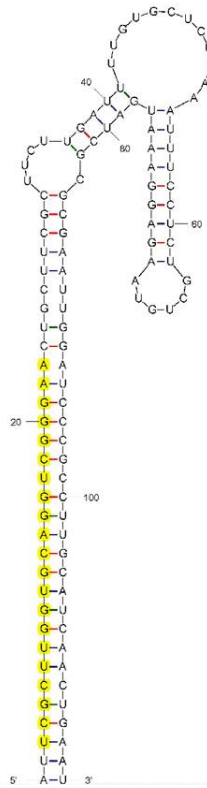
Şekil 4.6 cpe-miR166a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



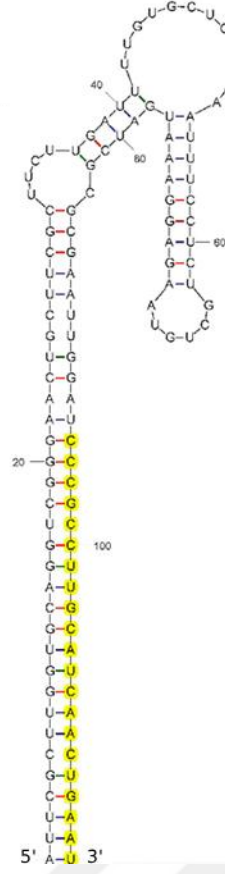
Şekil 4.7 cpe-miR166a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



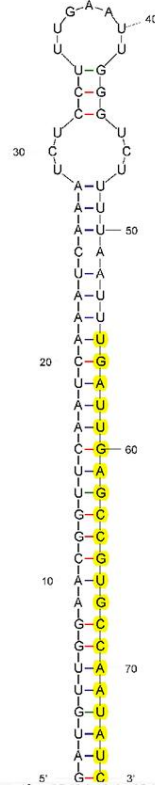
Şekil 4.8 cpe-miR167a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



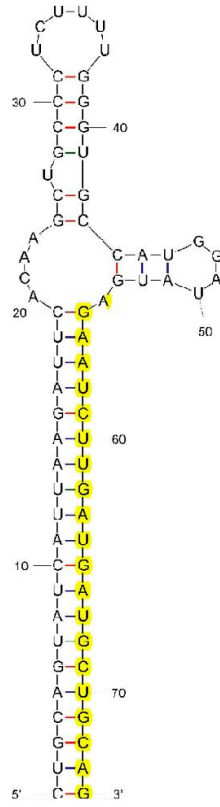
Şekil 4.9 cpe-miR168a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



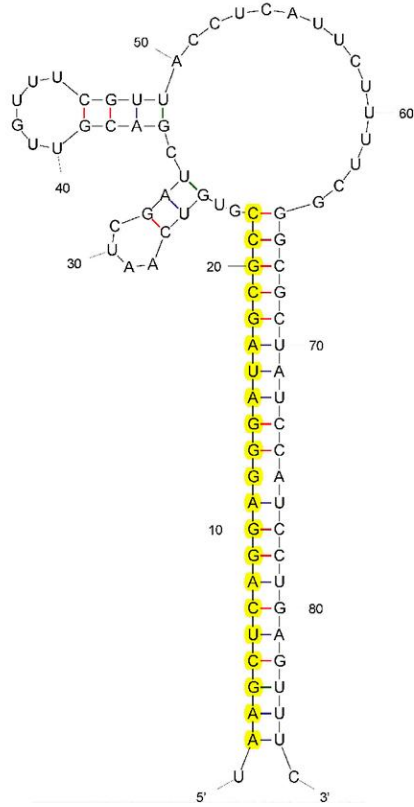
Şekil 4.10 cpe-miR168a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



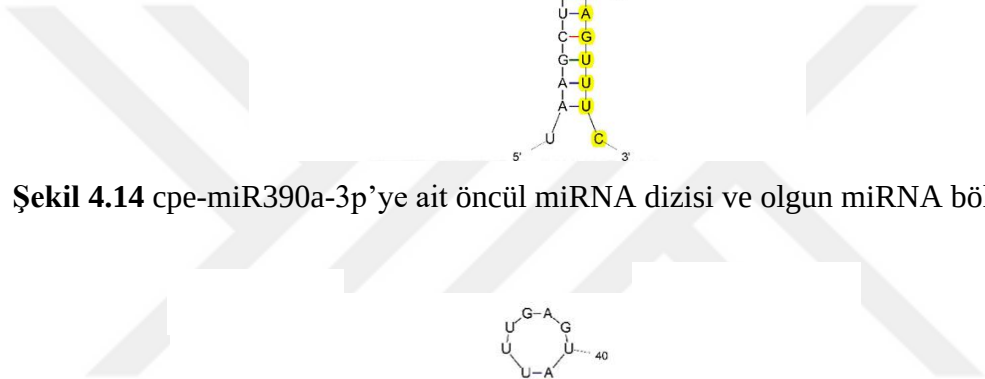
Şekil 4.11 cpe-miR171a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



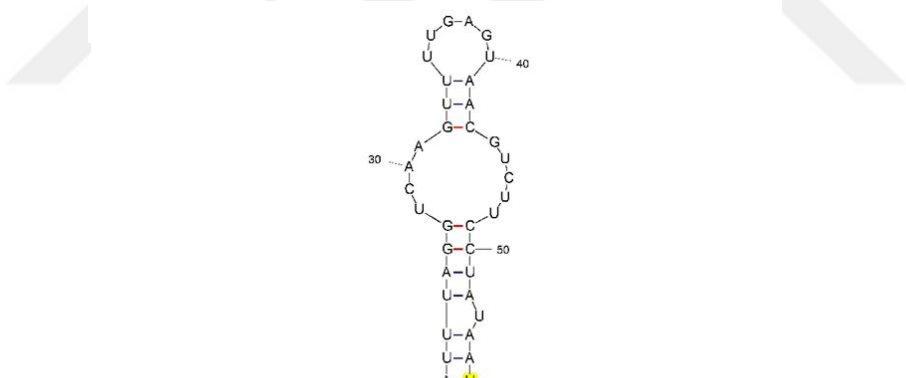
Şekil 4.12 cpe-miR172a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



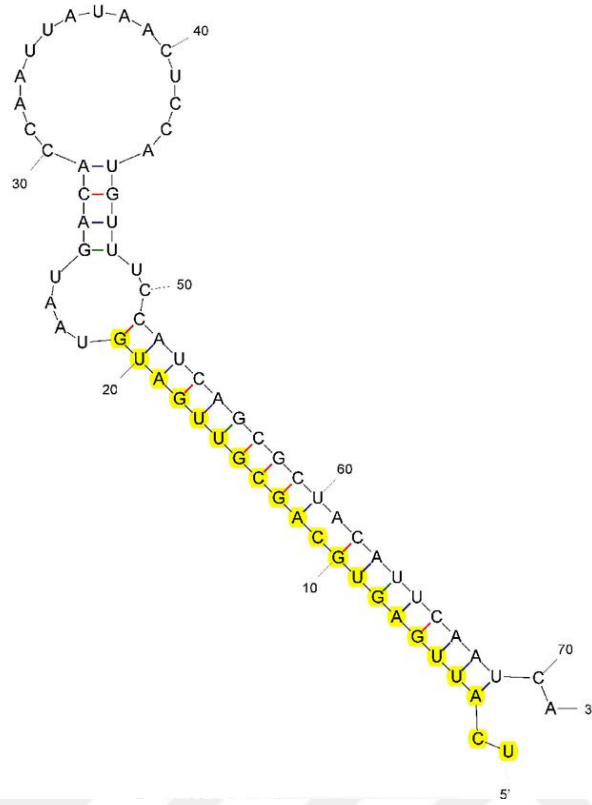
Şekil 4.13 cpe-miR390a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



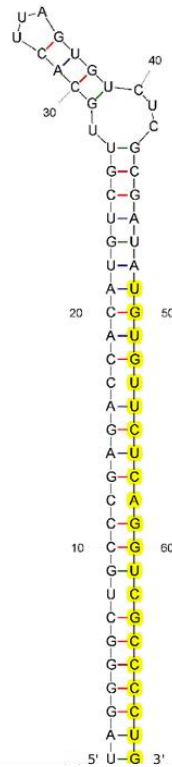
e-miR390a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi v



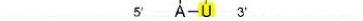
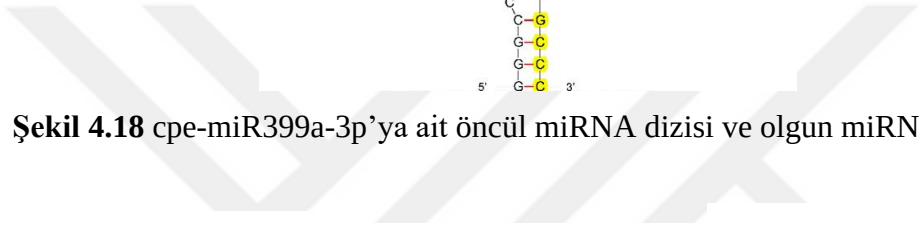
e-miR395a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi v



Şekil 4.16 cpe-miR397a-5p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



Şekil 4.17 cpe-miR398a-3p'ye ait öncül miRNA dizisi ve olgun miRNA bölgesi



4.3 miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi

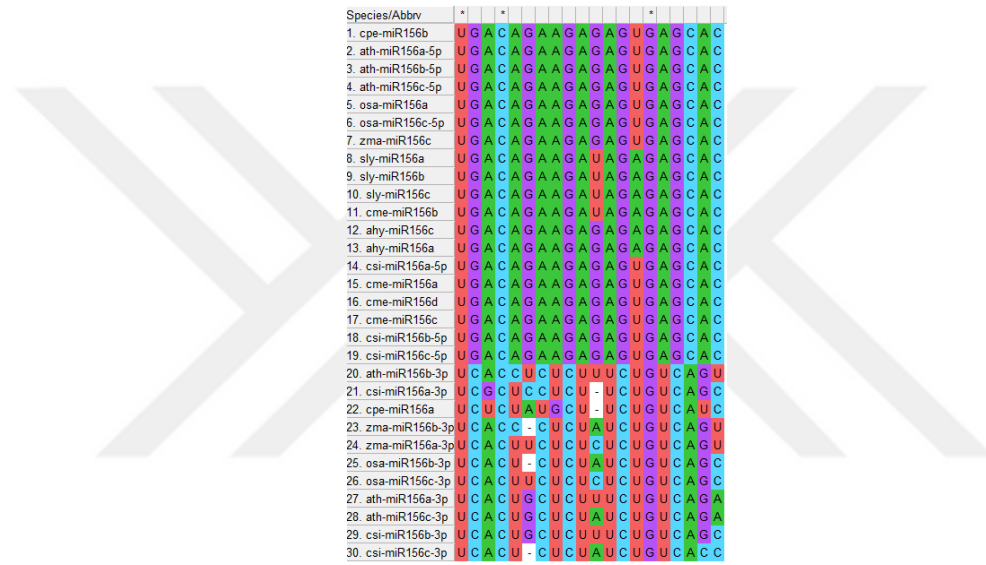
C. pepo genomunda miRNA dizilerinin karakterizasyonu, ikincil yapı tahminleri ve filogenetik analizler aracılığıyla evrimsel benzerliklerin ortaya konulmasının ardından; çalışmanın bir sonraki evresi olan potansiyel hedef genlerin tespiti sürecine odaklanıldı. Bu kapsamda, *C. pepo* türünde tanımlanan dizilere ait potansiyel hedef genler tespit edildi. Hedef genlerin belirlenmesinin ardından, bu genlerin işlevsel rollerini anlamak amacıyla Gene Ontology (GO) analizleri gerçekleştirilmiş ve ilgili genlerin biyolojik süreçler, moleküler fonksiyonlar ve hücresel bileşenlerle ilişkisi ortaya konuldu. Ayrıca, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analizleri ile bu hedef genlerin dahil oldukları metabolik yollar tespit edildi, böylece miRNA'ların potansiyel düzenleyici rollerine dair kapsamlı bir değerlendirme yapıldı.

4.4 miRNA Dizileri Arasındaki Evrimsel İlişkinin Belirlenmesi

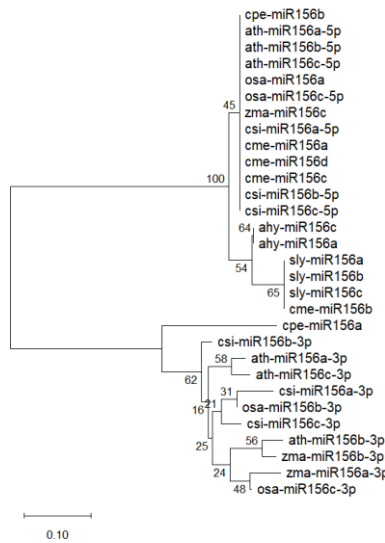
C. pepo türünde tanımlanan farklı miRNA ailelerine ait dizilerin farklı bitki türlerindeki homolog referans dizileri arasında hizalama yapıldı. Hizalama sonucunda aynı ailedeki diziler arasında büyük oranda benzerlikler olduğu görüldü. Farklı türlere ait diziler miRBase [75] üzerinden alınmış ve hizalamalar Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (MSA) yazılımı [78] üzerinden yapılmıştır. Filogenetik ağaç çizimleri ise MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [79] programı yardımıyla yapılmıştır. Hizalama ve filogenetik ağaç çizimleri yapılırken *C. pepo*'ya veri tabanındaki genetik açıdan en yakın tür olan *C. melo* ve diğer referans bitkilere ait diziler kullanılmıştır. Filogenetik ağaç çiziminde görsel sadelik sağlamak amacıyla, aynı miRNA ailesinden yalnızca 1 adet olduğu durumda dizilerin -5p/-3p uzantıları gösterilmemiş, sadece izoform isimleri kullanılmıştır. Filogenetik ağaçlarda "bootstrap" yüzdeleri dalların sol kısmında gösterilmiştir (Şekil 3.20 – Şekil 3.45).

4.4.1 miR156 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

Citrus sinensis (csi), *Zea mays* (zma), *Solanum lycopersicum* (sly), *A. thaliana* (ath), *C. pepo* (cpe), *C. melo* (cme), *Oryza sativa* (osa) bitkilerine ait toplamda 30 adet miRNA156 dizisi analiz edildi ve hizalama sonucunda olgun miRNA dizileri arasında büyük benzerlikler tespit edildi (Şekil 4.20). Ağacın 3 ana dala ayrıldığı belirlendi. Cme-miR156a, cme-miR156d, cme-miR156c ve cpe-miR156b dizilerinin aynı dalda olduğu görüldü. Tezde kullanılan cpe-miR156b-5p dizisinin *O. sativa* (pirinç), *A. thaliana*, *Z. mays* (mısır) ve *C. melo* (kavun) ile yüksek benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.21).



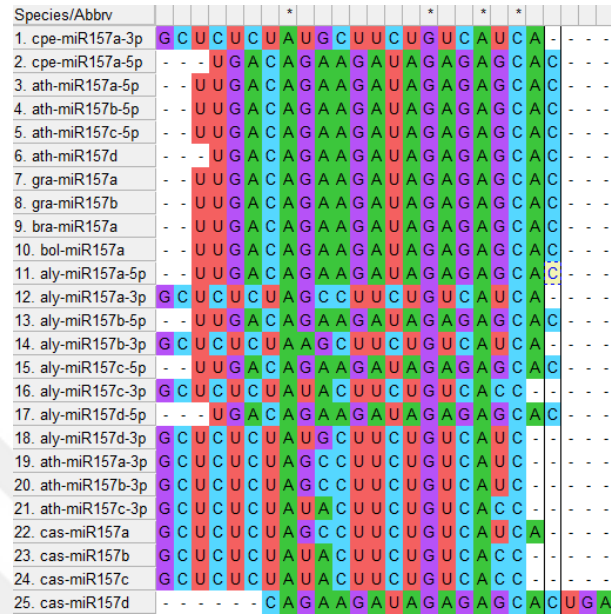
Şekil 4.20 miR156 ailesinin hizalama sonucu



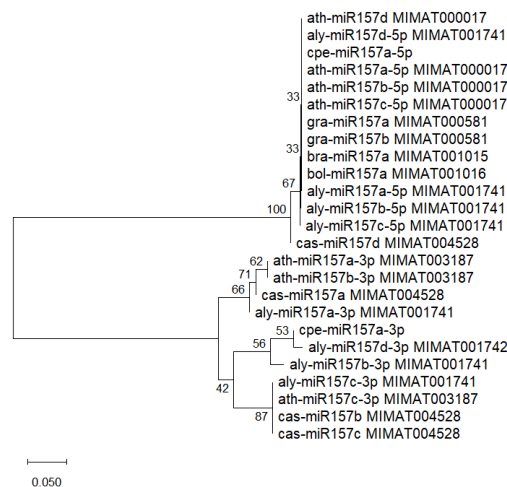
Şekil 4.21 miR156 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.4.2 miR157 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

Bu aileye ait toplam 25 adet dizi hizalandığında farklı ailedeki olgun miRNA dizileri arasında homoloji olduğu belirlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 miR157 ailesinin hizalama sonucu



Şekil 4.23 miR157 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

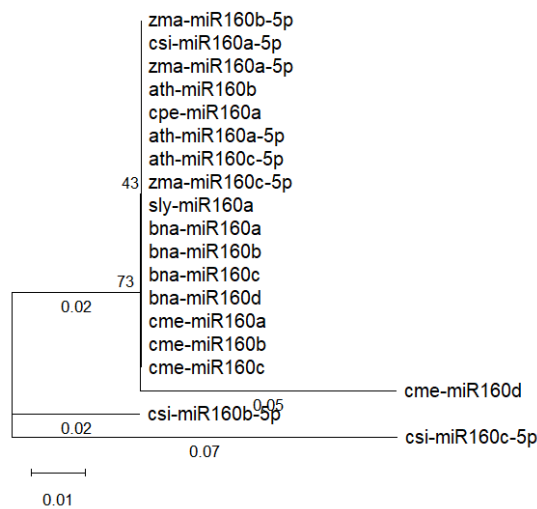
A. thaliana (ath), *Arabidopsis lyrata* (aly), *Brassica rapa* (bra), *Gossypium raimondii* (gra), *Brassica oleracea* (bol), *C. pepo* (cpe), *Camelina sativa* (cas) bitkileri incelendiğinde filogenetik ağaçta dizilerin iki ana dala ayrıldığı görüldü. Tezde kullanılan cpe-miR157a dizisinin *A. thaliana* ve *A. lyrata* bitkileriyle yakın benzerlikte olduğu tespit edildi (Şekil 4.23).

4.4.3 miR160 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

Hizalama analizleri sonucunda diğer miRNA'lara benzer şekilde miRNA dizileri arasında çok yüksek homoloji olduğu tespit edildi (Şekil 4.24). *A. thaliana* (ath), *C. pepo* (cpe), *O. sativa* (osa), *C. sinensis* (csi), *C. melo* (cme), *B. napus* (bna), *Z. mays* (zma) ve *S. lycopersicum* (sly) bitki türlerine ait toplam 19 adet olgun miR160 dizisi analiz edildi. Üç ana dala ayrıldıkları görüldü. Tezde kullanılan cpe-miR160a-5p'nin ise tüm türlere ait dizilerle çok yüksek benzerlikte olduğu tespit edildi (Şekil 4.25).

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1. cpe-miR160a	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
2. ath-miR160a-5p	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
3. ath-miR160b	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
4. ath-miR160c-5p	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
5. zma-miR160a-5p	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
6. zma-miR160c-5p	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
7. zma-miR160b-5p	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
8. sly-miR160a	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
9. csi-miR160a-5p	-	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
10. bna-miR160a	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
11. bna-miR160b	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
12. bna-miR160c	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
13. bna-miR160d	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
14. cme-miR160a	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
15. cme-miR160b	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
16. cme-miR160d	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
17. cme-miR160e	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
18. csi-miR160b	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A
19. csi-miR160c-5p	U	G	C	C	U	G	G	C	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	C	A

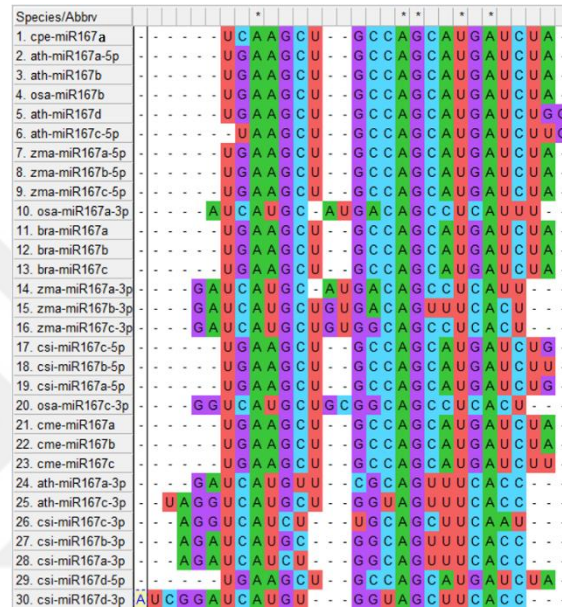
Şekil 4.24 miR160 ailesinin hizalama sonucu



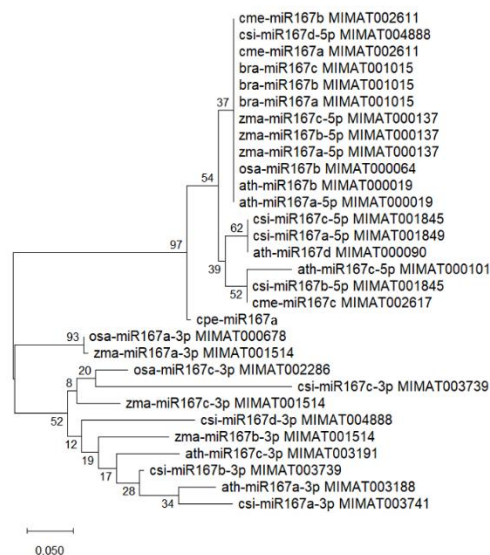
Şekil 4.25 miR160 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.4.5 miR167 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

C. melo (cme), *C. sinensis* (csi), *B. rapa* (bra), *Z. mays* (zma), *O. sativa* (osa), *A. thaliana* (ath) ve *C. pepo* (cpe) bitki türlerine ait toplam 30 adet miRNA167 dizisi analiz edildi (Şekil 4.28). Farklı türlere aile miRNA dizilerinin üç ana dala ayrıldıkları görüldü. Tezde kullanılan cpe-miR167a-5p dizisinin *C. melo* (kavun), *C. sinensis* (csi), *B. rapa* (bra), *Z. mays* (mısır), *A. thaliana* ile yüksek olmamakla birlikte belli düzeyde bir benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.29).



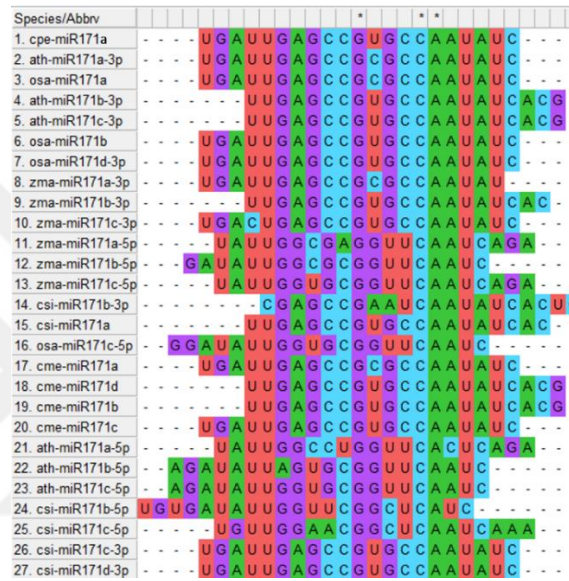
Şekil 4.28 miR167 ailesinin hizalama sonucu



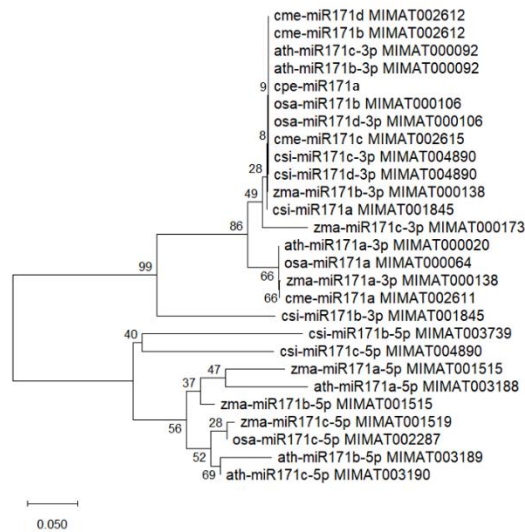
Şekil 4.29 miR167 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.4.7 miR171 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

C. melo (cme), *A. thaliana* (ath), *C. pepo* (cpe), *O. sativa* (osa), *C. sinensis* (csi) ve *Z. mays* (zma) bitki türlerine ait toplam 27 adet olgun miRNA171 dizisi incelendi (Şekil 4.32). Dizilerin dört ana dala ayrıldıkları görüldü. Çalışmada kullanılan cpe-miR171a-3p dizisinin *C. sinensis* (portakal), *O. sativa* (pirinç), *A. thaliana* ve *C. melo* (kavun) türlerine ait dizilerle aynı dalda ve yüksek benzerlikte olduğu tespit edildi (Şekil 4.34).



Şekil 4.32 miR171 ailesinin hizalama sonucu



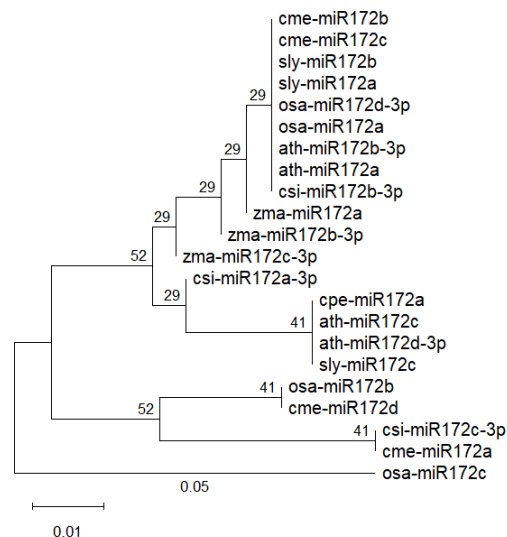
Şekil 4.33 miR171 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.4.8 miR172 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

C. melo (cme), *A. thaliana* (ath), *Z. mays* (zma), *S. lycopersicum* (sly), *C. sinensis* (csi), *O. sativa* (osa) ve *C. pepo* (cpe) bitki türlerine ait toplam 22 adet olgun miRNA172 dizisi hizalandı ve yüksek homoloji gösterdikleri tespit edildi (Şekil 4.34). Dizilerin filogenetik ağaçta iki ana dala ayrıldıkları görüldü. Çalışmada kullanılan cpe-miR172a-3p dizisinin *B. napus* (kanola) bitkisine ait bir diziyle aynı dalda ve yüksek benzerlikte olduğu görüldü (Şekil 4.35).

[illegible]

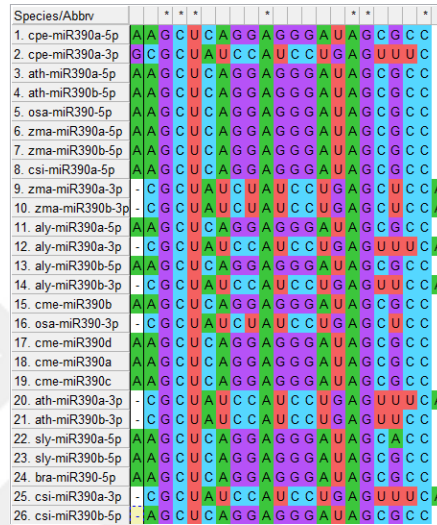
Şekil 4.34 miR172 ailesinin hizalama sonucu



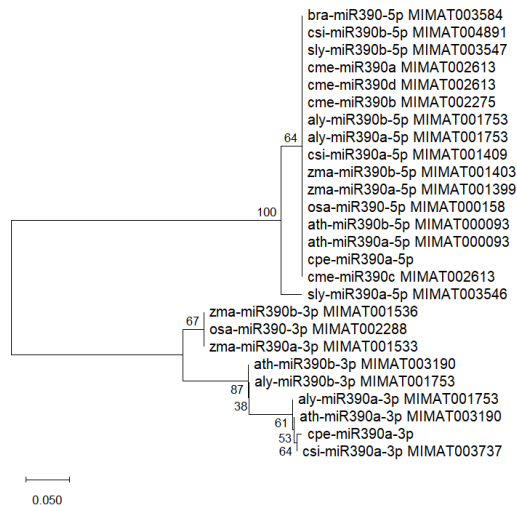
Şekil 4.35 miR172 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.4.9 miR390 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

B. rapa (bra), *C. sinensis* (csi), *S. lycopersicum* (sly), *C. melo* (cme), *A. lyrata* (aly), *Z. mays* (zma), *O. sativa* (osa), *A. thaliana* (ath) ve *C. pepo* (cpe) bitki türlerine ait toplam 25 adet miRNA390 dizisi hizalandı ve incelendi (Şekil 4.35). Toplam 26 dizinin iki ana dala ayrıldıkları görüldü. Çalışmada kullanılan cpe-miR390a-5p dizisinin incelenen tüm türlerle, cpe-miR390a-3p dizisinin ise *C. sinensis* (portakal) türüne ait bir diziyle yüksek benzerliğe sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.37).



Şekil 4.36 miR390 ailesinin hizalama sonucu



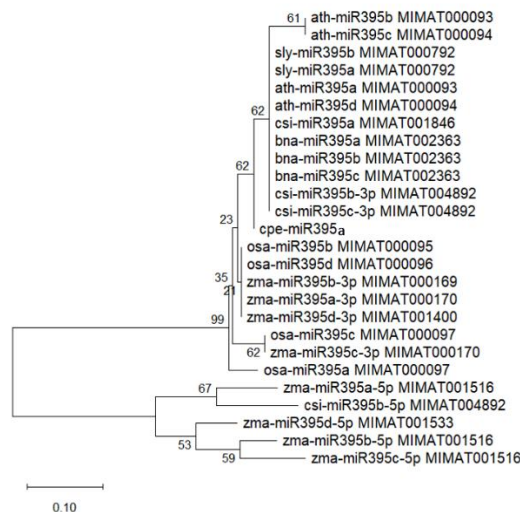
Şekil 4.37 miR390 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.4.10 miR395 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

A. thaliana (ath), *S. lycopersicum* (sly), *C. sinensis* (csi), *Z. mays* (zma), *O. sativa* (osa), *C. pepo* (cpe) ve *B. napus* (bna) bitki türlerine ait toplam 26 adet olgun miRNA395 dizisi hizalandı (Şekil 4.38). Toplam 26 dizinin filogenetik ağaçta iki ana dala ayrıldıkları görüldü. Çalışmada kullanılan cpe-miR395a-3p dizisinin *A. thaliana*, *S. lycopersicum* (domates), *C. sinensis* (portakal) ve *B. napus* (kanola) türlerine ait dizilerle yüksek benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.39).

Species/Abbrv		*										*	*										
1. cpe-miR395a	-	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
2. ath-miR395a	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
3. ath-miR395b	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
4. ath-miR395c	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
5. ath-miR395d	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
6. osa-miR395b	G	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
7. osa-miR395d	G	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
8. osa-miR395c	G	U	G	A	A	G	U	U	U	G	A	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
9. osa-miR395a	G	U	G	A	A	G	U	C	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-		
10. zma-miR395b-3p	G	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
11. zma-miR395c-3p	G	U	G	A	A	G	U	U	U	G	A	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
12. zma-miR395a-3p	G	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
13. sly-miR395a	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	C	-	-		
14. sly-miR395b	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	C	-	-		
15. zma-miR395d-3p	G	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
16. zma-miR395b-5p	-	-	G	U	C	C	C	U	A	C	A	A	G	-	C	A	C	U	C	A	C	A	
17. zma-miR395c-5p	-	-	G	U	C	C	C	U	G	C	A	A	G	-	C	A	C	U	C	A	C	A	
18. zma-miR395a-5p	-	-	G	U	C	C	C	U	C	A	A	A	C	-	C	A	C	U	C	A	C	U	
19. zma-miR395d-5p	-	-	G	U	C	C	U	A	U	G	C	A	A	G	-	C	A	C	U	C	A	C	G
20. csi-miR395a	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
21. bna-miR395a	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
22. bna-miR395b	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
23. bna-miR395c	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
24. csi-miR395b-5p	-	-	G	U	C	C	C	C	U	G	A	A	-	-	C	A	C	U	C	A	U	U	
25. csi-miR395b-3p	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		
26. csi-miR395c-3p	C	U	G	A	A	G	U	U	U	G	G	G	G	A	A	C	U	C	-	-	-		

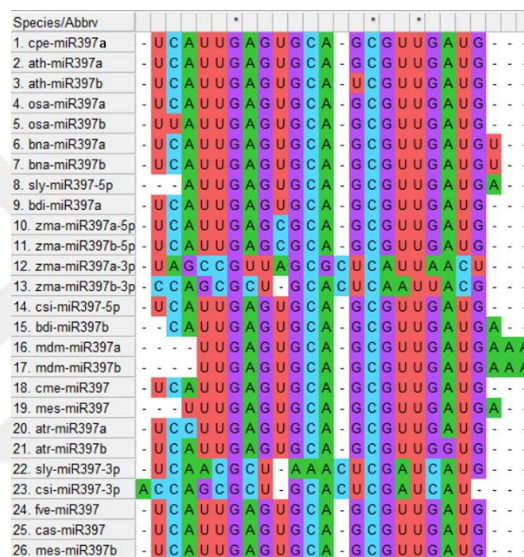
Şekil 4.38 miR395 ailesinin hizalama sonucu



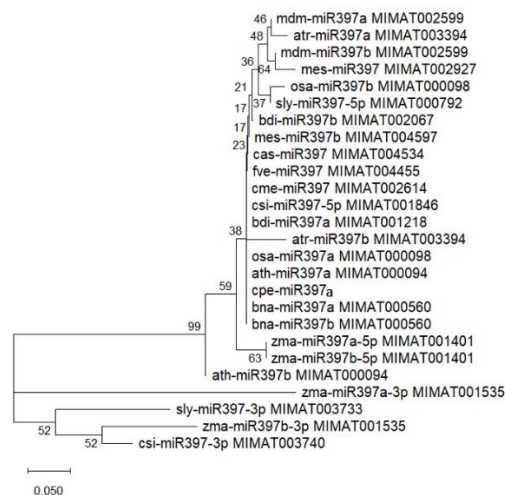
Şekil 4.39 miR395 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.4.11 miR397 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

Malus domestica (mdm), *Medicago sativa* (mes), *O. sativa* (osa), *S. lycopersicum* (sly), *Brachypodium distachyon* (bdi), *C. sativa* (cas), *Fragaria vesca* (fve), *C. melo* (cme), *C. sinensis* (csi), *C. pepo* (cpe), *B. napus* (bna), *Z. mays* (zma) ve *A. thaliana* (ath) bitki türlerine ait toplam 26 adet olgun miRNA397 dizisi incelendi ve hizalandı. Yüksek bir homoloji gösterdikleri görüldü (Şekil 4.40). Filogenetik ağaçta üç ana dala ayrıldıkları görüldü. Çalışmada kullanılan cpe-miR397a-5p dizisi ile *O. sativa* (pirinç), *A. thaliana* ve *B. napus* (kanola) türüne ait dizilerle yüksek dizi benzerliği gösterdiği ve aynı dalda olduğu tespit edildi (Şekil 4.41).



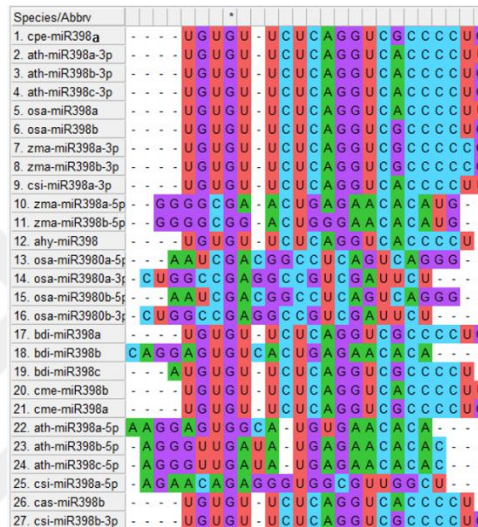
Şekil 4.40 miR397 ailesinin hizalama sonucu



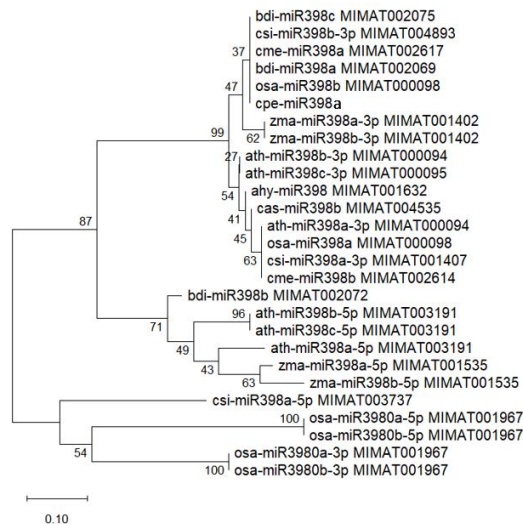
Şekil 4.41 miR397 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.4.12 miR398 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

B. distachyon (bdi), *C. sinensis* (csi), *C. melo* (cme), *C. sativa* (cas), *Z. mays* (zma), *A. thaliana* (ath), *O. sativa* (osa), *C. pepo* (cpe) bitki türlerine ait toplam 27 adet olgun miRNA398 dizisi analiz edildi ve aynı koldan olan dizilerin yüksek homoloji gösterdikleri görüldü (Şekil 4.42). Filogenetik ağaçta iki ana dala ayrıldıkları görüldü. Çalışmada kullanılan cpe-miR398a-3p dizisinin *O. sativa* (pirinç), *B. distachyon*, *C. melo* (kavun) ve *C. sinensis* (portakal) türüne ait dizilerle aynı dalda olduğu ve yüksek benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.43).



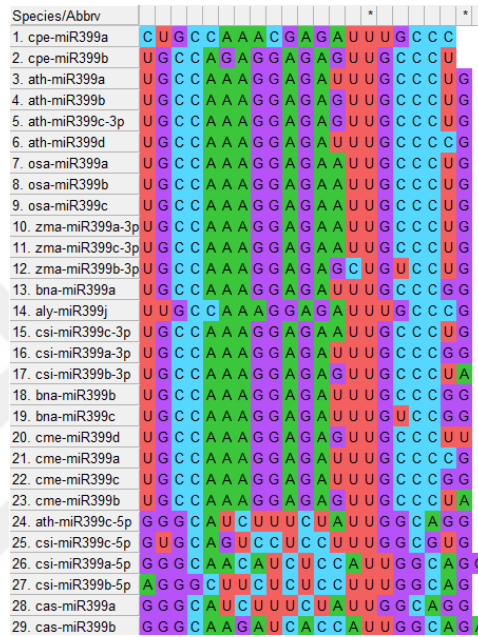
Şekil 4.42 miR398 ailesinin hizalama sonucu



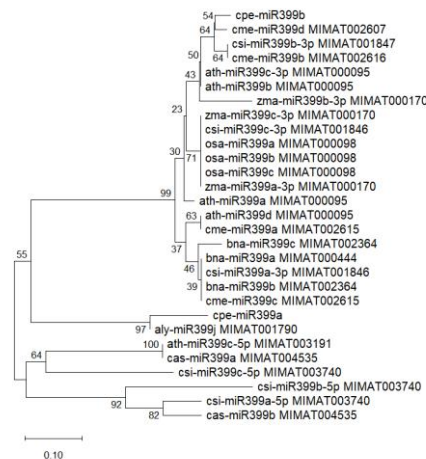
Şekil 4.43 miR398 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.4.13 miR399 Ailesinin Üyeleri Arasındaki Evrimsel İlişki

C. melo (cme), *C. sinensis* (csi), *A. thaliana* (ath), *Z. mays* (zma), *O. sativa* (osa), *B. napus* (bna), *A. lyrata* (aly), *C. sativa* (cas) ve *C. pepo* (cpe) bitki türlerine ait toplam 29 adet miRNA399 dizisi incelendi ve hizalandı, büyük benzerlikler tespit edildi (Şekil 4.44). Filogenetik ağaçta iki ana dala ayrıldıkları görüldü. Çalışmada kullanılan cpe-miR399b-3p dizisinin *C. melo* (kavun) ile, cpe-miR399a-3p dizisinin ise *A. lyrata* ile yüksek dizi benzerliği gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.45).



Şekil 4.44 miR399 ailesinin hizalama sonucu



Şekil 4.45 miR399 ailesinin filogenetik ağaç çizimi

4.5 Bulunan miRNA'ların psRNATarget Sonuçları

Bu bölümde, elde edilen miRNA'ların potansiyel hedef genleri psRNATarget aracı kullanılarak tahmin edilmiştir. psRNATarget, her bir miRNA'nın hedef mRNA üzerindeki bağlanma olasılığını Expectation Score ve bağlanma bölgesinin açılabilirliğini UPE (Unpaired Energy) değerleri ile değerlendirmektedir.

Expectation Score değeri düşük olan (0 – 3) miRNA–hedef çiftleri, bağlanma olasılığı yüksek olarak kabul edilir. UPE değeri ise miRNA'nın hedef bölgeye bağlanabilmesi için gereken enerji miktarını gösterir; düşük UPE değerleri (0-15 kcal/mol) hedef bölgenin daha “açık” ve bağlanmaya elverişli olduğunu gösterir.

Tablolar, bulunan miRNA'lar ve bunların biyotik stresle ilişkili olduğu tahmin edilen hedef genlerini, bağlanma bölgelerini, 'expectation score' ve UPE değerlerini özetlemektedir. Ayrıca, genlerin fonksiyonları ve belirlenen miRNA'ların hedef mRNA'lar üzerindeki post-transkripsiyonel inhibisyon modları da tabloya eklenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 Bulunan miRNA'lara ait psRNATarget verileri

miRNA	Exp. Score	UPE	Hedef Gen ve Bölgesi	Aksesyon Numarası	Fonksiyon	İnhibisyon
cpe-miR156a-3p	3.0	14.06	MELO3C0020 65.2 CDS=1-1806	XM_008458 237	Pectate Lyase-like	Kesim
	3.0	18.81	MELO3C0102 66.2 CDS=429-2114	XM_008445 684.3	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g26790	Kesim
cpe-miR156b-5p	1.0	12.56	MELO3C0261 96.2 CDS=408-1547	XM_008466 192.3	squamosa promoter-binding-like protein 13A	Kesim
	1.0	15.73	MELO3C0223 18.2 CDS=628-1614	XM_008461 629.3	squamosa promoter-binding-like protein 16	Kesim
cpe-miR157a-3p	3.0	24.66	MELO3C0100 64.2 CDS=177-1280	XM_051081 450.1	Zinc Finger CCCH Domain-Containing Protein ZFN-Like	Kesim

Tablo 4.3 Bulunan miRNA'lara ait psRNATarget verileri (devamı)

miRNA	Exp. Score	UPE	Hedef Gen ve Bölgesi	Aksesyon Numarası	Fonksiyon	İnhibisyon
cpe-miR157a-5p	0.0	19.37	MELO3C0148 95.2 CDS=374-1408	XM_008451 896.3	squamosa promoter-binding-like protein 13A	Kesim
	1.0	16.84	MELO3C0161 49.2 CDS=1-1785	XM_008453 564.3	cationic amino acid transporter 8, vacuolar	Kesim
	1.5	14.89	MELO3C0096 39.2 CDS=311-1459	XM_008444 850.3	squamosa promoter-binding-like protein 9	Translasyonel Baskılama
cpe-miR160a-5p	0.0	18.68	MELO3C0198 01.2 CDS=753-2873	XM_008458 263.3	auxin response factor 16-like	Kesim
	0.0	22.91	MELO3C0257 77.2 CDS=672-2822	XM_008465 730.3	auxin response factor 18-like	Kesim
cpe-miR166a-3p	1.0	20.49	MELO3C0244 46.2 CDS=964-3753	XM_008464 215.3	homeobox-leucine zipper protein ATHB-15	Kesim
	1.5	19.65	MELO3C0028 07.2 CDS=814-3348	XM_008446 985.3	homeobox-leucine zipper protein ATHB-14	Kesim
cpe-miR166a-5p	2.5	13.99	MELO3C0305 12.2 CDS=1-1218	XM_051085 265.1	Uncharacterized LOC103500217	Kesim
	2.5	15.08	MELO3C0100 59.2 CDS=3-449	XR_007819 125.1	Protein METHYLENE BLUE SENSITIVITY 1	Kesim

Tablo 4.3 Bulunan miRNA'lara ait psRNATarget verileri (devamı)

miRNA	Exp. Score	UPE	Hedef Gen ve Bölgesi	Aksesyon Numarası	Fonksiyon	İnhibisyon
cpe-miR167a-5p	2.0	21.01	MELO3C0250 70.2 CDS=713-3271	XM_008464 905.2	Auxin Response Factor 8	Kesim
	2.0	22.58	MELO3C0027 71.2 CDS=947-3655	XM_008446 512.3	Auxin Response Factor 6	Kesim
cpe-miR168a-5p	3.0	15.51	MELO3C0269 34.2 CDS=1-1215	XM_023697 772.1	Dihydrofolate Synthetase	Kesim
	3.0	18.90	MELO3C0315 79.2 CDS=118-453	XM_008460 561.3	Pseudo Histidine-Containing Phosphotransfer Protein 5	Kesim
cpe-miR168a-3p	3.0	24.57	MELO3C0129 13.2 CDS=1-4035	XM_008449 225.3	Uncharacterized LOC103489892	Kesim
	3.5	18.00	MELO3C0349 99.2 CDS=1-507	CP136111.1	Isolate PI 511890 chromosome 11	Kesim
cpe-miR171a-3p	0.5	18.33	MELO3C0139 47.2 CDS=2-2308	XM_008450 640.3	scarecrow-like protein 6	Kesim
	1.5	12.55	MELO3C0175 48.2 CDS=1-1602	XM_008455 503.3	scarecrow-like protein 15	Kesim
	0.5	17.50	MELO3C0211 46.2 CDS=412-2676	MW417854.1	GRAS24 protein	Kesim
cpe-miR172a-3p	0.5	10.32	CDS=1-1539	XM_008465 658.3	ethylene-responsive transcription factor RAP2-7	Kesim
	1.5	13.40	MELO3C0142 61.2 CDS=1-1359	XM_008451 062.3	APETALA2-like protein 3	Kesim

Tablo 4.3 Bulunan miRNA'lara ait psRNATarget verileri (devamı)

miRNA	Exp. Score	UPE	Hedef Gen ve Bölgesi	Aksesyon Numarası	Fonksiyon	İnhibisyon
cpe-miR390a-5p	2.5	15.67	MELO3C0250 88.2 CDS=270-3122	XM_023693 954.1	Receptor protein kinase TMK1	Kesim
	3.0	16.10	MELO3C0138 72.2 CDS=217-2124	CP136112.1	Isolate PI 511890 chromosome 9	Translasyonel Baskılama
cpe-miR390a-3p	3.5	18.04	MELO3C0142 66.2 CDS=1-666	CP136110.1	Isolate PI 511890 chromosome 5	Kesim
	3.5	23.20	MELO3C0244 35.2 CDS=521-2815	XM_023658 368.1	nuclear poly(A) polymerase 4-like	Kesim
cpe-miR395a-3p	1.0	19.79	MELO3C0142 80.2 CDS=50-1453	XM_008451 088.3	ATP sulfurylase 1, chloroplastic	Kesim
	1.5	8.72	MELO3C0228 02.2 CDS=92-1222	XM_008462 265.3	low affinity sulfate transporter 3	Kesim
cpe-miR397a-5p	0.5	20.42	MELO3C0032 28.2 CDS=358-2028	XM_008450 958.3	Laccase-4-Like	Kesim
	1.5	11.89	MELO3C0142 34.2 CDS=32-1723	XM_008451 024.2	Laccase-11	Kesim
	1.5	7.93	MELO3C0092 50.2 CDS=1-1755	XM_008444 310.3	laccase-17-like	Kesim
cpe-miR398a-3p	1.5	17.14	MELO3C0044 54.2 CDS=130-810	XM_008458 647.3	Cupredoxin-like protein	Kesim
	2.5	23.59	MELO3C0044 55.2 CDS=87-1109	XM_008458 657.3	Uclacyanin-3-Like	Kesim
cpe-miR399a-3p	2.5	12.69	MELO3C0072 83.2 CDS=1314-4049	XM_008441 632.3	Probable Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 24	Kesim

Tablo 4.3 Bulunan miRNA'lara ait psRNATarget verileri (devamı)

miRNA	Exp. Score	UPE	Hedef Gen ve Bölgesi	Aksesyon Numarası	Fonksiyon	İnhibisyon
cpe-miR399b-3p	2.0	17.79	MELO3C0269 68.2 CDS=115-687	XM_008467 221.3	Suppressor Protein SRP40	Kesim
	2.0	12.10	MELO3C0072 83.2 CDS=1314-4049	XM_008441 632.3	Probable Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 24	Kesim
	2.5	13.60	MELO3C0187 19.2 CDS=75-1019	XM_008457 075.2	Peroxidase P7-Like	Kesim

4.6 Hedef Genlerin GO ve KEGG Analizleri

C. pepo bitkisinde tanımlanan 19 miRNA'nın, biyotik stresle ilişkili 40 farklı hedef genin düzenlenmesinde rol oynadığı belirlendi (Tablo 4.2). Birçok miRNA dizisinde bir miRNA dizisinin birden fazla mRNA ile bağlantılı olduğu tespit edildi.

Aşağıda, her bir miRNA için tespit edilen hedef genlerine ait GO analizleri yer almaktadır (Şekil 4.46 - 4.56). (miR168 ve miR390 dizilerine ait yeterince veri seti olmadığından, yani hedef genlerin veritabanlarında yeterince bilgi bulunmadığından GO analizi yapılamamıştır.)

miR156 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçler kısmında %31'inin transkripsiyonla, %21'inin metabolik süreçlerle, %16'sının gelişimsel süreçlerle, %12'sinin fotosentez ve pigment ilişkili süreçlerle, %8'inin hücresel taşımayla, %5'inin hücresel yapı ve hücre iskeletinin düzenlenmesiyle, %4'ünün savunma ve stres yanıtıyla, %3'ünün ise belirsiz biyolojik süreçlerle ilgili olduğu görüldü. Moleküler fonksiyonlar (MF) kısmında; %40'ının taşıyıcı aktivitesiyle, %30'unun bağlama aktivitesiyle, %30'unun ise enzim aktivitesiyle bağlantılı olduğu saptandı. Hücresel bileşenler (CC) kısmında ise; %22,5 çekirdek ile, %22,5 sitoplazmayla, %16 kloroplast ve plastid ile, %11 hücre zarı ve taşıma sistemiyle, %6 mitokondriyle, %6 hücre iskeletiyle, %9 hücre dışı bölgeyle, %6'nın ise bilinmeyen bileşenlerle ilgili olduğu belirlendi (Şekil 4.46).

miR157 için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçler kısmında %59'unun DNA RNA işlemleriyle, %17'sinin protein işlemeyle, %8'inin hücresel taşımayla,

%8'inin hücre yaşamı ve ölümüyle, %8'inin ise hücrel savunmayla bağlantılı olduğu görüldü. Moleküler fonksiyonlar kısmında %25'inin DNA bağlama ve transkripsiyon aktivitesiyle, %16'sının RNA bağlama ve metabolizmayla, %25'inin histon ve kromatin bağlamayla, %16'sının protein işleme ve proteaz aktivitesiyle, %8'inin moleküler taşıma aktivitesiyle, %8'inin ise savunma ve reseptör aktivitesiyle ilişkili olduğu tespit edildi. Hücrel bileşenlerle ilgili kısmında ise %75'inin çekirdekle, %16,7'sinin sitoplazmayla, %8,3 nükleus ve sitoplazma taşınmasıyla, %8,3'ünün ise savunmayla ilişkili olduğu gözlemlendi (Şekil 4.47).

miR160 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçlerle ilgili kısmında %18,2'sinin transkripsiyonla, %40,9'unun metabolizmayla, %6,1 protein işleme ve düzenlemeyle, %4,5'inin hücrel düzenle, %25,8 hücre farklılaşmasıyla, %7,6 taşımayla, %12,1'inin ise stres ve tepkiyle ilişkili olduğu görülmüştür. Moleküler fonksiyonlar kısmında %18,2 DNA bağlamayla, %6,1 RNA bağlamayla, %40,9 enzim aktivitesiyle, %7,6 protein işlemeyle, %7,6 taşımayla, %4,5 sitoskeletonla, %12,1 antioksidan ve metal bağlamayla, %1,5 ise sinyal ve reseptör aktivitesiyle ilişkili olduğu görülmüştür. Hücrel bileşenler kısmında ise %16,7 çekirdekle, %36,4 sitoplazmayla, %7,6 mitokondriyle, %4,5 ER ile, %9,1 hücre zarıyla, %3 sitoskeletonla, %12,1 stres ve redoksle, %11'inin ise protein kompleksiyle ilişkili olduğu tespit edildi (Şekil 4.48).

miR166 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçlerle ilgili kısmında %18,6'sının cevap ve adaptasyon süreçleriyle, %23,3'ünün metabolik süreçlerle, %9,3'ünün biyosentetik süreçlerle, %7'sinin transkripsiyonel düzenlemeyle, %4,7'sinin protein modifikasyonu, %9,3'ünün organizasyon ve gelişimsel süreçlerle, %4,7'sinin apoptoz ile, %6,8'inin ise diğer spesifik süreçlerle ilişkili olduğu görüldü. Moleküler fonksiyonlarla ilgili olarak da; %30,2'nin katalitik aktiviteyle, %25,6'sının bağlama aktivitesiyle, %16,3'ünün transkripsiyonel faktör aktivitesiyle, %7'sinin taşıma ve iyon kanallarıyla, %4,7'sinin reseptör aktivitesiyle, %9,3'ünün protein modifikasyonu, %7'sinin ise diğer süreçlerle ilgili olduğu görüldü. Hücrel bileşenlerle ilgili ise; %10,9'unun organellerle, %6,5'inin hücre duvarı ve yapısıyla, %4,3'ünün vezikül ve membran ile, %39,2'nin çekirdekle, %39,1'inin sitoplazmayla ilgili olduğu belirlendi (Şekil 4.49).

miR167 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçlerle ilgili kısmında %50'sinin transkripsiyon ve düzenlemeyle, %50'sinin ise gelişimsel süreçlerle ilgili olduğu görüldü. Moleküler fonksiyonlarla ilgili kısmında %50'sinin DNA bağlamayla, %25'inin sinyal iletim aktivitesiyle, %25'inin ise gelişimsel süreç ilişkili fonksiyonlarla ilgili olduğu görüldü. Hücresel bileşenlerle ilgili kısmında %50'sinin çekirdek ve %50'sinin de sitoplazma ilişkili bileşenlerle ilgili olduğu belirlendi (Şekil 4.50).

miR171 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçlerle ilgili kısmında %17,9'unun hücre bölünmesiyle, %10,7'sinin hücre morfogenez ile, %42,9'unun taşıma ve iyon homeostazıyla, %7,1'inin organel organizasyonu, %10,7'sinin adaptasyon ve hücresel cevaplarla, %10,7'sinin protein modifikasyonu ile ilgili olduğu görüldü. Moleküler fonksiyonlarla ilgili kısmında %21,4'ünün katalitik aktiviteyle, %35,7'sinin taşıma ve iyon bağlamayla, %21,4'ünün yapı ve morfogenezle, %21,4'ünün de düzenleyici ve sinyal aktivitesiyle ilgili olduğu görüldü. Hücresel bileşenlerle ilgili olan kısmında ise %17,9'unun çekirdekle, %17,9'unun sitoplazmayla, %14,3'ünün organel ve organel parçalarıyla, %25'inin membran ve taşıma yapılarıyla, %25'inin ise diğer belirlenemeyen bileşenlerle ilgili olduğu belirlendi (Şekil 4.51).

miR172 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçlerle ilgili kısmında %18'inin hücresel süreçlerle, %12,5'inin transkripsiyon ve gen regülasyonu, %10'unun protein modifikasyonu, %22'sinin metabolik süreçlerle, %10'unun taşıma ve iyon homeostazıyla, %8'inin hücresel yapı organizasyonu, %8,5'inin hormon ve sinyal iletimiyle, %11'inin ise stres yanıtlarıyla ilişkili olduğu görülmüştür. Moleküler fonksiyonlarla ilgili kısmında ise %28'inin katalitik aktiviteyle, %16'sının taşıma ve bağlanma aktivitesiyle, %18,5'inin düzenleyici ve sinyal iletimiyle, %10'unun yapı ve protein kompleksleriyle ilişkili bağlamayla, %27,5'inin ise adaptasyonla ilişkili bağlamayla bağlantılı olduğu görülmüştür. Hücresel bileşenlerle ilgili olan kısmında ise %18,5'inin çekirdekle, %32,6'sının sitoplazmayla, %22,3'ünün organel ve organel parçalarıyla, %26,6'sının membran ve taşıma yapılarıyla ilişkili olduğu belirlendi (Şekil 4.52).

miR395 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçlerle ilgili kısmında %50'sinin protein ve RNA işlemleriyle, %16,7'sinin transkripsiyon ve regülasyonla, %16,7'sinin iyon ve molekül taşınımıyla, %16,7'sinin ise metabolik

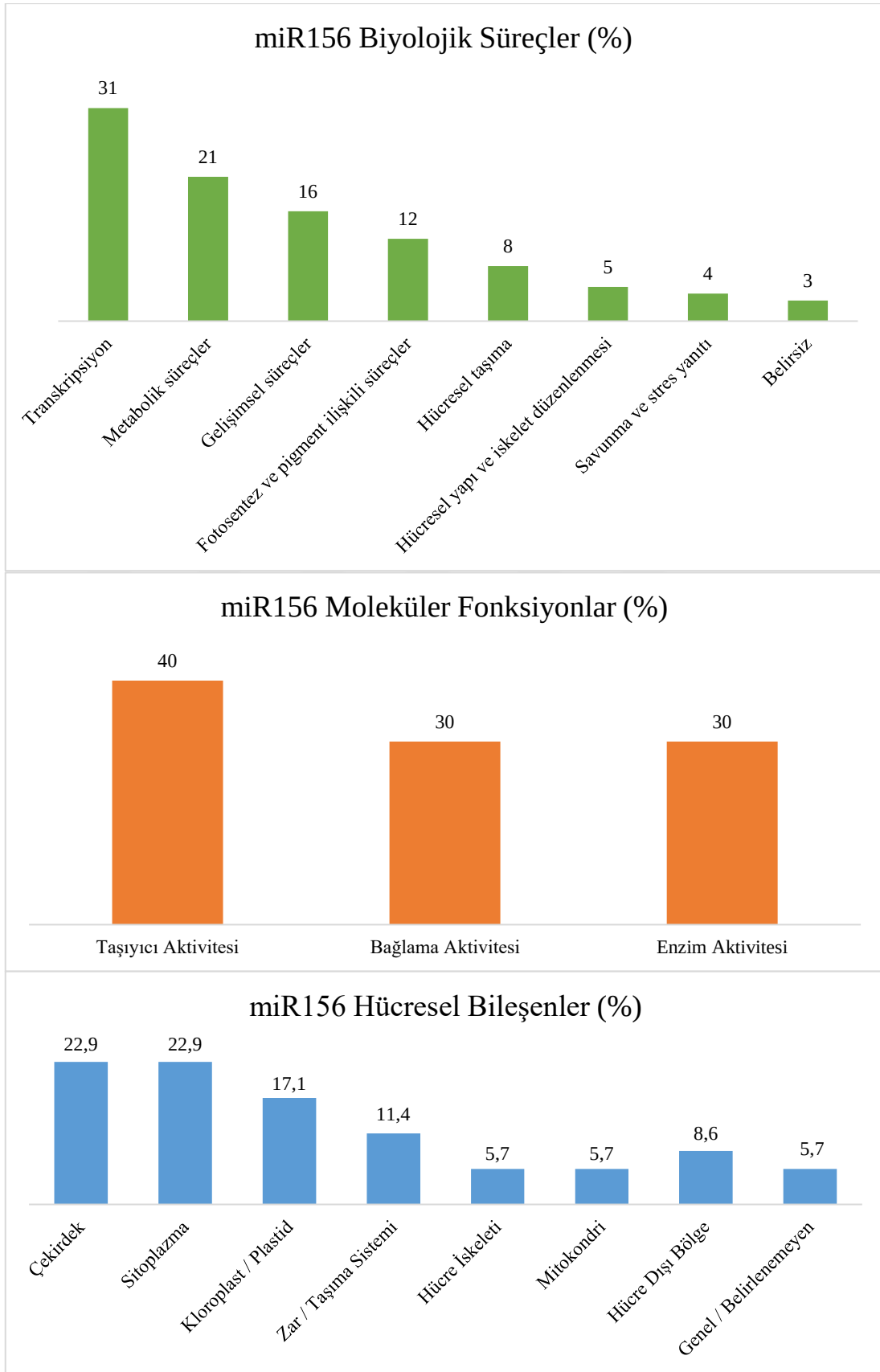
ve biyosentezle ilgili olduğu görülmüştür. Moleküler fonksiyonlarla ilgili kısmında %50'sinin katalitik aktiviteyle, %16,7'sinin DNA ve RNA bağlamayla, %16,7'sinin ribozom ve yapısal fonksiyonla, %16,7'sinin ise iyon ve taşıyıcı aktiviteyle ilgili olduğu görülmüştür. Hücresel bileşenlerle ilgili kısmında %42,9'unun sitoplazmayla, %14,3'ünün çekirdekle, %14,3'ünün ise plazma membranıyla ilişkili olduğu belirlendi (Şekil 4.53).

miR397 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçlerle ilgili olan kısmında %33,3'ünün metabolik süreçlerle, %33,3'ünün stres yanıtıyla, %22,2'sinin gen ekspresyonuyla, %11,1'inin ise translasyon ve ribozomal kalite kontrolüyle ilişkili olduğu görüldü. Moleküler fonksiyonlarla ilgili olan kısmında %55,6'sının enzimatik aktivitelerle, %11,1'inin transkripsiyon faktörü aktivitesiyle, %11,1'inin şaperon aktivitesiyle, %11,1'inin GTPaz aktivitesiyle, %11,1'inin ise metal iyon bağlamayla ilgili olduğu görülmüştür. Hücresel bileşenlerle ilgili olan kısmında ise %33,3'ünün sitoplazmayla, %22,2'sinin mitokondriyle, %11,1'inin kloroplastla, %11,1'inin çekirdekle, %11,1'inin ise endomembran sistemiyle ilgili olduğu tespit edildi (Şekil 4.54).

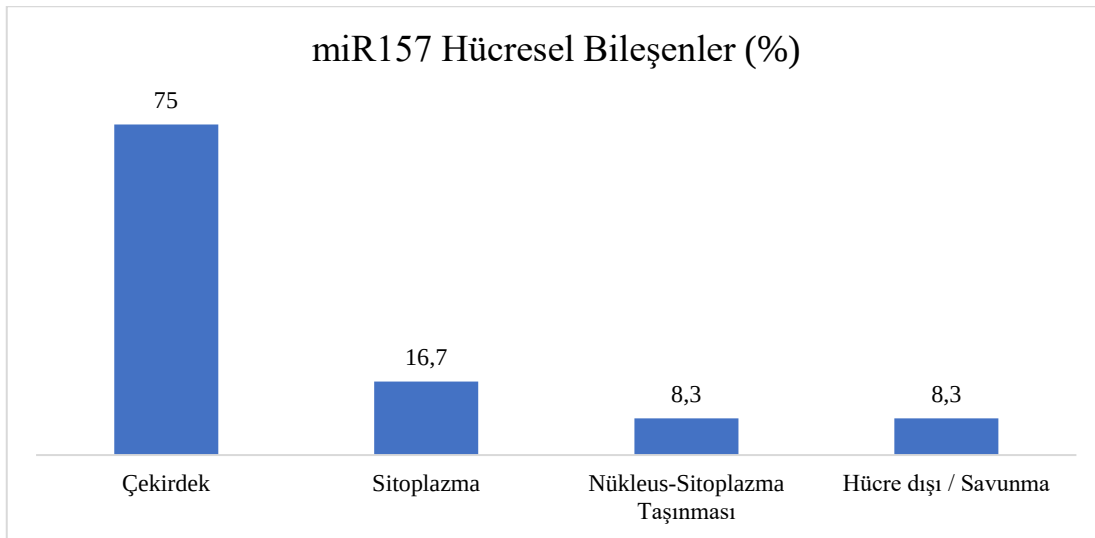
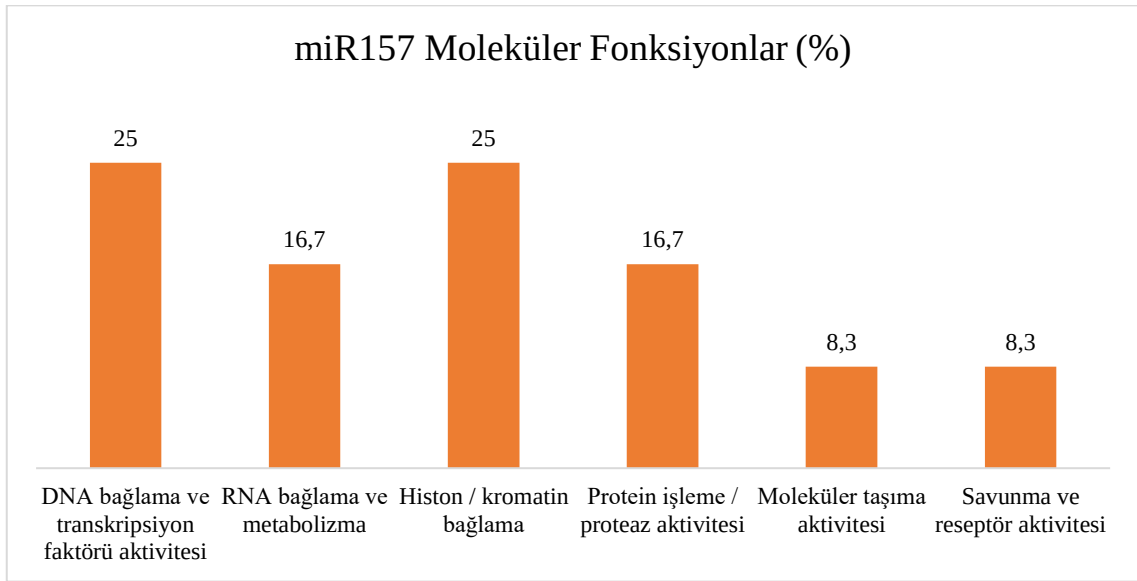
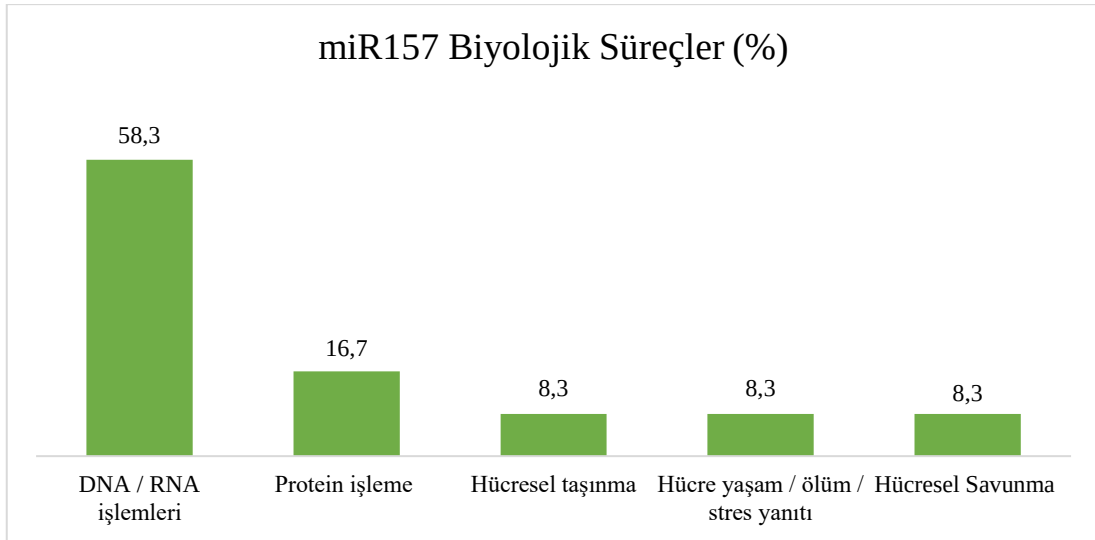
miR398 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçlerle ilgili olan kısmında %20'sinin transkripsiyonla, %18'inin stres ve çevresel yanıtlarla, %16'sının metabolik ve redoks süreçleriyle, %10'unun protein modifikasyonu, %8'inin DNA tamiriyle, %8'inin fotosentez ve kloroplast organizasyonu, %7'sinin hücre farklılaşmasıyla, %6'sının taşıma süreçleriyle, %5'inin savunma yanıtlarıyla, %2'sinin ise diğer özel düzenleyici süreçlerle ilişkili olduğu görüldü. Moleküler fonksiyonlarla ilgili olan kısmında %22'sinin DNA ve RNA bağlamayla, %20'sinin enzimatik aktiviteyle, %10'unun protein katlanmasıyla, %10'unun taşıyıcı ve taşıma aktivitesiyle, %9'unun sinyal ve reseptör aktivitesiyle, %9'unun protein bağlanmasıyla, %8'inin elektron taşıma aktivitesiyle, %7'sinin iyon bağlanmasıyla, %5'inin ise diğer düzenleyici aktivitelerle ilişkili olduğu görüldü. Hücresel bileşenlerle ilgili olan kısmında ise %23'ünün çekirdekle, %18'inin sitoplazmayla, %10'unun mitokondriyle, %9'unun kloroplast ile, %8'inin ER ve golgiyle, %6'sının plazma zarıyla, %5'inin ribozomla, %4'ünün peroksizomla, %17'sinin ile belirsiz diğer parçalarla ilgili olduğu belirlendi (Şekil 4.55).

miR399 dizisi için yapılan GO analizlerinde; biyolojik süreçlerle ilgili olan kısımda %24'ünün hücresel ve gelişimsel süreçlerle, %9'unun transkripsiyonla, %35'inin metabolik süreçlerle, %12'sinin taşıma ve protein işlemeyle, %7'sinin sitoskeletonla, %13'ünün ise savunmayla ilgili olduğu görüldü. Moleküler fonksiyonlarla ilgili olan kısımda %76,5'inin katalitik aktiviteyle, %23,5'inin ise bağlanma ve taşıma aktivitesiyle ilgili olduğu görüldü. Hücresel bileşenlerle ilgili olan kısımda ise %20'sinin hücre duvarıyla, %60'ının protein taşıma ve membran ile, %20'sinin ise yapısal organizasyonla ilgili olduğu tespit edildi (Şekil 4.56).

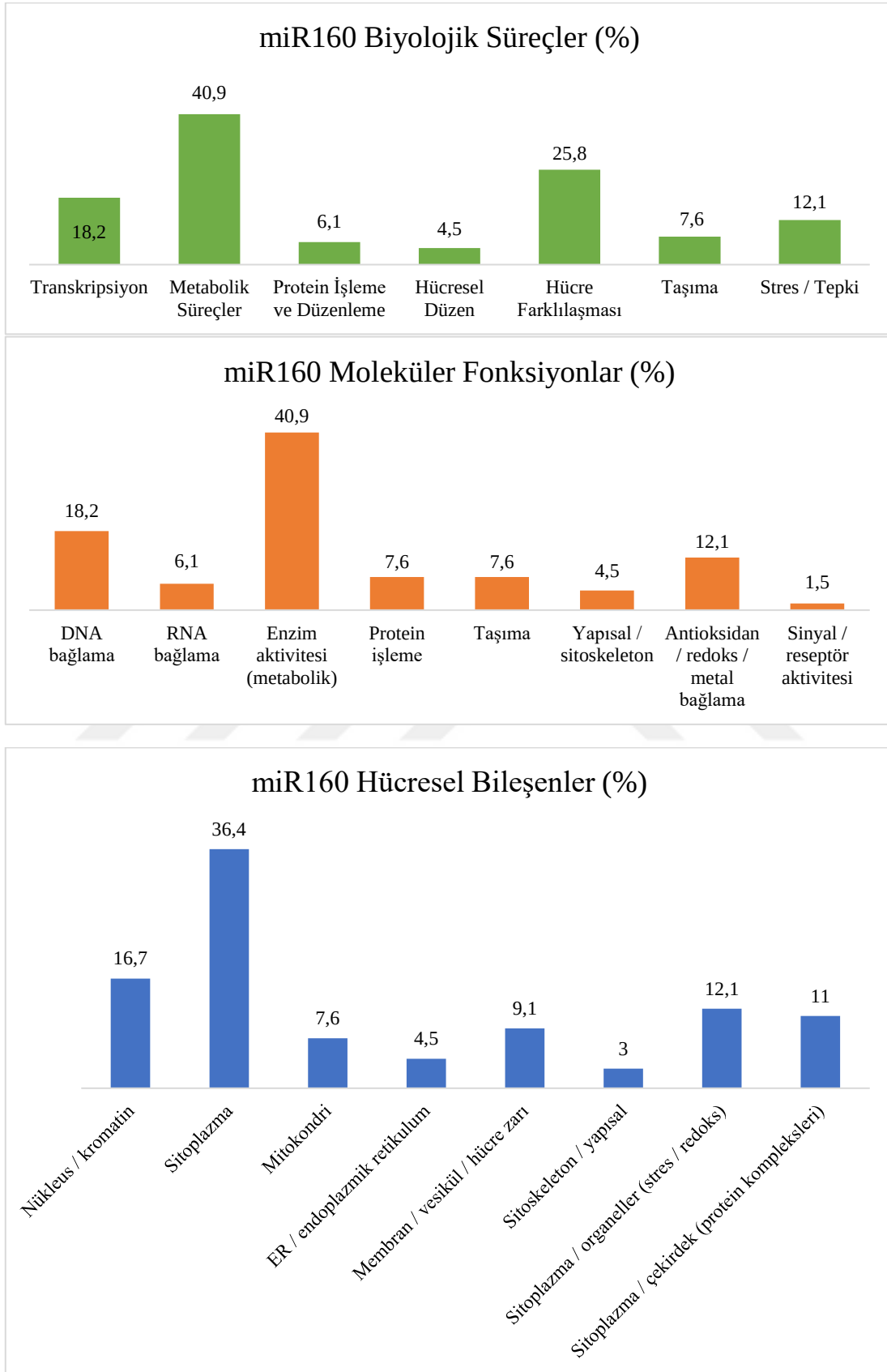




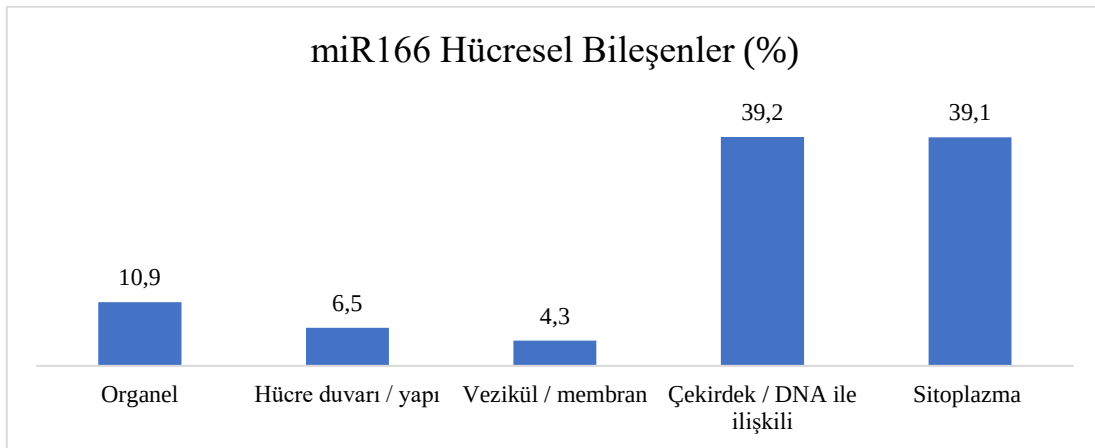
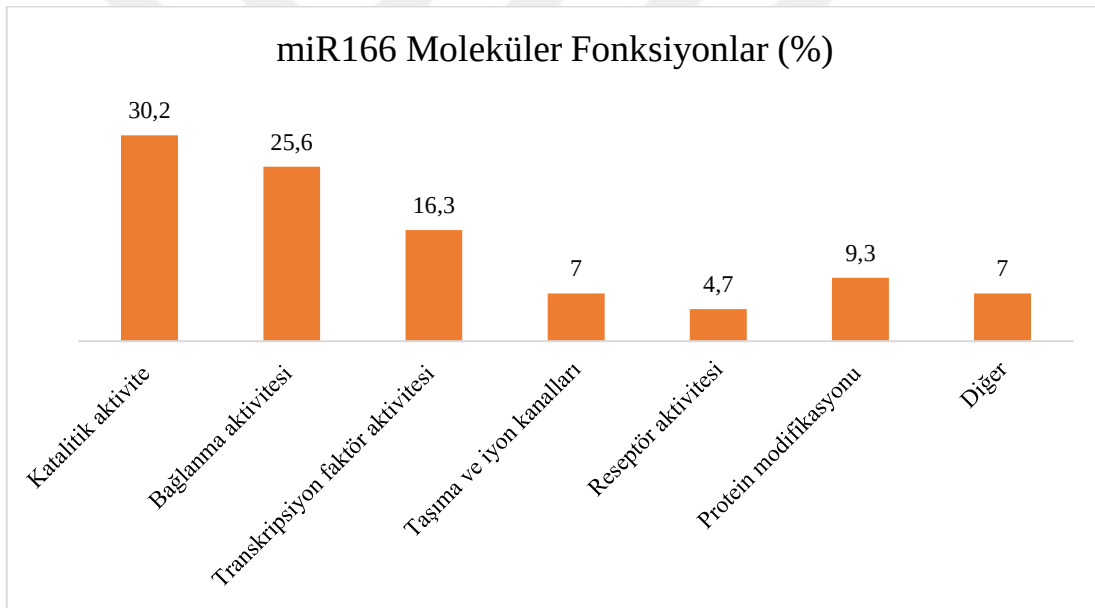
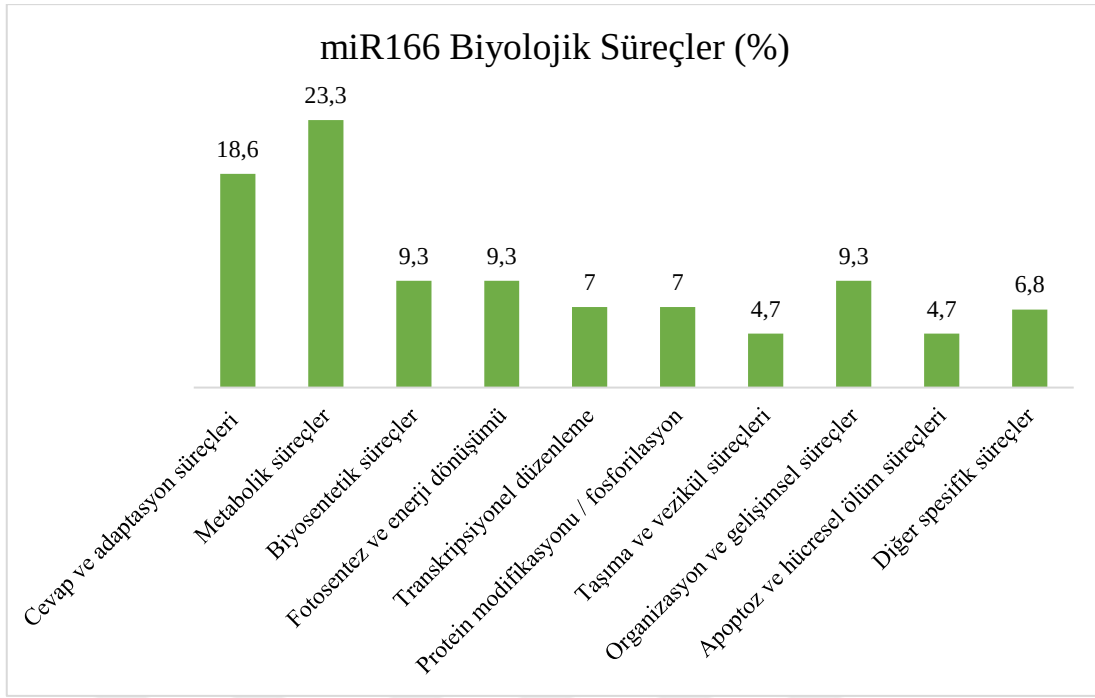
Şekil 4.46 miR156'nın hedeflediği genlerin GO analizleri



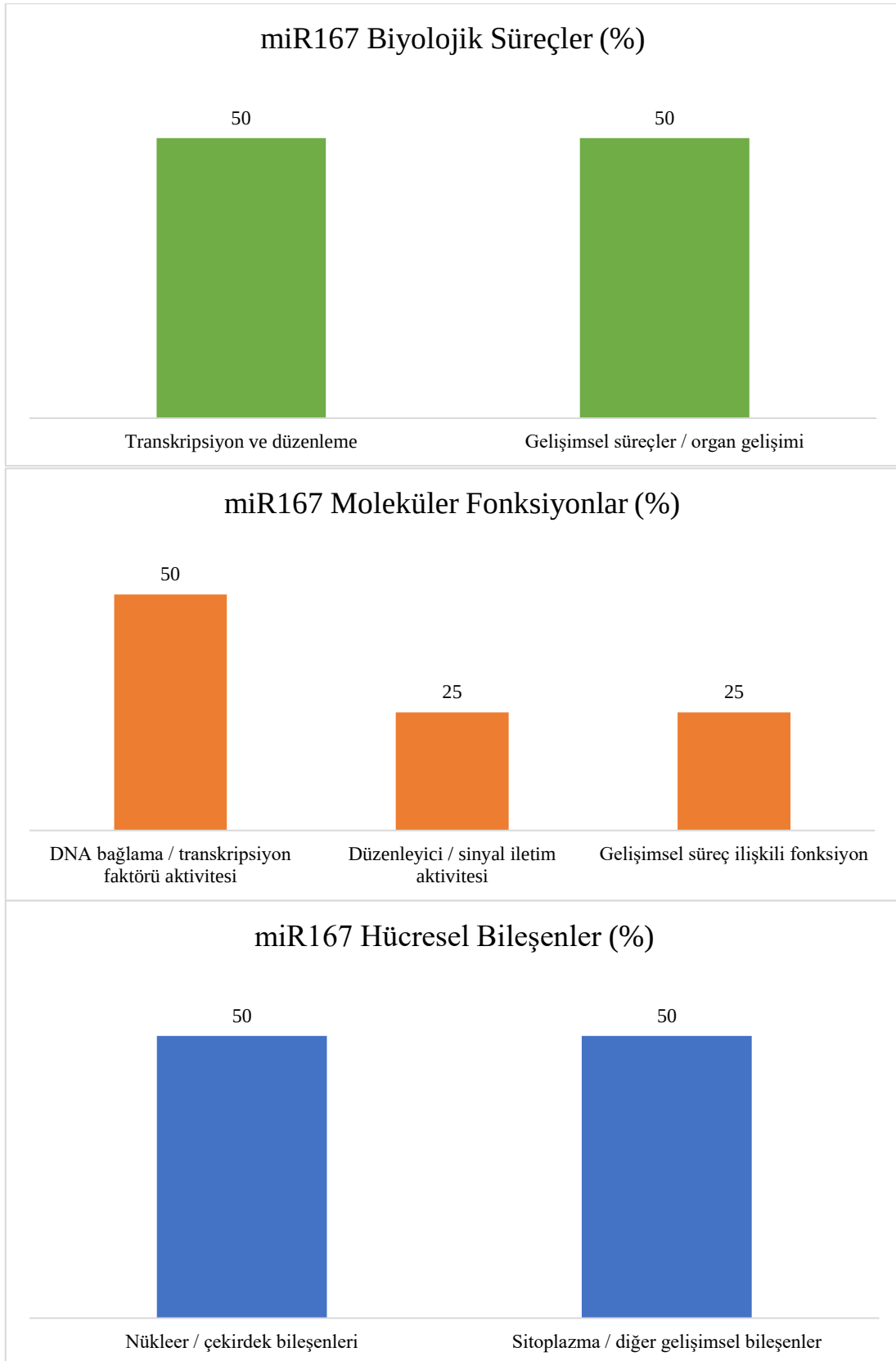
Şekil 4.47 miR157'nin hedeflediği genlerin GO analizleri



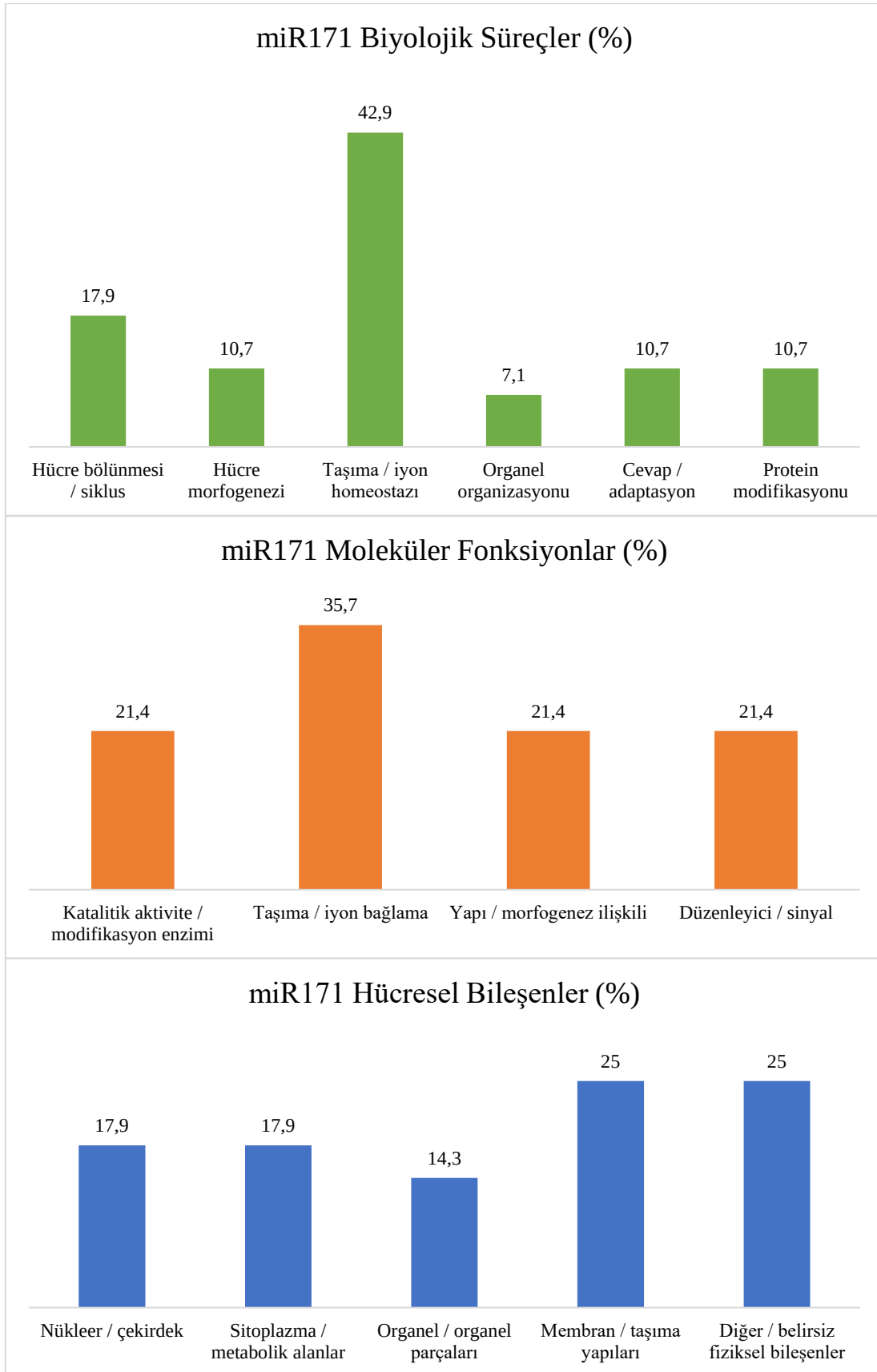
Şekil 4.48 miR160'ın hedeflediği genlerin GO analizleri



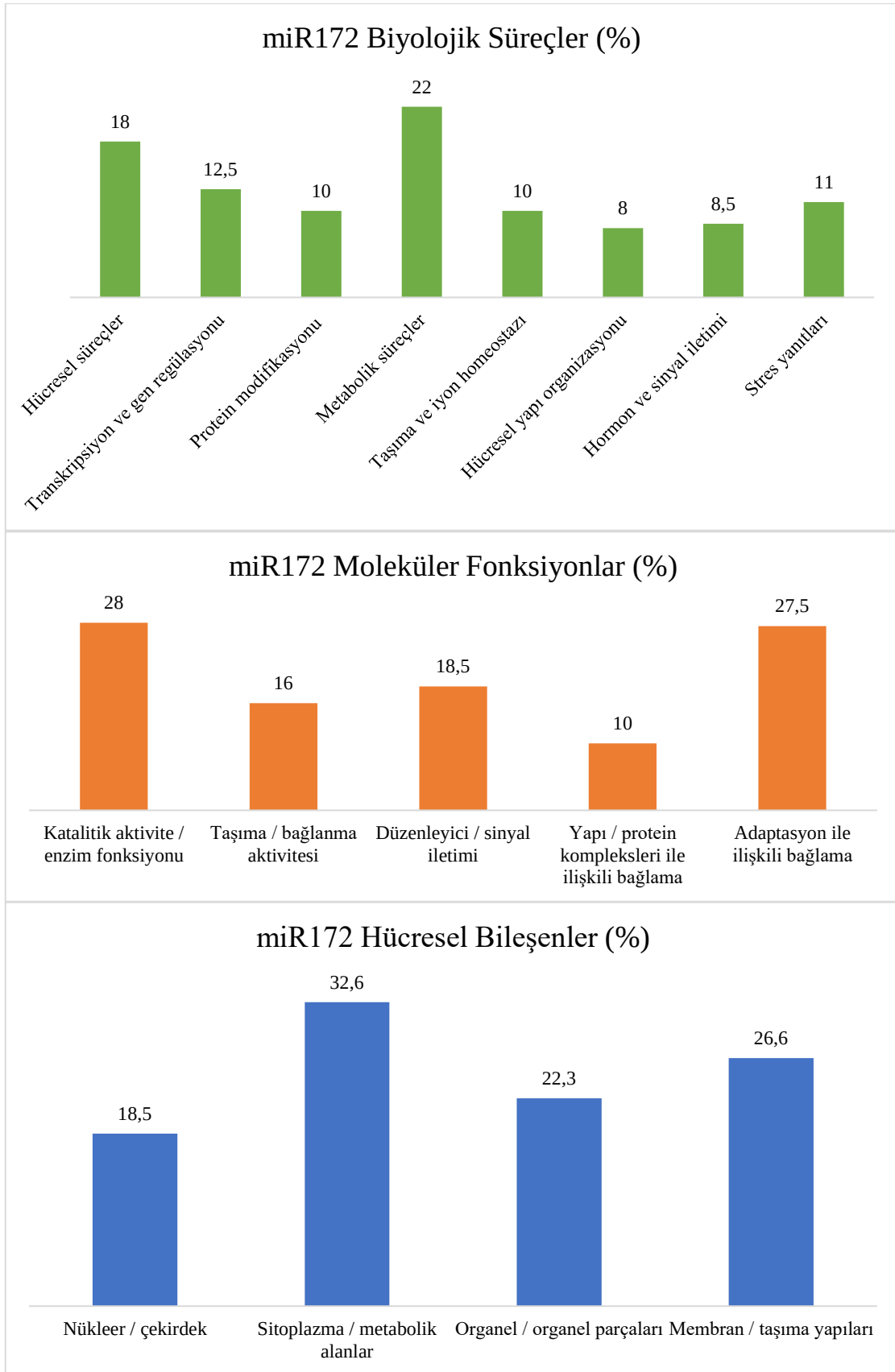
Şekil 4.49 miR166'nın hedeflediği genlerin GO analizleri



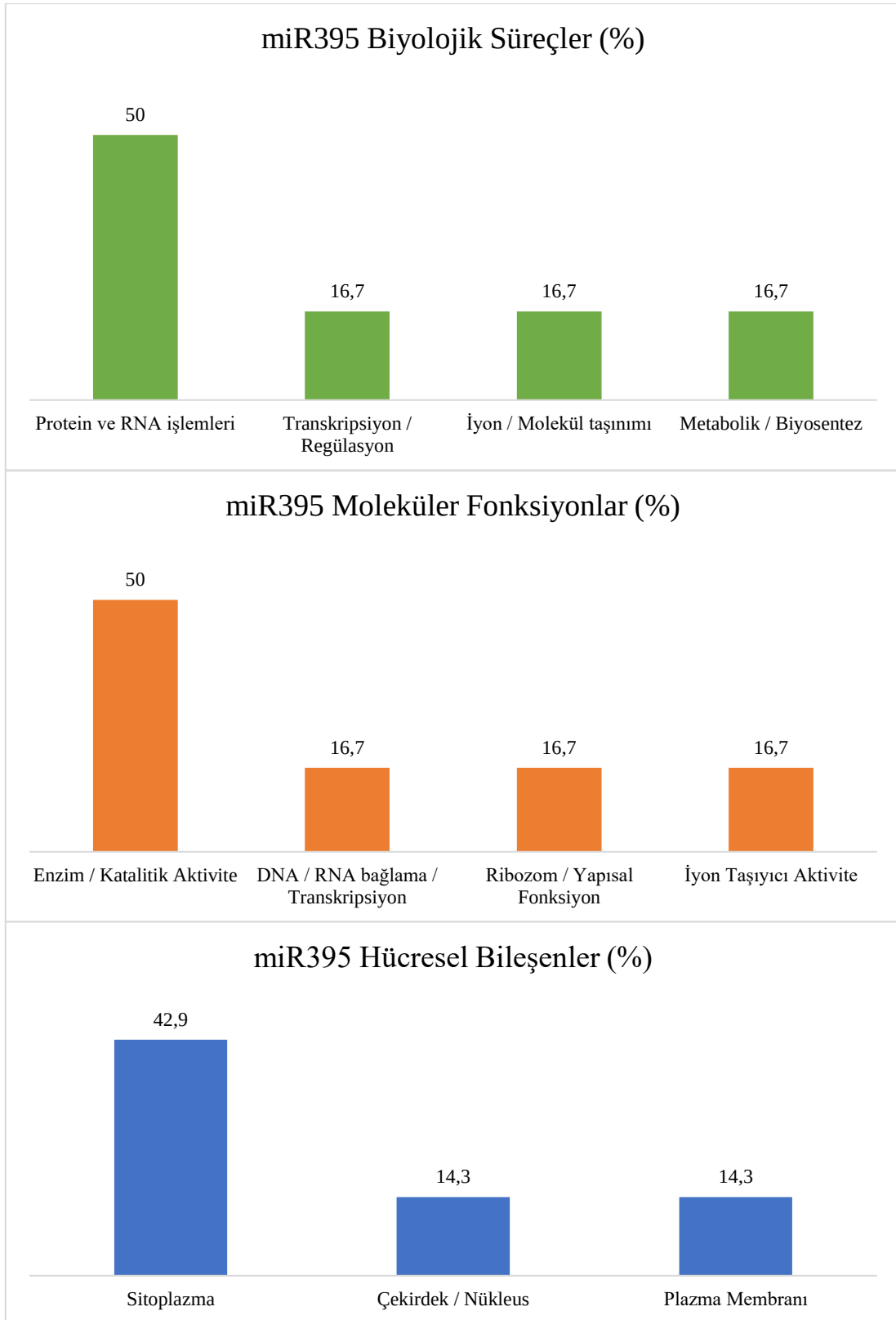
Şekil 4.50 miR167’nin hedeflediği genlerin GO analizleri



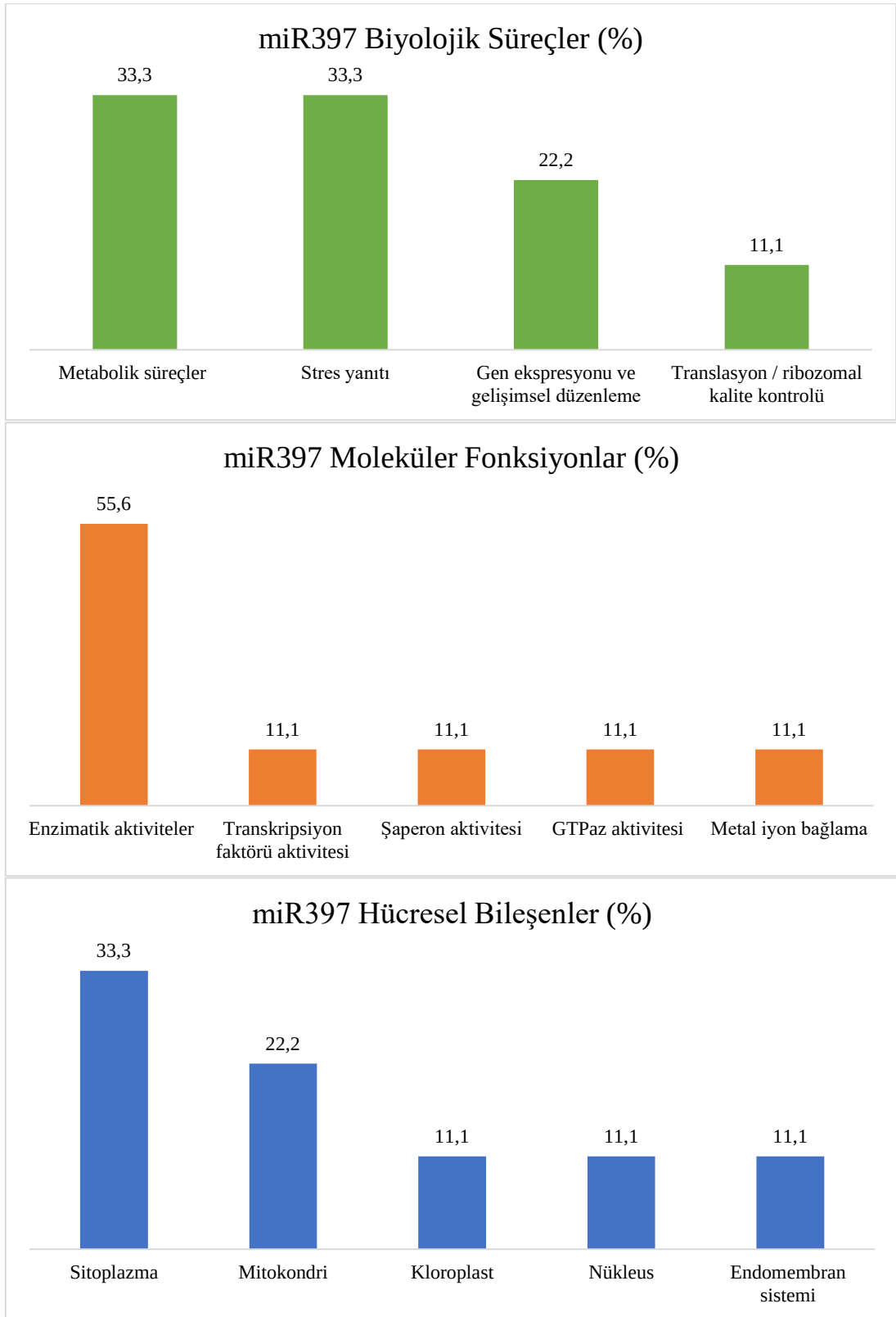
Şekil 4.51 miR171’in hedeflediği genlerin GO analizleri



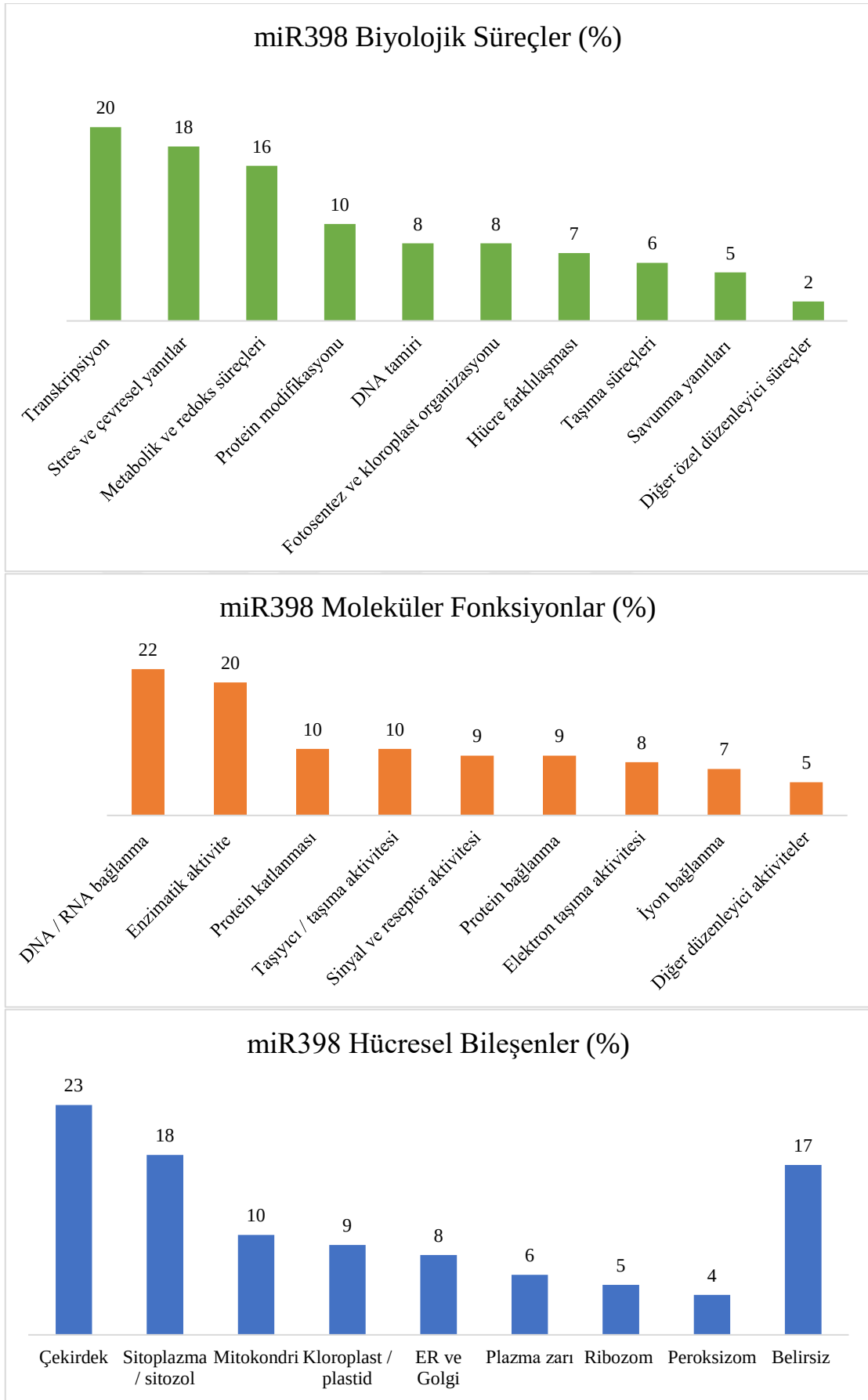
Şekil 4.52 miR172'nin hedeflediği genlerin GO analizleri



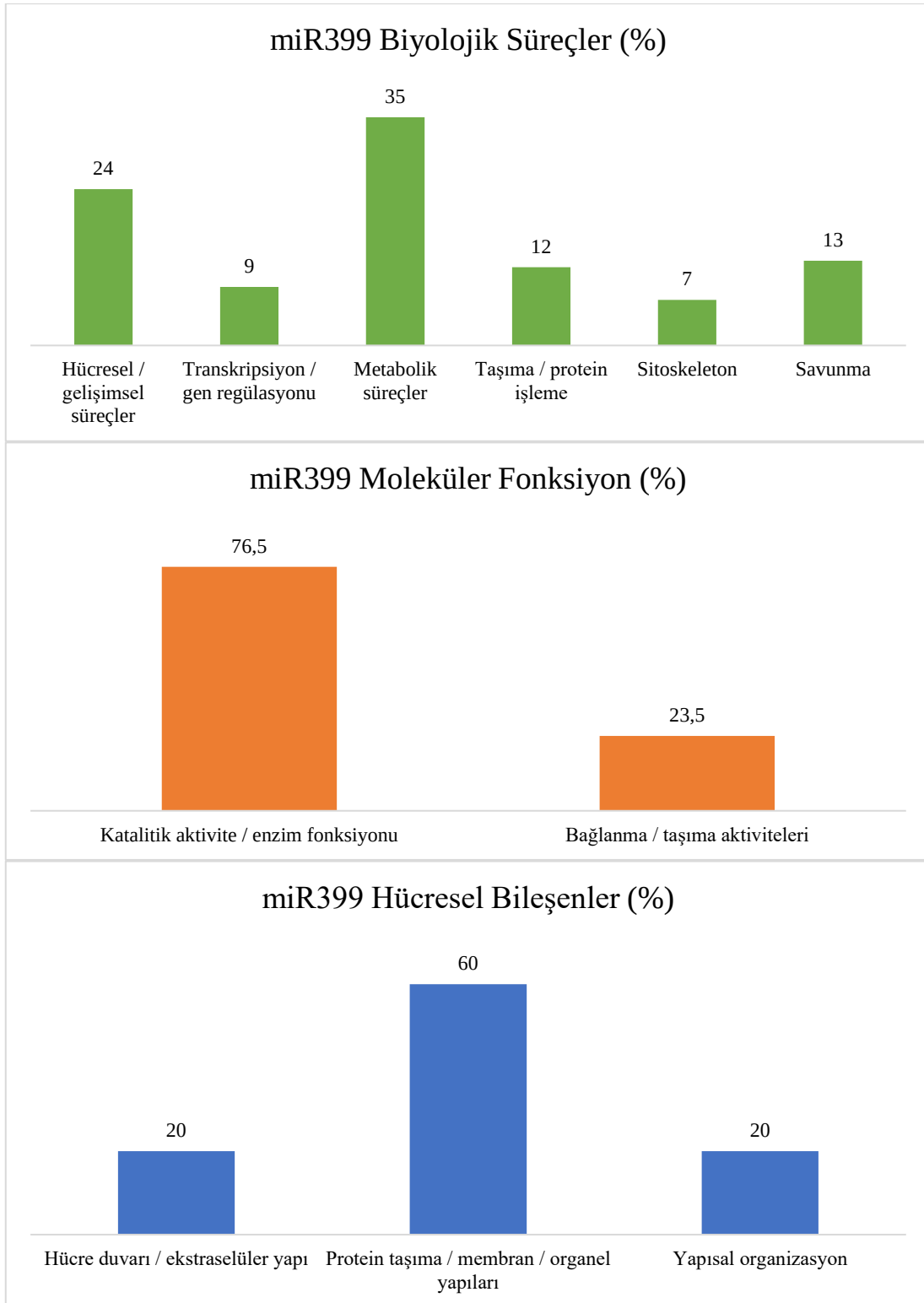
Şekil 4.53 miR395'in hedeflediği genlerin GO analizleri



Şekil 4.54 miR397'nin hedeflediği genlerin GO analizleri



Şekil 4.55 miR398’in hedeflediği genlerin GO analizleri



Şekil 4.56 miR399'un hedeflediği genlerin GO analizleri

GO analizlerinden sonra genler, biyolojik yolları belirlemek için KAAS programında KEGG veri tabanı içerisinde BLASTX programı kullanılarak karşılaştırıldı. miR168, miR390 ve miR398 dizisinin hedef genleri ile ilgili yeterince KEGG Orthology yolağı ataması olmadığından KEGG analizi yapılamamıştır. Aşağıda, ilgili miRNA'ların KEGG analiz verileri yer almaktadır (Tablo 4.4 – Tablo 4.11).

GO analizlerinden sonra gerçekleştirilen KEGG analizleri ile miR156 hedef genlerinin rol oynadığı metabolik yollar tespit edildi. Bu genlerin metabolizma, genetik bilgi işlenmesi, organizma sistemleri, insan hastalıkları, bulaşıcı hastalıklar ve enzimler kategorilerine ait olarak toplamda 9 farklı metabolik yolağı ile bağlantılı olduğu tespit edildi. Bu yollar ve yolların kodları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 miR156 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar.

Metabolizma	Organizma Sistemleri	Genetik Bilgi İşleme
00230 - Purin metabolizması 00240 - Pirimidin metabolizması 00350 - Tirozin metabolizması 00643 - Stiren degradasyonu 00030 - Pentoz fosfat yolu 00040 - Pentoz ve glukuronat dönüşümleri 00710 - Fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu	04623 - Sitosolik DNA algılama yolu (Cytosolic DNA-sensing pathway)	03020 - RNA polimeraz

GO analizlerinden sonra miR157 dizisi için gerçekleştirilen KEGG analizleri ile hedef genler KEGG yollarıyla ilişkilendirilememiş, yalnızca KEGG Orthology/fonksiyonel sınıflandırma (enzim ve kromatin ilişkili proteinler) kapsamında listelenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 miR157 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu fonksiyonel kategoriler.

Enzimler	Peptidazlar	Kromozom
K16297 - SCPL-II; serine carboxypeptidase-like clade II	K16297 - SCPL-II; serine carboxypeptidase-like clade II	K11290 - SET, TAF1, I2PP2A; template-activating factor I

GO analizlerinden sonra gerçekleştirilen KEGG analizleri ile miR160 hedef genlerinin rol oynadığı metabolik yollar tespit edildi. Bu genlerin metabolizma, genetik bilgi işleme, enzim, hücrel antijen ve hücre sinyali kategorilerine ait toplamda 18 farklı yolak ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bunun dışında bazı genler de KEGG yollarıyla ilişkilendirilemeyip, yalnızca KEGG Orthology/fonksiyonel sınıflandırma (enzim ve kromatin ilişkili proteinler) kapsamında listelenmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 miR160 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.

Metabolizma	Genetik Bilgi İşleme	Enzim	Hücre Sinyali	Hücrel Antijen
00630 - Glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması 00680 - Metan metabolizması 00260 - Glisin, serin ve treonin metabolizması 00230 - Purin metabolizması 00240 - Pirimidin metabolizması 00760 - Nikotinat ve nikotinamid metabolizması 00460 - Siyanamino asit metabolizması 00010 - Glikoliz / Glukoneogenez	03021 - Transkripsiyon mekanizması 03021 - RNA polimeraz I K05019 - RNA transport K09338 - HD-ZIP; homeobox-leucine zipper protein	K01081 - 5'-nükleotidaz K01834 - PGAM, gpmA; 2,3-bisfosfogliserat bağımlı fosfogliserat mutaz (phosphoglycerate mutase) K00600 - glyA, SHMT; glycine hidroksimetiltransferaz	K15382 - SLC50A, SWEET; solute carrier family 50 (sugar transporter) K05019 - CLNS1A; klorür kanalı, nükleotid duyarlı (RNA transport ile ilişkili)	K01081 - CD73, NT5E; 5'-nükleotidaz, ecto (CD73)

Gerçekleştirilen KEGG analizleri ile miR166 hedef genlerinin rol oynadığı metabolik yollar tespit edildi. Bu genlerin metabolizma, genetik bilgi işleme, hücre süreçleri, organizma sistemleri, insan hastalıkları ve enzimler kategorilerine ait olmak üzere toplam 15 farklı yolla ve 6 farklı fonksiyonel sınıflandırmayla ilişkili olduğu belirlendi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7 miR166 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.

Metabolizma	Genetik Bilgi İşleme	Hücre Süreçleri	Organizma Sistemleri	Enzimler
00230 - Purin metabolizması 00240 - Pirimidin metabolizması 00760 - Nikotinat ve nikotinamid metabolizması 00190 -Oksidatif fosforilasyon 00944 - Flavon ve flavonol biyosentezi	03013 RNA transport K05019 CLNS1A; klorür kanalı, nükleotid duyarlı	04145 - Fagosom 04142 - Lizozom K02154 - ATPeVI, ATP6N1A; V-type H+-transporting ATPase subunit I	04966 - Toplama kanalı asit salgısı 04721 - Sinaptik vezikül döngüsü	K01081 - 5'-nükleotidaz K02154 - H+-transporting two-sector ATPase K05279 - Quercetin 3-O-metiltransferaz

KEGG analizleri ile miR167 dizisine ait hedef genlerinin rol oynadığı yollar belirlendi. Bu genlerin veri tabanı üzerinde yalnızca 04075 kodlu Plant hormone signal transduction yolağı ile ilişkili olduğu belirlendi.

miR171 dizisine ait hedef genlerin rol oynadığı metabolik yollar tespit edildi. Bu genlerin metabolizma, enzim, splayozom, organizmal sistemler, insan hastalıkları, hücresel süreçler kategorilerine ait toplamda 1 adet yollar ve 3 adet fonksiyonel protein ile ilişkili olduğu belirlendi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8 miR171 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.

Metabolizma	Splayozom	Organizma Sistemleri	Enzimler	Hücrel Süreçler
00190 - Oksidatif fosforilasyon K02154 - ATPeVI, ATP6N1A; V-tipi H ⁺ -taşıyan ATPaz alt birimi I	K14944 - NOVA; RNA bağlayıcı protein Nova	04721 - Sinaptik vezikül döngüsü 04966 - Toplayıcı kanal asit sekresyonu K02154 - ATPeVI, ATP6N1A; V-tipi H ⁺ -taşıyan ATPaz alt birimi I	K02154 - ATPeVI, ATP6N1A; V-tipi H ⁺ -taşıyan ATPaz alt birimi I	04142 - Lizozom 04145 - Fagozom K02154 - ATPeVI, ATP6N1A; V-tipi H ⁺ -taşıyan ATPaz alt birimi I

miR172 dizisine ait hedef genlerin rol oynadığı metabolik yollar tespit edildi. Bu genlerin metabolizma, genetik bilgi işleme, hücrel süreçler, organizmal sistemler ve hastalıklar kategorilerine ait olmak üzere toplamda 9 adet yollar ve 3 adet fonksiyonel protein ve 1 adet modül ile ilişkili olduğu belirlendi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9 miR172 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.

Metabolizma	Genetik Bilgi İşleme	Organizma Sistemleri	Hücrel Süreçler
ko00190 – Oksidatif fotofosforilasyon K02154 – V-type H ⁺ -transporting ATPase subunit I K01081 – 5'-nükleotidaz	K14944 – NOVA; RNA-binding protein Nova	ko04966 – Collecting duct acid secretion ko04721 – Sinaptik vezikül döngüsü	ko04145 – Fagozom ko04142 – Lizozom M00160 – V-type ATPase, eukaryotes (modül)

Gerçekleştirilen KEGG analizleri ile miR395 dizisine ait hedef genlerinin rol oynadığı metabolik yollar tespit edildi. Bu genlerin metabolizma, enzim, genetik bilgi işleme ve taşıyıcı proteinler kategorilerine ait olmak üzere toplamda 10 farklı yolak ve 4 fonksiyonel protein ile ilişkili olduğu belirlendi (Tablo 4.10).

Tablo 4.10 miR395 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.

Metabolizma	Enzim	Genetik Bilgi İşleme	Taşıyıcı Proteinler
ko00920 – Sülfür metabolizması ko00230 – Pürin metabolizması ko00261 – Monobactam biyosentezi ko00541 – Çeşitli nükleotid şekerlerinin biyosentezi	111799934 - Adenil-sülfat kinaz (transferaz) 119665434 - 3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase Sbal175_3956 - tRNA pseudouridine ³² sentaz	ko03009 – Ribozom biyogenezi ko03016 – Transfer RNA biyogenezi	111788310 - Elektrokimyasal potansiyel taşıyıcı

miR397 dizisinin hedef genleri üzerine gerçekleştirilen KEGG analizleri sonucunda, bu genlerin yalnızca K05909 kodlu lakkaz metabolizması ile ilişkili olduğu belirlendi.

Gerçekleştirilen KEGG analizleri ile miR399 dizisine ait hedef genlerinin rol oynadığı metabolik yollar tespit edildi. Bu genlerin metabolizma, enzimler, organizma sistemleri kategorilerine ait toplamda 9 farklı yolak ve 2 farklı fonksiyonel protein ile ilişkili olduğu belirlendi (Tablo 4.11)

Tablo 4.11 miR399 dizisine ait hedef genlerin ilişkili olduğu yollar ve fonksiyonel kategoriler.

Metabolizma	Enzimler	Organizma Sistemleri
ko00564 – Gliserofosfolipid metabolizması ko00565 – Eter lipid metabolizması ko00590 – Araşidonik asit metabolizması ko00591 – Linoleik asit metabolizması ko00592 – α - Linoleik asit metabolizması	EC 3.1.1.4 - Phospholipase A2 (hidrolaz)	ko04270 – Vasküler düz kas kasılması ko04972 – Pankreas salgısı ko04975 – Yağ sindirimi ve emilimi

4.7 Tartışma

Sakız kabağı genomu içerisinde tespit edilen miRNA'ların birçoğunun bitki metabolizması dahilinde birden fazla role sahip olduğu ve bunların bir bölümünün de çevresel streslere doğrudan ve dolaylı yanıtları düzenlemek olduğu tespit edilmiştir. *C. pepo*'ya ait cDNA/transkriptom verisi bulunmadığından, psRNA Target analizi yakın akraba tür olan *C. melo* transkriptomuna karşı yürütülmüştür. Bu nedenle elde edilen hedef gen tahminleri, türler arası dizi benzerliğine dayalı ön tahminlerdir.

Bu tez çalışması kapsamında *C. pepo* genomunda biyoinformatik yöntemlerle tanımlanan 13 farklı aileye (miR156, miR157, miR160, miR166, miR167, miR168, miR171, miR172, miR390, miR395, miR397, miR398, miR399) ait toplam 19 adet miRNA, bitkinin büyüme ve savunma mekanizmalarını hormon sinyal ağları üzerinden yönetmektedir. Bu miRNA'lardan miR160, miR167 ve miR390, hedefledikleri Auxin Response Factor (ARF) genleri aracılığıyla Oksin sinyalizasyonunu düzenleyerek kök ve yaprak gelişimini kontrol ederken; miR156, miR157 ve miR172 aileleri Gibberellin ve Etilen dengesi üzerinden bitkinin faz değişimini ve çiçeklenme zamanlamasını (Stres Kaçış Stratejisi) yönetmektedir. Ayrıca miR171 ve miR166, Absisik Asit (ABA) ve Oksin çapraz konuşmalarıyla büyüme-savunma dengesini kurarken; miR395, miR397, miR398 ve miR399 ise

Sülfat, Bakır ve Fosfat homeostazını sağlayarak Jasmonik Asit (JA) ve Salisilik Asit (SA) ilişkili savunma ve hücre duvarı (lignifikasyon) mekanizmalarını modüle etmektedir.

Gerçekleştirilen anotasyon çalışmaları sonucunda, *C. pepo* bitkisinde tespit edilen genlerin işlevsel dağılımı incelenmiş ve genlerin biyolojik süreçler, moleküler fonksiyonlar ve hücresel bileşenler düzeyinde sınıflandırılması sağlanmıştır. Elde edilen gen yanıtları, bitkinin stres koşullarına verdiği tepkileri anlamada önemli ipuçları sunmuştur. Özellikle transkripsiyon faktörleri, sinyal iletiminde görevli proteinler ve savunma mekanizmalarına katılan genlerin zenginliği dikkat çekmiştir. Ayrıca, bazı genlerin abiyotik streslere (örneğin kuraklık ve tuzluluk) ve biyotik streslere (patojen, mantar, bakteri savunması) karşı rol oynadığı bilinen yollarla ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada *C. pepo* genomunda tanımlanan miR156 ailesinin, bitki gelişimsel faz değişiminin (juvenil-yetişkin geçişi) ana düzenleyicisi olan SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) transkripsiyon faktörlerini (*SPL6-like*, *SPL9-like*, *SPL13-like*) hedeflediği belirlenmiştir. Literatürde miR156-SPL modülü, bitkilerin yaşlanma sürecini kontrol eden evrimsel olarak korunmuş bir mekanizma olarak bilinse de, son çalışmalar bu modülün biyotik stres yanıtında da kritik roller üstlendiğini ortaya koymuştur. [85] Özellikle bazı araştırmacılar, miR156 tarafından hedeflenen *SPL9*'un, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) birikimini ve Salisilik Asit (SA) sinyal yolağını düzenleyerek bitki doğal bağışıklığını (innate immunity) kontrol ettiğini göstermiştir [86]. Bulgular stres koşulları altında saptanan miR156 regülasyonunun, *C. pepo*'nun patojen saldırısı karşısında 'Büyüme-Savunma Dengesi' (Growth-Defense Trade-off) stratejisini devreye soktuğuna işaret etmektedir. Bitki, miR156 aracılığıyla SPL ifadesini baskılayarak vejetatif faz değişimini ve çiçeklenmeyi geciktirmekte, böylece metabolik kaynaklarını büyüme yerine aktif savunma mekanizmalarına ve ROS temelli sinyalizasyona yönlendirmektedir.

Çalışmada *C. pepo* transkriptomunda tanımlanan miR157 ailesinin, miR156 ile yüksek dizi benzerliği gösterdiği ve fonksiyonel olarak SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) transkripsiyon faktörlerini (özellikle *SPL13-like* ve *SPL6-like*) hedeflediği belirlenmiştir. Gelişimsel süreçte miR157, bitkinin juvenil fazdan yetişkin faza geçişini negatif yönde düzenleyen ana faktörlerden

biridir. Ancak biyotik stres bağlamında, miR157-SPL modülü bitki-patojen etkileşiminde stratejik bir savaş alanı olarak öne çıkmaktadır. Literatürde, vasküler solgunluk etmeni *V. dahliae*'nin, salgıladığı küçük RNA'lar (sRNA) aracılığıyla konukçu bitkinin miR157 prekürsörlerini hedefleyerek miR157 birikimini artırdığı rapor edilmiştir [87]. Patojen kaynaklı bu manipülasyon, SPL hedef genlerinin baskılanmasına ve bitkinin çiçeklenme fazına geçişinin gecikmesine neden olmaktadır. Bu durum, patojenin bitkiyi daha uzun süre vejetatif fazda tutarak kendi kolonizasyonu için uygun doku sürekliliğini sağlama stratejisi olarak yorumlanmaktadır. Bulgular *C. pepo*'da saptanan miR157 varlığının, bu miRNA'nın sadece gelişimsel bir saat değil, aynı zamanda patojenlerin konukçu fizyolojisini manipüle etmek için hedef alabileceği potansiyel bir duyarlılık faktörü (susceptibility factor) olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada, *C. pepo* genomundaki cpe-miR160'ın hedef genlerinin Auxin response factor 10-like (*ARF10-like*), Auxin response factor 17-like (*ARF17-like*) ve Auxin response factor 18-like (*ARF18-like*) olduğu belirlenmiştir. KEGG analizinde bu genlerin "Bitki hormonu sinyal iletimi (Plant hormone signal transduction)" yolağında yer aldığı, GO analizinde ise "Oksin ile aktive olan sinyal yolağı" ve "Transkripsiyonun düzenlenmesi" süreçlerinde görevli oldukları saptanmıştır. miR160'ın *A. thaliana*'da *ARF10*, *ARF16* ve *ARF17* genlerini hedefleyerek kök şapkasının oluşumunu ve yerçekimine yanıtı (gravitropizm) kontrol ettiğini gösteren temel bir çalışmada ise miR160'ı ifade edemeyen (mutant) bitkilerde ARF seviyeleri artmış ve bu durum kök uçlarında gelişim bozukluklarına, kök şapkasının düzgün oluşamamasına ve yerçekimi algısının kaybına yol açmıştır. Bu çalışma, miR160-ARF modülünün gelişimsel süreçler için ne kadar kritik olduğunu kanıtlar [88]. *A. thaliana* bitkisinin *P. syringae* bakterisine karşı savunma yanıtında miR160'ın rolünün incelendiği bir başka araştırmada ise, araştırmacılara göre bakteri enfeksiyonu, bitkide miR160 ifadesini artırır. Artan miR160, *ARF* genlerini (özellikle *ARF17*) baskılar. *ARF17*'nin baskılanması, oksin sinyalinin azalmasına ve buna bağlı olarak salisilik asit (SA) gibi savunma hormonlarının sinyal yollarının aktive olmasına yardımcı olur. Sonuç olarak, miR160'ın artışı bitkinin bakteriye karşı direncini güçlendirir. Bu, "büyüme-savunma dengesi" teorisini destekleyen güçlü bir örnektir [89].

Tespit edilen miR166'nın, Sınıf III Homeodomain-Leucine Zipper (HD-ZIP III) transkripsiyon faktörlerini ve Protein METHYLENE BLUE SENSITIVITY 1 (*MBS1*) genini hedeflediği tespit edilmiştir. Bulgularımızda saptadığımız miR166-ATHB15 etkileşimi, literatürde *A. thaliana* ve pamuk gibi bitkilerde gösterilen vasküler gelişim mekanizmasıyla örtüşmektedir. Ancak bu tez çalışmasından elde edilen verilere göre, *C. pepo*'da bu mekanizmanın biyotik stres altında aktive olduğunu öne sürülebilir. Araştırmacılar pamuk bitkisinde miR166'nın mantar genlerini susturmak için kullanıldığını göstermiştir. Bitkiden gelen miR166, mantarın virülans (hastalık yapıcı) için kritik olan Ca^{2+} -bağımlı sistein proteaz (*Clp-1*) genini hedefleyip susturmaktadır. Mantar da hastalık yapma yeteneğini kaybediyor ve bitki direnç kazanmaktadır [90]. Bu çalışmada *C. pepo*'da biyotik stres yollarında miR166'nın tespit edilmesi, bu türün de benzer bir 'sınır ötesi savunma' (cross-kingdom RNAi) stratejisi izleyebileceğine işaret etmektedir.

Çalışmada *C. pepo* genomunda tanımlanan miR167 ailesinin, oksin sinyalizasyonunun pozitif düzenleyicileri olan Auxin Response Factor 6 (*ARF6*) ve *ARF8* genlerini hedeflediği belirlenmiştir. Normal gelişim sürecinde miR167-*ARF6/8* modülü, bitkinin üreme organı gelişimi ve çiçeklenme zamanlamasını kontrol etmektedir. Ancak biyotik stres koşullarında bu modülün, bitkinin 'Fiziksel ve Hormonal Bağışıklığı'nda kritik bir rol üstlendiği düşünülmektedir. Araştırmacılar, miR167'nin aşırı ifadesinin, hedef genleri olan *ARF6* ve *ARF8*'i baskılayarak oksin sinyalini düşürdüğünü, buna bağlı olarak SA düzeylerini artırdığını ve stoma açıklığını azalttığını göstermiştir [91]. Stomaların kapanması, patojenlerin (özellikle bakteriyel) bitki dokusuna girişini engelleyen ilk fiziksel savunma hattıdır. Bulgularda stresle ilişkili olarak saptanan miR167 varlığı, *C. pepo*'nun patojen saldırısı anında oksin kaynaklı büyümeyi durdurup, kaynaklarını stoma kapatma ve SA üretimi gibi aktif savunma stratejilerine yönlendirdiğini (Growth-Defense Trade-off) desteklemektedir.

miRNA168 dizileri, bitkilerde abiyotik ve biyotik strese karşı cevapta en yaygın çalışılan diziler olduğu bilinmektedir [92]. Bu dizi bitkiler arasında yaygın olarak korunmuştur. Aynı zamanda araştırmacılar [92] miR168 dizisinin viral enfeksiyonlara karşı direncini tütün (*N. benthamiana*) bitkisinde incelemiştir. Yine bir başka çalışmada da araştırmacılar [93] *Arabidopsis*'te *F. oxysporum* kaynaklı mantar elisitörleriyle muamele edilen bitkide miR168 ekspresyonunun

arttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da bitki üzerinde miR168 dizisi tespit edilmiş ve dihidrofolat sentataz ve psödohistidin içeren fosfotransfer Protein 5 genlerinin mRNA'larını düzenlediği anlaşılmıştır. GO analizlerinde de dizinin protein glikozilasyonu ile ilişkisi olduğu görülmüş, KEGG analizlerinde ise yeterince anotasyon verisi bulunmadığından anlamlı sonuç elde edilememiştir.

Çalışmada *C. pepo* genomunda tanımlanan miR171 ailesinin, GRAS ailesine mensup SCARECROW-LIKE (SCL) transkripsiyon faktörlerini (*SCL6-like*, *SCL22-like*) hedeflediği saptanmıştır. Gelişimsel biyolojide miR171-SCL modülü, meristem aktivitesi, kök gelişimi ve faz değişiminin ana düzenleyicisi olarak bilinmektedir. Ancak son yıllardaki çalışmalar, bu modülün biyotik stres yanıtında, özellikle viral enfeksiyonlara karşı dirençte kritik bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Araştırmacılar, miR171b'nin aşırı ifadesinin, hedef genleri olan SCL6-II ailesini baskılayarak Rice stripe virus (RSV) semptomlarını hafiflettiğini ve viral çoğalmayı sınırlandırdığını göstermiştir. Ayrıca miR171, Gibberellin (GA) sinyalizasyon yolağını modüle ederek bitkinin büyüme ve savunma arasındaki enerji dengesini (Gelişim-savunma ödünleşim) kurmasına yardımcı olmaktadır [94]. Bizim bulgularımızda *C. pepo*'da saptanan miR171 regülasyonu, bitkinin patojen saldırısı altında vejetatif büyümeyi kontrol altında tutarak kaynaklarını aktif savunma ve viral dirence yönlendirdiğini düşündürmektedir.

Çalışmada *C. pepo*'da tanımlanan miR172 ailesinin, *AP2-like* ve *TOE* transkripsiyon faktörlerini hedeflediği belirlenmiştir. Bu bulgu, literatürde miR172-AP2 modülünün bitkilerdeki korunmuş gelişimsel rolüyle örtüşmektedir. Ancak daha da önemlisi, son yıllardaki çalışmalar, bu modülün sadece çiçeklenme zamanını değil, aynı zamanda biyotik ve abiyotik stres yanıtlarını da düzenlediğini ortaya koymuştur [95]. Literatürde, stres altındaki bitkilerin neslini devam ettirebilmek amacıyla miR172'yi artırıp AP2 baskısını kaldırarak erken çiçeklenmeye gittiği 'Stres Kaçış Stratejisi (Stress Escape Strategy)' tanımlanmıştır. Bu çalışmada miR172'nin biyotik stres yolaklarıyla ilişkilendirilmesi, *C. pepo*'nun patojen saldırısı altında kaynaklarını savunma ve üreme arasında dengelemek için bu modülü bir 'acil durum şalteri' olarak kullandığını düşündürmektedir. Çalışmada miR172 hedeflerinin beklenenin aksine mRNA kesimi (cleavage) göstermesi, *C. pepo* türünde bu ailenin hedef bölge korunumunun yüksek olduğunu ve kesim mekanizmasını kullandığını düşündürmektedir.

Çalışmada *C. pepo* genomunda tanımlanan miR390 ailesinin, diğer miRNA'lardan farklı olarak doğrudan protein kodlayan genleri değil, kodlamayan TAS3 (Trans-acting siRNA 3) transkriptlerini hedeflediği öngörülmüştür. Bu etkileşim, bitkilerde evrimsel olarak yüksek düzeyde korunmuş olan miR390-TAS3-ARF regülasyon kaskadının bir parçasıdır. miR390 aracılığıyla TAS3 transkriptinden üretilen trans-acting siRNA'lar (tasiRNA), nihai hedef olarak Auxin Response Factor (ARF) ailesine ait (*ARF3-like*, *ARF4-like*) genleri transkripsiyon sonrası düzeyde baskılamaktadır. Biyotik stres bağlamında bu dolaylı regülasyon mekanizması, bitkiye oksin sinyalizasyonunu çok daha hassas ve katmanlı bir şekilde kontrol etme imkanı tanır. Araştırmacılar, *M. domestica* (elma) bitkisinde miR390 aşırı ifadesinin, hedef *ARF* genlerini baskılayarak Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Peroksidaz (POD) aktivitelerini artırdığını ve böylece fungal patojenlere (*Colletotrichum*) karşı direnç sağladığını göstermiştir [96]. Bulgularda *C. pepo*'da saptanan miR390 aktivitesi, bitkinin patojen saldırısı anında sadece gelişimsel (kök mimarisi) değişiklikleri değil, aynı zamanda ROS homeostazını ve antioksidan savunma sistemini de bu tasiRNA aracılı yolk üzerinden modüle ettiğini (Fine-tuning) düşündürmektedir. Öte yandan, miR390 için tespit edilen translasyonel baskılama (kesim olmaması) durumu, bu ailenin biyolojik görevi olan tasiRNA biyogenezi ile uyumludur. Bilindiği üzere miR390, TAS3 transkriptine bağlandığında 3' ucunda kesim yapmayarak (non-cleavable site) RDR6/SGS3 kompleksini rekrüte etmekte ve ikincil siRNA üretimini tetiklemektedir [97].

Çalışmada *C. pepo* genomunda tanımlanan miR395 ailesinin, sülfat asimilasyon yolunun ilk ve en kritik enzimi olan ATP Sülfürilaz (ATPS/APS1-like) ve sülfat translokasyonundan sorumlu Sülfat Taşıyıcı (SULTR2;1-like) genlerini hedeflediği belirlenmiştir. Literatürde miR395, genellikle sülfat eksikliğine yanıt veren bir açlık sinyali olarak tanımlansa da, son çalışmalar bu miRNA'nın biyotik stres direncinde de stratejik bir rol üstlendiğini ortaya koymuştur. Araştırmacılar, çeltikte miR395 modülasyonunun, sülfat metabolizmasını yeniden düzenleyerek geniş spektrumlu bir bakteri direnci sağladığını göstermiştir. Bu direnç mekanizması, sülfatın patojenler üzerindeki doğrudan toksik etkisine ve bitki savunma bileşikleri olan Glutasyon (GSH) ve sülfür içeren sekonder metabolitlerin (örneğin antimikrobiyal peptitler veya glukosinolat benzeri bileşikler) artışına dayanmaktadır [98]. Bulgularda biyotik stresle ilişkili olarak saptanan miR395

aktivitesi, *C. pepo*'nun patojen saldırısı anında sülfat havuzunu bir 'Kimyasal Savunma Deposu' olarak kullandığını ve miR395 aracılığıyla bu kaynağı enfeksiyon bölgesine yönlendirerek patojen virülansını kırmayı hedeflediğini düşündürmektedir.

Bitkiler patojen saldırısına uğradığında mir397 ifadesi genellikle düşer (down-regulation). miR397 azaldığında, baskıladığı Lakkaz enzimleri artar. Lakkazlar, monolignollerin polimerizasyonunu katalize ederek hücre duvarında lignin birikimini sağlar. Bu sertleşmiş duvar, patojenlerin (özellikle mantarların) hücre içine girişini engelleyen fiziksel bir bariyer oluşturur. Örneğin, *Malus hupehensis* (elma) bitkisinde miR397'nin susturulması lakkaz aktivitesini ve lignin içeriğini artırarak *Botryosphaeria dothidea* mantarına karşı direnç sağlamıştır [99]. Tez çalışmasında, *C. pepo* genomundaki cpe-miR397'nin hedef genlerinin *Laccase-4-Like*, *Laccase-11* ve *Laccase-17-Like* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca KEGG analizlerimizde bu genlerin Lakkaz metabolizması (K05909) yolağında yer aldığı saptanmıştır. Bu bulgu, *A. thaliana* ve *Populus trichocarpa* (kavak) gibi model bitkilerde miR397'nin evrimsel olarak korunmuş ana hedeflerinin *LAC4* ve *LAC17* genleri olduğunu gösteren çalışmalarla tam bir uyum içindedir [100]. Aynı zamanda pamuk (*Gossypium hirsutum*) bitkisinde miR397 ifadesinin düşürülmesi (knock-down), hedefi olan *GhLAC4* geninin artmasına ve lignin birikiminin yükselmesine neden olur; bu durum bitkiye *V. dahliae* mantarına karşı direnç kazandırır [101].

miR398, bitkilerde bakır homeostazının (dengesinin) birincil düzenleyicisi olarak bilinir ve abiyotik streslere (özellikle oksidatif stres, kuraklık, tuzluluk) karşı verdiği yanıtla ünlüdür. Ancak, miR398'in biyotik stres (patojen saldırısı) ile ilişkisi daha karmaşık ve bazen çelişkili sonuçlar içeren, hızla gelişen bir araştırma alanıdır. miR398'in biyotik stres altındaki rolü, genellikle bitkinin genel "savunma-büyüme dengesi" ve oksidatif patlama (ROS) yönetimi üzerinden gerçekleşir. Tez çalışmasında, *C. pepo* genomundaki cpe-miR398'in (ve varyantlarının) hedef genlerinin *Uclacyanin-3-Like*, Cupredoxin-like protein ve *Laccase-11* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca KEGG analizlerimizde bu genlerin Lakkaz metabolizması (K05909) ve bakır bağlama işlevleriyle ilişkili olduğu saptanmıştır. Bir dönüm noktası niteliğindeki çalışma, miR398'in bakteriyel direncinde kilit bir rol oynadığını göstermiştir. Patojen (*P. syringae*) bitkiye saldırdığında, bitki miR398 ifadesini artırır. Artan miR398, *CSD1* ve *CSD2* genlerini baskılar. SOD

enzimlerinin azalmasıyla, patojenin giriş noktasında süperoksit ve hidrojen peroksit birikimi artar. Bu lokal "oksidatif patlama", bakterinin büyümesini durdurur ve bitkiye direnç kazandırır. miR398'i aşırı ifade eden bitkiler bakteriye daha dirençli, miR398'i susturulan (knock-down) bitkiler ise daha duyarlı bulunmuştur [102]. Buğdayda yapılan bir çalışmada, külleme mantarı enfeksiyonunun miR398 seviyelerini artırdığı gözlemlenmiştir. Ancak buradaki sonuç *Arabidopsis*'in tersidir. miR398'in aşırı ifadesi, *TaCSD1* genini baskılayarak bitkiyi mantara karşı daha duyarlı (hassas) hale getirmiştir. Araştırmacılar, miR398'i susturduklarında direncin arttığını bulmuşlardır. Bu durum, külleme mantarının (bir biyootrof) bitkinin ROS savunmasını aşmak veya kendi lehine kullanmak için miR398'i manipüle ediyor olabileceğini düşündürmektedir [103].

Çalışmada *C. pepo* genomunda tanımlanan miR399 ailesinin, fosfat homeostazının negatif düzenleyicisi olan Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 24 (*UBC24/PHO2-like*) genini ve oksidatif stresle ilişkili Peroxidase P7-like enzimini hedeflediği belirlenmiştir. Literatürde miR399-UBC24 modülü, genellikle fosfat eksikliğine verilen bir yanıt olarak bilinse de, son çalışmalar bu yolağın bitki bağışıklığında da merkezi bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Araştırmacılar, miR399'un aşırı ifadesi veya hedefi olan *PHO2*'nin susturulması sonucu bitki dokularında artan inorganik fosfat (Pi) seviyelerinin, Salisilik Asit (SA) ve Jasmonik Asit (JA) savunma sinyal yollarını aktive ettiğini ve ROS (Reaktif Oksijen Türleri) birikimini tetikleyerek patojenlere karşı direnç sağladığını göstermiştir [104]. Bizim bulgularımızda miR399'un *UBC24* ile birlikte bir peroksidaz enzimini de hedeflemesi, *C. pepo*'nun biyotik stres altında fosfat metabolizmasını manipüle ederek savunma için gerekli enerji (ATP) ve sinyal moleküllerini (ROS) sağlayan bir 'Lojistik Destek ve Enerji Yönetimi' stratejisi izlediğini desteklemektedir.

Tanımlanan miRNA'ların gen regülasyon stratejilerini anlamak amacıyla hedef mRNA'lar üzerindeki susturma modları analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, miRNA-hedef etkileşimlerinin büyük bir kısmının (%95) kesim (cleavage) mekanizması üzerinden ilerlediğini, geriye kalan kısmın ise protein sentezini durduran translasyonel baskılama yoluyla gen ifadesini sınırladığını ortaya koymuştur. Bu durum, *C. pepo* genomunda miRNA aracılı gen susturmanın birincil olarak mRNA kararlılığının bozulması (degradasyon) üzerinden şekillendiğini desteklemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, ekonomik değeri yüksek olan *C. pepo* bitkisinde, bitki savunma mekanizmalarının post-transkripsiyonel düzenleyicileri olan miRNA'ların biyotik stres koşullarındaki potansiyel rolleri biyoinformatik yaklaşımlarla aydınlatılmıştır. Yürütülen analizler sonucunda, miR156, miR160, miR166, miR167, miR397 ve miR398 gibi evrimsel olarak korunmuş miRNA ailelerinin, *C. pepo* genomunda biyotik stres yanıtlarını modüle eden kritik unsurlar olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular, bu miRNA'ların hedeflediği genlerin (örneğin; *ARF*, *NAC*, *GRAS*, *SPL* transkripsiyon faktörleri ve Laccase, Peroxidase gibi enzimler) bitki bağışıklık sisteminde merkezi roller üstlendiğini göstermektedir. Özellikle oksin, salisilik asit (SA) ve jasmonik asit (JA) sinyal yolları ile hücre duvarı modifikasyonu ve oksidatif stres dengesinin (ROS homeostazı), tanımlanan miRNA-hedef gen modülleri aracılığıyla sıkı bir şekilde kontrol edildiği öngörülmüştür. Bu çalışma, genomik verilerin sınırlı olduğu *C. pepo* türünde, biyotik stres toleransının moleküler temellerini anlamak adına önemli bir referans veri seti oluşturmaktadır.

5.1 Gelecek Perspektifi

Tüm bu koşullar altında, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmadan spesifik patojen ilişkileri belirlenemese de elde edilen veriler güçlü bulgulara işaret etmektedir. Bu çalışmada *in silico* yöntemlerle elde edilen verilerin, gelecekteki deneysel çalışmalarla desteklenmesi ve biyoteknolojik uygulamalara dönüştürülmesi amacıyla aşağıdaki adımların izlenmesi önerilmektedir:

- Deneysel doğrulama (validasyon): Çalışmada hesaplamalı olarak tahmin edilen miRNA ve hedef gen etkileşimleri, *C. pepo* bitkilerine spesifik fungal (örn.

Podosphaera xanthii) veya viral (örn. ZYMV) patojenler inoküle edilerek, qRT-PCR ve Northern Blot analizleri ile laboratuvar ortamında doğrulanmalıdır. Stres altındaki ekspresyon seviyelerindeki değişimler, bu miRNA'ların biyolojik işlevini kesinleştirecektir.

- Degradome dizileme analizi: miRNA'ların hedef mRNA'ları kestiği bölgelerin kesin tespiti için degradome dizileme (PARE-Seq) çalışmaları yapılmalıdır. Bu sayede, psRNATarget ile tahmin edilen kesim noktaları *in vivo* ortamda kanıtlanabilir.
- Fonksiyonel karakterizasyon ve gen düzenleme: Aday miRNA'ların (özellikle miR397 ve miR166 gibi savunma ile güçlü ilişkisi saptananların) aşırı ifadesi (over-expression) veya CRISPR/Cas9 teknolojisi ile nakavt edilmesi (knock-out) çalışmaları yapılmalıdır. Bu transgenik hatların geliştirilmesi, ilgili miRNA'ların patojen direncindeki doğrudan etkisini fenotipik olarak gözlemlemeye olanak tanıyacaktır.
- Islah programlarına entegrasyon: Tespit edilen ve doğrulanacak olan miRNA-SSR veya miRNA-SNP markörleri, moleküler ıslah çalışmalarına entegre edilmelidir. Bu markörler, biyotik streslere dayanıklı yeni ve üstün *C. pepo* varyetelerinin geliştirilmesinde seçim kriteri olarak kullanılabilir.

C. pepo üzerinde biyotik stresle (özellikle virüsler, mantarlar ve böcekler) ilişkili miRNA'ların keşfedildikten sonra kesinleştirilmesi, sadece akademik bir bulgu değil, doğrudan uygulamaya dökülebilecek çok güçlü araçlar sunar.

- Suni miRNA (amiRNA) ile virüs direnci: *C. pepo* için en büyük tehditlerden biri Kabak Sarı Mozaik Virüsü (ZYMV)'dür. Keşfedilen miRNA'nın iskeletini (backbone) kullanarak, virüsün hayati bir genini (örneğin HC-Pro geni) hedef alan "Sun miRNA'lar" tasarlanabilir. Bu amiRNA'yı bitkiye aktardığımızda, bitki virüsün genini daha o çoğalamadan parçalayan moleküler bir bağışıklık kazanır. Araştırmalar, bu yöntemin *C. pepo*'da %40'ın üzerinde koruma sağladığını göstermiştir [105].
- RNA aşıları (sprey tabanlı mücadele - SIGS): Genetik modifikasyon (GDO) istemeyen veya hızlı çözüm aranan durumlarda bu miRNA dizileri "sprey" olarak kullanılabilir. Stresle ilişkili miRNA'yı veya onun prekürsörü laboratuvarda sentezlenip bir spre (Spray-Induced Gene Silencing) haline

getirilebilir. Sonrasında çiftçi, tarlada hastalık belirtisi gördüğünde veya risk anında bu RNA karışımını yapraklara sıkarak. Bu "RNA aşısı", bitkinin savunma genlerini geçici olarak aktive eder veya patojenin genlerini susturur [106].

- Erken teşhis kitleri (biyobelirteç olarak kullanım): Bitkide hastalık belirtileri (yapraklarda mozaik desen, kuruma) görülmeden günler önce, kanda hastalık aranması gibi miRNA seviyeleri değişir. Keşfedilen bu spesifik miRNA'ları hedef alan basit bir RT-qPCR kiti veya kâğıt tabanlı bir biyosensör geliştirilebilir. Sonrasında çiftçi yapraktan bir örnek alır ve hızlıca "Bu bitkide henüz belirti yok ama 3 gün içinde mantar enfeksiyonu başlayacak" uyarısını alarak önlem alabilir [107].
- Dirençli anaç geliştirme (aşılama teknolojisi): *C. pepo*, genellikle salatalık veya karpuz gibi diğer kabakgiller için anaç (rootstock) olarak kullanılır. Eğer bulunan miRNA köklerde üretilip bitkinin üst kısımlarına taşınabiliyorsa, sadece anacı bu miRNA'yı üretecek şekilde ıslah etmeniz yeterlidir. Üstteki meyve veren kısım (örneğin hassas bir salatalık çeşidi) genetik olarak değiştirilmemiş olsa bile, alttaki dirençli anaçtan gelen miRNA sinyalleri sayesinde hastalıklara karşı korunur [108].
- Gen düzenleme (CRISPR/Cas9) ile hassas müdahale: Eğer bulunan miRNA, bitkinin savunmasını "frenleyen" bir rol oynuyorsa (bazı miRNA'lar enerji tasarrufu için savunmayı baskılar) CRISPR teknolojisiyle bu miRNA'nın üretimi veya hedef gen üzerindeki bağlanma bölgesi modifiye edilebilir. Bitki, patojene karşı "freni boşalmış" bir şekilde, çok daha hızlı ve şiddetli bir savunma yanıtı verir [109].

KAYNAKÇA

- [1] J. Montero-Pau *vd.*, “De novo assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the Cucurbita genus”, *Plant Biotechnol J*, c. 16, sy 6, ss. 1161-1171, Haz. 2018, doi: 10.1111/PBI.12860;JOURNAL:JOURNAL:14677652;ISSUE:ISSUE:DOI.
- [2] G. Jagadeeswaran, P. Nimmakayala, Y. Zheng, K. Gowdu, U. K. Reddy, ve R. Sunkar, “Characterization of the small RNA component of leaves and fruits from four different cucurbit species”, *BMC Genomics* 2012 13:1, c. 13, sy 1, ss. 329-, Tem. 2012, doi: 10.1186/1471-2164-13-329.
- [3] C. G. Amoroso *vd.*, “Transcriptomic and genomic analysis provides new insights in molecular and genetic processes involved in zucchini ZYMV tolerance”, *BMC Genomics*, c. 23, sy 1, s. 371, Ara. 2022, doi: 10.1186/S12864-022-08596-4.
- [4] L. Navarro *vd.*, “A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling”, *Science* (1979), c. 312, sy 5772, ss. 436-439, Nis. 2006, doi: 10.1126/SCIENCE.1126088/SUPPL_FILE/NAVARRO.SOM.PDF.
- [5] P. V. Shivaprasad, H. M. Chen, K. Patel, D. M. Bond, B. A. C. M. Santos, ve D. C. Baulcombe, “A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs”, *Plant Cell*, c. 24, sy 3, s. 859, 2012, doi: 10.1105/TPC.111.095380.
- [6] É. Várallyay, A. Válczi, Á. Ágyi, J. Burgyán, ve Z. Havelda, “Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation”, *EMBO J*, c. 29, sy 20, ss. 3507-3519, 2010, doi: 10.1038/EMBOJ.2010.215.
- [7] Y. Li, Q. Q. Zhang, J. Zhang, L. Wu, Y. Qi, ve J. M. Zhou, “Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity”, *Plant Physiol*, c. 152, sy 4, ss. 2222-2231, 2010, doi: 10.1104/PP.109.151803.
- [8] C. Schommer *vd.*, “Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets”, *PLoS Biol*, c. 6, sy 9, ss. 1991-2001, 2008, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.0060230.
- [9] H. S. Paris, “History of the Cultivar-Groups of Cucurbita pepo”, *Hortic Rev (Am Soc Hortic Sci)*, ss. 71-170, Eki. 2000, doi: 10.1002/9780470650783.CH2.
- [10] H. Schaefer ve S. S. Renner, “Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae)”,

- Taxon*, c. 60, sy 1, ss. 122-138, Şub. 2011, doi: 10.1002/TAX.601011;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.
- [11] R. W. Robinson ve D. S. Decker-Walters, “Crop Production Science in Horticulture”, *Cucurbits*, s. 153, 1997, Erişim: 21 Aralık 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://books.google.com/books/about/Cucurbits.html?hl=tr&id=y0PEQgAACAAJ>
- [12] H. S. Paris, J. Janick, ve M. C. Daunay, “Medieval herbal iconography and lexicography of Cucumis (cucumber and melon, Cucurbitaceae) in the Occident, 1300-1458”, *Ann Bot*, c. 108, sy 3, ss. 471-484, Eyl. 2011, doi: 10.1093/AOB/MCR182.
- [13] R. W. Robinson, “Breeding and Evaluation of Squash and Pumpkin for Multiple Disease and Insect Resistance”, 1999, *New York State Integrated Pest Management Program*. Erişim: 02 Ocak 2026. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://hdl.handle.net/1813/55303>
- [14] A. Lebeda, E. Křístková, ve H. S. Paris, “Variation for morphological traits within and among Cucurbita pepo genotypes”, *Acta Hortic*, c. 871, ss. 211-218, Ağu. 2010, doi: 10.17660/ACTAHORTIC.2010.871.27.
- [15] I. O. Agbagwa ve B. C. Ndukwu, “The value of morpho-anatomical features in the systematics of Cucurbita L. (Cucurbitaceae) species in Nigeria”, *Afr J Biotechnol*, c. 3, sy 10, ss. 541-546, 2004, doi: 10.5897/AJB2004.000-2106.
- [16] OECD, “Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 5: OECD Consensus Documents”, *Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology*, Nis. 2016, doi: 10.1787/9789264253018-EN.
- [17] Teppner H., “Notes on Lagenaria and Cucurbita (Cucurbitaceae) - Review and new contributions”. Erişim: 02 Ocak 2026. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/285981806_Notes_on_Lagenaria_and_Cucurbita_Cucurbitaceae_-_Review_and_new_contributions
- [18] G. Formisano vd., “Genetic diversity of Spanish Cucurbita pepo landraces: An unexploited resource for summer squash breeding”, *Genet Resour Crop Evol*, c. 59, sy 6, ss. 1169-1184, Ağu. 2012, doi: 10.1007/S10722-011-9753-Y.
- [19] R. L. Saade ve S. M. Hernández, *Cucurbits*. Purdue Horticulture. Erişim: 05 Haziran 2024. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/1492/cucurbits.html>
- [20] R. M. Perez Gutierrez, “Review of Cucurbita pepo (Pumpkin) its Phytochemistry and Pharmacology”, *Med Chem (Los Angeles)*, c. 6, sy 1, 2016, doi: 10.4172/2161-0444.1000316.
- [21] R. Damiano, T. Cai, P. Fornara, C. A. Franzese, R. Leonardi, ve V. Mirone, “The role of Cucurbita pepo in the management of patients affected by lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia: A narrative review”, *Arch Ital Urol Androl*, c. 88, sy 2, ss. 136-143, 2016, doi: 10.4081/AIUA.2016.2.136.

- [22] M. Grzybek vd., “Evaluation of Anthelmintic Activity and Composition of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Extracts-In Vitro and in Vivo Studies”, *Int J Mol Sci*, c. 17, sy 9, Eyl. 2016, doi: 10.3390/IJMS17091456.
- [23] C. M. Teugwa, T. Boudjeko, B. T. Tchinda, P. C. Mejiato, ve D. Zofou, “Anti-hyperglycaemic globulins from selected Cucurbitaceae seeds used as antidiabetic medicinal plants in Africa”, *BMC Complement Altern Med*, c. 13, Mar. 2013, doi: 10.1186/1472-6882-13-63.
- [24] A. T. Fahim, A. A. Abd-El Fattah, A. M. Agha, ve M. Z. Gad, “Effect of pumpkin-seed oil on the level of free radical scavengers induced during adjuvant-arthritis in rats”, *Pharmacol Res*, c. 31, sy 1, ss. 73-79, 1995, doi: 10.1016/1043-6618(95)80051-4.
- [25] U. Kaushik, V. Aeri, ve S. R. Mir, “Cucurbitacins – An insight into medicinal leads from nature”, *Pharmacogn Rev*, c. 9, sy 17, s. 12, Oca. 2015, doi: 10.4103/0973-7847.156314.
- [26] FAO Statistical Corporate Database, “10 World’s Biggest Country Producers of Pumpkins, Squash, and Gourds”. Erişim: 08 Aralık 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.scienceagri.com/2024/11/10-worlds-biggest-country-producers-of.html>
- [27] N. J. Atkinson ve P. E. Urwin, “The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field”, *J Exp Bot*, c. 63, sy 10, ss. 3523-3544, Haz. 2012, doi: 10.1093/JXB/ERS100.
- [28] S. Savary, L. Willocquet, S. J. Pethybridge, P. Esker, N. McRoberts, ve A. Nelson, “The global burden of pathogens and pests on major food crops”, *Nat Ecol Evol*, c. 3, sy 3, ss. 430-439, Mar. 2019, doi: 10.1038/S41559-018-0793-Y.
- [29] T. W. Nyoike ve O. E. Liburd, “Effect of living (buckwheat) and UV reflective mulches with and without imidacloprid on whiteflies, aphids and marketable yields of zucchini squash”, *Int J Pest Manag*, c. 56, sy 1, ss. 31-39, Oca. 2010, doi: 10.1080/09670870902991815.
- [30] S. E. WEAVER, “Critical period of weed competition in three vegetable crops in relation to management practices”, *Weed Res*, c. 24, sy 5, ss. 317-325, 1984, doi: 10.1111/J.1365-3180.1984.TB00593.X.
- [31] F. A. Neela, I. A. Sonia, S. Shamsi, F. A. Neela, I. A. Sonia, ve S. Shamsi, “Antifungal Activity of Selected Medicinal Plant Extract on *Fusarium oxysporum* Schlechtthe Causal Agent of Fusarium Wilt Disease in Tomato”, *Am J Plant Sci*, c. 5, sy 18, ss. 2665-2671, Ağu. 2014, doi: 10.4236/AJPS.2014.518281.
- [32] S. T. Koike, P. Gladders, ve A. O. Paulus, “Vegetable Diseases : A Colour Handbook”, *Vegetable Diseases*, Ara. 2006, doi: 10.1201/B15147.
- [33] “*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (cucurbit angular leaf spot)”, *PlantwisePlus Knowledge Bank*, c. Species Pages, Oca. 2022, doi: 10.1079/PWKB.SPECIES.44969.
- [34] J. liang Tang, D. J. Tang, Z. E. Dubrow, A. Bogdanove, ve S. qi An, “*Xanthomonas campestris* Pathovars”, *Trends Microbiol*, c. 29, sy 2, ss. 182-183, Şub. 2021, doi: 10.1016/j.tim.2020.06.003.

- [35] A. Ravanlou ve M. Babadoost, "Development of Bacterial Spot, Incited by *Xanthomonas cucurbitae*, in Pumpkin Fields", *HortScience*, c. 50, sy 5, ss. 714-720, May. 2015, doi: 10.21273/HORTSCI.50.5.714.
- [36] A. Ravanlou ve M. Babadoost, "Development of Bacterial Spot, Incited by *Xanthomonas cucurbitae*, in Pumpkin Fields", *HortScience*, c. 50, sy 5, ss. 714-720, May. 2015, doi: 10.21273/HORTSCI.50.5.714.
- [37] E. S. Rojas vd., "Bacterial Wilt of Cucurbits: Resurrecting a Classic Pathosystem", <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1068-FE>, c. 99, sy 5, ss. 564-574, May. 2015, doi: 10.1094/PDIS-10-14-1068-FE.
- [38] A. P. Keinath, W. M. Wintermantel, ve T. A. Zitter, "Compendium of Cucurbit Diseases and Pests, Second Edition", *Compendium of Cucurbit Diseases and Pests, Second Edition*, Oca. 2017, doi: 10.1094/9780890545744.
- [39] G. Agrios, "Plant pathology: Fifth edition", *Plant Pathology: Fifth Edition*, c. 9780080473789, ss. 1-922, Ara. 2004, doi: 10.1016/C2009-0-02037-6.
- [40] P. M. Geisel ve E. J. Perry, "Anthracnose / Home and Landscape / UC Statewide IPM Program (UC IPM)". Erişim: 05 Temmuz 2024. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://ipm.ucanr.edu/home-and-landscape/anthracnose/pest-notes/#gsc.tab=0>
- [41] P. D. Roberts, G. Vallad, S. Zhang, N. Dufault, ve M. Paret, "Anthracnose on Cucurbits in Florida", *EDIS*, c. 2023, sy 3, Haz. 2023, doi: 10.32473/EDIS-PP370-2023.
- [42] D. J. Vakalounakis, "Root and Stem Rot of Cucumber Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov.", *Plant Dis*, c. 80, sy 3, s. 313, 1996, doi: 10.1094/PD-80-0313.
- [43] T. A. Zitter, "Septoria Leaf Spot". Erişim: 05 Temmuz 2024. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/SeptoriaLeafSpot.aspx>
- [44] Jude Boucher, "Black Rot of Cucurbits | Integrated Pest Management". Erişim: 08 Aralık 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://ipm.cahnr.uconn.edu/black-rot-of-cucurbits/>
- [45] R. Provvidenti ve D. Gonsalves, "Occurrence of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California", *Plant Dis*, c. 68, sy 5, ss. 443-446, 1984, doi: 10.1094/pd-69-443.
- [46] A. Bertoli, B. Ruffoni, L. Pistelli, ve L. Pistelli, "Analytical methods for the extraction and identification of secondary metabolite production in 'in vitro' plant cell cultures", *Adv Exp Med Biol*, c. 698, ss. 250-266, 2010, doi: 10.1007/978-1-4419-7347-4_19.
- [47] BAYER, "Squash Leaf Curl Virus In Cucurbits". Erişim: 10 Ağustos 2024. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.vegetables.bayer.com/ca/en-ca/resources/agronomic-spotlights/squash-leaf-curl-virus-in-cucurbits1.html>

- [48] D. J. Vakalounakis, “Root and Stem Rot of Cucumber Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov.”, *Plant Dis*, c. 80, sy 3, s. 313, 1996, doi: 10.1094/PD-80-0313.
- [49] J. Boucher, *Pepper IPM: Aphids and Viruses*. University of Connecticut Integrated Pest Management Program.
- [50] P. Palukaitis ve F. García-Arenal, “Cucumoviruses”, *Adv Virus Res*, c. 62, ss. 241-323, 2003, doi: 10.1016/s0065-3527(03)62005-1.
- [51] PennState Extension, “Cucumber Mosaic Virus”. Erişim: 02 Aralık 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://extension.psu.edu/cucumber-mosaic-virus>
- [52] “Squash Leaf Curl Virus In Cucurbits”. Erişim: 10 Ağustos 2024. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.vegetables.bayer.com/ca/en-ca/resources/agronomic-spotlights/squash-leaf-curl-virus-in-cucurbits1.html>
- [53] “Cucurbit yellow stunting disorder virus | CABI Compendium”. Erişim: 10 Ağustos 2024. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.1079/cabicompendium.17070>
- [54] “Cucurbit yellow stunting disorder virus”, *PlantwisePlus Knowledge Bank*, c. Species Pages, Oca. 2022, doi: 10.1079/PWKB.SPECIES.17070.
- [55] R. Grumet, J. Garcia-Mas, ve N. Katzir, “Cucurbit Genetics and Genomics: A Look to the Future”, ss. 409-415, 2017, doi: 10.1007/7397_2017_1.
- [56] D. P. Bartel, “MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function”, *Cell*, c. 116, sy 2, ss. 281-297, Oca. 2004, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- [57] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, ve V. Ambros, “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*”, *Cell*, c. 75, sy 5, ss. 843-854, Ara. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- [58] B. J. Reinhart vd., “The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*”, *Nature*, c. 403, sy 6772, ss. 901-906, Şub. 2000, doi: 10.1038/35002607.
- [59] K. Rogers ve X. Chen, “Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs”, *Plant Cell*, c. 25, sy 7, ss. 2383-2399, 2013, doi: 10.1105/TPC.113.113159.
- [60] Y. Kurihara ve Y. Watanabe, “Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, c. 101, sy 34, ss. 12753-12758, Ağu. 2004, doi: 10.1073/PNAS.0403115101.
- [61] O. Voinnet, “Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs”, *Cell*, c. 136, sy 4, ss. 669-687, Şub. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.046.
- [62] M. R. Friedländer, S. D. MacKowiak, N. Li, W. Chen, ve N. Rajewsky, “miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades”, *Nucleic Acids Res*, c. 40, sy 1, ss. 37-52, Oca. 2012, doi: 10.1093/NAR/GKR688.

- [63] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, ve D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool”, *J Mol Biol*, c. 215, sy 3, ss. 403-410, Eki. 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [64] M. Zuker, “Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction”, *Nucleic Acids Res*, c. 31, sy 13, ss. 3406-3415, Tem. 2003, doi: 10.1093/NAR/GKG595.
- [65] X. Dai, Z. Zhuang, ve P. X. Zhao, “psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release)”, *Nucleic Acids Res*, c. 46, sy W1, ss. W49-W54, Tem. 2018, doi: 10.1093/NAR/GKY316.
- [66] J. D. Thompson, D. G. Higgins, ve T. J. Gibson, “CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, *Nucleic Acids Res*, c. 22, sy 22, ss. 4673-4680, Kas. 1994, doi: 10.1093/NAR/22.22.4673.
- [67] A. Kozomara, M. Birgaoanu, ve S. Griffiths-Jones, “miRBase: from microRNA sequences to function”, *Nucleic Acids Res*, c. 47, sy D1, ss. D155-D162, Oca. 2019, doi: 10.1093/NAR/GKY1141.
- [68] K. Tamura, G. Stecher, ve S. Kumar, “MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11”, *Mol Biol Evol*, c. 38, sy 7, ss. 3022-3027, Tem. 2021, doi: 10.1093/MOLBEV/MSAB120.
- [69] A. Conesa, S. Götz, J. M. García-Gómez, J. Terol, M. Talón, ve M. Robles, “Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research”, *Bioinformatics*, c. 21, sy 18, ss. 3674-3676, Eyl. 2005, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTI610.
- [70] Y. Moriya, M. Itoh, S. Okuda, A. C. Yoshizawa, ve M. Kanehisa, “KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server”, *Nucleic Acids Res*, c. 35, sy Web Server issue, Tem. 2007, doi: 10.1093/NAR/GKM321.
- [71] CUGENDB, “Cucurbit Genomics Database (CuGenDB)”. Erişim: 18 Temmuz 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <http://cucurbitgenomics.org/>
- [72] UseGalaxy, “Galaxy”. Erişim: 01 Nisan 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: https://usegalaxy.org/?tool_id=toolshed.g2.bx.psu.edu%2Frepos%2Frateam%2Fmirdeep2%2Frbc_mirdeep2%2F2.0.1.2%2Bgalaxy0&version=latest
- [73] RNAfold, “RNAfold web server”. Erişim: 12 Temmuz 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>
- [74] Kanehisa Laboratories, “KEGG PATHWAY Database”. Erişim: 01 Nisan 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
- [75] miRBase, “miRBase - Downloads”. Erişim: 05 Mayıs 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.mirbase.org/download/>
- [76] NCBI, “Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query”. Erişim: 12 Temmuz 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch

- [77] R. Lorenz vd., “ViennaRNA Package 2.0”, *Algorithms for Molecular Biology*, c. 6, sy 1, ss. 26-, Kas. 2011, doi: 10.1186/1748-7188-6-26/TABLES/2.
- [78] OMEGA, “Clustal Omega < EMBL-EBI”. Erişim: 29 Temmuz 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo?type=protein>
- [79] MEGA, “Home”. Erişim: 10 Ağustos 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.megasoftware.net/>
- [80] ZhaoLab, “psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server (2017 Update)”. Erişim: 05 Mayıs 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>
- [81] W. R. Pearson, “An introduction to sequence similarity (‘homology’) searching”, *Curr Protoc Bioinformatics*, c. 42, sy SUPPL.42, ss. 3.1.1-3.1.8, Haz. 2013, doi: 10.1002/0471250953.BI0301S42;JOURNAL:JOURNAL:1934340X;WGR OUP:STRING:PUBLICATION.
- [82] BLAST2GO, “Blast2GO – Functional Annotation and Genomics”. Erişim: 16 Eylül 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.blast2go.com/>
- [83] UGENE, “Unipro UGENE - Integrated Bioinformatics Tools”. Erişim: 15 Temmuz 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://ugene.net/>
- [84] RNACanvas, “RNACanvas”. Erişim: 15 Temmuz 2025. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://rna2drawer.app/>
- [85] J. W. Wang, B. Czech, ve D. Weigel, “miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*”, *Cell*, c. 138, sy 4, ss. 738-749, Ağu. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.06.014.
- [86] H. Yin vd., “miR156/SPL9 Regulates Reactive Oxygen Species Accumulation and Immune Response in *Arabidopsis thaliana*”, *Phytopathology*, c. 109, sy 4, ss. 632-642, Nis. 2019, doi: 10.1094/PHYTO-08-18-0306-R.
- [87] B. Sen Zhang, Y. C. Li, H. S. Guo, ve J. H. Zhao, “Verticillium dahliae Secretes Small RNA to Target Host MIR157d and Retard Plant Floral Transition During Infection”, *Front Plant Sci*, c. 13, s. 847086, Nis. 2022, doi: 10.3389/FPLS.2022.847086/BIBTEX.
- [88] J. W. Wang, L. J. Wang, Y. B. Mao, W. J. Cai, H. W. Xue, ve X. Y. Chen, “Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*”, *Plant Cell*, c. 17, sy 8, ss. 2204-2216, 2005, doi: 10.1105/TPC.105.033076.
- [89] K. Hao, Y. Wang, Z. Zhu, Y. Wu, R. Chen, ve L. Zhang, “miR160: An Indispensable Regulator in Plant”, *Front Plant Sci*, c. 13, s. 833322, Mar. 2022, doi: 10.3389/FPLS.2022.833322/ENDNOTE.
- [90] T. Zhang vd., “Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen”, *Nature Plants* 2016 2:10, c. 2, sy 10, ss. 16153-, Eyl. 2016, doi: 10.1038/nplants.2016.153.

- [91] J. C. Caruana, N. Dhar, ve R. Raina, “Overexpression of Arabidopsis microRNA167 induces salicylic acid-dependent defense against *Pseudomonas syringae* through the regulation of its targets ARF6 and ARF8”, *Plant Direct*, c. 4, sy 9, Eyl. 2020, doi: 10.1002/PLD3.270.
- [92] Y. Li, Y. Fu, L. Ji, C. Wu, ve C. Zheng, “Characterization and expression analysis of the Arabidopsis mir169 family”, *Plant Science*, c. 178, sy 3, ss. 271-280, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.PLANTSCI.2010.01.007.
- [93] P. Baldrich vd., “Small RNA profiling reveals regulation of Arabidopsis miR168 and heterochromatic siRNA415 in response to fungal elicitors”, *BMC Genomics*, c. 15, sy 1, Ara. 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-1083.
- [94] A. Tong vd., “Altered accumulation of osa-miR171b contributes to rice stripe virus infection by regulating disease symptoms”, *J Exp Bot*, c. 68, sy 15, ss. 4357-4367, Eyl. 2017, doi: 10.1093/JXB/ERX230.
- [95] Y. Zou vd., “Transcriptional Regulation of the Immune Receptor FLS2 Controls the Ontogeny of Plant Innate Immunity”, *Plant Cell*, c. 30, sy 11, ss. 2779-2794, Kas. 2018, doi: 10.1105/TPC.18.00297.
- [96] J. Shi, Q. Jiang, S. Zhang, X. Dai, F. Wang, ve Y. Ma, “MIR390 Is Involved in Regulating Anthracnose Resistance in Apple”, *Plants*, c. 11, sy 23, s. 3299, Ara. 2022, doi: 10.3390/PLANTS11233299/S1.
- [97] M. J. Axtell, C. Jan, R. Rajagopalan, ve D. P. Bartel, “A Two-Hit Trigger for siRNA Biogenesis in Plants”, *Cell*, c. 127, sy 3, ss. 565-577, Kas. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.09.032.
- [98] Z. Yang vd., “miR395-regulated sulfate metabolism exploits pathogen sensitivity to sulfate to boost immunity in rice”, *Mol Plant*, c. 15, sy 4, ss. 671-688, Nis. 2022, doi: 10.1016/j.molp.2021.12.013.
- [99] S. Huang, J. Zhou, L. Gao, ve Y. Tang, “Plant miR397 and its functions”, *Functional Plant Biology*, c. 48, sy 4, ss. 361-370, Mar. 2021, doi: 10.1071/FP20342.
- [100] S. Lu vd., “Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, c. 110, sy 26, ss. 10848-10853, Haz. 2013, doi: 10.1073/PNAS.1308936110;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.
- [101] T. Wei vd., “A Cotton Lignin Biosynthesis Gene, GhLAC4, Fine-Tuned by ghr-miR397 Modulates Plant Resistance Against *Verticillium dahliae*”, *Front Plant Sci*, c. 12, s. 743795, Kas. 2021, doi: 10.3389/FPLS.2021.743795/BIBTEX.
- [102] J. Li, Q. Song, Z. F. Zuo, ve L. Liu, “MicroRNA398: A Master Regulator of Plant Development and Stress Responses”, *Int J Mol Sci*, c. 23, sy 18, s. 10803, Eyl. 2022, doi: 10.3390/IJMS231810803/S1.
- [103] S. Salamon, J. Żok, K. Gromadzka, ve L. Błaszczyk, “Expression patterns of mir398, mir167, and mir159 in the interaction between bread wheat (*Triticum aestivum* l.) and pathogenic fusarium culmorum and beneficial trichoderma fungi”, *Pathogens*, c. 10, sy 11, s. 1461, Kas. 2021, doi: 10.3390/PATHOGENS10111461/S1.

- [104] B. Val-Torregrosa vd., “Phosphate-induced resistance to pathogen infection in *Arabidopsis*”, *Plant J*, c. 110, sy 2, ss. 452-469, Nis. 2022, doi: 10.1111/TPJ.15680.
- [105] J. Qu, J. Ye, ve R. Fang, “Artificial MicroRNAs for Plant Virus Resistance”, *Methods in Molecular Biology*, c. 894, ss. 209-222, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-882-5_14.
- [106] M. Wang ve H. Jin, “Spray-Induced Gene Silencing: a Powerful Innovative Strategy for Crop Protection”, *Trends Microbiol*, c. 25, sy 1, ss. 4-6, Oca. 2017, doi: 10.1016/J.TIM.2016.11.011.
- [107] B. Khraiwesh, J. K. Zhu, ve J. Zhu, “Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants”, *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, c. 1819, sy 2, ss. 137-148, Şub. 2012, doi: 10.1016/j.bbagrm.2011.05.001.
- [108] B. D. Pant vd., “Identification of Nutrient-Responsive *Arabidopsis* and Rapeseed MicroRNAs by Comprehensive Real-Time Polymerase Chain Reaction Profiling and Small RNA Sequencing”, *Plant Physiol*, c. 150, sy 3, s. 1541, 2009, doi: 10.1104/PP.109.139139.
- [109] J. Chandrasekaran vd., “Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology”, *Mol Plant Pathol*, c. 17, sy 7, s. 1140, Eyl. 2016, doi: 10.1111/MPP.12375.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. M. Özkuluz, S. Erişen ve S. Maraklı, "*Cucurbita pepo* Bitkisinde Biyotik Stres ile İlişkili MikroRNA'ların Tanımlanması ve Fonksiyonel Karakterizasyonu," in *8th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2025)*, Ankara, Türkiye, 2025, p. 153.