



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI**

**ÇİLEKTE (*Fragaria* × *ananassa*) YÜKSEK SICAKLIK
STRESİNE TOLERANSIN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL
VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Izhar ULLAH

I. Danışman

Prof. Dr. Leyla DEMİRİSOY

II. Danışman

Doç. Dr. Musa KAVAS

SAMSUN
2024

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI



**ÇİLEKTE (*Fragaria* × *ananassa*) YÜKSEK SICAKLIK
STRESİNE TOLERANSIN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL
VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

İzhar ULLAH

Danışman

Prof. Dr. Leyla DEMİRSOY

II. Danışman

Doç. Dr. Musa KAVAS

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.ZRT.1901.21.004 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Izhar ULLAH tarafından, **Prof. Dr. Leyla Demirsoy** danışmanlığında hazırlanan “**ÇİLEKTE (*Fragaria* × *ananassa*) YÜKSEK SICAKLIK STRESİNE TOLERANSIN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 15.2.2024 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Leyla DEMİRSOY Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Ece TURHAN Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Sedat SERÇE Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

04 /01 / 2024

Izhar ULLAH

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : ÇİLEKTE (*Fragaria* × *ananassa*) YÜKSEK SICAKLIK STRESİNE TOLERANSIN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 04/01/2024 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 4 çıkmıştır.

04 /01 / 2024

Prof. Dr. Leyla Demirsoy

ÖZET

ÇİLEKTE (*Fragaria* × *ananassa*) YÜKSEK SICAKLIK STRESİNE TOLERANSIN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ

Izhar Ullah

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı

Doktora, Şubat/2024

Danışman: Prof. Dr. Leyla DEMİRİSOY

Çilek dünyanın pek çok yerinde yetiştiriciliği yapılan önemli bir türdür. Artan küresel sıcaklıklar çilek yetiştiriciliği için tehdit oluşturmaktadır. Çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklık stresine karşı fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tepkileri ve tolerans mekanizmaları hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Bu çalışma, farklı kısa gün ve nötr gün çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklık stresi altında gösterdiği fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevapları belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Denemede kullanılan çilek çeşitlerinin frigo bitkileri 15 cm çapındaki plastik saksılarda açık koşullarda 3-4 yapraklı oluncaya kadar 5 hafta süreyle yetiştirilmiştir. Daha sonra uyum sağlaması amacıyla bitkilerin iki hafta süreyle iklim odalarında 25/15°C’de büyütülmesine devam edilmiştir. Kontrol bitkilerinde deneme süresince 25/15°C sıcaklıklar korunurken; yüksek sıcaklık stresi uygulamalarında sıcaklığın her 48 saatte bir 5°C artırılmasıyla bitkiler 30/25, 35/25, 40/25 ve 45/25°C şeklinde artan sıcaklıklara maruz bırakılmıştır.

Denemede bitkilerin oransal su içeriği ve toplam klorofil içerikleri ve membran stabilite indeksi sıcaklığın artışıyla birlikte önemli ölçüde azalmıştır. Bitkilerin yaprak yüzey sıcaklığı, malondialdehid (MDA) ve prolin içerikleri ise sıcaklığın yükselmesiyle artmıştır. Çeşitler arasında en yüksek yaprak yüzey sıcaklığı ‘Tillamook’; en yüksek yaprak oransal su içeriği, membran stabilite indeksi ve prolin içeriği ‘Portola’; en yüksek toplam klorofil içeriği ‘Redlands Hope’; en yüksek MDA içeriği ‘Fronteras’ çeşitlerinde kaydedilmiştir. İncelenen çilek çeşitleri, “Tartılı Derecelendirme” yöntemi ile yüksek sıcaklığa tolerant (‘Albion’, ‘Portola’, ‘Osmanlı’, ‘Monterey’, ‘Calinda’, ‘Splendor’, ‘Sweet Ann’), orta derecede tolerant/hassas (‘Alba’, ‘Asia’, ‘Favette’, ‘Fortuna’, ‘Petaluma’, ‘Roxana’, ‘Redlands Hope’, ‘San Andreas’) ve hassas (‘Festival’, ‘Sabrina’, ‘Jive’, ‘Tillamook’, ‘Amiga’, ‘Fronteras’) olarak gruplandırılmıştır.

Yüksek sıcaklık stresinin (40°C) gen ifadesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yüksek sıcaklığa hassas (‘Fronteras’) ve tolerant (‘Portola’) olarak seçilen iki çilek çeşidinde RNA-seq transkriptomik analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, P40×F40 (Portola-40°C×Fronteras-40°C) örneğinde önemli ölçüde ifadesi artan 11 785 ve ifadesi azalan 12 016 mRNA geni tespit edilmiştir. P40×F40’ta önemli ölçüde ifadesi artan 1698 ve ifadesi azalan 905 lncRNA geni tespit edilmiştir. Biyolojik süreçlerde karbonhidrat metabolik süreçleri ve fotosenteze bağlı yollarla ilişkilendirilmiş genlerin anlamlı bir şekilde zenginleştiği gözlemlenirken, hücresel konumda tilakoid, tilakoid bölümü, fotosentetik membran ve fotosistemle ilişkilendirilmiş genlerin zenginleştiği gözlemlenmiştir. P40×F40’ta izomeraz aktivitesi ve ATPaz aktivitesi gibi moleküler fonksiyonlarda zenginleşme gözlenmiş,

bu da yüksek sıcaklığa karşı dokunun moleküler, biyolojik ve hücresel düzeyde termotolerans hazırlığı olarak ifade edilmiştir. KEGG zenginleşme analizi, P40×F40'ta ribozom biyosentezi, ökaryotlarda peroksizom ve fotosentezle ilgili olarak anlamlı bir zenginleşme göstermiştir.

qRTPCR analizi sonuçları, P40×F40'ta P25×F25'e göre glikolitik yol, hidralaz aktivitesi, oksogli, thaumatin/osmotin ubikuitin, homeobox-leucine zip kodlu protein ve floem gelişimi ile ilişkilendirilmiş genlerin ifadelerinin arttığı; syntaxin, Myb/SANT, ubikuitin protein ligaz aktivitesi, E3 ligaz, CCCH-tipi çinko parmak, floem, C-terminal ve RING/FYVE/PHD-çinko parmak tipi genlerin ifadelerinin azaldığı bulunmuştur. P40×F40'ta P25×F25'e göre ısı şoku proteinleri LOC101290755'in ifadesi artarken, LOC101313245, LOC101304168 ve LOC101291264'ün azaldığı gözlenmiştir. Yüksek sıcaklık stresine hassas ve tolerant çeşitlerdeki değerlendirmeler, yüksek sıcaklığa tolerans mekanizmalarına dair fizyolojik, biyokimyasal ve transkriptomik önemli veriler sunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Çilek, yüksek sıcaklık stresi, tolerans mekanizması, ısı şoku proteinleri, gen ifadesi

ABSTRACT

DETERMINATION OF PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL, AND MOLECULAR MECHANISMS OF HIGH TEMPERATURE STRESS TOLERANCE IN STRAWBERRY (*Fragaria* × *ananassa*)

Izhar Ullah

Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Horticulture

Ph.D., February/2024

Supervisor: Prof. Dr. Leyla DEMİRSOY

Rising global temperatures are causing irreversible damage to optimal growth, and sustainable yields of fruit crops. Currently, there is little information on the physiological, biochemical, and molecular responses of strawberry cultivars to high-temperature stress and their tolerance mechanisms. The study was conducted to determine the effects of high-temperature stress (25-45°C) on physiological, biochemical, and molecular responses of different day-neutral and short-day varieties. Frigo plants of the strawberry cultivars were grown for 5 weeks in 15 cm diameter plastic pots (3:1:1; garden soil, peat, perlite) under open conditions until they had 3-4 leaves and then transferred to climate chambers. In climate chambers, they were exposed to a temperature of 25/15°C for two weeks before being placed under high-temperature stress. The temperature of 25/15°C day/night was maintained in the control group, while in the temperature stress group, the temperature was gradually increased by 5°C every 48 hours up to 45/25°C.

The relative water content, total chlorophyll content, and membrane stability index of the plants decreased significantly with increasing temperature. The leaf surface temperature, malondialdehyde (MDA), and proline content of the plants increased with increasing temperature. Among the varieties, the highest leaf surface temperature was recorded in 'Tillamook'; the highest leaf relative water content, membrane stability index, and proline content in 'Portola'; the highest total chlorophyll content in 'Redlands Hope', and the highest MDA content in 'Fronteras'. Strawberry cultivars studied were grouped as high temperature tolerant ('Albion', 'Portola', 'Osmanlı', 'Monterey', 'Calinda', 'Splendor', 'Sweet Ann'), moderately tolerant/sensitive ('Alba', 'Asia', 'Favette', 'Fortuna', 'Petaluma', 'Roxana', 'Redlands Hope', 'San Andreas') and sensitive ('Festival', 'Sabrina', 'Jive', 'Tillamook', 'Amiga', 'Fronteras') by the "Modified weighted ranked" method.

To determine the effects of high-temperature stress (40°C) on gene expression, RNA-seq transcriptomic analysis was performed in two strawberry cultivars selected as high-temperature sensitive ('Fronteras') and tolerant ('Portola'). According to the obtained results, 11 785 upregulated and 12 016 downregulated differentially expressed genes of mRNAs were detected in P40×F40 (Portola-40°C×Fronteras-40°C). Similarly, 1698 upregulated and 905 downregulated differentially expressed genes of lncRNAs were detected in P40×F40. Gene ontology of functional analysis term showed significant enrichment of differentially expressed genes related to carbohydrate metabolic process and photosynthetic pathways in biological processes. While in cellular location, genes associated with thylakoid, thylakoid compartment, photosynthetic membrane, and photosystem were significantly enriched in P40×F40. Genes belonging to isomerase and ATPase

activity were significantly enriched in molecular functions of P40×F40, which was expressed as thermotolerance preparation of the tissue at molecular, biological, and cellular levels against high temperature. KEGG enrichment analysis showed a significant enrichment in P40×F40 related to ribosome biosynthesis, peroxisome in eukaryotes, and photosynthesis.

The results of qRT-PCR analysis showed that expression of genes associated with the glycolytic pathway, hydrolase activity, oxogly, thaumatin/osmotin ubiquitin, homeobox-leucine zipper protein, and phloem development increased in P40×F40 compared to P25×F25, while the expression of genes belonging to syntaxin, Myb/SANT, ubiquitin-protein ligase activity, E3 ligase, CCCH-type zinc finger, sieve element occlusion, C-terminal, and RING/FYVE/PHD-zinc finger type were decreased in P40×F40 over P25×F25. The expression of heat shock protein LOC101290755 increased in P40×F40 compared to P25×F25, while the expression of heat shock protein LOC101313245, LOC101304168, and LOC101291264 decreased. These evaluations in high-temperature stress-sensitive and tolerant cultivars provided important physiological, biochemical, and transcriptomic data on high-temperature tolerance mechanisms.

Keywords: Strawberry, high-temperature stress, tolerance mechanism, heat shock proteins, gene expression

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Öncelikle, bana güç ve kararlılık veren Yüce Allah'a sonsuz şükürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bana cesaret aşılayan, öğretim ve araştırma ruhunu aktaran, çalışmalarımın her adımında bana sabırla rehberlik eden danışmanım Prof. Dr. Leyla DEMİRİSOY'a derin şükranlarımı sunarım.

Danışmanımın yanı sıra, öğretici tavsiyeleri, değerli dersleri, desteği, teşviki ve sabrı için Prof. Dr. Hüsnü DEMİRİSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tezimin yürütülmesi sırasında fakültemizin tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Aysun PEKŞEN'e, Doç. Dr. Musa KAVAS'a, Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM'a, Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK'e, Dr.Öğr.Üyesi Mehmet TÜTÜNCÜ'ye, bilgilerini esirgemeyen Araş. Gör. Bayram YERLİKAYA'ya, Araş. Gör. Derviş Emre DOĞAN'a, Araş. Gör.İlkay Sevgen KÜÇÜK'e, Araş. Gör.Yahya URAY'a, Araş. Gör. Aslıhan TÜTÜNCÜ'ye ve Araş. Gör. Yakup Mert KUL'a yardımlarından ve katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Üniversiteye katıldığım ilk günden bu yana sürekli destekleri için ablam gibi olan Dr. Öğr.Üyes Dilek SOYSAL'a ve Dr. Birol SOYSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ziraat Fakültesindeki tüm meslektaşlarıma, Dr. Adis LIZALO'ya, Yüksek Lisans Öğrencisi Hassan Hamit RASHEED'e, Yüksek Lisans Öğrencisi Mohammed Ghaleb'e, Ahmet MUSSA'ya, Yüksek Lisans Öğrencisi Mustafa Can SİNOP'a, Yüksek Lisans Öğrencisi Furkan BALCI'ya, Yüksek Lisans Öğrencisi Muhammad Danish TOOR'a, Yüksek Lisans Öğrencisi Noraiz Ahmad TANVEER'e, Doktora Öğrencisi Zaki FAIZI'ya, Doktora Öğrencisi Mohsin RIAZ'a ve diğer lisans ve lisansüstü öğrencilerine teşekkür ederim.

Beni bugün olduğum kişi yapan sevgili annem ve babamın sonsuz sevgisi ve desteği olmasaydı, motive olamaz ve kendime güvenemezdim. Başarılarım onların bana güvendikleri içindir. Kardeşlerime en derin teşekkürlerimi sunarım.

İzhar Ullah

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	7
2.1. Çileğin Kısa Tanıtımı	7
2.2. Çileklerin Fotoperiyodik Sınıflandırılması	9
2.2.1. Kısa gün çilekleri	9
2.2.2. Nötr gün çilekleri	10
2.3. Yüksek sıcaklık stresine genel bir bakış	12
2.4. Çileklerde yüksek sıcaklık stresinin etkileri	14
2.5. Bazı kültür bitkilerinde yüksek sıcaklık stresi ile ilgili araştırmalar	19
2.6. Yüksek sıcaklık stresi altındaki bitkilerde genetik değişiklikler	23
2.7. Yüksek sıcaklık stresi altında protein metabolizması	27
3. MATERYAL VE METOT	32
3.1. Materyal	32
3.2. Metot	38
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi	38
3.2.2. Yüksek sıcaklık stresi uygulamaları	38
3.2.3. Deneme deseni	39
3.2.4. Yüksek sıcaklık stresi uygulanan bitkilerde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklerin belirlenmesi	39
4. BULGULAR	50
4.1. Yüksek sıcaklık uygulamalarının fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler üzerine etkileri	50
4.1.1. Yaprak yüzey sıcaklığı	50
4.1.2. Yaprak oransal su içeriği	53
4.1.3. Membran stabilite indeksi	56
4.1.4. Toplam klorofil içeriği	59
4.1.5. Malondialdehid (MDA) içeriği	62
4.1.6. Prolin içeriği	65
4.2. Çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklığa hassasiyet/toleranslarının belirlenmesi	68
4.3. Yüksek sıcaklık stresi altında çilek çeşitlerindeki moleküler değişimler	70
4.3.1. Toplam RNA izolasyonu ve analizi	70
4.3.2. Dizileme için kütüphanelerin oluşturulması	71
4.3.3. mRNA ve lncRNA analizi	78
5. TARTIŞMA	128
5.1. Yaprak yüzey sıcaklığı	128
5.2. Yaprak oransal su içeriği	129
5.3. Membran stabilite indeksi	131
5.4. Toplam klorofil içeriği	132
5.5. Malondialdehit (MDA) içeriği	134
5.6. Prolin içeriği	135

5.7. Çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklığa tolerans/hassasiyetlerinin belirlenmesi.....	136
5.8 Yüksek sıcaklık stresine farklı ifade olan gen tepkileri.....	137
6. SONUÇ	144
KAYNAKLAR	149
ÖZ GEÇMİŞ.....	165



SİMGELER VE KISALTMALAR

HSP'ler	:Isı şok proteinleri
sHSP	:Küçük ısı şoku proteini
ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
GR	:Glutasyon redüktaz
DEGs	:Farklı İfade Olan Genler
KEGG	:Kyoto of Encyclopedia of Genes and Genomes
lncRNAs	:Uzun RNA'lar
PRX	:Peroxidaz
APX	:Ascorbat peroksidaz
CAT	:Katalaz
MSİ	:Membrane stabilite indeksi
MDA	:Malondialdehyde
YOSİ	:Yaprak oransal su içeriği
TCA	:Trikloroasetik asit
TBA	:Thiobarbiturik asit
PR	:Prolin
CC	:Hücre sel Bileşen
MF	:Moleküler fonksiyon
BP:	:Biyolojik süreç
qRT-PCR	:Quantitative Real time-Polymerase chain reaction

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Yüksek sıcaklık stresiyle başa çıkmak için bitkilerin gösterdiği morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiminin şematik gösterimi.....	14
Şekil 3.1 Bitkilerin açıkta ve iklim kabinindeki büyüme aşamalarına ait görüntüler.....	39
Şekil 4.1 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre yaprak yüzey sıcaklığının değişimi.....	52
Şekil 4.2 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre yaprak oransal su içeriğinin değişimi.....	55
Şekil 4.3 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre membran stabilite indeksinin değişimi.....	58
Şekil 4.4 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre toplam klorofil içeriğinin değişimi.....	61
Şekil 4.5 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre MDA içeriğinin değişimi.....	64
Şekil 4.6 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre prolin içeriğinin değişim.....	67
Şekil 4.7 Yüksek sıcaklık stresi (45°C) altında tolerant ve hassas çilek çeşitlerinin görünümü.....	69
Şekil 4.8 Portola ve Fronteras çeşitlerinde RNA izolasyonundan sonra elde edilen örneklerle ait 28S ve 18S ribozomal RNA'nın jel görüntüleri.....	71
Şekil 4.9 Tüm kütüphaneler için toplam RNA işleminden biyoinformatik analizlere kadar özet iş akış şeması.....	72
Şekil 4.10 12 kütüphanedeki bilgilerin temiz okumalar, bağdaştırıcıyla ilişkili okumalar, bilinmeyen bazlar (N) içeren okumalar, düşük kaliteli okumalar olarak sınıflandırılması.....	74
Şekil 4.11 Toplam 12 dizi verisi için sıralama hata oranı dağılımı.....	76
Şekil 4.12 Toplam 12 dizi verisinin GC içeriği.....	77
Şekil 4.13 lncRNA ve mRNA'ların biyoinformatik analizinde izlenen iş akışları.....	79
Şekil 4.14 Referans genomu hizalandığında ekzonlar veya intergenik bölgeler arasındaki dizileme kitaplıklarından okumaların dağılımını gösteren grafikler.....	82
Şekil 4.15 Farklı veri tabanlarında tahmin edilen lncRNA'ların Venn diyagramı.....	84
Şekil 4.16 Filtrelemeden sonra farklı lncRNA türlerinin sınıflandırılması.....	85
Şekil 4.17 Tanımlanan lncRNA ve mRNA moleküllerinin yapısal karşılaştırması.....	86
Şekil 4.18 'Dağılım grafiği' ile 4 farklı karşılaştırmada farklı ifade olan genel bir bakış..	90
Şekil 4.19 Önemli derecede farklı ifade edilen genlerin kümelenmiş ısı haritası.....	92
Şekil 4.20 4 farklı karşılaştırmaya ait GO zenginleştirme analizinin histogramı.....	97
Şekil 4.21 GO zenginleştirme analizi DAG grafiği (Biyolojik fonksiyon).....	101
Şekil 4.22 GO zenginleştirme analizi DAG grafiği (Hücresel bileşen).....	105
Şekil 4.23 GO Zenginleştirme Analizi DAG Çizelgesi (moleküler işlev).....	109
Şekil 4.24 KEGG zenginleştirme analiz histogramı.....	113
Şekil 4.25 KEGG zenginleştirmesi ile bulunan hedef genlerin dağılım grafiği.....	118

Şekil 4.26 Çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresine bağlı qRT-PCR aracılığı ile belirlenen gen ifade sonuçları.....	122
Şekil 4.27 Çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresine bağlı qRT-PCR aracılığı ile belirlenen gen ifade sonuçları.....	124
Şekil 4.28 Çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresine bağlı qRT-PCR aracılığı ile belirlenen gen ifade sonuçları.....	126
Şekil 4.29 Çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresine bağlı qRT-PCR aracılığı ile belirlenen gen ifade sonuçları.....	127



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1 Denemede incelenen çilek çeşitlerinin fotoperiyodik grupları, ebeveynleri ve orijinleri.....	32
Tablo 3.2 Tartılı derecelendirmede dikkate alınan özellikler, görece puanları, özelliklerin sınıf değerleri ve puanları.....	44
Tablo 3.3 Transkriptom analizi sonucunda diferansiyel olarak ifade edilen 21 genin qRT-PCR analizi için tasarlanmış primer bilgileri.....	48
Tablo 4.1 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının yaprak yüzey sıcaklığı üzerine etkileri.....	51
Tablo 4.2 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının yaprak oransal su içeriği üzerine etkileri.....	54
Tablo 4.3 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının membran stabilite indeksi üzerine etkileri.....	57
Tablo 4.4 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının bitkilerin toplam klorofil içeriği üzerine etkileri.....	60
Tablo 4.5 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının bitkilerin MDA içeriği üzerine etkileri.....	63
Tablo 4.6 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının bitkilerin prolin içeriği üzerine etkileri.....	66
Tablo 4.7 Çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklığa hassasiyet/toleranslarının “Tartılı Derecelendirme” yöntemi ile belirlenmesi.....	68
Tablo 4.8 RNA bütünlüğünü gösteren değer (RIN).....	70
Tablo 4.9 Portola ve Fronteras çeşidi örneklerinden kontrol ve stres koşullarında elde edilen RNA’ların izolasyonu sonrası jel görüntüsündeki 28S:18S oranı.....	71
Tablo 4.10 12 veri setinin toplam okumalarının kalite kontrolünün özeti.....	73
Tablo 4.11 Referans genomla eşlenen okumaların özeti.....	80
Tablo 4.12 StringTie programından elde edilen sonuçların özet gösterimi, transkriptlerin birleştirilmesi ve lncRNA’ların tanımlanması.....	83
Tablo 4.13 4 farklı kütüphaneden elde edilen çileğin birinci kromozomundaki ilk 10 genin FPKM değerlerini göstermektedir.....	88
Tablo 4.14 Kütüphaneler arası karşılaştırmalar sonucunda mRNA’ların DEG gen sayıları.....	89
Tablo 4.15 Kütüphane karşılaştırmalarında farklı şekilde ifade edilen lncRNA’ların sayısı.....	119
Tablo 4.16 Kütüphane karşılaştırmalarında bazı farklı ifade edilen lncRNA’ların bilgileri.....	120

1. GİRİŞ

Çevresel stres faktörlerini de içeren abiyotik stresler, dünya genelinde birçok ana ürün grubunda ortalama verimi %50'den fazla düşürmektedir (Bray vd., 2000). Abiyotik streslerden biri olan yüksek sıcaklık stresi, bitki büyüme ve gelişmesinde geri dönüşü olmayan zararlara neden olan belirli bir süre ve eşik seviyesinin üzerindeki sıcaklık artışı olarak tanımlanmaktadır (Wahid ve Close, 2007). Yüksek sıcaklık stresi tepkisi, optimum koşulların en az 5°C üzerindeki sıcaklıklara maruz kalan bitkilerde görülür (Bray vd., 2000). İklim değişikliği ve küresel ısınmaya bağlı yüksek sıcaklık stresinin tarımsal ekosistemler üzerinde olumsuz etkilere neden olacağı ve tarımsal üretim için büyük bir tehdit oluşturacağı öngörülmektedir. Yirmi birinci yüzyılın sonuna kadar atmosferik CO₂ konsantrasyonunun 1000 ppm'i aşabileceği ve yüzey sıcaklığının 2.5-7.8°C artabileceği tahmin edilmektedir (IPCC, 2014). Küresel iklim raporlarında en sıcak 20 yılın 1996'dan sonra, en sıcak 10 yılın 2005 ve sonrasında, son 5 sıcak yılın ise 2015 ve sonrasında gerçekleştiği belirtilmiştir (NOAA, 2019, 2020). 2022 yılı, NOAA'nın sıcaklık verilerine göre kayıtlara geçen en sıcak altıncı yıl olmuştur. 2022 yılında yüzey sıcaklığı, 20. yüzyıl ortalaması olan 13.9°C'den 0.86°C daha sıcak ve sanayi öncesi dönemden (1880-1900) 1.06°C daha sıcak olmuştur (Lindsey ve Dahlman, 2023). Ülkemizde de benzer bir durum yaşanmakta olup 1981-2010 yılları arasında 13.5°C olan ortalama sıcaklıklar 2013 yılında 14.1°C, 2018 yılında 15.4°C, 2019 yılında ise 14.7°C olarak gerçekleşmiştir (Anonymous, 2014, 2019, 2020). Bu durumda Türkiye, yüksek sıcaklığa bağlı olarak risk grubu ülkeler arasında yer almaktadır.

Bitkiler stresle başa çıkabilmek için stresten kaçma, strese tolerans geliştirme ve stresten zarar gören dokuların yenilenmesi gibi mekanizmalar geliştirmektedirler (Huey vd., 2002). Strese tepki olarak bitkiler kendilerini fenolojik, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olarak düzenler (Zhang vd., 2000), bazı genlerin ifadesinde değişiklikler gösterir (Seki vd., 2001, Singh vd., 2002) ve strese karşı koymaktan sorumlu birçok metabolit ve protein üretirler.

Yüksek sıcaklık stresi genellikle bitki büyüme ve gelişiminde, fizyolojik süreçlerde ve verimde olumsuz değişikliklere neden olur (Levitt, 1980). Kök büyümesini, fide büyümesini azaltır ve önemli verim kayıplarına sebep olur (Saeed vd., 2023). Yüksek sıcaklık stresi ayrıca hücre büyüklüğünü, büyümeyi ve bölünmeyi azaltır ve sonuçta ölüme yol açarak büyüme ve biyokütlede önemli bir

azalmaya neden olur (Srivastava vd., 2012). Yaprak ve gövde yanıklığı, yaprak kıvrılması, nekroz ve klorozu içeren morfolojik değişikliklere neden olur (Omae vd., 2012). Bitkiler, aşırı sıcaklık dalgalanmalarına karşı generatif dönemde vejetatif döneme göre daha fazla hassasiyet gösterirler, bu durum tohum üretiminin azalmasına yol açar (Zhang vd., 2017; Lamaoui vd., 2018). Erkek üreme organları özellikle hassastır (Giorno vd., 2013). Polenlerin olgunlaşması, polen tüpü büyümesi, tozlanma, döllenme ve embriyo gelişimi gibi farklı üreme süreçlerinde zararlanmalar meydana gelmektedir (Giorno vd., 2013; Zhang vd., 2017). Üreme sırasındaki yüksek sıcaklık stresinin sonraki fizyolojik etkileri çiçeklenme öncesinde çiçek sayısında azalma, düşük döllenme ve verimlilik, zayıf kabuk ve tohum gelişimi olarak görülür (Morrison ve Stewart, 2002). Özetle, yüksek sıcaklık stresi çiçeklenme, meyve tutumu ve tohum üretimine olumsuz etkileri yoluyla generatif büyüme ve gelişmeyi ciddi şekilde engeller.

Yüksek sıcaklık, evapotranspirasyonu artırarak bitkideki ozmotik düzenlemeyi olumsuz etkiler, bu da stres toleransı için gerekli olan çözünür maddelerin üretimini olumsuz etkiler (Hassan vd., 2021; Raza ve vd., 2022; Saeed vd., 2023). Artan sıcaklıklar fotosentezi azaltır ve solunumu artırır, bu da asimilasyonu azaltır ve önemli ölçüde verim kaybına neden olur (Hassan vd., 2021). Yüksek sıcaklık stresi kloroplastın yapısını değiştirir ve tilakoidleri düzensizleştirerek fotosentezde büyük bir azalmaya yol açar (Wang vd., 2009). Ayrıca fotosistem II aktivitesi, stoma iletkenliği ve hücrelerarası CO₂ konsantrasyonuna kritik şekilde zarar verir, bunların hepsi fotosentezi azaltır ve bitki büyümesinde önemli bir düşüşe neden olur (Sabagh vd., 2020; Sharma vd., 2022). Su alımını düşürerek hücre metabolizmasını bozar, bu da turgor kaybına yol açar (Machado ve Paulsen, 2001).

Yüksek sıcaklık stresi moleküler düzeyde, membran proteinlerini ve stabilitesini değiştirerek yapısal hasara; enzimatik aktiviteleri bozarak ve toksik metabolitlerin üretimine neden olarak metabolik hasara neden olabilir (Mittler vd., 2012). Bitkiler, ısı kaynaklı reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklanan oksidatif hasarı azaltmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları aktive eder (Hassan vd., 2021) ve şekerler, prolin ve glisin betain gibi ozmolitleri biriktirirler (Sabagh vd., 2021). Reaktif oksijen türleri, bitki hücresel metabolizmasının normal ürünleri olarak üretilir. Yüksek sıcaklık gibi çeşitli çevresel stresler hücresel redoks dengesini bozarak aşırı ROS üretimine yol açar ve bitkilerde oksidatif strese neden

olur (Ergin vd., 2012a; Krishnamurthy ve Rathinasabapathi, 2013). Yüksek sıcaklık stresi, protein yapısı ve işlevleri üzerinde de olumsuz bir etkiye sahiptir (Hasanuzzaman vd., 2013). Yüksek sıcaklık stresine karşı bitkilerdeki en yaygın moleküler tepki, ısı şok proteinlerinin (HSP'ler) ifadesidir (Wahid ve Close, 2007). Isı şok proteinleri, birçok normal hücrel süreçte protein katlanması, birleşmesi, translokasyonu ve yıkımından sorumludur ve stres altındayken proteinlerin denatürasyonunu önler (Hartl vd., 2011). Sonuç olarak HSP'ler, denatüre proteinlere bağlanır, bunların toplanmasını engeller ve termotoleransı korur (Su ve Li, 2008).

Üzümsü meyveler arasında en önemli grubu oluşturan çilek, benzersiz lezzet ve aroması, zengin antioksidan, organik asit, fenolik bileşik, vitamin ve özellikle ellagik asit (antikanserojenik ve antimutajenik) ve sindirimi kolaylaştıran selüloz içeriği sayesinde tüketicilerin ilgisini çeken bir meyvedir. Çilek tüketiminin ve üretiminin sürekli artmasına bağlı olarak, dünya üretimi de giderek artmaktadır. Dünya çilek üretimi 2021 yılında 9 175 384 tona ulaşmıştır. 2021 yılında Çin (3 389 620 19 ton), Amerika Birleşik Devletleri (ABD) (1 211 090 ton) ve Türkiye (669 195 ton) dünyanın en büyük çilek üreticileri olmuştur (FAO, 2023).

Çilekler, fotoperiyoda tepki olarak çiçeklenme açısından kısa gün, uzun gün ve nötr gün tipleri olarak gruplandırılır. Ticari çilek yetiştiriciliğinde çoğunlukla kısa ve nötr gün çilekleri kullanılmaktadır. Kısa gün çilekleri, 15°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kısa gün koşulları altında (<14 saat) ve 15°C'nin altındaki sıcaklıklarda fotoperiyottan bağımsız olarak çiçek tomurcuklarını oluştururlar (Darrow, 1966). Kısa gün çilekleri kışın soğuklama etkisi altında yeniden vejetatif büyüme ve çiçeklenme gücü kazanırken (Risser vd., 1993), yazın günler uzadıkça ve sıcaklık arttıkça büyüme azalır (Durner ve Poling, 1988). Uzun gün çileklerinde gün uzunluğu 12 saatten daha uzun olduğunda çiçeklenme başlar (Darrow ve Waldo, 1934). Nötr gün çileklerinde ise çiçek tomurcuğu oluşumu fotoperiyoda bağlı değildir. İlk çiçek tomurcukları dikimden 1-2 ay sonra ortaya çıkar ve büyüme mevsimi boyunca meyve verirler. Çileklerin fotoperiyodik tepkisi, sıcaklığın etkisi ile karmaşık hale gelir (Mookerjee vd., 2013).

Çilek, ideal yetiştirme sıcaklığının 18–26°C arasında olması nedeniyle ılıman iklimlerde yetişir (Strik, 1985). Geniş alanlarda yetiştirilen bir tür olarak çilekler hem açıkta yetiştiricilikte hem de sera yetiştiriciliğinde sıklıkla yüksek sıcaklık stresine maruz kalmaktadırlar (Kesici, 2009). Bu tehdit küresel ısınmanın etkisiyle giderek artmaktadır. Çileklerde yüksek sıcaklıklar morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve

moleküler değişikliklere neden olur. Çilekler için 18-26°C sıcaklıklar genellikle optimum olarak tanımlanır (Wang ve Camp, 2000). 35°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda büyüme ve verimde önemli ölçüde azalma görülür (Sorkel vd., 2006). Genellikle 30°C çilekler için kritik bir sıcaklıktır. Çeşitlere bağlı olarak 30°C ve üzerindeki yüksek sıcaklıklar generatif büyüme ve gelişmeyi, meyve kalitesi ve bitki büyümesini olumsuz etkiler (Gulen vd., 2011; Palencia vd., 2013; Balasooriya vd., 2016). 30°C'nin üzerindeki sıcaklıkların meyve büyüklüğünü (Wang ve Camp 2000), meyve ağırlığını (Kumakura ve Shishido, 1994) ve tüm bitki gelişimini (Hellman ve Travis, 1988) azalttığı bilinmektedir. Mori (1998), 32/27°C (gündüz/gece) sıcaklığın, sırasıyla 24/19°C ve 20/15°C'ye kıyasla daha düşük aken oluşumuna neden olduğunu bildirmiştir. Wang ve Camp, (2000) 30/22°C sıcaklığın, çilek meyvelerinde şeker ve toplam karbonhidratlar, askorbik asit ve toplam organik asitlerde önemli bir azalmaya neden olarak meyve kalitesini olumsuz etkilediğini öne sürmüştür.

Yüksek sıcaklıklarda yetişen çileklerin, strese karşı savunma mekanizması olarak daha fazla fenolik madde ve antioksidan kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Rekika vd., 2005). Gulen ve Eriş (2003), yüksek sıcaklık uygulamalarında (30, 35, 40 ve 45°C) kontrol bitkilerine (25°C) kıyasla, çilek bitkilerinde iyon sızıntısı, turgor kaybı ve klorofil içeriğinin arttığını, oransal su içeriğinin azaldığını belirlemişlerdir. Toplam protein ve DNA içerikleri de ısı stresi uygulamaları (kademeli ve şok ısı stresi) tarafından önemli ölçüde değiştirilmiştir. Ergin vd. (2012a), kademeli ve şok ısı stresinin 'Redlands Hope' (yüksek sıcaklığa tolerant) ve 'Cal-Giant 3' (yüksek sıcaklığa hassas) üzerindeki etkilerini karşılaştırmışlardır. Her iki ısı stresi uygulamasında da 'Cal-Giant 3'ün, 'Redlands Hope'den daha yüksek iyon sızıntısı ve hidrojen peroksit (H₂O₂) seviyelerine sahip olduğunu bulmuşlardır. Kademeli ısı stresi, şok ısı stresinden daha yüksek peroksidaz (PRX) aktivitesi ile sonuçlanmıştır. 'Redlands Hope'un PRX bant yoğunlukları 'Cal-Giant 3'e kıyasla daha düşük olmuştur. Sorkel ve Gaganpreet (2006), yüksek sıcaklığa (40/35°C) maruz bırakılan çilek çeşitlerinde ('Chandler' ve 'Sweet Charlie'), orta (30/25°C) veya düşük sıcaklığa (20/15°C) maruz bırakılanlara göre fotosentez, büyüme ve meyve veriminde önemli bir azalma gözlemlemiştir. Kesici (2009) 50°C'ye maruz bırakılan çilek bitkilerinde kontrol (30/15°C) bitkilerine kıyasla MDA içeriğinde 3.1 kat artış olduğu sonucuna varmıştır. Ergin (2012b), tolerant 'Redlands Hope' ve hassas 'Festival' çilek çeşitlerini yüksek sıcaklık stresine (2 saat boyunca 35, 40, 43, 46, 49, 52, 55 ve 60°C) maruz

bırakmıştır. Çalışmada çilek bitkilerindeki HSP yoğunluğunun çeşitler ve ısı stresi uygulamaları (kademeli ve şok ısı stresi) arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur. Isı stresine tepki olarak birkaç yeni protein ortaya çıkmış ve bazı proteinlerin yoğunluğu azalmıştır. Çalışmada ayrıca HSP 60 antikorunun, her iki çeşitte de, 23 kDa olarak tahmin edilen bir bandı tanıdığı ve bu proteinin çilek bitkilerinde ısı stresi toleransından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür.

Yüksek sıcaklık stresi fotosentetik elektron taşınımı, ribuloz-1,5-bisfosfat (RuBP) rejenerasyon kapasitesi (Wise vd., 2004) ve ribuloz 1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco) protein içeriğinde bozulmaya ve Rubisco aktivitesinde azalmaya neden olur (Sharkey, 2005). Kesici vd. (2013), yüksek sıcaklığa tolerant 'Elsanta' ve 'Redlands Hope' çeşitlerinin klorofil içeriklerinin düşük; yüksek sıcaklığa hassas 'Cal-Giant 3' ve 'Whitney' çeşitlerinin klorofil içeriklerinin yüksek olduğunu bildirmiştir. Nathewet (2017) sıcaklık stresinin (39/29°C) kontrol bitkilerine (25/25°C) kıyasla tüm çilek çeşitlerinde ('DN 1', 'NO.329', 'Pharajchatan 60', 'Akihime' ve 'Sachinoka') düşük transpirasyon oranı, stoma iletkenliği ve CO₂ asimilasyonuna neden olduğunu bildirmiştir. Isı stresi koşullarında yetiştirilen çilek çeşitleri arasında, 'Para-jchatan 60' belirgin bir şekilde en düşük yaprak sıcaklığı ve iyon sızıntısı değerlerine sahip olmuştur. Aghdam vd. (2020), ısı stresi koşulları altında (42°C'de 3 saat) en düşük flavonoid içeriğinin 'Parus' ve 'Gaviota' çilek çeşitlerinde olduğunu belirlemişlerdir.

Çilek bitkileri için en zorlayıcı çevresel faktör yüksek sıcaklıklardır, genellikle 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklar çilek yetiştiriciliği için kritik öneme sahiptir. Dolayısıyla çilek, hem açıkta yetiştiricilikte, hem de ortalama sıcaklıkları artırmaya eğilimli olan seralardaki yetiştiricilikte, farklı gelişim aşamalarında yüksek sıcaklık stresine maruz kalmaktadır. Bu durum gelecekte çilek yetiştiriciliği için daha da kritik hale gelecektir. Çünkü dünyada sıcaklığın 2030 ile 2050 yılları arasında 1.5°C, yüzyılın sonunda yaklaşık 3°C artacağı tahmin edilmektedir (Masson-Delmotte, 2018).

Yüksek sıcaklık stresine verilen tepkiler çilek tür ve çeşitlerine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Dünyada çoğunlukla kısa gün çilekleri yetiştirilmekle birlikte, sürekli çiçeklenme ve meyve verme kapasiteleri nedeniyle yüksek verim potansiyeline sahip olan nötr gün çileklerine ilgi giderek artmaktadır. Nötr gün çilekler, kısa gün çeşitlerinin hasat döneminin bittiği yaz-sonbahar aylarında meyve vermeye devam ederek, çilek üretim sezonunun uzamasında önemli rol

oyunmaktadır. Günümüzde yetiştirilen nötr gün çilek çeşitleri genellikle Kaliforniya kökenli olup, karasal iklimlerdeki yüksek yaz sıcaklıklarından olumsuz etkilenmektedirler. Bu durum bu çeşitlerin yetiştiricilik alanlarını sınırlamaktadır. Bu nedenle günümüzde çilek ıslahında en önemli konulardan biri, yüksek sıcaklık stresine toleransı yüksek nötr gün çilek genotipleri elde etmektir. Bununla birlikte, yüksek sıcaklıkların çilek verimi, meyve kalitesi ve bitki gelişimi üzerine etkileri esas olarak kısa gün çilek çeşitlerinde araştırılmış olup, yüksek sıcaklık stresi mekanizmasının belirlenmesine yönelik çalışmalar her iki çilek tipinde (kısa ve nötr gün) de sınırlıdır. Yüksek sıcaklık stresi altında çilek çeşitlerinin bireysel tolerans düzeylerinin, fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerinin, gen ifadelerindeki değişikliklerinin belirlenmesine yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışma, bazı kısa gün ve nötr gün çilek genotiplerinin yüksek sıcaklık stresine karşı tolerans düzeylerini belirlemek; yüksek sıcaklık stresi altında meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal tepkiler ile yüksek sıcaklığa tolerans/hassasiyetin moleküler mekanizmalarını belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Çalışmanın özel amaçları aşağıda özetlenmiştir:

- Yüksek sıcaklık stresine tolerant ve hassas çilek çeşitlerini belirlemek
- İncelenen çeşitlerin yüksek sıcaklık stresi altındaki fizyolojik ve moleküler tepkileri ışığında tolerans mekanizmalarının açıklanmasını sağlamak
- Yüksek sıcaklık toleransı ile ilgili yapılacak ıslah çalışmaları açısından fizyolojik ve moleküler düzeyde bilgi sağlamak

Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, çileklerdeki yüksek sıcaklık stresinin fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmasının anlaşılmasına, gelecekte yüksek sıcaklıklarla ilgili genlerin haritalanmasına yönelik çalışmalara ve böylece yüksek sıcaklık stresine tolerant çeşitlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Çileğin Kısa Tanıtımı

Yabani çilek türü *Fragaria vesca*, 17. yüzyılda Kanada'nın doğusundan gelen *Fragaria virginiana* türü ile yer değiştirinceye kadar yüzyıllar boyunca Avrupa çilek yetiştiriciliğinde hakim olmuştur. 1700'lerde yerli *Fragaria chiloensis* klonu, Fransız Kaptan Amédée Frézier tarafından Şili'den, Avrupa'ya getirilmiştir. Ancak getirilen bitkilerin tamamı erkek çiçekli bitkilerden oluşmuştur. Daha sonra Fransız bahçeciler *Fragaria chiloensis*'in *Fragaria virginiana* ile tozlaşmasıyla meyve elde edildiğini keşfetmişlerdir. Böylece Britanya'da, farklı meyve özellikleri ve morfolojik özelliklere sahip bitkiler ortaya çıkmıştır. 1766'da Fransız botanikçi Antoine Nicholas Duchesne bunları *Fragaria chiloensis* × *Fragaria virginiana* melezleri olarak tanımlayıp *Fragaria* × *ananassa* olarak isimlendirmiştir (Darrow,1966; Hancock vd., 2008).

Dünyada çilek çeşit ıslahı çalışmaları başlıca ABD, Avrupa (İngiltere, Almanya, Fransa, İtalya, İspanya, Hollanda), Avustralya ve Japonya'da yapılmıştır. Buralarda ıslah edilen önemli çeşitler aşağıda özetlenmiştir (Darrow, 1966; Hancock, 2006; Badenes ve Byrne, 2012; Husaini ve Neri, 2016; Demirsoy ve Lizalo, 2022; Sarıdaş, 2022).

Çilek ıslahı, 18. yüzyılın başlarında Britanya'da hız kazanmış ve 1817'de 'Downton' ve 'Elton' gibi ünlü çeşitler geliştirilmiştir. Bunları, 18. yüzyılın ikinci yarısında 'Noble' ve 'Royal Sovereign' çeşitleri takip etmiştir. Yirminci yüzyılın ortalarında Avrupa'da, özellikle İskoçya, İngiltere, Almanya ve Hollanda'da ıslah programları yürütülmüştür. İskoçya programından elde edilen 'Climax' çeşidi, İngiltere ve Kuzey Avrupa'da yaygın olarak yetiştirilmiş, bunu 'Redgauntlet' (1956) ve 'Talisman' (1955) çeşitleri takip etmiştir. İngiltere, en önemlisi 'Cambridge Favorite' olan Cambridge serisi çeşitleri geliştirmiştir. Almanya 1954'te 'Senga' serisi çilek çeşitlerini geliştirmiş, bunlardan 'Senga Sengana' popüler olmuştur. Hollanda'da 1960'ta 'Gorella' ve ünlü 'Elsanta' çeşidi elde edilmiştir. Avrupa'da çilek ıslahında daha sonraki ilerlemeler İspanya ve İtalya'da olmuştur. 2002 yılında José M. A. López İspanya'da, meyve büyüklüğü ve üniform meyve şekli ile ayırt edilen 'Sabrosa' çeşidini geliştirmiştir. İspanya'da geliştirilen diğer son çeşitler 'Cisco', 'Coral', 'Pedrone', 'Sabrina', 'Sabrosa', 'Candonge' ve 'Amiga' çeşitlerini içermektedir. İtalya son yıllarda 'Roxana' (2001), 'Alba' (2002), 'Asia' (2005), 'Murano' (2012) ve 'Malga' (2018) çilek çeşitlerini piyasaya sürmüştür. Fransa,

‘Ciflorette’, ‘Ciloe’, ‘Cigaline’, ‘Cireine’, ‘Cigoulette’, ‘Cifrance’, ‘Cirafine’ ve ‘Cirano’ olmak üzere çok sayıda çeşidi tescil ettirmiştir.

Fragaria × *ananassa* klonlarının 19. yüzyılın ortalarında Kuzey Amerika’ya getirilmesinden sonra, buradaki ıslah faaliyetleri hem kamu hem de özel sektörde önemli bir artış göstermiştir. 1836’da Kuzey Amerika çeşidi ‘Hovey’, Avrupa çileği Mulberry ile yerli bir *F. virginiana* klonunun melezlenmesiyle geliştirilmiştir. Daha sonra ‘Ettersburg 80’, Kaliforniya’daki yerli *F. chiloensis* klonlarından geliştirilerek ‘Huxley’ olarak yeniden adlandırılmıştır. Ondokuzuncu yüzyılın ortalarında, Kaliforniya Üniversitesi, Florida Üniversitesi ve ABD Tarım Bakanlığı (USDA) pek çok çeşidin geliştirilmesinde anahtar rol oynamıştır.

USDA, ‘Maryland’, ‘Beltsville’de 1929’da ‘Blakemore’, 1933’te ‘Fairfax’, ‘Pocahontas’, ‘Albritton’, ‘Surecrop’ ve ‘Sunrise’ gibi diğer önemli çeşitleri geliştirmiştir. Maryland’de 1950’lerde ‘Redchief’, ‘Guardian’, ‘Earliglow’ ve ‘Midway’ çeşitleri elde edilmiştir. Corvallis, Oregon’daki USDA programı, 20. yüzyılın ortalarında ‘Narcissa’ (1932), ‘Brightmore’ (1942), ‘Hood’ (1965) ve ‘Benton’ (1974) gibi önemli çeşitleri ıslah etmiştir.

Kaliforniya Üniversitesi 1945 yılında ‘Lassen’ ve ‘Shasta’ çeşitlerini üretmiştir. Özellikle, 1950’lerde Cal-Davis programı ‘Tioga’ (1964), ‘Tufts’ (1972), ‘Aiko’ (1975), ‘Pajaro’ (1979), ‘Chandler’ (1983), ‘Selva’ (1983), ‘Seascape’ (1991), ‘Ventana’ (1991) ve ‘Camarosa’ (1992) gibi Akdeniz bölgelerine adapte olan çeşitleri üretmiştir. ‘Camarosa’ ve ‘Chandler’ dünya çapında popülerlik kazanmıştır.

Florida’daki ıslah programları, kış boyunca meyve verebilen çok düşük soğuklama ihtiyacı olan çeşitler geliştirmeye odaklanmıştır. ‘Florida 90’ (1952) çok lezzetli, yüksek verimli ve erkencilik özellikleri nedeniyle bu ıslah programından seçilmiştir. Florida Üniversitesi sertliği ile bilinen ‘Florida’ ‘Festival’i (2000) ve arkasından erkenciliği nedeniyle Akdeniz bölgelerinde popülerlik kazanan ‘Florida Radiance’ (Avrupa’da Florida Fortuna) (2009) çeşitlerini geliştirmiştir.

Asya’da da aktif çilek ıslah programları mevcut olup, Japonya bu konuda başı çekmektedir. Japonya, ‘Fukuba’ (1899) ve ‘Kogyoku’ (1940) çeşitlerini ıslah etmiş, bu çeşitler şartlandırma (forcing) kültüründe önemli olmuşlardır. Geçmişte ‘Toyonaka’, ‘Nyoho’ ve ‘Tochiotome’ gibi çeşitler Japonya’da ana çeşitler olmuşlardır. Japon çilek çeşitlerinin çoğu, kasımdan mayısa kadar çilek üretimine olanak tanıyan kısa gün tipleridir. Bununla birlikte, son zamanlarda geliştirilen

‘Summer Princess’, ‘Summer Engel’, ‘Flamenco’ gibi çeşitler yıl boyu meyve üretimine imkan tanıyan çeşitlerdir.

Çilek çeşit ıslah programları dünya çapında yaklaşık 40 ülkede yürütülmektedir ve 1980 yılından bu yana 463 yeni çilek çeşidinin tescil edilmiştir. Bu çeşitlerin %17’si nötr gün çeşitleri olup, çoğunluğu ABD tarafından tescil edilmiştir. Nötr gün çeşitlerin geliştirilmesi, ılıman iklime sahip bölgelerde yaz ve erken sonbaharda meyve üretimine olanak sağlamıştır. Kaliforniya Üniversitesi, 1990’lardan itibaren ‘Seascape’ (1991), ‘Albion’ (2006), ‘Portola’ (2009), ‘Monterey’ (2009), ‘San Andreas’ (2009), ‘Royal Royce’ (2018), ‘Finn’ (2019), ‘Mojo’ (2019) gibi çok sayıda nötr gün çilek çeşidi geliştirmiştir. Avustralya da ‘Redlands Hope’ ve ‘Kabarla’ nötr gün çeşitlerini ıslah etmiştir.

Türkiye’de çilek ıslahı konusundaki çalışmalar sınırlıdır. Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü ‘Yalova-13’, ‘Yalova-14’, ‘Yalova-15’ ve ‘Yalova-104’ü geliştirmiştir (Konarlı, 1986). Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü 2009 yılında ‘Kaşka’, ‘Sevgi’ ve ‘Ebru’ isimli üç çilek çeşidini tescil ettirmiştir. Ayrıca Dr. Burhan Erenoğlu tarafından yürütülen ıslah programından 2012 yılında ‘Erenoğlu-77’, ‘Dorukhan-77’, ‘Doruk-77’, ‘Bolverim-77’, ‘Hilal-77’, ‘Eren-77’ ve ‘Ata-77’ isimli çeşitler tescil edilmiştir. Ayrıca Türkiye’de ‘Osmanlı’, ‘Arnavutköy’, ‘Ereğli’, ‘Karşıyaka’, ‘Kestel’, ‘Karaçilek’ ve ‘Tüylü’ Çilek gibi bazı yerel çilek çeşitleri de bulunmaktadır (Konarlı, 1986). Osmanlı, eşsiz aroması ve tadıyla bunların en ünlüsüdür.

2.2. Çileklerin Fotoperiyodik Sınıflandırılması

Ticari çilekler, çiçeklenme için gösterdikleri fotoperiyot isteğine göre kısa gün, uzun gün ve nötr gün çilekleri olarak gruplanırlar (Hancock, 2000; Demirsoy vd., 2012). Günümüzde yetiştiriciliği yapılan çileklerin çoğu kısa gün çeşitleridir, nötr gün çileklerin popülaritesi de giderek artmaktadır (Hancock vd., 2008).

2.2.1. Kısa gün çilekleri

Kısa gün çilek çeşitleri “haziran çilekleri” veya “tek ürün veren çilekler” olarak da isimlendirilir. Bu çilekler, çiçek tomurcuklarını 14 saatten kısa olan fotoperiyotlarda oluşturmaya başlarlar (Darrow, 1966). Ancak, sıcaklığın etkisini dikkate almadan çilekleri fotoperiyodik gruplar halinde sınıflandırmak doğru değildir. Kısa gün çileklerinde çiçek tomurcuğu oluşumu, kısa gün şartlarında 10-25°C arasında sürekli olmakta (Taylor, 2002), uzun gün şartlarında ise 10-15°C arasında gerçekleşmektedir (Darnell vd., 2003). Dolayısıyla kısa gün çilekleri

15°C'nin altındaki sıcaklıklarda fotoperiyottan bağımsız olarak çiçek oluşturabildikleri için “fakültatif kısa gün bitkileri” olarak adlandırılırlar (Demirsoy vd., 2012). Vejetatif ve generatif büyüme fotoperiyot ve sıcaklık tarafından etkilenen antagonistik bir ilişki ile düzenlenir (Brown ve Wareign, 1965; Heide ve Sønsteby 2007). Uzun fotoperiyot (>14-16 saat) ve yüksek sıcaklık (>17-20°C) kısa gün çileklerinde stolon oluşumunu teşvik eder (Brown ve Wareing, 1965; Hytönen, 2009), Kısa gün koşulları ve yüksek ışık yoğunluğu gövde ve floral meristem oluşumunu teşvik eder (Wagstaffe ve Battey, 2004; Hytönen vd., 2009). Kısa gün çileklerinde, sonbahardaki kısa fotoperiyotlar apikal meristemde çiçeklenmeyi, yazın uzun günler vejetatif büyümeyi teşvik eder (Heide, 1977; Battey vd., 1998; Battey, 2000; Heide ve Sønsteby, 2007). Genel olarak çeşitlere ve sıcaklığa bağlı olarak, kısa gün çileklerinde çiçek oluşumu için gerekli olan kritik fotoperiyot 8-12 saat, kısa gün döngüsü 7-24 gün arasında değişir (Heide, 1977; Hancock, 1999). Genel olarak 26-30°C'nin üzerindeki veya 9°C'nin altındaki sıcaklıklar, kısa gün ve nötr gün çileklerinde çiçeklenmeyi teşvik etmeyecektir (Ito ve Saito, 1962; Sønsteby ve Heide, 2006).

2.2.2. Nötr gün çilekleri

Nötr gün çilek çeşitleri, hem uzun hem de kısa fotoperiyotlarda 10-25°C arasında sürekli olarak çiçek ve meyve oluştururlar (Bringinghurst ve Voth, 1980; Durner vd., 1984; Nishiyama ve Kanahama, 2000). Nötr gün çilekleri, fotoperiyottan bağımsız olarak çiçek oluşturma yetenekleri; dikimden üç ay sonra çiçeklenme ve meyve verme eğilimleri ile karakterize edilir (Bringinghurst ve Voth, 1980; Ahmadi vd., 1990). Çilek bitkilerindeki nötr gün özelliği, ilkbahar ve yazın uzun günlerde çiçek tomurcuklarının farklılaşmasına izin vererek, yaz ve sonbaharda meyve üretimine olanak sağlar. Bu nedenle, nötr gün karakteri, çileklerin üretim sezonunu uzatmak için kritik bir role sahiptir (Shaw ve Famula, 2005). Nötr gün çilekleri kışları sıcak olan yerlerde kış üretimi ve yazları serin olan yerlerde yaz ve sonbahar üretimi için uygundur (Galletta ve Bringinghurst, 1990). Nötr gün çileklerini yetiştirmek için yaz boyunca sıcaklıklar 30°C'nin altında olmalıdır. Düşük eşik büyüme sıcaklığına sahiptirler ve kışa kadar devam eden meyve üretimi için büyümeye devam ederler (Ruan vd., 2013). 4-29°C arasındaki sıcaklıklarda vejetatif büyümeye ve çiçeklenmeye devam ederler (Durner vd.,1984).

Çilekte çiçeklenme sıcaklık ve fotoperiyodun etkileşimi ile yönetilir. Bu faktörler çiçek tomurcuklarının uyarılmasını ve farklılaşmasını etkiler. Serin yaz

sıcaklıklarının (17°C), uzun fotoperiyotlar altında bile kısa gün çeşitlerinde çiçeklenmeyi uyardığı belirlenmiştir. Ancak yüksek sıcaklıklar çilek tiplerinde çiçeklenmeyi engeller, ancak nötr gün çeşitlerinde kritik sıcaklığın daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Manakasem ve Goodwin, 2001; Stewart ve Folta, 2010). Nötr gün çeşitleri için ideal çiçek tomurcuğu farklılaşma sıcaklıkları 18-26°C'dir; mevcut nötr gün çeşitleri 30/26°C (gündüz/gece) veya üzerindeki sıcaklıklarda çiçek tomurcuğu oluşumunu tamamen durdururlar (Durner vd., 1984). Yüksek yaz sıcaklığı çiçeklenmeyi ve verimi olumsuz etkiler, ancak nötr gün çeşitleri kısa gün çeşitlerine göre daha iyi bir yüksek sıcaklık toleransına sahiptir (Draper vd., 1981; Galletta ve Bringhurst, 1990).

Nötr gün özelliğinin ticari oktoploit çeşitlere ilk başarılı aktarımı melezleme yoluyla, 1979'da Kaliforniya Üniversitesi, Davis'te Bringhurst ve Voth (1984) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar, *Fragaria virginiana* subsp'nin doğal klonlarından genleri ticari çilek çeşitlerine (*Fragaria* × *ananassa*) aktarmışlardır. Bu transfer, çilek endüstrisinde önemli gelişmelere yol açmıştır. Günümüzde, bu çeşitler Kaliforniya'nın çilek üretimine önemli katkılar sağlamıştır. İlk nötr gün çeşitleri olan 'Aptos', 'Brighton' ve 'Hecker'dan sonra Kaliforniya Üniversitesi 'Fern' (1983), 'Selva' (1984), 'Seascape' (1991), 'Diamante' (1997), 'Aromas' (1998) ve 'Whitney' (1999) çeşitlerini elde etmiştir. Kaliforniya Üniversitesi'nin daha sonra elde ettiği 'Albion', 'Monterey', 'Portola', 'San Andreas', 'Triumph', 'Cabrillo' gibi çeşitler günümüzde çok popüler olmuştur. Kaliforniya'da en son ıslah edilen nötr gün çeşitleri 'Royal Royce', 'Valiant', 'Moxie', 'Finn' ve 'Mojo' gibileridir. Günümüzde, Kaliforniya çilek endüstrisine nötr gün çeşitler hakimdir. Avrupa'da, özellikle oldukça serin yazlara sahip ve hasadın yaz ve sonbaharda 4-5 ay sürebildiği Kuzey Avrupa çilek endüstrisinde nötr gün çilek çeşitlerinin önemi giderek artmaktadır. 'Everest', 'Evie2', 'Murano', 'Eve Delight' ve 'Malga' gibi çeşitler yakın zamanda Avrupa'da ıslah edilen nötr gün çeşitleridir (Demirsoy ve Lizalo, 2022).

Nötr gün çilekleri, çiçeklenme kabiliyetine bağlı olarak güçlü, orta ve zayıf nötr gün çilekleri olarak üç gruba ayrılır. Güçlü nötr gün çilekleri yazın daha fazla çiçek açar ve daha az stolon üretir. Bu çeşitler aynı zamanda orta sayıda gövde ve küçük yapraklara sahip kompakt bitkiler olarak tanımlanır. Buna karşılık, orta ve zayıf nötr gün çilekleri, daha fazla stolon üretimine sahip olup kısa gün çileklerine daha fazla benzerler (Pritts ve Dale, 1989).

2.3. Yüksek sıcaklık stresine genel bir bakış

İklim değışikliği, küresel olarak gıda güvenliğini tehdit etmektedir. Artan nüfusun taleplerini karşılamak için, ekosistemlerin sürdürülebilirliği sağlanırken ürün verimliliğinin 2050 yılına kadar %25-70 oranında artırılması gerekmektedir. Ancak çeltik, buğday ve mısır gibi başlıca gıda ürünlerinin verim artış hızı 1960'lerden bu yana yavaşlamıştır ve mevcut verimlilik artışları gelecekteki ihtiyaçları karşılamak için yeterli değildir. Gelecekte aşırı iklim olaylarının (kuraklık, sıcak hava dalgası, don, şiddetli yağış, fırtına vb.) artması ve yoğunlaşması beklenmektedir. Bu iklimsel aşırılıklar, bitki büyüme ve gelişimini, ekosistemi ve insan yaşamını olumsuz etkileyecektir. İnsan kaynaklı faaliyetler ve sera gazı emisyonları nedeniyle küresel sıcaklıklardaki artış, mevcut iklim koşullarının önemli bir sonucudur. Önümüzdeki yüzyılda Dünya'nın sıcaklığının 1.1°C ila 6.4°C kadar artabileceği ve bunun da bitkilerde büyüme ve toplam verimliliği ciddi ölçüde engelleyebileceği öngörülmektedir (Yamori vd., 2014). Bu yüzden bilim insanları bitkilerde stres toleransını arttırmanın yollarını araştırmaktadırlar. Son zamanlarda, sık sık yaşanan şiddetli sıcak hava olayları, dünya çapında farklı bitki türlerinde birçok fenolojik bozukluğa neden olmaktadır (Lamichaney vd., 2021). Sıcaklık stresi nedeniyle yüzyılın ikinci yarısında bitkisel üretimde meydana gelecek verim kayıplarının %40 artması beklenmektedir (Shahzad vd., 2021).

Normalin üzerindeki sıcaklıklar tüm canlı organizmalar tarafından sıcaklık stresi olarak algılanır. Yüksek sıcaklıklar yaprak sıcaklığında, stoma geçirgenliğinde ve solunumda fizyolojik artışlara neden olur (Mittler, 2006). Sıcaklık stresi hücre dengesini bozarak büyüme ve gelişmede ciddi gerilemelere ve hatta ölüme neden olur. Pasif hareket eden organizmalar olan bitkiler, sıcaklık değışiminden ve diğer abiyotik streslerden sıklıkla etkilenmektedir (Kotak vd., 2007). Son 140 yılda artan küresel CO₂ konsantrasyonu, sıcaklıkların 0.5 ve 0.7°C arasında yükselmesine neden olmuştur ve bu artış önümüzdeki 50 ile 100 yıl boyunca her 10 yılda 0.2°C'ye kadar artacaktır. Sıcaklıktaki her 1.5°C'lik artış, sıcak bölgelerin 50 ile 80 km güneye yayılmasına neden olacaktır (Else ve Atkinson, 2010). Daha yüksek sıcaklıklar, üretimin daha kuzeye (veya güney yarımkürede daha güneye) kaymasına ya da aynı bölgelerde daha yüksek kesimlerde daha uzun üretim dönemlerine neden olacaktır. 2011 yılında yayınlanan İklim Değişikliği Ulusal Eylem Planında, Türkiye'de yıllık ortalama sıcaklıkların 2.5-4°C artacağı ve bu artışın Ege ve Doğu Anadolu Bölgelerinde 4°C'yi, iç bölgelerde 5°C'yi aşacağı belirtilmektedir. Türkiye'nin yakın

gelecekte daha sıcak, daha kurak ve yağış açısından daha belirsiz bir iklime sahip olacağı öngörülmektedir (Anonymous, 2014).

Bitkilerde ciddi hücrel zarara yol açan yüksek sıcaklık, kuraklık, soğuk ve tuzluluk, ana abiyotik stresler olarak bilinmektedir. Abiyotik stresler genellikle birbiriyle ilişkilidir. Bitki büyümesi ve verimlilik üzerinde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere neden olarak olumsuz etkiler yaparlar (Bita ve Gerats, 2013). Yüksek sıcaklıkların bitkiler üzerindeki etkileri tür ve genotipe bağlıdır (Barnabás vd., 2008; Bita ve Gerats, 2013). Yüksek sıcaklık tohum çimlenmesinin engellenmesine, bitki büyümesinde azalmaya, fotosentezde bozulmalara, fenolojide değişikliğe, meyve veriminde azalmaya, düşük meyve kalitesine ve oksidatif strese neden olur (Hasanuzzaman vd., 2013). Sıcaklık stresi, solunum ve fotosentez süreçlerinde değişikliklere neden olarak yaşam döngüsünün kısılmasına ve bitki verimliliğinin azalmasına yol açar (Barnabás vd., 2008). Sıcaklık stresi, erken etkilerini kloroplast protein komplekslerinde yapısal değişiklikler ve enzim aktivitesinde azalma şeklinde gösterir (Ahmad vd., 2010). Tüm bitki türlerinde, yaprak gaz değişimi etkinliği ile sıcaklık stresi arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Aktif ribüloz-1, 5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco) miktarındaki azalma, sıcaklığın net fotosentez üzerindeki önemli olumsuz etkisiyle ilişkilidir (Salvucci ve Crafts-Brandner, 2004). Karbon fiksasyonunun engellenmesi, ROS'ların oluşmasına ve ardından oksijenin azalmasına yol açar. Sonuç olarak, yaprak fotosentezi ve fotosentez ürünlerinin dağılımının yönlendirilmesi, yüksek sıcaklık koşullarında ürün verimliliğini artırmak için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır (Ainsworth ve Ort, 2010). Genellikle, sıcaklığa dayanıklı bir çeşit, daha yüksek fotosentez oranı, tilakoid zarının artan termo-stabilitesi ve sıcaklıktan kaçınma (Nagarajan vd., 2010; Scafaro vd., 2010) yeteneği ile karakterize edilir.

Bitkiler fizyolojik, morfo-anatomik ve biyokimyasal değişiklikler yoluyla yüksek sıcaklık stresi ile başa çıkabilir. Yüksek sıcaklık stresi altında bitkiler, daha iyi stomatal düzenleme ve artan fotosentez oranı için bitkilerde su tutmaya yardımcı olan ozmolitler biriktirir. Bitkiler ayrıca yüksek sıcaklık stresiyle başa çıkmak için hücre boyutunda küçülme, stomaların kapanması, stoma ve tüy yoğunluğunda artış ve daha büyük ksilem damarları gibi bazı morfo-anatomik değişiklikler sergiler. Yüksek sıcaklıkla başa çıkmanın üçüncü mekanizması, biyokimyasal değişikliklerdir. Bitkiler stresle ilgili proteinleri artırarak, bitki hücrelerinde

antioksidanların (süperoksit dismutaz (SOD); Katalaz (CAT) ve PRX) aktivitelerini artırır. Bu antioksidanlar, ROS'u temizler, fotooksidasyonu azaltır, kloroplast zarının bütünlüğünü korur ve fotosentez oranı artırır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Yüksek sıcaklık stresıyla başa çıkmak için bitkilerin gösterdiği morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiminin şematik gösterimi (Waraich vd., 2012).

2.4. Çileklerde yüksek sıcaklık stresinin etkileri

Yüksek sıcaklık, bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde etkili olan en önemli çevresel faktörlerden biridir. Yüksek sıcaklık stresi genellikle bitki büyüme ve gelişiminde, fizyolojik süreçlerde ve verimde olumsuz değişikliklere neden olur (Levitt, 1980). Yüksek sıcaklık stresi, özellikle optimum büyüme sıcaklığından 1.5-6°C'lik bir artış, hücre membranlarının zararlanmasına, fotosentezin engellenmesine, bitki büyüme ve gelişimini sınırlayan yaşlanma gibi değişikliklere neden olur.

Yüksek sıcaklık stresi, diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi, çilek bitkisinde de verimi etkileyen önemli faktörlerden biridir. Hem örtü altında hem de açıkta yetiştirilen çilek bitkileri çok sık yüksek sıcaklıklara maruz kalabilmektedir. Bu nedenle yüksek sıcaklık stresinin, çilek bitkisinin fizyolojik tepkileri üzerindeki etkisinin araştırılması, verimli bir yetiştiricilik için büyük önem taşımaktadır. Yüksek sıcaklık stresi çileklerde vejetatif büyümeyi ve kök büyümesini; meyve büyüklüğü ve verimi azaltır; çiçek tomurcuğu oluşumu, çiçeklenme, tozlaşma ve döllenme, aken ve

meyve gelişimine kadar generatif büyüme ve gelişiminin tüm aşamalarını etkiler. Çiçek tomurcuğu oluşumu, çilek tiplerine ve gün uzunluğuna bağlı olarak, 8°C'nin altındaki ve 26°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda engellenir, 20°C'nin üzerindeki sıcaklıklar çiçek sayısını azaltır, 30°C'nin üzerindeki daha yüksek sıcaklıklar genel bitki büyümesini azaltır ve 35°C'nin üzerindeki sıcaklıklar çilek bitkilerinin büyümesini durdurur. Antezisden olgunlaşmaya kadar olan periyottaki yüksek sıcaklıklarda meyve hızlı büyür ve küçük kalır (Darrow, 1966; Dana, 1980; Kumakura ve Shishido, 1994; Hancock, 1999; Ledesma vd., 2008; Mackenzie ve Chandler, 2009; Chen, 2013). Chen (2013) meyve gelişiminin farklı zamanlarda yüksek sıcaklıktan etkilendiğini bildirmiştir. Ovül sayısı 16 /11°C ve 20 /15°C gibi serin sıcaklıklarda en yüksek olmuştur. Akenlerin embriyoları 32/27°C sıcaklıkta aborsiyona uğramıştır. Ovül sayısının çiçeklenme öncesi sıcaklığın bir fonksiyonu olduğu; ovül başına meyve hacminin çiçeklenmeden meyve olgunlaşmasına kadar geçen dönemdeki sıcaklıklar tarafından belirlendiği sonucuna varılmıştır (Chen, 2013). Sıcaklıktaki bir artış meyve şekli, meyve büyüklüğü, meyve rengi (Wang ve Camp (2000), toplam polifenol içeriği, antioksidan kapasitesi, toplam flavonoid içeriği, C vitamini (Balasooriya vd., 2016), şeker, organik asit, titre edilebilir asit içeriği ve meyve sertliğinde değişikliklere neden olur (Klamkowski ve Treder, 2008)

Yüksek sıcaklığa dayanıklı genotiplerin geliştirilmesi, yüksek sıcaklıkların zararlarını önlemede en etkili yoludur. Farklı çilek tür ve çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresine tolerans mekanizması üzerinde yapılacak çalışmalar, toleran çeşit geliştirme bakımından önemlidir. Yaygın yetiştirilen çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklık stresine toleransı hakkındaki bilgiler sınırlıdır.

Gulen ve Eriş (2003), yüksek sıcaklık uygulamalarının 'Camarosa' çilek çeşidi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çilek bitkilerini 25 °C'den 45°C'ye kadar her 48 saatte 5°C sıcaklık artışıyla kademeli ve şok sıcaklıklara maruz bırakmışlardır. Kontrol ve stres uygulamalarında yaprak oransal su içeriği (YOSİ), turgor kaybı, klorofil içeriği ve kullanılan çeşitlerin yüksek sıcaklık stres toleransı (LT₅₀) araştırılmıştır. Kademeli ve şok şeklindeki yüksek sıcaklıkların etkileri klorofil içeriği dışında incelenen tüm özellikler üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuştur. Sıcaklık stresi, toplam protein ve DNA içeriğini önemli ölçüde değiştirmiştir. Kademeli sıcaklık uygulamalarında, şok sıcaklıklara göre artan bir tolerans gözlemlenmiştir. Bu toleransın, bazı HSP'lerin ifadesi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.

Gulen ve Eriş (2004), yüksek sıcaklığın çilek ('Camarosa') yapraklarındaki PRX izoenzim aktivitesi ve yaprak proteinleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çilek fideleri 3 hafta boyunca 25/10°C gündüz/gece sıcaklığında yetiştirilmiş; daha sonra bitkilerin yarısı bir hafta boyunca 25°C sıcaklıktaki büyüme odasına aktararak aklimasyonları sağlanmıştır. Ardından sıcaklık, kademeli olarak 48 saatte 5°C artışla 30, 35, 40 ve 45°C'ye yükseltilmiştir. Aklime olmuş bitkilere ek olarak, her sıcaklık basamağında dışarıdan yeni bitkiler büyüme odasına aktararak şok sıcaklıklara maruz bırakılmışlardır. Genel olarak, kademeli ve şok sıcaklık stresi, incelenen parametreler üzerinde önemli etkiler yapmıştır. Yüksek sıcaklık uygulanan tüm örneklerde PRX aktiviteleri artmış; toplam protein içeriği ise azalmıştır. Kademeli yüksek sıcaklıklarda, şok yüksek sıcaklıklara göre daha yüksek PRX enzim aktivitesi, daha az elektrolit sızıntısı görülmüştür.

Wagstaffe ve Battey (2004) uzun gün çeşidi 'Everest'te uzun bir hassat sezonu için gerekli optimum sıcaklıkların belirlenmesi üzerinde çalışmışlar, yükselen sıcaklıklara karşı koruma sağlayan gece sıcaklığının önemli olduğunu tespit etmişlerdir.

Matsubara vd. (2004) arbusküler mikoriza bakterileri ile enfekte edilen çileklerde, enfekte edilmeyenlere kıyasla yüksek sıcaklıklarda (>35°C) daha iyi büyüme özellikleri (yaprak ve kök sayısı, yaprak ve kök kuru ağırlığı, gövde çapı, taç çapı) gözlemiştir.

Verheul vd. (2005), 'Korona' çilek çeşidinin çiçeklenmesi üzerine fotoperiyodun (10, 12, 16, 20 ve 24 saat), sıcaklığın (12, 15, 18, 24 ve 30°C), kısa gün uygulama süresinin ve bitki yaşının (4, 8 ve 12 hafta) etkileşimini çalışmıştır. 21 gün boyunca 12-18°C gündüz sıcaklıklarında 10 ve 12 saatlik fotoperiyotlarda yetişen bitkilerde tam çiçeklenme meydana gelmiştir. Sıcaklıktaki daha fazla artış, bitki başına çiçek sayısında azalmaya neden olmuştur.

Ledesma ve Sugiyama (2005) Japon çilek çeşitleri 'Toyonoka' ve 'Nyoho' polenlerinin çimlenmesini 30/25 ve 23/18°C'de karşılaştırmış ve 'Toyonoka' polenlerinin yüksek sıcaklık uygulamasında daha düşük çimlenme yüzdesine ve daha kısa polen tüplerine sahip olduğunu bulmuştur.

Wang ve Lin (2006) de artan gündüz/gece sıcaklıklarına maruz kalan 'Korona' ve 'Elsanta' çeşitlerinde membran lipid içeriğinde farklılıklar bulmuştur. Çeşitlerin artan fotoperiyot ve gündüz/gece sıcaklık kombinasyonlarına tepkileri

incelendiğinde, çiçek üretimi açısından ‘Korona’nın fotoperiyot ve sıcaklığa Elsanta’dan daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Kadir vd. (2006), üç farklı sıcaklıkta (düşük: 20/15°C, orta: 30/25°C, yüksek: 40/35°C) tutulan ‘Chandler’ ve ‘Sweet Charlie’ çeşitlerinde fotosentez ve verimlilik üzerine yüksek sıcaklığın etkisini araştırmışlardır. Yüksek sıcaklık fotosentez ve verimlilik için zarar verici olurken, orta dereceli sıcaklık vejetatif büyüme için en uygun olmuştur. Özellikle ‘Sweet Charlie’de net CO₂ asimilasyon oranı ve diğer fotosentetik parametreler 40/35°C’de belirgin şekilde azalmıştır. ‘Chandler’ ise yüksek sıcaklık stresi altında daha uzun süre daha yüksek oranlar göstermiştir. Isı tolerans mekanizmaları bakımından çeşitler farklılık göstermiştir. ‘Chandler’ çeşidinin yaprakları yüksek sıcaklıklarda daha serin olup daha fazla transpirasyon göstermiştir. Yüksek sıcaklıklar fotosistem II için geri dönüşü olmayan hasara neden olmuştur. Asimilasyon oranlarındaki azalma stoma iletkenliğindeki değişikliklerden çok, hasara bağlı olmuştur. Yüksek sıcaklıklar yaprak alanı, sürgün, kök ve biyokütle gibi büyüme parametrelerini azaltmıştır. Kökler sürgünlere göre optimal olmayan sıcaklıklara daha duyarlı olmuştur. Orta sıcaklıklar ‘Chandler’ çeşidinde verimin maksimum olmasını sağlamıştır. Meyve kabuk rengi gibi meyve kalite parametreleri de sıcaklığa bağlı olmuştur. Çeşit veya süreye bakılmaksızın, yüksek sıcaklığın en fazla zararı meyve tutumu üzerine olmuştur.

Ledesma vd. (2008) yüksek sıcaklık stresinin (23/18 ve 30/25°C) çilek çeşitlerinin (‘Nyoho’ ve ‘Toyonoka’) generatif gelişimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Yüksek sıcaklığa (30/25°C) maruz kalan bitkilerin çiçek salkım sayısı, meyve büyüklüğü ve meyve boyutunda, meyve tutum oranında azalma meydana gelmiş, olgunlaşma süresi daha kısa olmuştur. Meyvelerin nispi büyüme oranları her iki çeşit ve her iki sıcaklıkta iki tepe noktası göstermiş, her iki tepe noktası da 30/25°C’de 23/18°C’ye göre daha erken ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar, yüksek sıcaklık stresinin çilekte generatif gelişim sürecini olumsuz etkilediğini ve bitkinin yüksek sıcaklık stresine verdiği tepkinin çeşitle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Ergin vd. (2012a) yüksek sıcaklık stresinin etkilerini, yüksek sıcaklığa toleran (‘Redlands Hope’) ve duyarlı (‘Cal-Giant 3’) olan iki çilek çeşidi üzerinde araştırmıştır. Bitkilerden toplanan yaprak örnekleri kademeli olarak 35, 40, 43, 46, 49, 52, 55 ve 60°C’ye çıkartılan sıcaklıklara maruz bırakılmıştır. Diğer grup yaprak örnekleri ise her sıcaklığa doğrudan maruz bırakılarak şok yüksek sıcaklık stresine

tabii tutulmuştur. Her sıcaklık uygulaması sonrası elektrolit sızıntısı, hidrojen peroksit (H_2O_2) seviyeleri ve PRX enzim aktivitesi değerlendirilmiştir. Hem kademeli hem de şok yüksek sıcaklık uygulamalarında, elektrolit sızıntısı ve H_2O_2 seviyeleri 'Cal-Giant 3'de 'Redlands Hope'den daha yüksek bulunmuştur. Genellikle PRX band yoğunlukları 'Cal-Giant 3'de 'Redlands Hope'den daha yüksek olmuştur. Yüksek sıcaklığa tolerant Redlands Hope çeşidinde, daha az PRX aktivitesi, buna karşın daha az H_2O_2 birikimi ve hücrel zarar olması, diğer savunma sistemlerinin etkileriyle ilişkilendirilmiştir.

Kesici vd. (2013), 15 çilek çeşidinin yüksek sıcaklığa tepkisini araştırmıştır. Çalışılan çeşitlerin saksılarda yetiştirilen frigo bitkileri büyüme odasına aktarılmış ve ardından sıcaklıkları 35°C'den 40, 45 ve 50°C'ye kadar kademeli olarak artırılmıştır. 'Elsanta' ve 'Redlands Hope' en yüksek, 'Festival' ve 'Cal-Giant 3' en düşük oransal su içeriğine sahip olmuştur. Bununla birlikte, 'Elsanta' ve 'Redlands Hope' en düşük, 'Festival' ve 'Cal-Giant 3' en yüksek turgor kaybına sahip olmuşlardır. 'Elsanta' ve 'Redlands Hope' en düşük, 'Cal-Giant 3' ve 'Whitney' en yüksek klorofil içeriği göstermişlerdir. Tüm çeşitlerde artan sıcaklıkla birlikte LT_{50} önemli derecede düşmüştür. Çeşitlerin LT_{50} değerleri 51.8 ila 52.9°C arasında değişmiştir. Toplanan verilere göre, 'Elsanta', 'Redlands Hope' ve 'Camarosa' nispeten yüksek sıcaklığa tolerant çeşitler olarak belirlenirken, 'Whitney', 'Fern', 'Festival' ve 'Cal-Giant 3' hassas çeşitler olarak belirlenmiştir.

Kesici vd. (2020) yüksek sıcaklıklara dayanıklılıkta çilek çeşitleri arasındaki farklılıkları gen ifadelerine bağlı olarak araştırmışlardır. Bitkiler 35, 40, 45 ve 50°C olmak üzere 24 saatte bir artan sıcaklıklara maruz bırakılmıştır. 'Redlands Hope'un yüksek sıcaklık stresine toleransının, yüksek sıcaklık stresi tepkisinde önemli rol oynayan 'Hsp70', 'Hsp90' ve küçük ısı şok proteinlerinin (sHsp'ler) koordinasyonu ile açıklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Duyarlı 'Festival' çeşidinin yüksek sıcaklıklara sadece, yüksek sıcaklık stres yanıtında merkezi bir rol oynamayan düşük molekül ağırlıklı protein ve transkriptler ile yanıt verebildiğini bildirmişlerdir. Her iki çeşitte de yüksek sıcaklıklar tarafından tetiklenen alerjen gen ifadesi farklı seviyeler ile tespit edilmiştir. Duyarlı 'Festival' çeşidinde yüksek sıcaklık stresi şartlarında daha yüksek seviyede gözlenen alerjen gen ifadesinin, alerjen genler ile ısı stresi toleransı arasında negatif bir korelasyon olabileceği ileri sürülmüştür.

2.5. Bazı kültür bitkilerinde yüksek sıcaklık stresi ile ilgili araştırmalar

Liu ve Huang (2000), sıcaklığa tolerant ‘L-93’ ve sıcaklığa duyarlı ‘Penncross’ çimi çeşitleri üzerinde sıcaklık rejimlerinin (22/16°C ve 35/25°C) etkisini araştırmışlardır. Çim bitkilerinde artan sıcaklıkla birlikte MDA içeriği ve iyon sızıntısında artış, klorofil içeriğinde ise azalma gözlenmiştir.

Sairam vd. (2000) ‘C306’, ‘HD2285’ ve ‘HD2329’ buğday çeşitlerinin yüksek sıcaklık altındaki performansını, oksidatif zarar dereceleri ve antioksidan enzim aktivitelerini belirleyerek incelemişlerdir. Geç ekimden kaynaklanan sıcaklık yükselmesi, antezisten (çiçeklenmeden) 8 ve 23 gün sonra tüm çeşitlerde yaprak oransal su içeriğinde, askorbik asitte azalmaya ve MDA içeriğinde artışa neden olmuştur. Yüksek sıcaklık altındaki ‘C306’ çeşidinin (sıcaklığa tolerant) yaprakları, diğer çeşitlere kıyasla yüksek oransal su içeriğini, askorbik asit ve düşük H₂O₂ içeriği ile MDA içeriğini korumuştur. ‘HD2285’ çeşidi en yüksek SOD ve CAT değerini gösterirken, ‘C306’ çeşidi en yüksek askorbat peroksidaz (APX) aktivitesine sahip olmuştur.

Jiang ve Huang (2001), sıcaklık ve kuraklık stresinin *Festuca arundinacea* L. ve *Poa pratensis* L. bitkileri üzerindeki etkisini birlikte ve ayrı ayrı araştırmışlardır. Bitkiler, kısıtlı sulama koşulları altında 35/30°C (gündüz/gece) sıcaklıkta büyüme odasında yetiştirilmiştir. Yapılan ölçümlerde, her stres türünde yaprak oransal su içeriğinin azaldığı gözlenmiştir.

Chaitanya vd. (2001), yüksek sıcaklık stresinin dut yaprağı metabolizması üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Kontrollü koşullarda yetiştirilen dut bitkileri farklı zaman dilimlerinde (120, 240 ve 360 dakika) 40°C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Yüksek sıcaklık stresi klorofil içeriği, protein içeriği ve fotosentezde rol alan enzimlerin aktivitesi gibi çeşitli biyokimyasal parametrelerde değişikliğe yol açmıştır. Ayrıca bitkilerde oksidatif zarara neden olduğu bilinen ROS seviyelerinde de bir artış gözlenmiştir. Çalışmada dut bitkilerinin SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak yüksek sıcaklık stresinin etkilerini ortadan kaldıracak bir mekanizmaya sahip olduğu bulunmuştur. Bu enzimler, fazla ROS’u temizlemeye yardımcı olur ve bitkiyi oksidatif zarardan korur.

Anderson (2002), bitkiler 24/20°C (gündüz/gece) sıcaklıkta 8 hafta yetiştirildikten sonra yüksek sıcaklıkların biber (*Capsicum annuum* L.) üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu bitkiler 24, 48 ve 54°C sıcaklıklara 15 dakika süreyle

maruz bırakılmıştır. Bitkilere verilen zararın yüksek sıcaklıklarla doğrusal olarak arttığı belirlenmiştir.

Fletcher vd. (2005) sıcaklık stresi (18 saat gündüz, 30/30°C gündüz/gece, 150 lux) ve kontrol koşullarında (18 saat gündüz, 20/18°C gündüz/gece, 200 lüks) 7 nane hattının performansını incelemişler; sıcaklık stresine maruz kalan nane bitkilerinin, yapraklarda toplam fenolik asit, çözünür fenoller, rosmarinik asit biyosentezi ve toplam antioksidan kapasitenin önemli derecede azaldığını bulmuşlardır.

Almeselmani vd. (2006) yüksek sıcaklık stresinin beş buğday genotipinde (PBW 343, PBW 175, HDR-77, HD 2815 ve HD 2865) antioksidan enzim aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Araştırmada, vejetatif dönem, antezis ve antezisten 15 gün sonra olmak üzere farklı büyüme dönemlerinde, geç ve çok geç ekimler sırasında SOD, APX ve CAT aktivitesinde belirgin bir artış ortaya çıkmıştır. Buna karşılık, glutatyon redüktaz (GR) ve PRX aktivitesi, normal ekime kıyasla geç ve çok geç ekimlerde azalmıştır. Genotipler arasında, HD 2815 ve HDR-77, geç ekimlerde, yüksek SOD, APX, GR, CAT ve PRX aktivitesi sergilemiştir. Ayrıca, tüm genotipler, özellikle farklı büyüme aşamalarında geç ve çok geç ekimlerde, yaş ile birlikte klorofil içeriğinde azalma ve membran zararı indeksinde artış göstermiştir. Özellikle geç ve çok geç ekimlerde en yüksek antioksidan enzim aktivitesine sahip HD 2815 ve HDR-77'nin, klorofil içeriğindeki azalmanın en az olduğu ve daha düşük membran zararı indeksine sahip oldukları görülmüştür.

Mohammadi vd. (2007), sıcaklık toleransı açısından buğday çeşitlerinin ('MTRWA116', 'Opata' ve 'W7984') hücre zarı termostabilitesi, antioksidan aktivitesi, fenolik içeriği ve tane ağırlığı parametrelerini karşılaştırmışlardır. 39°C sıcaklığa maruz bırakılan bitkilerin performansı, kontrol ile karşılaştırılmıştır. Antioksidan aktivite ve membran stabilitesi verilerinin çeşit hassasiyetini belirlemek için yeterli olmadığı; tane ağırlığının sıcaklık stresi toleransını belirlemek için daha uygun bir parametre olduğu bulunmuştur.

Wahid ve Close (2007), yüksek sıcaklık stresinin neden olduğu dehidrin proteinlerinin (DHN'ler) ifadesini ve su ile ilgili ilişkilerini şeker kamışı yapraklarında araştırmıştır. Şeker kamışı fideleri, farklı sürelerde (4, 12, 24, 36, 48, 60 ve 72 saat) sıcaklık stresine (40/35°C gündüz/gece) maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, yaprakların su ve ozmotik potansiyeli ile oransal su içeriğinin, sıcaklık stresinin ilk 12 saati içinde hızlı bir düşüş yaşadığını göstermiştir. Ancak, bu değerler 24 saat içinde toparlanmaya başlamıştır. Ozmotik basınç potansiyeli başlangıçta azalmış,

ancak daha sonra artmış ve kontrol yapraklarındaki seviyelere yaklaşmıştır. Basınç potansiyelindeki bu artış serbest prolin, glisin betain ve çözünür şekerlerin birikimi ile yakından ilişkilidir. Bu bileşiklerin ozmotik ayarlama da rol oynadığı bilinmektedir, bu da sıcaklık stresi koşullarında hücre hidrasyonunun korunmasında rol oynamaktadır.

Yin vd. (2008), yüksek sıcaklık stresinin lilyum bitkisinin fizyolojik tepkisi üzerindeki kısa süreli etkisini araştırmışlardır. Lilyum bitkileri 20, 37, 42 ve 47°C sıcaklıklara maruz bırakılmış ve bitkiler her sıcaklıkta 10 saat tutulmuştur. 47°C'ye maruz bırakılan bitkilerin MDA içeriği ve iyon sızıntısı açısından diğer sıcaklıklara göre daha yüksek farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir.

Dalla vd. (2011) hidroponik sistemde yetiştirilen mısır marulu (*Valerianella locusta* L.) bitkilerini üç farklı sıcaklığa (15, 20 ve 25°C) maruz bırakmışlardır. Araştırma sonucunda, 20°C sıcaklığın yaprakta taze verim, yaprak sayısı, SPAD indeksi (klorofil içeriği) ve kök biyokütlesi açısından en iyi sonuçları verdiğini belirtilmiştir. Ayrıca bu sıcaklık, yapraklarda daha düşük nitrat birikimine yol açmış, bu da daha iyi kalite anlamına gelmiştir. Bununla birlikte, 25°C sıcaklıklar stres belirtilerine neden olmuş, büyümede azalmaya ve daha düşük yaprak kalitesine yol açmıştır. İlginç bir şekilde, daha yüksek sıcaklıklarda, yapraklarda fosfor, kükürt, çinko ve bakır birikiminde bir artış gözlenmiştir.

Cansev (2012), zeytin yapraklarının ('Gemlik' çeşidi) çeşitli sürelerdeki (30 dakika, 1 saat ve 2 saat) yüksek sıcaklık uygulamalarına (30°C, 40°C ve 50°C) fizyolojik tepkilerini araştırmıştır. Araştırmacı, daha uzun süreler ve daha yüksek sıcaklıkların yaprak oransal su içeriği, klorofil içeriği ve fotosentez oranında bir azalmaya yol açtığını bulmuştur. Yüksek sıcaklık uygulamaları elektrolit sızıntısı ve lipid peroksidasyon seviyelerini artırmış, bu da hücre zarlarına zarar vermiştir.

Kumar vd. (2013), nohut genotiplerinin generatif gelişim aşamasında sıcaklık zararını incelemiş ve genotipleri sıcaklığa tolerant (ICCV07110, ICCV92944) ve sıcaklığa duyarlı (ICC14183, ICC5912) olarak sınıflandırmışlardır. Farklı sıcaklık kombinasyonlarında (30/20, 35/25, 40/30 ve 45/35°C), artan sıcaklıkların nohut bitkilerinin generatif gelişimini olumsuz etkilediğini ortaya konulmuştur. Sıcaklık stresi, özellikle 45/35°C'de polen canlılığı, çimlenme, tüp büyümesi, polen yükü ve stigma alıcılığında bir düşüşe yol açmıştır. Sıcaklığa tolerant genotipler polen ve stigma işlevinde daha az zarara uğramışlardır. Yükselen sıcaklıklar, duyarlı genotipleri daha ciddi şekilde etkileyerek membran bütünlüğü, klorofil içeriği,

fotokimyasal verim ve hücre oksitleme yeteneğini inhibe etmiştir. Sıcaklık stresinin, 40/30 ve 45/35°C’de duyarlı genotiplerde daha yüksek lipid peroksidasyonu ve H₂O₂ içeriği ile belirgin oksidatif zarara yol açtığı görülmüştür. 40/30°C’de antioksidan seviyeleri artarken, 45/35°C’de önemli ölçüde azalmış, sıcaklığa tolerant genotipler daha yüksek APX ve GR aktivitesi ile her iki sıcaklıkta da yükseltilmiş askorbat ve indirgenmiş glutatyon seviyeleri sergilemiştir. Biyokütle, bakla tutumu ve verimi 40/30°C’de azalmaya başlamış ve 45/35°C’de en düşük düzeye inmiştir. Duyarlı genotipler 45/35°C’de bakla oluşturmamışken, tolerant genotipler bu sıcaklıkta sadece birkaç verimli bakla üretebilmiştir.

Djanaguiraman vd. (2014) sorgum genotiplerinin sıcaklık stresi toleransını belirlemek, yapraklarda ve polen tanelerinde oksidatif zararı incelemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Denemede, sorgum genotiplerini 10 gün boyunca optimum sıcaklığa (30/20°C gündüz/gece) ve yüksek sıcaklığa (38/28°C) maruz bırakmışlardır. Araştırmacılar yüksek sıcaklık stresinin, fotosentetik aktiviteyi azalttığını, rubisco aktivaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin transkript düzeylerini azalttığını ve hücre zarı zararına neden olduğunu bildirmişlerdir. Polen canlılığı, çimlenme ve tohum tutumu da yüksek sıcaklık stresinden olumsuz etkilenmiştir. Bazı genotipler yüksek sıcaklık stresine karşı daha iyi tolerans göstermiş, polen çimlenmesi için daha yüksek tavan sıcaklığı ve daha yüksek tohum tutma yüzdesi sergilemişlerdir. Temel bileşen analizi, DK-54-00, Pioneer 84G62, SC 1047 ve SC 1019 gibi belirli genotipleri yüksek sıcaklık stresine karşı tolerant olarak belirlemiş, DK 28-E, SC 15, B 35 ve TX 7078 gibi genotipleri ise duyarlı olarak tanımlamıştır. Tolerant genotiplerin yaprak ve polen tanelerinde daha az oksidatif zarar görülmüştür.

Wassie vd. (2019) sıcaklığa tolerant ve duyarlı çeşitleri ayırt etmek amacıyla 15 yonca çeşidinde fideleri 38/35°C gündüz/gece sıcaklığına yedi gün boyunca maruz bırakmışlardır. Sıcaklık stresi, sıcaklığa duyarlı çeşitlerde elektrolit sızıntısı ve MDA içeriğinin artması ile birlikte biyokütle, yaprak oransal su içeriği (YOSİ) ve klorofil içeriğinde belirgin bir azalmaya neden olmuştur., Buna karşılık, sıcaklığa dayanıklı çeşitlerde çözünür şeker ve protein seviyeleri yüksek olmuştur. Her çeşit için sıcaklık tolerans derecesi, üyelik fonksiyon değeri kullanılarak belirlenmiş, ‘Bara310SC’ ve ‘Magna995’, sırasıyla 0.86 ve 0.80 üyelik fonksiyon değerleri ile sıcaklığa dayanıklı olarak tanımlanırken, ‘Gibraltar’ ve ‘WL712’ 0.24 üyelik fonksiyon değeri ile sıcaklığa duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Klorofil analizi,

sıcaklığa duyarlı çeşitlerde fotosentetik aktivite üzerinde sıcaklık stresinin etkisini doğrulamıştır.

Bolton vd. (2019) havuç gen kaynaklarının tohum çimlenmesinde sıcaklık stresinin (24°C, 32.5°C, 35°C, 37.5°C ve 40°C) etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, 35°C'yi havuç tohumlarının sıcaklık toleransı için en uygun tarama sıcaklığı olarak belirlemişlerdir. İncelenen genotipler sıcaklık stresi (35°C) ve stres olmayan (24°C) koşullar altında test edilmiştir. Havuç genotipleri arasında sıcaklık toleransında önemli farklılıklar olmuştur. Yüzde çimlenmede mutlak azalma, inhibisyon indeksi, oransal sıcaklık toleransı ve sıcaklık tolerans indeksi için geniş bir değer aralığı gözlemlenmiştir. Bazı yabani hatlar ve saf hatlar düşük sıcaklık toleransı gösterirken, ABD, Türkiye, Çin ve Rusya'dan kültüre alınmış örnekler en yüksek sıcaklık toleransı göstermiştir.

Nijabat vd. (2020) yabani ve kültüre alınmış 215 adet havuç gen kaynağında erken ve geç fide gelişim aşamalarında sıcaklık stresinin hücre membran stabilitesi ve zararı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Ekimden sonra 15 gün boyunca ortalama 24°C ± 3°C sıcaklıkta yetiştirilen bitkiler, daha sonra üç sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu 24 °C ± 3°C'de kalırken, erken fidelerin hava sıcaklığı dikimden 30 gün sonrasına kadar; geç fidelerin hava sıcaklığı dikimden sonra 30-60 gün arasında 35°C ± 3°C'ye yükseltilmiştir. Sonuçlar, sıcaklık stresinin hücre membran stabilitesini olumsuz etkileyerek, elektrolit sızıntısında ve göreceli hücre zararında önemli bir artışa yol açtığını ortaya koymuştur. Özellikle, kültüre alınmış havuç çeşitleri yabani havuçlara göre daha yüksek sıcaklık toleransı göstermiş, PI 326009, PI 451754, L2450 ve PI 502654 hatları sıcaklığa tolerant olarak tanımlanmış ve sıcaklık stresi koşulları altında üstün hücre membran stabilitesi göstermişlerdir.

2.6. Yüksek sıcaklık stresi altındaki bitkilerde genetik değişiklikler

Bitkilerde savunma ve stres mekanizmalarıyla ilgili birçok çalışmanın, gen ifadeleriyle ilişkili olduğu anlaşıldıktan sonra, farklı şekilde ifade edilen genlerin işlevleri ve transkriptom analizleri, yüksek bitkilerin stres tepkisi ve tolerans mekanizmasını daha iyi anlamamıza olanak sağlamaktadır. Bu çalışmalar sırasında, stres tepkisinde yer alan birçok yeni gen keşfedilmiştir (Tyagi ve Chandra, 2006). Sıcaklık stresine tepki ve hayatta kalma, bitkilerde çok karmaşık bir olgudur. Değiştirilmiş sıcaklık-toleransına sahip mutant sayısındaki artış, bitkilerde sıcaklık stresi tepkilerinin karmaşıklığının anlaşılmasına da katkı sağlamaktadır (Kotak vd.,

2007). Stres tepkisi, sıcaklık stresi faktörleri tarafından yönetilir, stres etkisiyle monomerik, DNA bağlanmayan formdan trimerik forma dönüşebilirler ve sıcaklık stresi genlerinin promotörlerine bağlanabilirler. Bu, yüksek sıcaklıklara maruz kalan organizmalarda moleküler düzeyde en çok gözlenen tepkidir. Ayrıca, farklı bitki türleri, farklı dokular ve farklı gelişim evreleri üzerinde yapılan çalışmalarda bitki genomunun %2'sinin yüksek sıcaklık stresinden etkilendiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra bu genlerin başlıca yüksek sıcaklıklara tepki olarak yer aldığı saptanmıştır (Bhatnagar-Mathur vd., 2008). Bugüne kadar abiyotik streslere tepki ile ilgili birçok gen tanımlanmış ve açıklanmıştır. Bununla birlikte, bu çalışmaların çoğu *Arabidopsis thaliana* bitkisi üzerinde yürütülmüştür (Peleg vd., 2012). Yüksek sıcaklık stresine tepki baskılayıcılar tarafından düzenlendiği ve bunlar elimine edildiğinde (knock-out hatlarında) sıcaklık stresi toleransına neden olduğu belirlenmiştir. Alternatif olarak sıcaklık stresi ile doğrudan ilişkili olmayan ancak stres tepkisini tetikleyen mutasyonların sıcaklık stresi toleransına neden olabileceği kanıtlanmıştır (Luhua vd., 2013). *Arabidopsis* genomunun 1500'den fazla transkripsiyon faktörü kodladığının keşfinden sonra, bitkilerin genom kapasitelerinin büyük bir kısmını transkripsiyona ayırdıkları anlaşılmıştır (Riechmann vd., 2000).

Panchuk vd. (2002), HSF3'ü aşırı ifade eden transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin sıcaklık stresi koşulları altında yabancı tip bitkilere kıyasla daha yüksek HSP seviyelerine sahip olduğunu bulmuştur. HSF3'ü aşırı ifade eden transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde 44°C sıcaklık stresinde bile saptanamayan Apx5 adlı stabil bir APX izoformunun daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak, hem yabancı tip hem de transgenik bitkilerde sıcaklık stresine yanıt olarak düzenlenen Apx2'nin RT-PCR çalışmaları yoluyla yeni bir ısı şok geni olarak tanımlandığı belirlenmiştir.

Mishra (2002), domatestte bir ısı şok transkripsiyon faktörü olan HsfA1'in rolü ile ilgili bir çalışma yürütmüştür. Çalışmaya göre, HsfA1 domatestte sıcaklığa yanıt olarak ana düzenleyici olarak hareket eder. Transgenik domateslerde, bu genin sentezinin baskılandığı bitki grubuna kıyasla 10 kat daha fazla HsfA1 ifadesi belirlenmiştir. Bu, HsfA1 ifadesinin artırılmasının domateslerde sıcaklık toleransını artırabileceğini düşündürmektedir. Bu anlamda, HsfA1'in sıcaklık toleransında benzersiz bir işleve sahip olduğu ve başka bir ısı şok faktörü (HSF) tarafından değiştirilemeyeceği bildirilmiştir.

Lohmann vd. (2004), *Arabidopsis thaliana*'nın AtHsf1 ve AtHsf3 genlerinde T-DNA eklenmesi mutantları izole ederek bitki ısı şok transkripsiyon faktörlerinin

belirli işlevsel rollerini aydınlatmayı amaçlamıştır. Araştırma, sadece hsf1(-) /hsf3(-) çift mutantlarının ısı şok gen ifadesinde önemli bir bozulmaya sebep olduğu, AtHSF1 ve AtHSF3 genlerinin sıcaklık stresi genlerinin hızlı aktivasyonunda hayati düzenleyiciler olarak hizmet ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca çalışma, yüksek molekül ağırlıklı ısı şok elemanı-bağlayıcı kompleksleri oluşturma yeteneğindeki bu bozukluk ile incelenen tüm HSF hedef genlerinden mRNA birikim kinetiğinde belirgin bir değişiklik arasında bir korelasyon olduğunu belirlemiştir. Bu bulgular, bitkilerin sıcaklık stresine tepkilerdeki mekanizmalara ilişkin değerli içgörüler sağlamakta ve gelecekteki uygulamalarda bitki sıcaklık toleransını artırma potansiyeline sahip olabilmektedir.

Yokotani vd. (2008), çeltikten (*Oryza sativa*) özgül sıcaklık stres transkripsiyon faktörü OsHsfA2e'yi *Arabidopsis thaliana*'ya aktarmanın etkisini araştırmıştır. Araştırmacılar, OsHsfA2e'yi aşırı ifade eden transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde, sıcaklık stresi, yüksek tuzluluk ve oksidatif stres de dahil olmak üzere çeşitli çevresel stresler altında kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında fenotipik ve fizyolojik değişiklikleri incelemiştir. Çalışma, *Arabidopsis*'te OsHsfA2e'nin aşırı ifadesinin bu çevresel streslere karşı gelişmiş tolerans sağladığını ortaya koymuştur. Transgenik bitkiler, kontrol bitkilere kıyasla yüksek sıcaklık koşulları altında optimum büyüme ve yaşam oranları ile birlikte yüksek tuzluluğa ve oksidatif strese karşı toleransı artmıştır. Bu gelişmiş stres toleransının altında yatan mekanizmalarla ilgili moleküler araştırmalar, transgenik bitkilerde ısı şok proteini (HSP) sentezi, antioksidan savunma ve osmoprotektan birikimi ile ilgili strese tepki genlerinin düzenlenmiş ifadesi olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Wu vd. (2009), HSP101 promotörü kontrolünde OsWRKY11 adlı geni aşırı ifade ederek çeltik bitkilerinin sıcaklık ve kuraklığa dayanıklılığını artırmayı amaçlamıştır. Çalışma, OsWRKY11'i aşırı ifade eden transgenik çeltik fidelerinin transgenik olmayan kontrol bitkilerine kıyasla gelişmiş sıcaklık ve kuraklık toleransı gösterdiğini bulmuştur. Transgenik bitkiler, yüksek sıcaklıklar ve kuraklık koşulları altında optimum büyüme ve hayatta kalma oranları göstermiş, bu da OsWRKY11'in aşırı ifadesinin strese tepki yollarının tetiklenmesine neden olduğunu göstermiştir. Çalışma, HSP101 promotörü kontrolünde OsWRKY11 genini aşırı ifade etmenin çeltik fidelerinin sıcaklık ve kuraklık toleransını iyileştirebileceğini göstermiştir.

Hong vd. (2009) su banyosunda 36 saat boyunca transgenik (35S:AtDREB1A) ve transgenik olmayan karanfil bitkilerine 45°C yüksek sıcaklık

uygulamıştır. DREB1A ailesine ait 74 genin 55'inin ifadesi transgenik bitkilerde yüksek oranda artmıştır. AtDREB1A geninin aşırı ifadesi ile sinyal iletiminde rol alan genlerin ifadesinde büyük bir artış olmuştur. Metabolizma ve fotosentez ile ilgili genlere ek olarak, HSP70 geninin transkripsiyonu da daha erken gözlenmiştir.

Frank vd. (2009) yüksek sıcaklığa toleranslı 'Hazera 3042' ve hassas 'Hazera 3017' domates çeşitlerine 2 saat boyunca 43-45°C yüksek sıcaklık uygulamışlardır. Yüksek sıcaklık uygulanan domates mikrosporlarında transkriptomik analiz (Affymetrix Tomato Genome Array ve cDNA-AFLP) sonucunda sHSP, HSP70 ve HSP90 gen ailelerinin aktiviteleri ortaya çıkarılmış, HSFA2 ve HSFA3 gibi transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları gözlemlenmiştir.

Li vd. (2010) *Arabidopsis thaliana* WRKY39'un sıcaklık stresi ile aktive edilen abiyotik ve biyotik stres tepkilerinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olduğunu bildirmiştir. WRKY39'un mutantları sıcaklık stresine karşı artan duyarlılık gösterirken, aşırı eksprese eden bitkiler gelişmiş termotolerans sergilemiştir. Mutantların ve aşırı eksprese eden bitkilerin analizi, WRKY39 tarafından düzenlenen genleri tanımlamış, salisilik asit ile düzenlenen genlerin ifadesi mutantlarda aşağı düzenlenmiş ve aşırı eksprese eden bitkilerde yukarı düzenlenmiştir. WRKY39 ifadesi SA ve metil jasmonat (JA) tarafından indüklenmiştir. Çalışma ayrıca WRKY39'un SA ve JA sinyal yolları tarafından pozitif olarak birlikte düzenlendiğini ve bu yollar arasındaki işbirliğini kolaylaştırarak sıcaklık stresine verilen tepkilere aracılık etmedeki rolünü gösterdiğini ortaya koymuştur.

Giorno vd. (2010) 36°C yüksek sıcaklık altında normal meyve üreten toleranslı domates anterlerinde (*Solanum lycopersicum* cv. Saladett) qRT-PCR ile ifade analizleri gerçekleştirmiştir. HsfA2 ve Hsp17-CII'nin yüksek sıcaklık stres sisteminin iki önemli üyesi olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar bu genlerin anter gelişimi sırasında düzenlendiğini ve ifadelerinin kısa ve uzun sıcaklık stresi tarafından tetiklendiğini belirlemişlerdir.

Li vd. (2012), meyve oluşum performanslarına göre 100 genotip arasından sıcaklığa toleranslı ve hassas olarak belirlenen domates (*Solanum lycopersicum* L.) çeşitlerinde karbon dağılımı ve sakkaroz ayrıştırma enzimi modellerini araştırmışlardır. Domatesin genç meyvelerinde yüksek kapasiteli sakkaroz alımı ve invertaz aktivitesinin glukoz sinyal yolu aktivitesini artırarak programlı hücre ölümü yolunu baskıladığını tespit etmişlerdir.

2.7. Yüksek sıcaklık stresi altında protein metabolizması

Malik vd. (1999), Hsp17.7 geninin havuç hücrelerinin ve bitkilerinin termal stresten kurtulma kabiliyetinde önemli bir rol oynadığını bulmuştur. Hsp17.7 geninin ya yapısal olarak ifade edildiği ya da ısıya bağlı antisens RNA olarak ifade edildiği transgenik hücreler ve rejenere bitkiler üretmişlerdir. Çalışma, Hsp17.7 geninin yapısal olarak ifade edilmesinin termotoleransın artmasına yol açtığını, antisens RNA olarak ifade edilmesinin ise termotoleransın azalmasına neden olduğunu bulmuş. RNA analizi, Hsp17.7 mRNA'nın yapısal olarak ifade edilen hücrelerde ısı şokundan önce tespit edilebilir olduğunu, ancak vektör kontrol hücrelerinde tespit edilemediğini göstermiştir. Protein sentezi analizi, en termotoleranslı hattın daha aşırı bir ısı şokunda diğer hücre hatlarından daha yüksek bir oranda protein sentezini sürdürdüğünü, antisens hücrelerin ise büyük ve küçük birçok Hsp sentezinde azalma gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, Hsp17.7 geninin havuçta termotoleransta kritik bir rol oynadığını ve tek bir genin ifadesini manipüle ederek termotoleransı hem artırma hem de azaltma yeteneğinin ilk gösterimini temsil ettiğini göstermektedir.

Queitsch vd. (2000) tarafından Arabidopsis'te Hsp101'in rolünün araştırıldığı çalışmada, bitkiler 14 gün boyunca çimlenme ortamında yetiştirilmiştir. Yüksek sıcaklık stresi 45°C'de 2 saat boyunca uygulanmış ve daha sonra sıcaklık 22°C'ye geri çekilmiştir. Hsp101 proteininin bitkilerde sıcaklık tarafından tetiklendiği ve bitkilerin yüksek sıcaklık stresine karşı direncinde çok belirgin bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Bu proteinin evrimsel olarak korunmasının, proteinin hem yapısal olarak hem de stres koşulları altında oldukça etkili olmasına neden olduğu belirtilmiştir.

Escobar-Galvis vd. (2001) mitokondriyal nükleozit difosfat kinazı (mtNDPK) izole etmiş ve ilk kez bezelye cv. 'Oregon' şeker kapsülünde (*Pisum sativum*) karakterize etmiştir. Bezelye mtNDPK'nın 86kDa protein ile etkileşime girdiği ve sıcaklık stresine tepki olarak 86kDa proteinin düzenleyicisi olarak görev yaptığı bildirilmiştir.

Majoul vd. (2003) iki sıcaklık rejiminin (18/10°C ve 34/10°C) hekzaploid buğday tanelerinin endospermi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Kütle spektrometresi ile birleştirilmiş iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) kullanarak normal ve sıcaklık stresi koşulları altında endospermin proteomik profillerini karşılaştırmışlardır. Sonuçlar, sıcaklık stresine tepki olarak değişen ifade seviyeleri

gösteren birkaç proteini ortaya çıkarmıştır. Toplam buğday tanesi proteinlerinden 37'sinin yüksek sıcaklıkla önemli ölçüde değiştiği tespit edilmiştir. Bunlardan 25'i yüksek sıcaklık stresi altında ifadesi artarken, 1'i ifadesi azalmış. Tanımlanan proteinler arasında metabolik yollarda yer alan enzimler, strese tepki ile ilgili proteinler ve depo proteinleri yer almıştır.

Gulen vd. (2004) tarafından Camarosa çeşidinde yapılan çalışmada, bitkilere 30, 35, 40 ve 45°C'lik yüksek sıcaklıklar uygulanmış ve sıcaklık artışına bağlı olarak PRX aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.

Sanmiya vd. (2004), tütün bitkilerinde termotoleransı artırmada spesifik bir küçük ısı şoku proteininin (sHSP) rolünü araştırmışlardır. Mitokondriyal sHSP'yi aşırı eksprese etmek için tütün bitkilerini genetik olarak tasarladılar, yani bu bitkiler normal bitkilere kıyasla daha yüksek seviyelerde protein üretti. Sonuçlar, artan mitokondriyal sHSP seviyelerine sahip tütün bitkileri gelişmiş termotolerans gösterdi. Yüksek sıcaklıklara (2 saat boyunca 46°C veya 48°C) maruz kaldıklarında, bu bitkiler normal bitkilere kıyasla daha iyi hayatta kalma oranları gösterdi ve daha iyi bitki büyümesi sağladı. Araştırmacılar, mitokondriyal sHSP'nin aşırı ekspresyonunun tütün bitkilerinde termotoleransın artmasına katkıda bulunduğu sonucuna varmışlar.

Neta-Sharir vd. (2005) domates bitkilerinde Hsp21'in ikili rolünü araştırmıştır. Çalışma, Hsp21'in fotosistem II'deki (PSII) oksidatif hasarı azaltmada koruyucu bir rol oynadığını ve böylece stres varlığında fotosentetik verimliliği koruduğunu bulmuştur. Çalışma ayrıca Hsp21'in meyve olgunlaşması sırasında renk değişikliklerini teşvik etmede rol oynadığını buldu. Hsp21 ifadesi meyve olgunlaşması sırasında artar ve olgun domateslerin kırmızı renklenmesinden sorumlu pigmentlerin birikimi ile ilişkilidir. Çalışma, Hsp21'in meyve olgunlaşmasında yer alan pigmentlerin sentezini veya stabilitesini düzenlemede rol oynayabileceğini öne sürmüştür.

Lee vd. (2007) çeltik yaprağı proteomunun sıcaklık stresine tepkisini incelemişlerdir. Çeltik fideleri 42°C sıcaklığa maruz bırakılmış ve örnekler uygulamadan 12 ve 24 saat sonra toplanmıştır. Artan iyon sızıntısı ve lipid peroksidasyonu, yüksek sıcaklığa maruz kalan çeltik yapraklarında oksidatif stresin varlığına işaret etmiştir. Araştırmacılar yapraklardaki ısıya duyarlı proteinleri tanımlamak için 2-DE ve MS tekniklerini kullandılar. Protein lekeleri gümüş veya CBB boyama kullanılarak görselleştirildi ve toplamda yaklaşık 1.000 tekrarlanabilir

protein lekeli tespit edildi. Bunlar arasında 73 nokta en azından bir kerelik noktada diferansiyel ekspresyon göstermiştir. MALDI-TOF MS kullanılarak, ısı şoku proteinleri (HSP'ler), enerji ve metabolizma, redoks homeostazı ve düzenleyici proteinler gibi kategorilere ait 48 protein tanımlanmıştır. Çalışma özellikle, Western blot analizi ile doğrulanan düşük moleküler ağırlıklı bir mitokondriyal sHSP de dahil olmak üzere, sıcaklık stresine tepki olarak bir grup küçük ısı şoku proteininin (sHSP'ler) indüklendiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, dört antioksidan enzim proteininin mRNA analizi, çeviri ile tamamen uyumlu olmayan farklı gen ekspresyon seviyeleri göstermiştir. Yeni proteinlerin tanımlanması, bitkilerde sıcaklık duyarlılığının altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır.

Su ve Li (2008), bitki gelişiminde plastid stromal HSP70'in işlevini ve yüksek bitkilerin termotoleransındaki önemini tanımlamak için Arabidopsis'i bir model olarak kullanmıştır. Sonuçlar, stromal HSP70'lerin normal bitki büyümesi ve gelişimi için çok önemli olduğunu göstermiştir. Bu genlerdeki mutasyonlar, bitki boyutunun küçülmesi, çiçeklenmenin gecikmesi ve anormal kloroplast gelişimi de dahil olmak üzere çeşitli gelişimsel bozukluklara yol açmış. Araştırmacılar ayrıca, stromal HSP70'lerin tohum çimlenmesi sırasında termotolerans için gerekli olduğunu göstermiştir. Yüksek sıcaklıklara (37.5 ve 44.5°C) maruz kaldıklarında, stromal HSP70'lerden yoksun mutant tohumlar, yabani tip bitkilere kıyasla çimlenme oranları azalmış ve fide büyümesi bozulmuştur. cpHsc70-1 (At4g24280) ve cpHsc70-2 (At5g49910) Arabidopsis'te iki olası stromal HSP70 olarak tanımlanmıştır.

Chen ve Murata (2011) derlemelerinde glisin betain (GB) birikiminin stres tepkisinde bazı genleri indüklediğini bildirmişlerdir. *Fragaria* × *ananassa*'da GB birikimi stres altında olmayan bitkilerde 1.8µmol g⁻¹ TA iken, stres koşulları altında 3.7µmol g⁻¹ YA olmuştur.

Ergin vd. (2012b), kademeli olarak yüksek sıcaklıklara (35, 40, 43, 46, 49, 52, 55 ve 60°C) maruz bırakılan 'Redlands Hope' (toleranslı) ve 'Festival' (hassas) çilek çeşitlerinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile protein metabolizmasını araştırmıştır. Yüksek sıcaklık uygulamalarının bir sonucu olarak, hücre hasar sıcaklıklara paralel olarak artmıştır. Askorbik asit ve glutatyon uygulamalara ve sıcaklıklara göre değişmiştir. APX, CAT ve PRX aktiviteleri yüksek sıcaklıkla artmış, ancak glutatyon redüktaz aktivitesi değişmemiştir. HSP60

için yapılan immünoiblot çalışmalarında sadece 23kDa proteininin sıcaklığa bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir.

Christou vd. (2014) ‘Camarosa’ çilek çeşidinin köklerini H₂S donörü NaHS (100µM, 48 saat) ile ön işleme tabi tutmuş ve ardından 8 saat boyunca 42°C’de şok sıcaklığı uygulamıştır. HSP70, HSP80 ve HSP90 gibi HSP’lerin ifade seviyeleri H₂S’in öncül uygulamasıyla artmıştır.

Cheng vd. (2016) domates bitkilerinde sıcaklık stresi (22°C ve 45°C) tepkisi sırasında 2-Cys peroksiredoksinler (Prxs) ve askorbat arasındaki etkileşimleri araştırmıştır. Çalışma, hücrel geri dönüşüm ve strese adaptasyonda rol oynayan bir süreç olan otofagozom oluşumuna odaklanmıştır. Sıcaklık stresinin domates bitkilerinde spesifik 2-Cys Prx genlerinin ekspresyonunu indüklediğini bulmuştur. Bu Prx’ler, bir C vitamini formu olan askorbat ile etkileşime girerek otofagozom oluşumunda önemli bir rol oynamıştır. Askorbatın hücrel bir antioksidan olarak hareket ettiği ve çeşitli metabolik süreçlerde yer aldığı bilinmektedir. Çalışma, 2-Cys Prxs ve askorbat arasındaki etkileşimin, otofaji ile ilgili genlerin aktivasyonu ve sıcaklık stresi sırasında otofagozom oluşumu için gerekli olduğunu ortaya koydu. Otofaji, hasarlı proteinleri ve organelleri uzaklaştırarak hücrel homeostazın korunmasına yardımcı olan hücrel bir mekanizmadır.

Kumar vd. (2017) çiçeklenme sırasında çeltik bitkilerini sıcaklık stresine maruz bırakmıştır. Terminal ısı stresi, 0.1 mm kalınlığında UV şeffaf polivinil klorür film ile kaplanarak tek bir blokta uygulanmıştır. IET 21405 adı verilen sıcaklığa duyarlı bir çeltik genotipi üzerinde proteomik bir analiz gerçekleştirmişlerdir. Çeltik yapraklarındaki toplam 73 protein noktasını tanımlamak ve analiz etmek için iki boyutlu elektroforez (2-DE) ve MALDI-TOF/MS tabanlı proteomik tekniklerini kullanmışlardır. Kontrol ve ısı işlem görmüş çeltik genotiplerinin protein profilleri karşılaştırıldığında, protein ifadesinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. İfade edilen 73 proteinin işlevsel değerlendirmesi, yüksek sıcaklık stresine tepkide rol oynadığına inanılan çeşitli mekanizmalar hakkında bilgi sağlamıştır. Bu mekanizmalar, tanımlanan proteinlerin metabolizma, enerji düzenlemesi, protein sentezi, protein taşınması/depolanması ve daha birçok konudaki varsayılan rollerini içermektedir. Ayrıca, bazı proteinlerin fotosentez, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, glikoliz ve diğer enerji üretim süreçleriyle ilişkili olması beklenmektedir.

Hu vd. (2021), cpk28 geninde mutasyonlara sahip domates bitkileri oluşturmak için CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisini kullandılar ve CPK28’in

domates bitkilerinde termotoleransı artırmak için APX2'yi hedeflediğini buldular. Bu mutant bitkilerin normal sıcaklık (25°C) ve yüksek sıcaklık (45°C) koşulları altındaki tepkilerini yabani tip bitkilerle karşılaştırmışlardır. Çalışma, cpk28 mutantlarının, sıcaklık stresi altında daha yüksek ROS birikimi ve protein oksidasyonu ile yabani tip bitkilere kıyasla daha düşük termotolerans göstermiştir. Çalışma ayrıca CPK28'in APX'in bir izoformu olan sitozolik APX2 ile doğrudan etkileşime girdiğini ve kalsiyum sinyallerini tetiklemek ve termotoleransı artırmak için onu belirli bölgelerde (Thr-59 ve Thr-164) fosforile ettiğini bulmuşlardır.



3. MATERİYAL VE METOT

Bu araştırma Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde yürütülmüştür. Deneme bitkilerinin yetiştirildiği alan 41° 22' kuzey enlemi, 36° 11' doğu boylamındadır, deniz seviyesinden yüksekliği 115 metredir. Çilek bitkilerinde yüksek sıcaklık stresi uygulamaları OMÜ-KITAM (OMÜ Karadeniz İleri Araştırma Teknoloji ve Uygulama Merkezi) iklim odalarında gerçekleştirilmiştir. Denemede fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler OMÜ-KİTAM ve OMÜ Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1. Materyal

Denemede incelenen çeşitlerin fotoperiyodik grupları, ebeveynleri ve orijinleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Denemede incelenen çilek çeşitlerinin fotoperiyodik grupları, ebeveynleri ve orijinleri

Çeşitler	Fotoperiyodik Grup	Ebeveynler	Orijin
Albion	Nötr gün	Diamante × Cal 94.16-1	Californiya, US
Monterey	Nötr gün	Albion×Cal 97.85-6	Californiya, US
Portola	Nötr gün	Cal97.93-7×Cal 97.209-1	Californiya, US
Redlands Hope	Nötr gün	Parker × Redlands Promise	Avustralya
San Andreas	Nötr gün	Albion×Cal 97.86-1	Californiya, US
Sweet Ann	Nötr gün	4-A-28×10-B-131	Californiya, US
Alba	Kısa gün	-	İtalya
Amiga	Kısa gün	Camarosa × selection 3-79	İspanya
Asia	Kısa gün	-	İtalya
Calinda	Kısa gün	E2003-2875× E2003-28	İspanya
Elsanta	Kısa gün	Gorella × Holiday	Hollanda
Favette	Kısa gün	-	Fransa
Festival	Kısa gün	Rosa Linda × Oso Grande	Florida, US
Fortuna	Kısa gün	-	Florida, US
Fronteras	Kısa gün	Cal 4.18-4 × Cal 5.165-1	Californiya, US
Jive	Kısa gün	E1997-054 x E1998-142	Hollanda
Petaluma	Kısa gün	Cal 5.97-7 × Cal 5.165-1	Californiya, US
Osmanlı	Kısa gün	-	Türkiye
Roxana	Kısa gün	-	İtalya
Sabrina	Kısa gün	94-020×9719	İspanya
Splendor	Kısa gün	-	Californiya, US
Tillamook	Kısa gün	Cuesta x Puget Reliance	Oregon, US

Denemede 6 nötr gün ('Albion', 'Monterey', 'Portola', 'Redlands Hope', 'San Andreas' ve 'Sweet Ann') ve 15 kısa gün çilek çeşidi ('Alba', 'Amiga', 'Asia',

‘Calinda’, ‘Elasanta’, ‘Favette’, ‘Festival’, ‘Fortuna’, ‘Franteros’, ‘Jive’, ‘Osmanlı’, ‘Petaluma’, ‘Roxana’, ‘Sabrina’, ‘Splendor’ ve ‘Tillamook’) kullanılmıştır. Bitki materyali olarak ‘Osmanlı’ dışındaki tüm çeşitlerde frigo bitkiler (dormant çıplak köklü bitkiler) kullanılmış, Osmanlı çeşidinde ise önceki sonbahar döneminde kollardan elde edilen bitkiler kullanılmıştır.

Denemede kullanılan çilek çeşitlerinin tanıtımı

Nötr gün çilek çeşitleri

‘Albion’

Türkiye’de sınırlı sayıda nötr-gün çilek çeşidi bulunmaktadır, ‘Albion’ bunlar arasında en yaygın olarak yetiştirilen çeşittir. ‘Albion’, hem taze tüketim hem de işleme endüstrisi için olağanüstü bir lezzete sahiptir. ‘Diamante’ ve ‘Aromas’ ile benzerlikler gösteren Albion koyu renkli, sert, konik meyveleri ile öne çıkmaktadır. ‘Albion’un meyveli bitkilerinin morfolojisi ‘Diamante’ye benzer, bununla birlikte biraz daha dik ve açık bitki yapısına sahiptir. ‘Portola’ ve ‘Sweet Ann’ ile karşılaştırıldığında, ‘Albion’un yaprakları, kısa yaprak sapları nedeniyle daha kısadır. Yaprak sapları diğer çeşitlere göre daha kalındır ve genellikle yoğun bir tüylenme gösterir. Mükemmel lezzetiyle üreticilerin ilgisini çeker.

‘Monterey’

Orta derecede nötr gün bir çeşittir. Güçlü bir büyüme sergiler ve büyük, nefis meyveler verir. Seascape’i anımsatan bir lezzete sahiptir, aynı zamanda yüksek yaz sıcaklıklarına daha fazla tolerans gösterir. Bitkileri kuvvetlidir. Düşük asit oranı sayesinde yüksek bir tatlılığa sahip olan bu çeşit Asyalı tüketiciler arasında popülerdir. Meyveleri ‘Albion’a kıyasla daha iri fakat daha az serttir.

‘Portola’

‘Portola’, ilkbahar ve yaz dikim sistemlerinde çok iyi performans gösteren güçlü nötr gün özelliği gösteren bir çeşittir. Nötr gün çeşitlerde tipik olduğu gibi, bol verim verir ve büyük, açık renkli meyveler üretir. Subtropikal iklimlerde orta-güçlü gün-nötr özellik gösterir. Özellikle sonbahar meyve üretimine yönelik ilkbahar ve yaz dikim sistemleri için çok uygundur. Meyve veren bitkilerinin morfolojisi ‘Albion’ ve ‘Diamante’ninkine benzemekle birlikte sezon boyunca biraz daha büyüktür. Yaprak sapları ‘Albion’dan daha uzundur. Yaprak sapları genellikle incedir ve yoğun bir tüy örtüsüne sahiptir.

‘Redlands Hope’

Yaz dikimlerine uygun bir çeşittir. Meyveleri konik şekilli, iri ve orta sertliktedir. Redlands Hope’un Karadeniz ve Marmara bölgelerinde yetiştirilmesi tavsiye edilir. Bu çeşit, yüksek sıcaklık stresine tolerans gösteren bir çeşit olarak belirlenmiştir.

‘San Andreas’

Orta derecede nötr gün bir çilek çeşididir. Meyve sertliği, meyve şekli bakımından mükemmeldir, çok iyi bir aroma ve tada sahiptir. Meyve büyüklüğünü sezon boyunca korur. ‘San Andreas’, düşük soğuklama gereksinimi nedeniyle özellikle kıyı bölgeleri için çok uygundur. Meyve eti sert ve suludur, taşıma ve depolama sırasında olağanüstü dayanıklılık sağlar.

‘Sweet Ann’

Kuzey Kaliforniya koşulları için ıslah edilmiş, güçlü bir büyüme ve yüksek verime sahip olan nötr gün bir çilek çeşididir. Parlak orta-kırmızı dış ve iç renge sahip büyük-çok büyük konik meyveler üretir. Meyveleri üniform, çekici ve son derece tatlı aromalı olarak tanımlanmaktadır. Bitkiler, bol meyve üretimini destekleyen açık bir form sergiler. Fidanlık şartlarında yüksek kol üretimine kıyasla açıkta meyve üretim parsellerinde orta düzeyde kol üretimine sahiptir. ucu oluşumu meydana gelir. Genel olarak ‘Sweet Ann’ yüksek meyve kalitesi, yüksek lezzet, iyi bir verim ve iyi bir bitki büyümesi gibi özellikleri birlikte taşır.

Kısa gün çilek çeşitleri

‘Alba’

Meyveleri büyük ve üniformdur. Meyveleri çekici, çok sert ve parlak kırmızıdır. Meyveleri iyi bir kokuya ve ortalama bir tada sahiptir. Bitkileri çok güçlüdür. Meyvelerin toplanması kolaydır. Bitkiler herbisitlere karşı hassastır. Konik, çok düzgün, parlak kırmızı meyveleri, küçük kaliks yaprakları ve çok güzel bir görsel izlenimi vardır.

‘Asia’

Üniform, çekici, parlak, mükemmel lezzetli ve aromalı meyveleri ile bilinir. Çiçekleri yaprakların hafif altında açar. Meyveleri uzun konik şekilli, parlak kırmızı renklidir ve ‘Elsanta’dan birkaç gün sonra olgunlaşır. Bitkisi kuvvetli büyür.

‘Amiga’

‘Amiga’ çilek çeşidi, uzun çiçek salkımları üzerinde konik şekilli meyveler oluşturur. Büyük, kama şeklindeki meyveler, çok sıkı bir dokulu, geniş, uzun

formunu korur. ‘Amiga’, hasat sezonu boyunca tutarlı büyük meyve boyutu ve yüksek yıllık verim ile karakterize edilir. Güçlü bitkiler bol miktarda kol üretimine yönelir ve küresel, orta yoğunlukta bir büyüme alışkanlığı gösterir. Verim, meyve şekli, sertlik ve çekici görünüm kombinasyonu ‘Amiga’yı değerli bir çeşit haline getirmektedir.

‘Calinda’

En iyi Akdeniz çevresinde yetişir, Son derece çekici, lezzetli meyveler üreten erkenci kısa gün çeşididir. ‘Calinda’, akenlerin bir miktar meyve etine girintisi ile düzgün şekilli uzun konik meyveler üretir. Çekici, parlak kırmızı meyveler yüksek meyve suyu içeriğini, lezzetini ve dokusunu korur. Ortalama meyve ağırlığı ve Brix seviyeleri, hasat mevsimi boyunca yüksek seyrederek. Güçlü çiçek sapları güçlü çiçekler oluşturur, bu da iyi gelişmiş, büyük meyvelerle sonuçlanır. Raf ömrü, tutarlı verimle benzersiz olarak tanımlanmaktadır. Güçlü saplar sağlam çiçekler taşır, bu da iyi gelişmiş, büyük meyvelerle sonuçlanır. Tutarlı verim ile raf ömrü eşsiz olarak tanımlanmaktadır.

‘Elsanta’

Yoğun çilek aromalı, çok sert etli ve harika tada sahip meyveler veren bir kısa gün çeşididir. Büyük, geniş meyvelerin et rengi beyaz, dış kısmı ise kırmızı renktedir. Güçlü çiçek salkımları ve büyük çiçekleri nedeniyle iri meyveler oluşturur. Bu özellikler ‘Elsanta’nın ticari bir çeşit olarak tarihsel popüleritesinin temelini oluşturmaktadır.

‘Festival’

Konik meyve şekline sahip olup et rengi açık kırmızı, meyve dış rengi ise koyu parlak kırmızıdır. Bitkinin açık yapısı tozlaşmayı, uzun meyve sapları ise meyve hasadını kolaylaştırır. Erkencilik açısından ‘Sweet Charlie’den 10 gün, ‘Camarosa’dan 2-3 hafta önce verim verir. İlk baharın sonlarında ve tüm yaz boyunca çiçek açar. Asidik toprakta, tınlı toprakta ve kumlu toprakta iyi yetişir.

‘Fortuna’

Erkenci ve yüksek verimli olan ‘Fortuna’nın meyve hasadı kolaydır. Meyveler koyu kırmızı parlak pürüzsüz bir görünüme sahiptir. Meyve, enfes tadı, parlaklığı ve estetik açıdan hoş bir kaliks ile karakterize edilen çekici bir görseelliğe sahiptir. Bu çeşit, verimliliği ile öne çıkmaktadır. Çoğunlukla konik ve sert olan meyve, sıcak kırmızı bir iç kısım ve pürüzsüz bir yüzeyle tamamlanan parlak, canlı, koyu kırmızı bir renk tonu sergiler. Özellikle, uzun raf ömrü ve mükemmel

taşınabilirlik özelliği kalitesinin kalıcı olmasını sağlar. Özellikle Akdeniz ülkelerinde kış üretimleri için önerilir.

‘Favette’

Yarı dik bir büyüme karakterine sahip, erkenci bir çeşittir. Kısa konik şekilli, böbrek şeklinde, parlak koyu kırmızı, yeme kalitesi yüksek, sert etli, tatlı ve hafif asitli meyvelere sahiptir. Bitkileri kuvvetli büyür ve ilkbaharın sonlarında yeniden çiçeklenme eğilimi gösterir. Sera, tünel ve açıkta yetiştiricilik için uygundur. Verimliliği orta düzeydedir. Hassas kabuğu nedeniyle raf ömrü iyi değildir. Yetiştiriciliği çoğunlukla hem kuzey hem de güney iklimleri için uygundur.

‘Fronteras’

‘Fronteras’, Kaliforniya Üniversitesinde 1990’larda geliştirilmiştir. ‘Fronteras’ önemli hastalık direnç özellikleri gösterir. Bu çeşit Fusarium solgunluğuna oldukça dayanıklıdır ve Verticillium solgunluğu ve Phytophthora’ya karşı önceki kısa gün çeşitlerinden daha yüksek bir direnç seviyesine sahiptir. Kontrollü inokülasyonlara dayanarak, ‘Fronteras’ın Macrophomina tarafından neden olunan taç çürüklüğüne karşı iyi bir direnç seviyesi vardır. ‘Fronteras’ bitkileri güçlü ve verimli olup yayvan bir büyüme alışkanlığına sahiptir. Çok sayıda sürgün ürettikleri için mat sıralarda yetiştirmek için idealdir. Meyveleri Iri, parlak, tatlı, kırmızı renkli, konik biçimli ve sert dokuludur. Amerika Birleşik Devletleri, Meksika ve Avrupa dahil olmak üzere birçok ülkede ticari olarak yetiştirilmektedir.

‘Jive’

‘Jive’, büyük, çok parlak turuncu-kırmızı meyveler üreten geç mevsim kısa gün çeşididir. Tipik uzun, üniform meyveleri serttir ve hafif ekşi bir aromaya sahiptir. Kompakt yapılı bitkiler, kaynakların çoğunu kollardan ziyade çiçeklere ve meyvelere yönlendirir. Yavaş olgunlaşma, meyve sertliğini ve mekanik hasara karşı dayanıklılığı artırır. Yüksek kaliteli çiçekler iyi şekilli meyveler verir. ‘Jive’ın göze çarpan meyve rengi, geç verim vermesi, meyvelerinin dayanıklılığı, onu cazip bir geç sezon çeşidi yapmaya yardımcı olur.

‘Osmanlı’

Güçlü büyüme gösteren bir kısa gün çeşididir. Morfolojik erkek kısırlığı gösterir, erkek organlar düzgün oluşmadığı için tozlayıcı bir çeşit ile yetiştiricilik yapmak gerekir. Kol oluşumu iyi seviyededir. Yaprak sapı tüylü ve kalındır. Çiçek sapı kısa, çiçekleri küçük veya orta iriliktir. Meyve küçük ve küresel bir şekle sahiptir. Meyvelerin yüzeyi pembe, akenler kırmızı ve meyve eti beyaz-krem

renklidir ve meyve eti oldukça yumuşaktır. Kırmızı akenler pembe yüzey üzerinde belirgin bir görünüme sahiptir. Verim düzeyi düşüktür ancak yüksek suda çözünen kuru madde (SÇKM) içeriği ve aroması nedeniyle gıda işlemede oldukça ilgi gören bir çeşittir

‘Petaluma’

Kaliforniya kıyılarının sonbahar-kış üretim sistemlerine adapte olmuştur. Bitkileri orta derecede kuvvetlidir. Meyvesi ‘Ventana’dan biraz daha koyu ve büyüktür. Çok iyi bir lezzete ve iyi depolama özelliklerine sahiptir. ‘Petaluma’nın meyve verme şekli ‘Ventana’ ile benzerdir ve üretiminin ortalama 2/5’i erken sezonda gerçekleşir.

‘Roxana’

‘Roxana’, Rusya’da yaygın kullanılan orta verimli bir çeşittir. Orta-geç sezon olgunlaşır. Meyveleri parlaktır, sarı renki akenler yüzeysel olarak yerleşmiştir. Bitkisi kuvvetli, kompakt ve yapraklanma ortadır. Hasatın ana kısmı sonbaharın başlarında oluşur. Hem seralarda hem de sıcak yerlerde açıkta yetiştirilir. Meyveler, tepesi iki kola ayrılmış bir koni şeklindedir. Bu özelliği nedeniyle ‘Roxana’ meyveleri genellikle “açılmamış bir lale” ile karşılaştırılır. Rusya’nın merkezinde -20 °C’den düşük olmayan sıcaklıklarda koruma olmaksızın kışları tolere eder.

‘Sabrina’

‘Sabrina’ orta mevsim çilek çeşididir, çok verimlidir. Meyvesi konik-uzun, parlak kırmızı ve orta-iri büyüklüktedir, bu yapıyı hasat sonuna kadar korur. Meyve eti kıvamlı ve iyi renklidir. Meyve eti suludur, C vitamini, potasyum, demir, folat ve flavonoidler açısından zengindir, tüm özellikler tüketiciler tarafından çekici kabul edilir.

‘Splendor’

‘Splendor’ boyut, renk ve lezzet bakımından ideal özelliklere sahiptir. Akdeniz iklimine iyi adapte olmuş erkenci bir çeşittir, bu da onu güney İspanya ve İtalya, Yunanistan ve kuzey Fas için ideal kılar. Meyleri orta büyüklükte olup parlak, yoğun kırmızı etlidir. Meyveleri suludur ve mükemmele yakın şeker/asit dengesi nedeniyle orijinal çilek aromasına sahip olduğu söylenir.

‘Tillamook’

Bu çeşit, hem taze hem de dondurulmuş olarak tüketim için idealdir. Sıradışı tatlı ve sert meyveleri iri/çok iri olup simetriktir, orta sezonda olgunlaşır.

3.2. Metot

3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Toplam 21 çilek çeşidine ait frigo fideler 15 cm çapındaki plastik saksılara 3:1:1 oranında bahçe toprağı, torf ve perlitten oluşan harç ortamına 14 Mayıs 2022 tarihinde dikilmiştir. Bitkiler 5 hafta boyunca 3-4 yapraklı oluncaya kadar açık alanda doğal ışıık koşulları altında yetiştirilmiştir. Bu aşamada bitkiler düzenli olarak sulanmış ve gübrenlenmiştir (NPK,17:17:17). Daha sonra, 22 Haziran'da saksılı çilek bitkileri iklim odalarına aktarılmıştır. İklim odalarında deneme süresince, bitkilere eşit miktarda düzenli sulama yapılmış, sulama suyuyla birlikte 1:3 oranında Hoagland besin çözeltisi verilmiştir. Çilek bitkilerinin dikimi, arazide yetiştirilmesi ve iklim odalarında büyümelerine ait görüntüler Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

3.2.2. Yüksek sıcaklık stresi uygulamaları

İklim odalarına alışmayı ve kontrollü koşullar altında büyümeyi sağlamak için, bitkiler yüksek sıcaklık stresi uygulamalarına başlamadan önce iklim odalarında iki hafta süreyle 25/15°C (gündüz/gece) sıcaklıkta yetiştirilmişlerdir. 12m² boyutlarına sahip iklim odalarında deneme süresince oransal nem %65, karbondioksit konsantrasyonu 450-500 ppm ve ışıık şiddeti 4000 lüks (14 saat) olarak düzenlenmiştir. 2 haftalık alışma döneminden sonra, yüksek sıcaklık uygulamaları başlatılmıştır. Kontrol grubu bitkilere 25/15°C sıcaklıklar uygulanırken, yüksek sıcaklık stresi uygulamalarında Kesici (2015) tarafından izlenen metotların modifiye edilmesiyle sıcaklıklar her 48 saatte bir 5°C artırılarak bitkiler 30/25, 35/25, 40/25 ve 45/25°C sıcaklıklara maruz bırakılmışlardır.



Şekil 3.1 Bitkilerin açıkta ve iklim kabinindeki büyüme aşamalarına ait görüntüler

3.2.3. Deneme deseni

Deneme, iki faktörlü (sıcaklık stresi ve çeşitler) Tesadüf Parselleri deneme desenine göre planlanmıştır. Denemede 5 farklı sıcaklık uygulaması (kontrol:25/15°C ; yüksek sıcaklık stresi: 30/25, 35/25, 40/25, 45/25°C) için 21 çilek çeşidinin herbirinde 3 adet bitki kullanılmış, böylece denemede toplam olarak 315 adet saksılı çilek bitkisi kullanılmıştır. İklim odalarında bitki konumunun etkisini ortadan kaldırmak için, bir çeşide ait saksılı bitkiler odanın farklı yerlerine yerleştirilmiştir.

3.2.4. Yüksek sıcaklık stresi uygulanan bitkilerde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklerin belirlenmesi

Kontrol bitkilerinden (25/15°C) ve yüksek sıcaklık stresi uygulanan bitkilerden (30/25, 35/25, 40/25 ve 45/25°C) her sıcaklık kademesinden sonra taze yaprak örnekleri alınarak bitkilerde yaprak su içeriği ve membran stabilite indeksi belirlenmiştir. Ayrıca hem kontrol bitkilerinde hem de yüksek sıcaklık uygulanan bitkilerde her bir sıcaklık kademesinde yaprak yüzey sıcaklıkları belirlenmiştir.

Alınan taze yaprak örneklerinin bir kısmı sıvı azot ile muamele edilerek biyokimyasal (klorofil içeriği, lipid peroksidasyonu ve prolin içeriği) ve moleküler analizler için -80°C’de muhafaza edilmiştir. Yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan farklı çilek çeşitlerindeki fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikleri belirlemek için aşağıdaki metotlar izlenmiştir.

3.2.4.1. Fizyolojik değişiklikler

Yaprak yüzey sıcaklığı

Yaprak yüzey sıcaklığı (°C) her tekerrürdeki her bir bitkinin tam açmış son yaprağı üzerinde, yaprak yüzeyinin 1 cm üzerinden bitkiye dokunmadan infrared termometre (HNK-TB-01, Türkiye) kullanılarak belirlenmiştir.

Yaprak oransal su içeriği

Yaprak oransal su içeriği (YOSİ) Gulen ve Eris (2003) tarafından bildirilen metotlara göre belirlenmiştir. Tam büyüklüğe ulaşmış, üniform büyüyen yapraklardan 2 cm çapında yaprak diskleri alınmış, üzerindeki muhtemel toz veya kirleri uzaklaştırmak için saf su ile muamele edildikten sonra hafifce kurulanmıştır. Örnekler, yaş ağırlıkları (YA) kaydedildikten sonra bir petri kabında saf su içerisinde 4 saat bekletilmiş ve sonra turgor ağırlığını (TA) belirlemek için yeniden tartılmıştır. 70°C’deki etüvde 24 saat tutulduktan sonra örneklerin kuru ağırlıkları (KA) da kaydedilmiştir. Yaprak oransal su içeriği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Yaprak oransal su içeriği (YOSİ)(\%)} = \frac{(YA - KA)}{(TA - KA)} \times 100$$

Membran stabilite indeksi

Membran stabilite indeksi Sairam vd. (1997) tarafından bildirilen metoda göre belirlenmiştir. Tam büyüklüğe ulaşmış, üniform büyüyen yapraklardan 1.5 cm çapında yaprak diskleri toplanmıştır. Yaprak diskleri herhangi bir toz veya kirliliği elimine etmek için distile su ile muamele edilip hafifce kurulanmış, daha sonra 15-20 ml deiyonize su içeren tüplere yerleştirilmiştir. Tüpler 30 dakika süreyle 40°C sıcaklıktaki bir su banyosuna yerleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra bir elektriksel iletkenlik (EC) ölçüm cihazı (DDS-307A, Shanghai Leici, Çin) ile ilk elektriksel iletkenlik değeri (EC1) ölçülmüştür. Örneklerin 100°C’de 10 dakika kaynatılıp oda sıcaklığında soğumaya bırakılmasından sonra son elektriksel iletkenlik değeri (EC2) belirlenmiştir. Membran stabilite indeksi aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$\text{Membran stabilite indeksi (MSİ) (\%)} = 1 - \frac{EC1}{EC2} \times 100$$

3.2.4.2. Biyokimyasal değişimler

Yüksek sıcaklık stresi altında çilek bitkilerinde meydana gelen tolerans mekanizmalarını belirlemek amacıyla denemedeki çilek çeşitlerinde aşağıdaki biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

Toplam klorofil içeriği

Toplam klorofil içeriği Lichtenthaler ve Wellburn (1983)'e göre belirlenmiştir. 100 mg taze yaprak örneği, hassas bir terazide tartıldıktan sonra üzerine 5 ml etanol (%99.9) ilave edilerek parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen karışım Whatman No, 2 filtre kağıdından geçirildikten sonra test tüplerine aktarılmıştır. Test tüpleri 30 dakika süreyle bir buzdolabında 4°C'de tutulmuştur. Okuma yapılmadan önce örneklerin karanlık bir ortamda oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Daha sonra spektrofotometrede (Pharmacia LKB Novaspec II, İngiltere) klorofil a için 649 nm ve klorofil b için 665 nm'de ölçüm yapılmıştır. Toplam klorofil miktarı klorofil a ve klorofil b'nin toplamı olarak belirlenmiştir

$$\text{Klorofil a } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}$$

$$\text{Klorofil b } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = 24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665}$$

$$\text{Toplam klorofil } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \text{Klorofil a} + \text{Klorofil b}$$

Lipid Peroksidasyonu

Yüksek sıcaklık uygulamalarının çilek çeşitlerinin yapraklarındaki malondialdehit (MDA) içeriği üzerine etkisini değerlendirmek için Ohkawa vd. (1979)'nin yöntemi kullanılmıştır. 200 mg taze yaprak örneği %5'lik 2ml trikloroasetik asit (TCA) ile havanda homojenize edilmiş, elde edilen ekstrakt eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 12,000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra ayrışan sıvı kısım ve %20 TCA içinde %0.5 tiyobarbitürik asit (TBA) eşit hacimde olacak şekilde yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır (500 µl ayrışan sıvı kısım ve 500 µl %20 TCA içinde %0.5 (TBA). Yeni eppendorf tüpleri iyice vortekslenmiş ve hot plate üzerinde 30 dakika boyunca 95°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüplerdeki karışım oda sıcaklığına ulaşınca kadar buz üzerinde soğutulmuştur. Son karışım tekrar 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve absorbans okumaları %20 TCA içinde %0.5 TBA kör olarak kullanılarak 532 nm ve 600 nm dalga boylarında kaydedilmiştir. Elde edilen değerler nmol/g yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir.

$$\text{MDA (nmole g}^{-1} \text{ YA)} = (\Delta\text{OD}/155) \times (10^3 \text{ nmole / ml}) \times (1/\text{g YA}) \times 2$$

$$\text{OD}_{532}-\text{OD}_{600} = \Delta\text{OD, YA: Yaş ağırlık}$$

Prolin içeriği

Yaprak prolin içeriğini belirlemek için Bates vd. (1977), Reddy vd. (2004) ve Ashraf ve Foolad (2007) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır. 200 mg'lık taze yaprak örneği, 0.01 g'a duyarlı bir terazide tartılmış ve daha sonra 1 ml % 3 sülfosalisilik asit ile bir havanda homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler Eppendorf tüplerine aktarılaraq 4°C'de 15 dakika boyunca 14,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Yeni bir eppendorf tüpüne 0.1 ml örnek, 0.2 ml asit ninhidrin, 0.2 ml %96 glasiyel asetik asit, 0.1 ml %3 sülfosalisilik asit eklenerek, karışım hot plate üzerinde 95°C'de 1 saat inkübe edilmiş ve 5 dakika süreyle buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra, karışıma 1 mL tolüen ilave edilmiş ve 15-20 saniye boyunca vortekslenmiş ve tüpler 14,000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Karışımın üst fazı (kırmızı renkli) toplanmış ve absorban değerleri spektrofotometrede 520 nm'de okunmuştur. Kör olarak tolüen kullanılmıştır. Örneklerden elde edilen sonuçlar L-prolin standardından elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak prolin içeriği hesaplanmış ve prolin miktarı µmol/g yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir. Prolin içeriği, standart eğrinin eğimi ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$\text{OD} = \epsilon \cdot c \cdot l$ (OD: Optik yoğunluk, ϵ : sönme katsayısı (standart eğrinin eğimi), c: konsantrasyon, l: spektrofotometre için ışık yolunun uzunluğu)

$$\text{OD} = \epsilon \cdot c \cdot l = (\text{eğim } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \cdot c \cdot (1 \text{ cm})$$

$$\text{Prolin (}\mu\text{mol/g YA)} = (\text{OD/ eğim}) \times (10^{-3} \mu\text{mol/ml}) \times (1/\text{YA g}) \times 10$$

3.2.4.3. Yüksek sıcaklığa hassas/tolerant çeşitlerin belirlenmesi

Denemede incelenen çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklığa karşı hassasiyet/tolerans durumlarının belirlemek amacıyla, daha önce Öztürk ve Demirsoy (2023)'un armutlarda, Çelikel vd. (2008)'nin kocayemişte (*Arbutus unedo* L.) kullandığı Michelson (1958) tarafından geliştirilen "Tartılı Derecelendirme Metodu" modifiye edilerek kullanılmıştır. "Tartılı Derecelendirme" metodu, çileklerde yüksek sıcaklık stresi ile ilgili önceki çalışmalarda çeşitlerin hassasiyet/tolerans durumlarının belirlenmesi için kullanılmamıştır. Bu metod genel olarak tekerrür sayılarının, uygulamaların yetersiz olduğu ya da sonuca ulaşmak için araştırmacının inisiyatifi ve gözlemlerini ön plana çıkaran çalışmalarda kullanılmaktadır. Çalışmamızda incelediğimiz 21 çilek çeşidinin yüksek sıcağa hassasiyet/tolerans durumlarının

belirlenmesi için yaptığımız ölçüm ve gözlemler sonucunda, farklı yüksek sıcaklık derecelerine (30, 35, 40 ve 45°C) maruz kalan bitkilerden 40°C'ye maruz kalanlarda özellikle membran stabilite indeksi ve prolin içeriği bakımından kontrole (25°C) göre ayırt edici farklılıklar meydana gelmesi, 45°C sıcaklık uygulamasından sonra çeşitler arasında görsel olarak bitki zararlanma veya canlılık durumlarının net bir şekilde gözlemlenmesi, bu kriterler baz alınarak yapılacak "Tartılı Derecelendirme" yöntemi ile, çeşitleri hassas ve tolerant olarak derecelendirme bakımından sonuca ulaşabileceğimiz kanaatini oluşturmuştur. Bu nedenle bu çalışmada, kullanılan çeşitlerin yüksek sığa hassasiyet/tolerans durumlarının derecelendirilmesinde "Tartılı Derecelendirme" metodu tercih edilmiştir. Bu yöntemin uygulanmasında, 40°C'ye maruz kalan bitkilerin membran stabilite indeksi ve prolin içeriği ile 25°C'ye (kontrol) maruz kalan bitkilerin membran stabilite indeksi ve prolin içeriğindeki değişim oranı (%) ve bitkilerin 45°C'ye maruz kaldıktan sonraki görünümünü içeren özellikler dikkate alınmıştır. Her bir özellik için göreceli puanlar ile sınıf aralığı değer puanları çarpılmış ve her bir çeşit için bu özelliklerden elde edilen puanlar toplanmış ve çeşidin tartılı derecelendirmeye esas olan toplam puanı belirlenmiştir.

Sınıf aralığı, tüm çeşitlerde her bir özellik için mevcut en yüksek puandan en düşük puanın çıkarılması ve elde edilen değer, yüksek/orta/düşük şeklinde belirlenen grup sayısına (3 grup) bölünmesiyle elde edilmiştir. Sınıf aralık değer puanı ise tarafımızca tecrübelerimiz ve sınıf aralığının rakamsal önemi dikkate alınarak 1, 3 ve 5 şeklinde belirlenmiştir.

Denemede membran stabilite indeksi 15-53 arasında; prolin içeriği 35-120 arasında; 45°C yüksek sığa maruz kalan çileklerin görünümü 1-5 arasında derecelendirilmiş (en sağlıklı görüntüye 5 puan, en kötü görüntüye ise 1 puan) ve tüm özellikler için sınıf aralıklarına 1, 3 ve 5 şeklinde değer puanı verilmiştir.

"Tartılı Derecelendirme" yönteminde, membran stabilite indeksi ve prolin içeriği %30; görsel görünüm %40 oranında ağırlıklandırılmıştır.

Farklı çilek çeşitlerinin yüksek sığa hassasiyet/tolerans durumlarının belirlenmesinde kullanılan "Tartılı Derecelendirme" yönteminde ele alınan özellikler, bu özelliklere verilen görece puanlar, sınıf değerleri ve bunların puanları Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Tartılı derecelendirmede dikkate alınan özellikler, görece puanları, özelliklerin sınıf değerleri ve puanları

Özellikler	Görece Puanlar	Sınıf Değerleri	Grubu	Değer Puanları
MSİ	30	< 27.62 27.62 – 40.27 > 40.27	Yüksek Orta Düşük	5 3 1
Prolin	30	< 34.98 34.98 – 77.70 > 77.70	Yüksek Orta Düşük	5 3 1
Görünüm	40	5 4 3 2 1	En iyi İyi Orta Kötü En kötü	5 4 3 2 1

Tüm çeşitlerin tartılı ağırlıklı puanları belirlendikten sonra, yukarıdaki yaklaşımla denemeye alınan çeşitler hassas, orta ve tolerant olmak üzere üç gruba ayrılmıştır.

3.2.4.4. Moleküler değişiklikler

3.2.4.4.1. RNA izolasyonu ve kütüphane yapımı

Çilekte yüksek sıcaklık stresine hassasiyet/toleransın moleküler mekanizmalarını belirlemek için, tartılı derecelendirme sonucunda yüksek sıcaklığa hassas ('Fronteras') ve tolerant ('Portola') olarak belirlenen 2 çeşitte transkriptom analizleri yapılmıştır. RNA dizileme çalışmaları için bu iki çeşidin kontrol (25°C) ve stres koşullarına (40°C) maruz kalan bitkilerinden genç yaprak örnekleri toplanmıştır. Örnekler iki çeşitte her bir sıcaklık uygulamasına ait her bir tekerrürden ayrı ayrı alınmış ve sıvı azot ile muamele edilmiştir. Her tekerrüre ait minimum 100-120 mg bitki örneği elde edilmiştir. Aynı çeşit ve uygulamaya ait tekerrürler, hem bitki hem de iklim odasındaki konum etkisini en aza indirecek şekilde birleştirilmiştir. Denemede yüksek sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde, yüksek fenolik içeriği nedeniyle, trizol kullanılarak başarılı RNA izolasyonu gerçekleştirilememiş; dizileme için yeterli kalitede RNA'lar sadece CTAB yöntemi kullanılarak elde edilebilmiştir (Yu vd., 2012). Toplam RNA izolasyonu, birleştirilmiş her bir biyolojik örnek için üç kopya olarak yapılmıştır.

3.2.4.4.1.1. Tüm transkriptom ve miRNA dizileme kütüphanelerinin hazırlanması ve dizilenmesi

İki çeşit, iki sıcaklık uygulaması (25 ve 40°C) ve üç biyolojik kopya olmak üzere toplam 12 kütüphane hazırlanmıştır. Her bir örneğin kütüphane hazırlığı için toplam 2 µg RNA kullanılmıştır. Kütüphane hazırlanmadan önce toplam RNA örneklerinden Ribozomal RNA'lar temizlenmiştir. lncRNA-mRNA kütüphanelerinin hazırlanması için, Illumina® NEBNext® Ultra™ RNA Kütüphanesi Hazırlık Kiti (NEB, ABD) kullanılarak dizi-spesifik kütüphaneler oluşturulmuştur. Her bir örneğin dizilerini tanımlamak için barkod kodları kullanılmıştır. Fragmentasyon, divalent katyonlar altında yüksek sıcaklıkta NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (5X) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk zincir cDNA, rastgele hexamer primer ve M-MuLV Ters Transkriptaz (RNase H-) kullanılarak sentezlenmiştir. İkinci zincir cDNA sentezi daha sonra dTTP yerine dUTP'nin eklenmesiyle DNA Polimeraz I ve RNase H kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalan sarkan uçlar, ekzonükleaz/polimeraz aktiviteleri ile küt uçlara dönüştürülmüştür. DNA parçalarının 3' uçlarına adenilasyondan sonra, hibridizasyon için NEBNext Adaptörü eklenmiştir. Tercihen 250-300 bp boyunda olan cDNA fragmentlerini seçmek için, kütüphaneler AMPure XP sistemi (Beckman Coulter, Beverly, ABD) saflaştırılmıştır. Ardından, USER Enzyme (NEB, ABD), istenilen boyutta seçilen ve 37°C'de 15 dakika boyunca adaptör eklenmiş cDNA'ların ikinci zincirinin parçalanması için kullanılmıştır.

PCR reaksiyonları Phusion High-Fidelity DNA Polimeraz, Universal PCR primerleri ve İndeks (X) Primeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kütüphanelerin kalitesini belirlemek için sırasıyla Qubit2.0 Fluorometre ve Agilent 2100 Bioanalyzer kullanılmıştır. Son olarak ise kütüphanelerin kalitesi qRT-PCR kullanılarak belirlenmiştir. Kütüphane kalitesi belirlendikten sonra, lncRNA-mRNA kütüphaneleri etkin konsantrasyonlarına ve dizileme sisteminden alınacak veri miktarına göre birleştirilmiş ve Illumina NovaSeq 6000 ile dizilenmiştir. Paired-end 150 bp olacak şekilde dizilemeler tamamlanmıştır.

3.2.4.4.2. Biyoinformatik analizler

3.4.4.4.2.1. Elde edilen ham verilerin analizi

Tüm transkriptom dizilemelerden fastq formatında elde edilen ham veriler (ham okumalar) ilk olarak Perl scriptleri (cutadapt, trimomatic) kullanılarak temizlenmiştir. Bu adımda, bağdaştırıcılar, poli-N veya düşük kaliteli okumalar

içeren okumalar kesilerek temiz veriler (temiz okumalar) elde edildi. Aynı zamanda temiz verilerin Q20, Q30 ve GC değerleri hesaplanmıştır. Tüm analizlerde bu temiz ve yüksek kaliteli okumalar kullanılmıştır.

3.4.4.4.2.2. Transkript oluşturarak okuma sayısını belirleme

Elde edilen temiz okumalar Hisat2 (<https://ccb.jhu.edu/software/hisat/index.shtml>) ile Phytozome v13 veri tabanından indirilen referans genoma (Nötr gün çeşidi Royal Royce'e) hizalanmıştır. Hisat tarafından oluşturulan hizalama dosyaları (bam dosyaları) Stringtie-1.3.3b kullanılarak transkriptlere dönüştürülmüş ve her bir gende eşleştirilen okuma sayısını saymak için kullanılmıştır. Farklı ifade olan genler (DEGs) ise RSEM (<http://deweylab.biostat.wisc.edu/RSEM>) ile her bir örnek için FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped) birimi olarak belirlenmiştir. FPKM, basit ve genellikle kullanılan bir ifade düzeyi normalleştirme yöntemidir. Hem okuma derinliği hem de genom boyutuna bağlı olarak ortaya çıkacak hataları normalize etmek için FPKM değeri tercih edilmiştir. Unigenlerin ifade sonuçlarını kullanarak örnekler arasında farklı ifade olan genler (DEGs) DESeq2 ile belirlenmiştir. DESeq2 negatif binominal dağılım kullanılarak Love vd. (2014) tarafından gerçekleştirildiği gibi (Fold Change ≥ 2.00 ve Adjusted Pvalue ≤ 0.05) kullanılmıştır. Tüm DEGs (mRNA ve lncRNA) analizlerinde incelenen 2 çeşidin kontrol bitkileri (25°C) ve yüksek sıcaklık stresine (40°C) maruz kalan bitkileri karşılaştırılmıştır.

Transkriptlerin protein kodlama potansiyeli 3 program (Coding-Non-Coding-Index (CNCI) (skor < 0), Coding Potential Calculator (CPC) (skor < 0), ve Pfam-scan (E-değeri < 0.001)) yardımıyla belirlenmiştir (Wang vd., 2014). Bu şekilde tanımlanan transkriptler lncRNA analizinin kapsamı dışında tutulmuştur. Yukarıdaki bütün filtrelerden geçen transkript ya da unigenler aday lncRNA olarak kabul edilmiş ve elde edilen çilek transkriptleri Lncrnadb (<http://www.lncrnadb.org/>) veri tabanında bulunan lncRNA dizilerine karşı Blast yapılmıştır.

3.4.4.4.2.3. Gen atıflandırılması ve ontolojisi

Farklı ifade edildiği tespit edilen transkriptler (DEGs) kullanılarak 7 fonksiyonel atıflandırma veri tabanında (NR, NT, GO, COG, KEGG, Swissprot ve InterproScan) BLAST hizalamalar şeklinde taramalar yapılarak atıflandırmalar yapılmıştır. “E” değeri (E-value) $1e-5$ olan, %80’in üzerinde homoloji gösteren contigler, protein kodlayan gen dizileri olarak atıflandırılmıştır. Bu diziler Blast2GO

ve Ontologizer 2.0 (Parent-Child-Intersection method ile Benjamini-Hochberg çoklu testleme düzeltmesi) ile UniProtKB bilgi bankasında bulunan dizilere karşı taranmış ve her birinin fonksiyonel gruplandırılmaları TAIR bilgi bankasında bulunan GeneOntology (GO) terimlerine göre yapılmıştır. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analizi ile de transkriptlerin rol aldıkları yollar belirlenmiştir.

3.4.4.4.2.4. Eş ifade edilen gen ağlarının oluşturulması

Sıcaklık uygulamaları altında benzer ifade profillerine sahip gen gruplarını tanımlamak için, önceden tanımlanmış parametrelerle R paketi WGCNA (Langfelder ve Horvath, 2008) kullanılarak eş ifade ağları oluşturulmuştur. Log₂'ye göre 2 ya da daha üstü bir değişim göstererek farklı ifade olduğu tespit edilen genler bu ağların oluşturulması için kullanılmıştır. Eş ifade modülleri, blockwise modül fonksiyonuyla TOMType="unsigned", maxBlockSize = 20000, mergeCutHeight = 0,4, minModuleSize = 15 parametreleri kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşan modülün ifade profili, modülün ilk temel bileşenine karşılık gelen modül eigene (ME) olarak verilmiştir. Ayrıca belirlenen lncRNA'ların fonksiyonel atıflandırmaları eş ifade analizleri ile gerçekleştirilmiştir (Mattick ve Rinn, 2015). Bunlara ilaveten TargetFinder (Lavorgna vd.,1999) ile mRNA ve lncRNA'ları hedefleyen miRNA'lar tespit edilmiştir.

3.4.4.4.2.5. Transkripsiyon faktörlerinin tanımlanması

Stringtie ile elde edilen bütün transkript dizileri kullanılarak öncelikle açık okuma çerçevesinin (ORF) belirlenmesi için getorf (<http://genome.csdb.cn/cgi-bin/emboss/help/getorf>) programında -minsize 150 şeklindeki parametre ile çalışmalar yapılmıştır. Buradan elde edilen farklı ifade olan (DEGs) ORF'ler Plant Transcription Factor Database v3.0 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) veri bankasında hmmsearch modülünde bilinen bütün TF domainlerine karşı hizalanarak transkripsiyon faktörleri belirlenmiştir.

3.2.4.4.3. qRT-PCR ile gen ifadesinin belirlenmesi

Çilek bitkilerinde yapılan transkriptom analizi sonucunda ifade seviyelerinde farklılık gösteren genlerden bazıları seçilmiş ve bu genlerin ifadeleri kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR kullanılarak doğrulanmıştır. Bu kapsamda 5 HSP geni (HSP) ve 16 mRNA hedefli gen olmak üzere toplam 21 gen seçilmiştir. Seçilen bu genler yapılan karşılaştırmalarda diferansiyel olarak farklı ifade olduğu belirlenen ve yüksek sıcaklığa hassasiyet/tolerans ile alakalı olduğu düşünülen genlerdir. Seçilen her gen için qRT-PCR'ye uygun bir çift primer tasarlanmıştır. Primer dizaynı için Primer

Blast kullanılmış ve Tm değerleri 60-62°C olacak şekilde tasarlanmıştır. Primer dimer oluşumları ise Thermo Oligo Analyzer aracıyla kontrol edilmiştir. Primer dimer oluşumu Thermo Oligo Analyzer aracı ile kontrol edilmiştir. Tasarlanan primerlerin listesi Tablo 3.3'te verilmiştir. cDNA sentezi, RevertAid cDNA sentez kiti (Thermo, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, üretici firmanın tavsiyelerine göre gen spesifik primerler ve Ampliqon SYBR Green karışımı kullanılarak qRT-PCR'ye tabi tutulmuştur. Gen ifade analizleri Agilent Real-Time PCR sisteminde (Agilent, ABD) belirlenmiş ve ifade seviyeleri qRT-PCR'den elde edilen değerler kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

Tablo 3.3 Transkriptom analizi sonucunda diferansiyel olarak ifade edilen 21 genin qRT-PCR analizi için tasarlanmış primer bilgileri

Gen tanımı	Gen ID	Hedef dizi	Primer dizisi
Glycolytic process	FxaYL_131g0769800	İleri primer Geri primer	CACCCCGTTGGGATCATTCA TCGACCGCGAAATTCTTGGA
Hydrolase activity	FxaYL_121g0718900	İleri primer Geri primer	TGACGTTGAGAACAGGATCAAGA GGATCACACCCCTTTGTTGC
Syntaxin	FxaYL_131g0777570	İleri primer Geri primer	CAAACAGAGCCAAACCCATCG TGAAGCAAAACCCAGGTGGT
Oxoglu/Fe-dep_dioxygenase, IPNS-like_FE2OG_OXY, DIOX_N, IPNS-like_sf	FxaYL_121g0725330	İleri primer Geri primer	TCTGGACAAGGTACGCGAAG GATCCTCCCCAAACCCCTTCA
Heat shock protein (sHSP)	FxaYL_341g0272830	İleri primer Geri primer	TATTGTGCTGGAGGTCTCTGC GCGCATCTAAGTCTGTGCAA
Osmotin/thaumatin-like superfamily	FxaYL_642g0168640	İleri primer Geri primer	TCGCAGGTATCCCAATTTCTCT AGGTTGCGGCATTAAGGCAT
E3 ligase, CCH-type zinc finger	FxaYL_121g0724030	İleri primer Geri primer	GAAATTCGAGGAGCCCCAA TAACCGGAGCATTGATGGG
Osmotin/thaumatin-like superfamily	FxaYL_642g0168640	İleri primer Geri primer	TCGCAGGTATCCCAATTTCTCT AGGTTGCGGCATTAAGGCAT
Osmotin/thaumatin-like superfamily	FxaYL_112g0706430	İleri primer Geri primer	TCCGACGAAGCAACATACCC AAACCGGAACTACGACTTGAA
SANT/Myb domain	FxaYL_131g0783880	İleri primer Geri primer	AGCTAGCACTGCCACTTTCT TCTGTTTCGTCCTGGCAGTTT
Protein of unknown function DUF1068	FxaYL_131g0788120	İleri primer Geri primer	CCTGCTCAAAATTGCTCCCG ACCAAACCTTCCAGAAACCCAG
Fragaria vesca subsp. vesca 15.7kDa heat shock protein peroxisomal	LOC101313245	İleri primer Geri primer	GGAAGGTGGGAAAGAGGAAG TTTCCGGCAACTCAATTC
Fragaria vesca subsp. vesca 18.1 kDa class 1 heat shock protein like	LOC101304168	İleri primer Geri primer	AAGAAGAAGCCCGACCACTT AATGTTACCCGCATCTGAGC

Fragaria vesca subsp. Vesca class 1 heat shock protein like	LOC101291264	İleri primer Geri primer	ACGTAGTCGTGGCAAGTTCC ACCTCCTGCTTGGGGATAGT
Fragaria vesca subsp. vesca heat stress transcription protein A-1 like transcript variant 2	LOC101290755	İleri primer Geri primer	GGCTGAAGCTGGAACATATGC AGAAGACATGCTTCGGTGCT
Homeobox-leucine zipper protein TF	FxaYL_122g0782910	İleri primer Geri primer	CAAGTTGCCGTCTGGTTTCAG GAGCCGTCTCAAGGTCGAG
chitinase activity	FxaYL_421g0532240	İleri primer Geri primer	TTATTAACCAGGCTGCCGCT GGTGGTAGCGAAATCGGTGT
Ubiquitin protein ligase activity	FxaYL_131g0766490	İleri primer Geri primer	GGCACGAGAGGAAGCCATTAG GTTTGAGCAACTTTCTGGCCT
Ubiquitin protein ligase activity	FxaYL_441g0227110	İleri primer Geri primer	CGGCCTAGCCAACAATGTGA CAAACAGGCTAAGCTCCCCA
Sieve element occlusion, C-terminal / phloem development	FxaYL_421g0528340	İleri primer Geri primer	CGGCCTAGCAAACAATGTGAC AGCAAACAGGCTAAGCTCCC
Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type	FxaYL_122g0773310	İleri primer Geri primer	GCGATGGAAGATCGGTACAGT AAAGACTCATCGAACCTCGCC
E3 ligase, CCCH-type zinc finger / RNA-binding protein ZFP36-like	FxaYL_121g0724030	İleri primer Geri primer	GTTTATGCCGGTCCAATCGC TGGACCTTGCTGCTCAAACCT

3.2.4.5. İstatistiksel Değerlendirme

Fizyolojik ve biyokimyasal parametrelere ilişkin veriler, iki faktörlü Tesadüf Parselleri deneme desenine uygun olarak SPSS 22 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalamaların karşılaştırılması P %5 önem düzeyinde Duncan Çoklu Karşılaştırma metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin tabloları MS Office Excel 16 programı kullanılarak yapılmış ve grafiklerin çiziminde Sigma Plot 10.0 programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Yüksek sıcaklık uygulamalarının fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler üzerine etkileri

4.1.1. Yaprak yüzey sıcaklığı

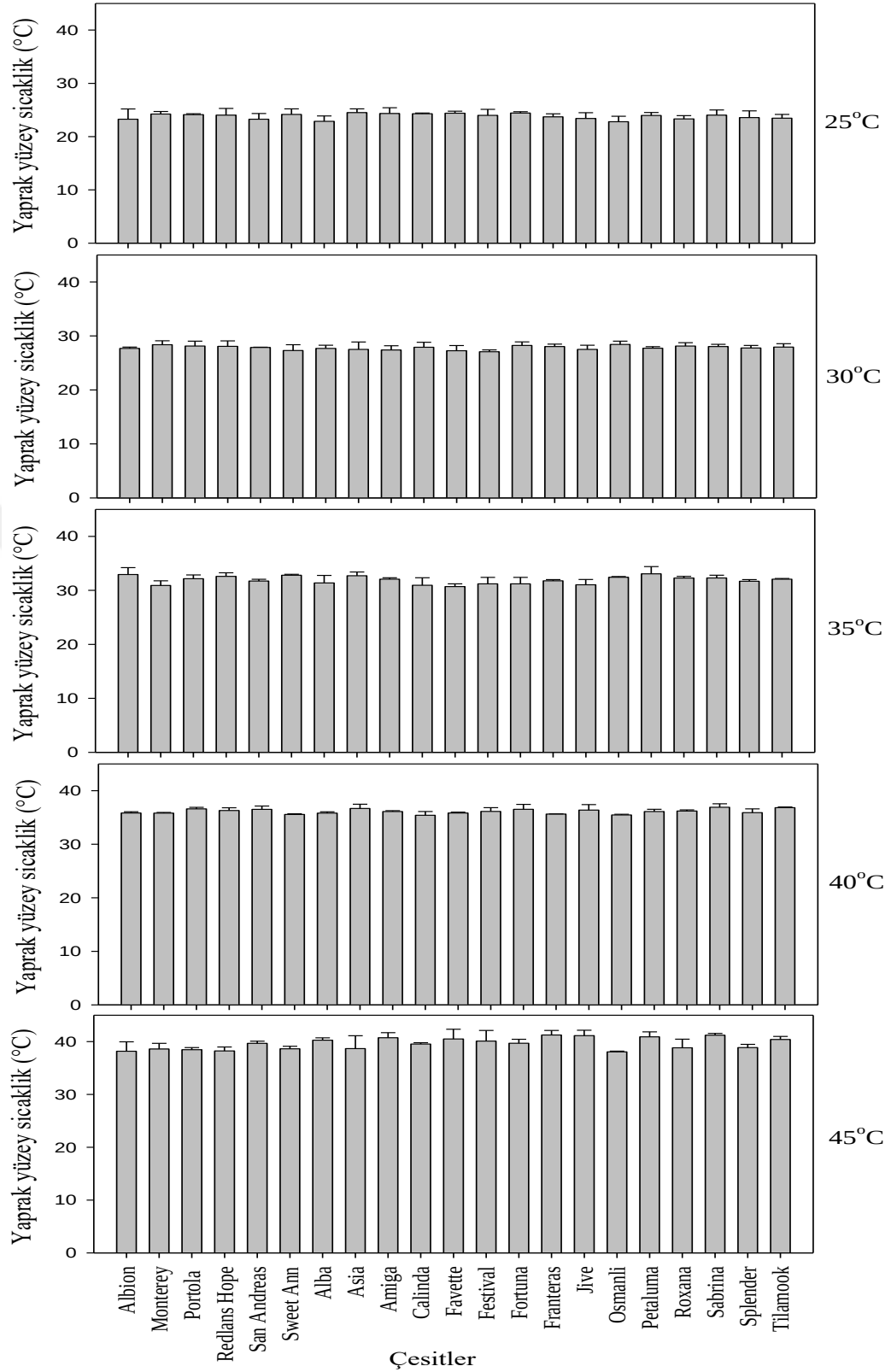
Sıcaklık uygulamalarının farklı çilek çeşitlerinin yaprak yüzey sıcaklığı üzerindeki etkileri Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Çileklerin yaprak yüzey sıcaklığı yüksek sıcaklık uygulamalarından önemli derecede etkilenmiştir. Ancak, yaprak yüzey sıcaklığı açısından çeşitler ve çeşit x sıcaklık stresi uygulamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Uygulanan sıcaklığın 25°C’den 45°C’ye yükselmesine paralel olarak yaprak yüzey sıcaklığı artmış, yaprak yüzey sıcaklığı 25°C’de 24.0°C’den, 45°C’de 38.9°C’ye yükselmiştir (Tablo 4.1). Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, çeşitlerin yaprak yüzey sıcaklıkları her bir sıcaklık seviyesinde benzerlik göstermiştir. Sıcaklık 25°C’den 45°C’ye arttıkça, yaprak yüzey sıcaklığı stresin şiddetine bağlı olarak artmıştır. Yaprak yüzey sıcaklığı, 30°C’de ılımlı derecede artarken, 30°C’den sonra oldukça fazla artış göstermiştir. Denemede incelenen çeşitler arasında yaprak yüzey sıcaklığı açısından önemli farklılıklar olmamakla birlikte, yaprak yüzey sıcaklığı ‘Tillamook’, ‘Roxana’, ‘Redlands Hope’ ve ‘Sweet Ann’de diğer çeşitlere kıyasla biraz daha yüksek (32.00-32.10°C) olmuştur.

Tablo 4.1 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının yaprak yüzey sıcaklığı üzerine etkileri

Sıcaklıklar (°C)	Yaprak yüzey sıcaklığı (°C)
25	24.00 e
30	26.90 d
35	31.00 c
40	35.30 b
45	38.90 a
Çeşitler	
Albion	30.50
Monterey	30.80
Portola	31.60
Redlands Hope	32.00
San Andreas	31.70
Sweet Ann	32.00
Alba	30.60
Asia	31.30
Amiga	30.50
Calinda	30.90
Favette	30.90
Festival	30.60
Fortuna	31.30
Fronteras	30.70
Jive	30.60
Osmanli	31.00
Petaluma	31.60
Roxana	32.10
Sabrina	31.60
Splendor	31.70
Tillamook	32.10
Önemlilik	
Sıcaklık	*
Çeşit	ÖD
Sıcaklık × Çeşit	ÖD

Aynı sütunda farklı harflarla gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır (P<0.05)

ÖD: Önemli değil



Şekil 4.1 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre yaprak yüzey sıcaklığının değişimi

4.1.2. Yaprak oransal su içeriği

Çilek yapraklarının oransal su içeriği yüksek sıcaklık uygulamaları, çeşitler ve bunların etkileşimi tarafından önemli ölçüde etkilenmiştir (Tablo 4.2). Çilek bitkilerinin yaprak oransal su içeriği farklı yüksek sıcaklık uygulamalarına göre karşılaştırıldığında, sıcaklığın 25°C'den (kontrol) 30°C'ye yükselmesiyle yaprak oransal su içeriğinin %88.22'den %89.74'e yükseldiği görülmüştür. Daha sonra 35°C'den 45°C'ye kadar sıcaklık artışları, yaprak oransal su içeriğinde kontrole göre önemli bir azalmaya neden olmuş; oransal su içeriği 35°C'de %87.71, 40°C'de %86.67, 45°C'de %74.47 olarak belirlenmiştir. Yaprak oransal su içeriği 45°C'de en düşük olarak belirlenmiştir.

Yaprak oransal su içeriği incelenen çeşitlerde %79.03-91.48 arasında değişiklik göstermiştir. Çeşitler arasında yaprak oransal su içeriği bakımından önemli bir farklılık bulunmuş, çeşitler arasında 'Portola' en yüksek yaprak oransal su içeriğine (%91.48) sahip olmuştur. 'Tillamook' çeşidi ise en düşük yaprak oransal su içeriğine (%79.03) sahip olmuş, bunu 'Jive', 'Sabrina', 'Roxana', 'Fronteras', 'Festival' ve 'Alba' çeşitleri takip etmiştir (%82.13-83.15) (Tablo 4.2).

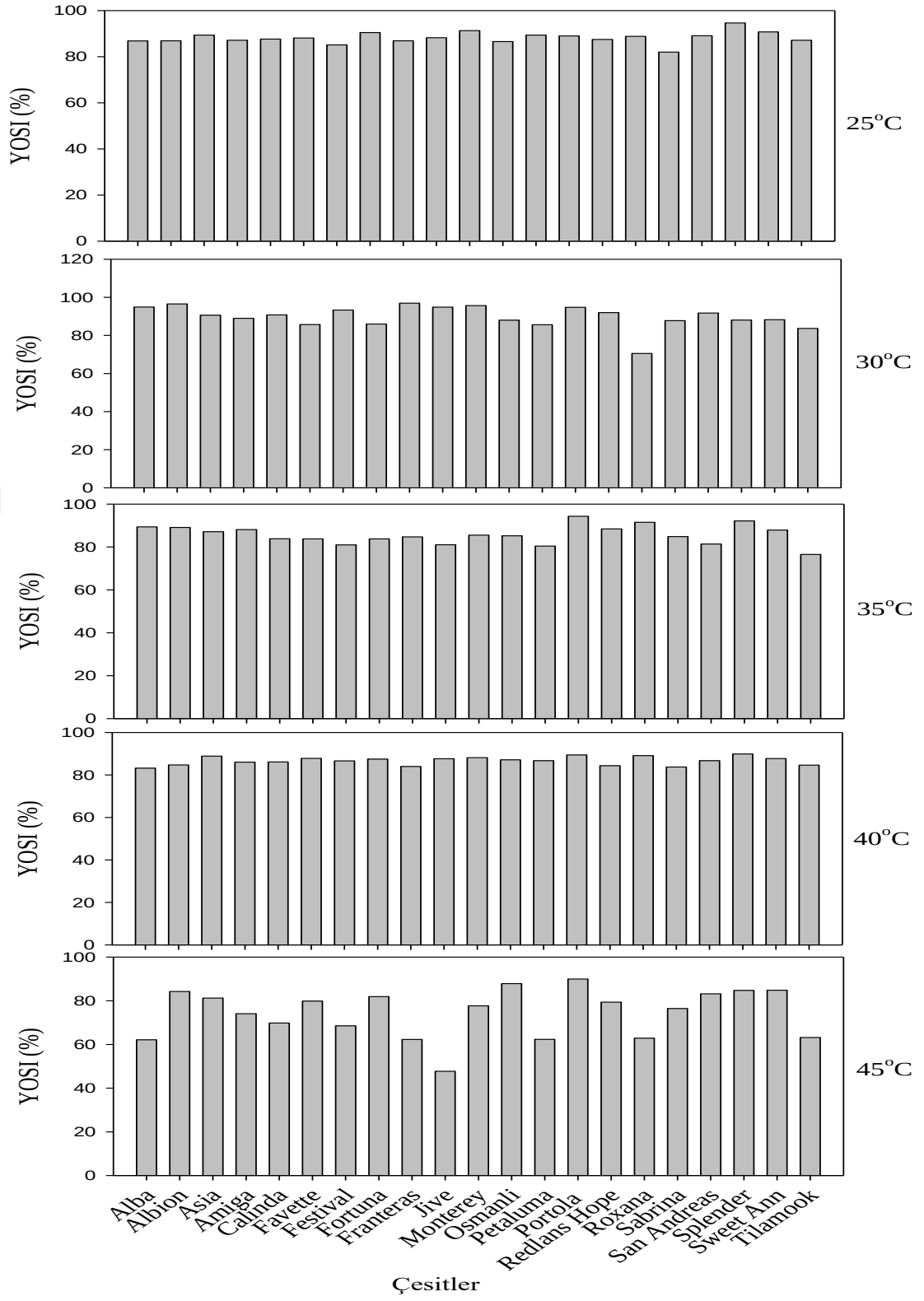
25 ve 30°C sıcaklıklarda tüm çeşitlerin yaprak oransal su içeriği genel olarak %88 civarı veya biraz üzerinde olmuştur. 35 ve 40°C'de, yaprak oransal su içeriği hafifçe azalma eğiliminde olmuş ve genel olarak bu sıcaklık derecelerinde çeşitler arasında yaprak oransal su içeriği açısından önemli bir farklılık meydana gelmemiş, ancak 45°C'de yaprak oransal su içeriğinde belirgin bir değişiklik gözlenmiştir. 45°C'de 'Jive', 'Fronteras', 'Alba' ve 'Roxana' çeşitleri daha düşük yaprak oransal su içeriğine sahipken, 'Portola', 'Osmanlı', 'Splendor' ve 'Sweet Ann' çeşitleri daha yüksek yaprak oransal su içeriğine sahip olmuşlardır (Şekil 4.2).

Tablo 4.2 Farklı ilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının yaprak oransal su içeriği üzerine etkileri

Sıcaklıklar (°C)	Yaprak oransal su içeriği (%)
25	88.22 b
30	89.74 a
35	85.71 c
40	86.67 c
45	74.47 d
Çeşitler	
Albion	88.29 abc
Monterey	87.65 bc
Portola	91.48 a
Redlands Hope	86.32 cde
San Andreas	86.43 bcde
Sweet Ann	87.91 bc
Alba	83.28 efg
Asia	87.44 bc
Amiga	84.87 cde
Calinda	83.63 def
Favette	85.04 cde
Festival	82.90 efg
Fortuna	85.91 cde
Fronteras	82.96 efg
Jive	79.90 gh
Osmanli	86.95 bcd
Petaluma	80.89 fgh
Roxana	80.57 fgh
Sabrina	82.96 efg
Splendor	89.89 ab
Tillamook	79.03 h
Önemlilik	
Sıcaklık	*
eşit	*
Sıcaklık × eşit	*

Aynı sütunda farklı harflarla gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır (P<0.05)

D: nemli değil



Şekil 4.2 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre yaprak oransal su içeriğinin değişimi

4.1.3. Membran stabilite indeksi

Sıcaklık uygulamaları, çeşitler ve sıcaklık uygulamaları $\times$ çeşitler, çilek yapraklarının membran stabilite indeksini önemli ölçüde etkilemiştir (Tablo 4.3). Sıcaklığın 25'ten 40°C'ye artırılması, membran stabilite indeksinde önemli bir azalmaya (%21.57'den %13.58'e) yol açmıştır. 40 ve 45°C'deki membran stabilite indeksi istatistiksel olarak benzer ve en düşük değerde olmuştur.

Çeşitler arasında, membran stabilite indeksinin en yüksek değeri 'Portola' (20.81%) ve 'Tillamook' (19.93%) çeşitlerinde gözlenmiştir. En düşük membran stabilite indeksi (13.38%) değeri 'Amiga' çeşidinde saptanmıştır (Tablo 4.3).

Sıcaklık uygulamaları ve çeşitlerin etkileşimi dikkate alındığında en yüksek membran stabilite indeksinin 30°C'ye maruz kalan 'Roxana' (%30.02) ve ardından 'Portola' (%26.96) çeşitlerinde; en düşük membran stabilite indeksinin ise 45°C'ye maruz kalan 'Roxana' (%10.32) çeşidinde fark edilmiştir.

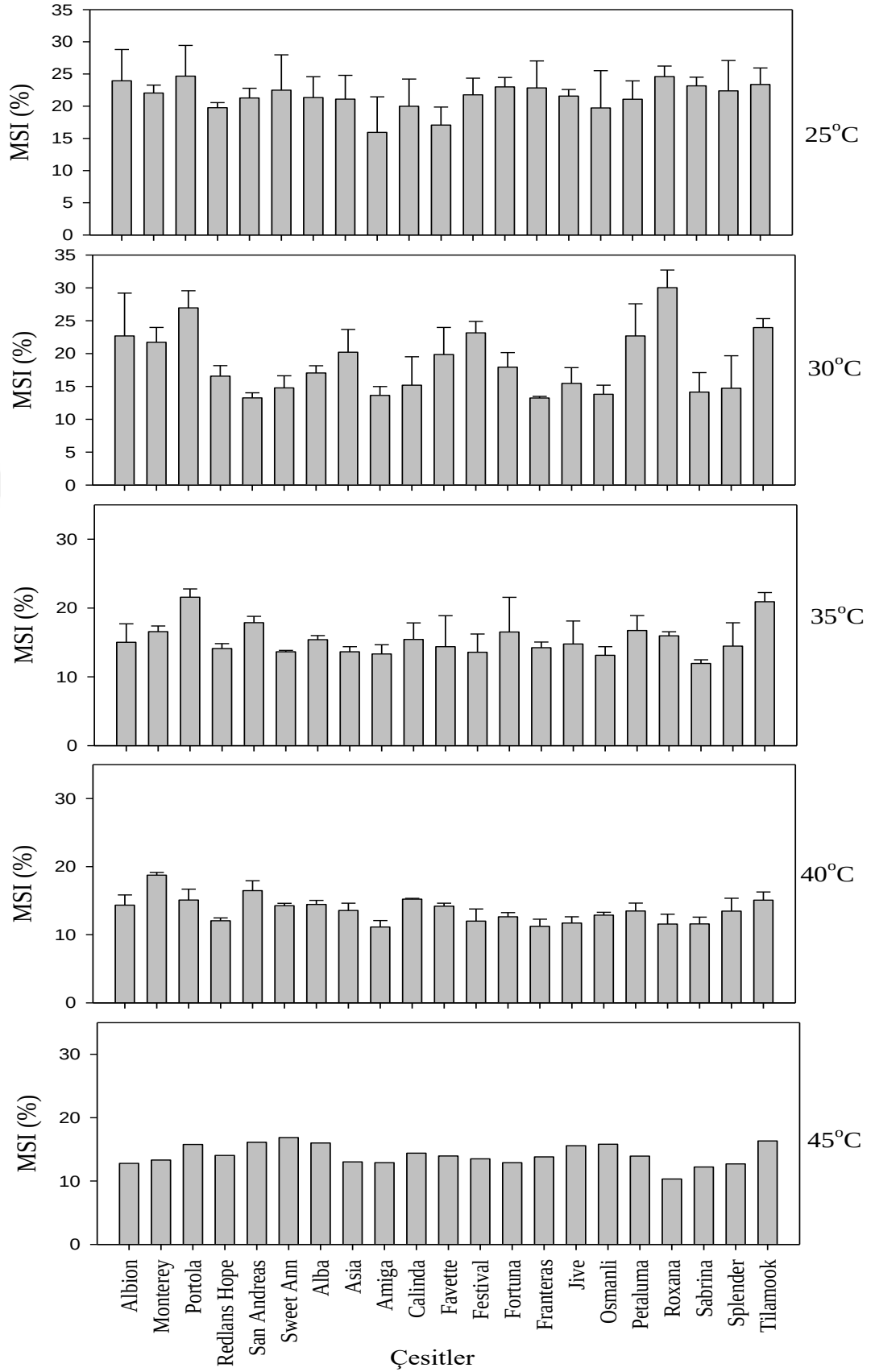
Her bir sıcaklık derecesinde çeşitlerin membran stabilite indeksi birbirinden önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Genel olarak tüm çeşitlerde ('Roxana' ve 'Portola' hariç) 30°C'de kontrole (25°C) göre membran stabilite indeksi azalmaya başlamış, en belirgin azalma %37.04 ve %34.58 olmak üzere sırasıyla 40 ve 45°C'de gerçekleşmiştir. Çeşitler arasında 'Portola'nın, tüm sıcaklıklarda yüksek membran stabilite indeksini sürdürdüğü fark edilmiştir. 'Portola'nın yanı sıra, 35, 40 ve 45°C yüksek sıcaklıklarda 'Monterey', 'San Andreas' ve 'Sweet Ann' gibi nötr gün çeşitlerinin de tutarlı olarak diğer çeşitlerden daha yüksek membran stabilite indeksine sahip oldukları fark edilmiştir (Şekil 4.3). 'Amiga' çeşidinin ise tutarlı olarak her sıcaklık derecesinde düşük membran stabilite indeksi gösterdiği görülmüştür.

Tablo 4.3 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının membran stabilite indeksi üzerine etkileri

Sıcaklıklar (°C)	Membran stabilite indeksi (%)
25	21.57 a
30	18.62 b
35	15.39 c
40	13.58 d
45	14.11 d
Çeşitler	
Albion	17.76 bcd
Monterey	18.48 abc
Portola	20.81 a
Redlands Hope	15.31 def
San Andreas	17.00 cde
Sweet Ann	16.41 cde
Alba	16.85 cde
Asia	16.30 cde
Amiga	13.38 f
Calinda	16.04 cdef
Favette	15.90 cdef
Festival	16.80 cde
Fortuna	16.59 cde
Franteras	15.07 def
Jive	15.83 cdef
Osmanli	15.07 def
Petaluma	17.58 bcd
Roxana	18.50 abc
Sabrina	14.61 ef
Splendor	15.54 def
Tillamook	19.93 ab
Önemlilik	
Sıcaklık	*
Çeşit	*
Sıcaklık × Çeşit	*

Aynı sütunda farklı harflarla gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır (P<0.05)

ÖD: Önemli değil



Şekil 4.3 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre membran stabilite indeksinin değişimi

4.1.4. Toplam klorofil içeriği

Çilek bitkilerinde yüksek sıcaklık stresi uygulamaları, çeşitler ve bunların etkileşiminin toplam klorofil içeriği üzerindeki etkisi önemli bulunmuştur (Tablo 4.4). Toplam klorofil içeriği kontrol bitkileri (25°C) ve 30°C' sıcaklığa maruz kalan bitkilerde en yüksek bulunmuştur (sırasıyla 30.97 ve 31.76 µg/ml). En düşük toplam klorofil içeriği ise 35, 40 ve 45°C'ye (sırasıyla 26.68, 25.39 ve 25.66 µg/ml) maruz kalan bitkilerde kaydedilmiştir. Yani klorofil içeriği 30°C'den sonra daha yüksek sıcaklıklarda azalmış, ancak 35, 40 ve 45°C'deki toplam klorofil içeriği istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. İncelenen çeşitler toplam klorofil içeriği açısından önemli farklılıklar göstermiştir. Toplam klorofil içeriği en yüksek 'Redlands Hope' (31.61µg/ml) ve 'Fortuna' (31.60µg/ml) çeşitlerinde, en düşük ise 'Festival' çeşidinde (25.02µg/ml) belirlenmiştir.

25 ve 30°C'de, çeşitlerin çoğunun klorofil içeriği genellikle 30 µg/ml'nin üzerinde tespit edilmiş ve klorofil içeriği bakımından 30°C'de 25°C'ye kıyasla hafif bir artış gözlenmiştir. 30°C'den sonra, klorofil içeriği kontrole göre 35°C'de yaklaşık %13.85; 40°C'da %18.02; 45°C'de %17.15 azalarak artan sıcaklıklarla kademeli olarak azalmıştır (Şekil 4.4). Çeşitlerin klorofil içerikleri her sıcaklıkta farklı davranış göstermiş ve bu konuda stabil bir durum tespit edilememiştir. Ancak daha önceki çalışmalarda yüksek sıcaklığa dayanıklı olduğu belirlenen 'Redlands Hope'un klorofil içeriğinin nispeten stabil bir davranış izlemesi, 40°C'ye kadar fazla bir değişiklik göstermemesi ve 35°C'den sonra klorofil içeriğinin çok azalmamış olması dikkat çekici bulunmuştur. Ayrıca 'Amiga' çeşidinde 30°C'den sonra klorofil içeriğinde önemli bir azalma olduğu görülmüştür.

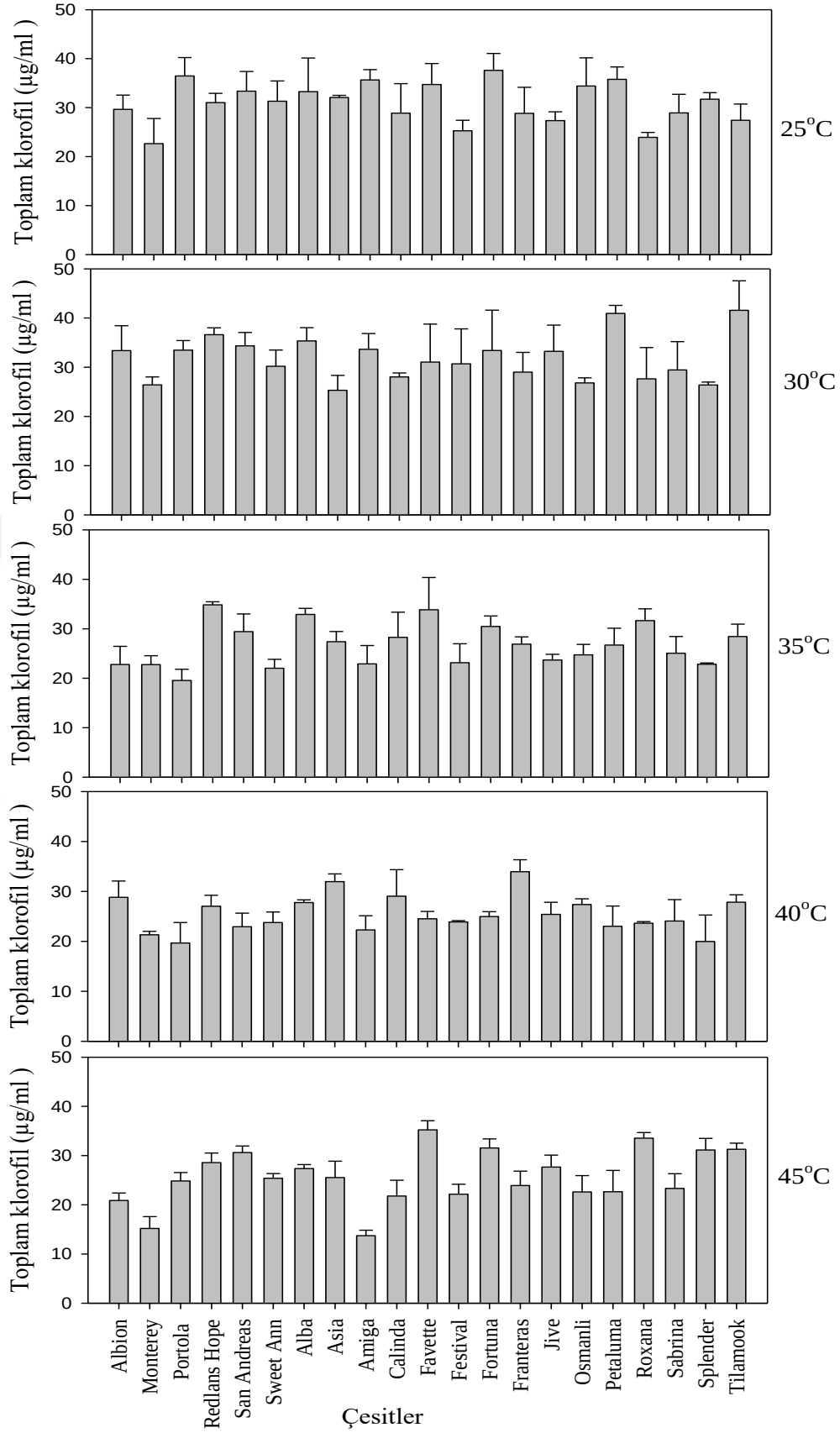
Denememizde, sıcaklık × çeşit etkileşiminin çilek bitkilerinin toplam klorofil içeriğini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Toplam klorofil içeriği en yüksek (41.58 µg/ml) 30°C'ye maruz bırakılan 'Tillamook' çilek çeşidinde, en düşük (13.73µg/ml) 45°C'deki 'Amiga' çilek çeşidinde gözlenmiştir.

Tablo 4.4 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının bitkilerin toplam klorofil içeriği üzerine etkileri

Sıcaklıklar (°C)	Toplam klorofil içeriği (µg/ml)
25	30.97 a
30	31.76 a
35	26.68 b
40	25.39 b
45	25.66 b
Çeşitler	
Albion	27.10 cd
Monterey	21.67 e
Portola	26.80 cd
Redlands Hope	31.61 a
San Andreas	30.14 abc
Sweet Ann	26.54 cd
Alba	31.33 ab
Asia	28.46 abcd
Amiga	25.64 d
Calinda	27.20 cd
Favette	31.88 a
Festival	25.02 de
Fortuna	31.60 a
Fronteras	28.52 abcd
Jive	27.47 bcd
Osmanli	27.19 cd
Petaluma	29.82 abc
Roxana	28.08 abcd
Sabrina	26.16 cd
Splendor	26.41 cd
Tillamook	31.31 ab
Önemlilik	
Sıcaklık	*
Çeşit	*
Sıcaklık × Çeşit	*

Aynı sütunda farklı harflarla gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır (P<0.05)

ÖD: Önemli değil



Şekil 4.4 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre toplam klorofil içeriğinin değişimi

4.1.5. Malondialdehid (MDA) içeriği

Yüksek sıcaklık uygulaması altında çilek çeşitlerinin yapraklarındaki MDA içeriği Tablo 4.5'te verilmiştir. Yüksek sıcaklık uygulamaları ve çeşitler arasında MDA içeriği bakımından önemli farklılıklar bulunurken, sıcaklık uygulamaları × çeşit etkileşiminin MDA içeriği üzerindeki etkisi önemsiz bulunmuştur.

Sıcaklık uygulamalarına göre MDA içeriği karşılaştırıldığında, 25°C'den 45°C'ye kadar, uygulanan sıcaklığa paralel olarak MDA içeriğinde bir artış gözlenmiştir. En yüksek MDA içeriği 40°C (53.66 nmol/g) ve 45°C (50.64 nmol/g) yüksek sıcaklıklara maruz kalan çilek bitkilerinde tespit edilirken, en düşük MDA içeriği (25.06 nmol/g) kontrol bitkilerinde (25°C) görülmüştür (Tablo 4.5).

Çeşitler arasında 'Fronteras' (54.16 nmol/g) ve 'Alba' (52.30 nmol/g) çeşitleri en yüksek MDA içeriği değerlerine sahipken, en düşük MDA içeriği değeri 'Osmanlı' (26.33 nmol/g) ve 'Roxana' (30,48 nmol/g) çeşitlerinde görülmüştür.

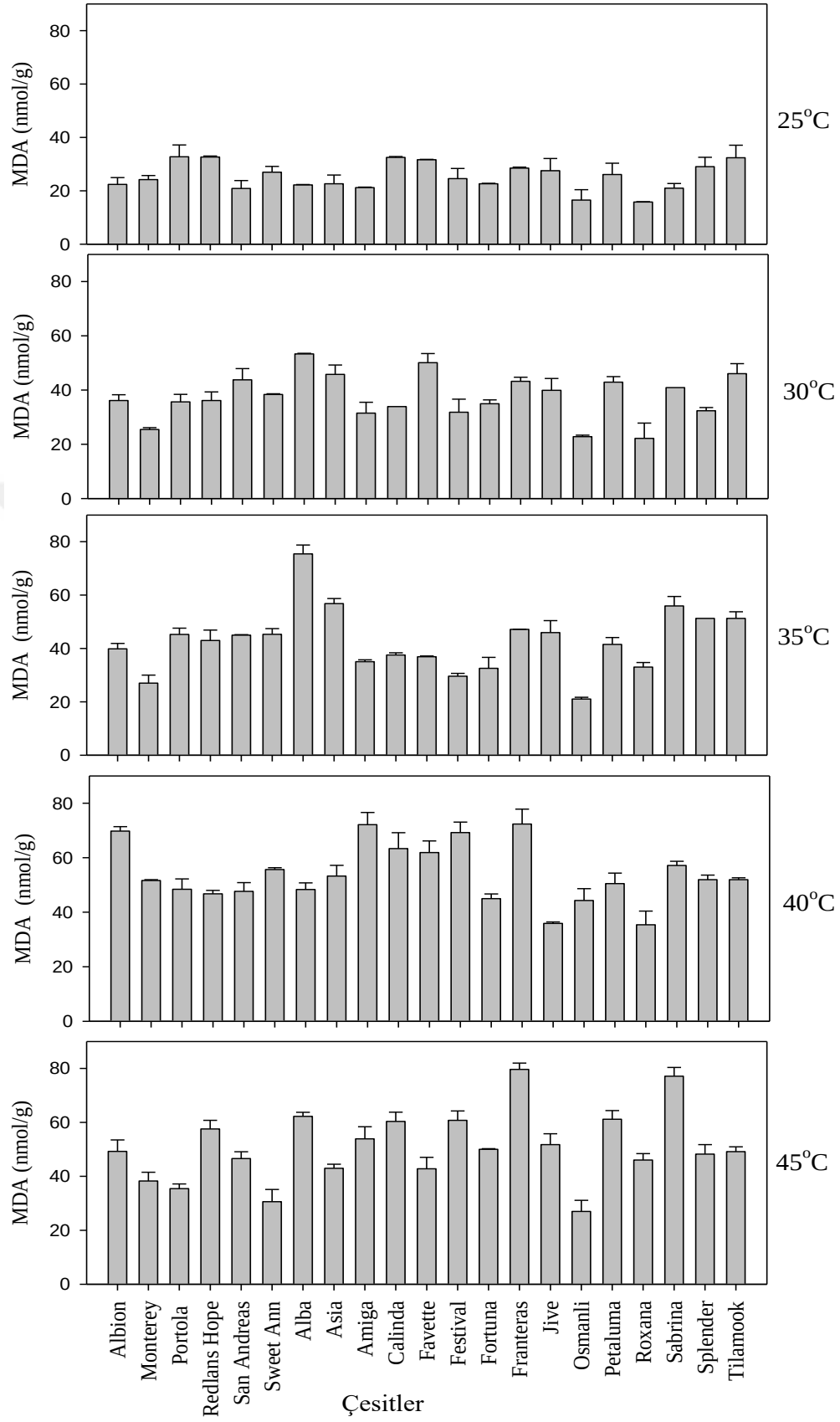
Şekil 4.5 incelendiğinde, her sıcaklık uygulamasında çeşitlerin çoğunun MDA seviyeleri arasında önemli bir fark olduğu görülmüştür. Sıcaklığın 25°C'den 45°C'ye kademeli olarak yükselmesiyle tüm çeşitlerin MDA içeriğinde artış gözlemlenmiştir. MDA içeriğindeki artış, 30 ve 35°C sıcaklıklara maruz kalan bitkilerde daha ılımlı iken, özellikle 40°C olmak üzere 40 ve 45°C sıcaklıklarda, incelenen tüm çeşitlerin MDA içeriğinde oldukça fazla bir artış gerçekleşmiştir. MDA içeriği hem 40°C hem de 45°C'de 'Fronteras' çeşidinde en yüksek olarak belirlenmiştir (sırasıyla 72.32 ve 79.65 nmol/g). En düşük MDA içeriği (27.00 nmol/g) 45°C'de 'Osmanlı' çeşidinde gözlenmiştir.

Tablo 4.5 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının bitkilerin MDA içeriği üzerine etkileri

Sıcaklıklar (°C)	MDA içeriği (nmol/g)
25	25.06 c
30	37.11 b
35	42.32 b
40	53.56 a
45	50.64 a
Çeşitler	
Albion	43.49 abc
Monterey	33.30 cd
Portola	39.49 abcd
Redlands Hope	43.21 abc
San Andreas	40.75 abcd
Sweet Ann	39.37 abcd
Alba	52.30 a
Asia	43.49 abc
Amiga	42.75 abcd
Calinda	45.53 abc
Favette	44.66 abc
Festival	43.18 abc
Fortuna	37.02 bcd
Fronteras	54.16 a
Jive	40.21 abcd
Osmanli	26.33 d
Petaluma	44.44 abc
Roxana	30.48 cd
Sabrina	50.41 ab
Splendor	42.58 abc
Tillamook	45.79 abc
Önemlilik	
Sıcaklık	*
Çeşit	*
Sıcaklık × Çeşit	ÖD

Aynı sütunda farklı harflarla gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır (P<0.05)

ÖD: Önemli değil



Şekil 4.5 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre MDA içeriğinin değişimi

4.1.6. Prolin içeriği

Denemede ilek bitkilerinde yaprakların prolin içeriği sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak değişiklik gösterirken, ilek eşitleri ve sıcaklık uygulamaları × çeşit etkileşimi prolin içeriği üzerinde önemli bir etkiye sahip olmamıştır (Tablo 4.6). Farklı sıcaklıklara maruz bırakılan ilek bitkilerinin prolin içeriği 24.49 - 32.25 µg/g arasında değişmiştir. Prolin içeriğinin en yüksek değeri (32.87µg/g) 40°C’deki bitkilerde kaydedilmiş olup, bu değer 35 ve 45°C’deki prolin içeriğine (31.55 ve 31.86 µg/g) istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Prolin içeriğinin en düşük değeri (24.49 µg/g) kontrol uygulamasında (25°C) gözlenmiş, bunu 30 °C’deki prolin içeriği (27.90 µg/g) izlemiştir.

Denemede kullanılan ilek çeşitlerinin prolin içerikleri arasında önemli bir fark görülmemiştir. Ancak, ‘Portola’ diğer çeşitlere kıyasla daha yüksek prolin içeriğine (32.88 µg/g) sahip olma eğilimi göstermiştir (Tablo 4.6).

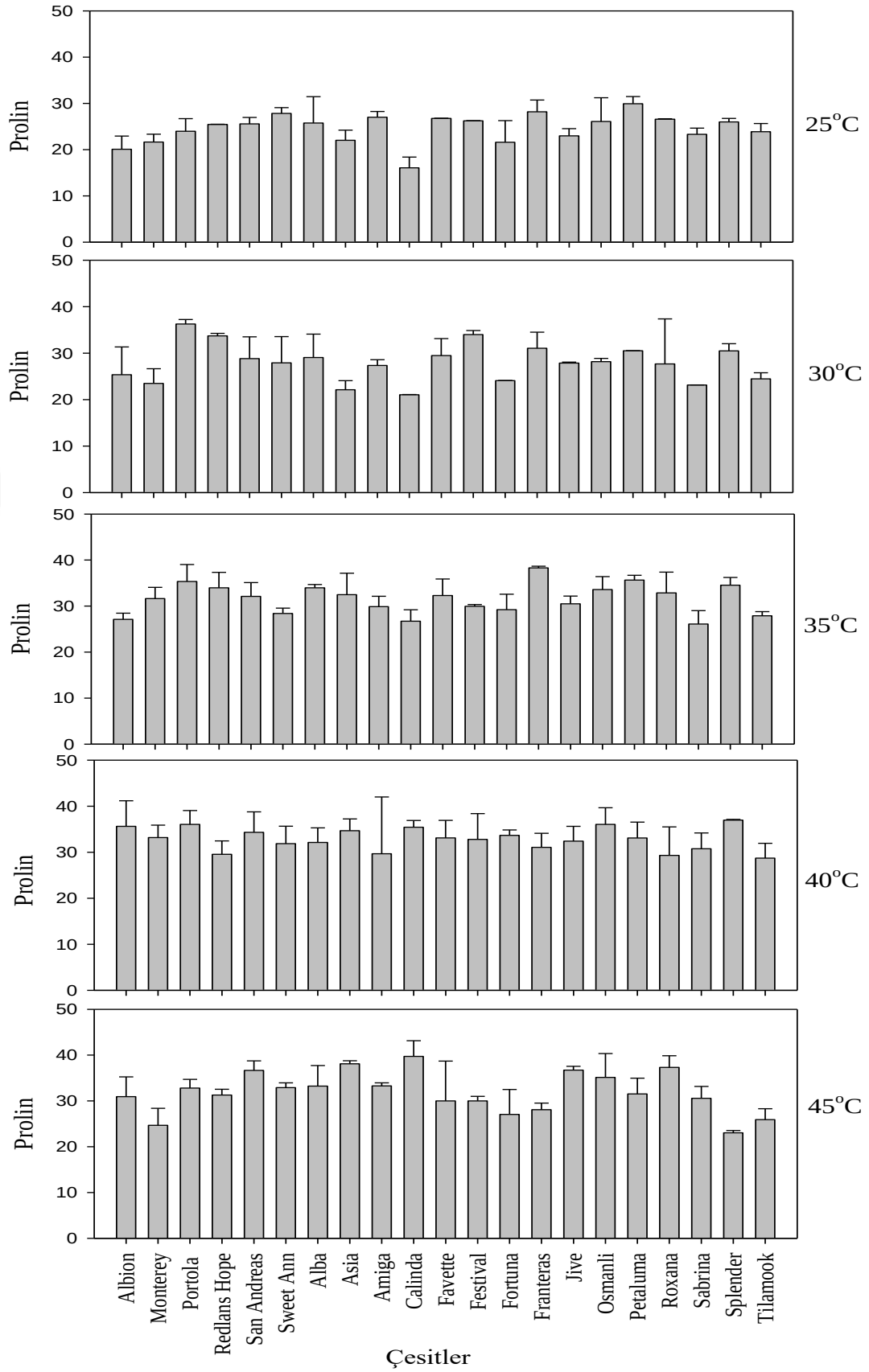
Tüm çeşitlerin prolin içeriği her sıcaklık seviyesinde farklılık göstermiştir. Tüm çeşitlerde genel olarak artan sıcaklıkla birlikte prolin içeriğinde artış görölmüştür. 30°C’den itibaren, tüm çeşitlerin prolin içeriği önemli ölçüde artmış, ancak en belirgin prolin artışı 40°C’de kaydedilmiştir (Şekil 4.6).

Tablo 4.6 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarının bitkilerin prolin içeriği üzerine etkileri

Sıcaklık (°C)	Prolin içeriği (µg/g)
25	24.61 c
30	27.90 b
35	31.55 a
40	32.87 a
45	31.86 a
Çeşitler	
Albion	27.82
Monterey	26.93
Portola	32.88
Redlands Hope	30.80
San Andreas	31.49
Sweet Ann	29.78
Alba	30.83
Asia	29.88
Amiga	29.43
Calinda	27.79
Favette	30.33
Festival	30.59
Fortuna	27.13
Fronteras	31.33
Jive	30.09
Osmanlı	31.80
Petaluma	32.14
Roxana	30.75
Sabrina	26.77
Splendor	30.20
Tillamook	26.17
Önemlilik	
Sıcaklık	*
Çeşit	ÖD
Sıcaklık × Çeşit	ÖD

Aynı sütunda farklı harflarla gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır (P<0.05)

ÖD: Önemli değil



Şekil 4.6 Farklı çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarına göre prolin içeriğinin değişimi

4.2. Çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklığa hassasiyet/toleranslarının belirlenmesi

Denemede incelenen 21 çilek çeşidi, 25°C (kontrol) ve 40°C sıcaklıklara maruz kalan bitkilerin membran stabilite indeksi ve prolin içeriğindeki değişim oranı (%) ve bitkilerin 45°C'ye maruz kaldıktan sonraki görünümüne ait parametreler dikkate alınarak yüksek sıcaklığa hassas, orta ve tolerant olarak gruplandırılmıştır. 'Amiga', 'Festival', 'Fronteras', 'Jive', 'Sabrina' ve 'Tillamook'tan ibaret 6 adet kısa gün çeşidi 100 ('Fronteras') - 160 ('Amiga') arasındaki en düşük puanları almışlar ve yüksek sıcaklıklara hassas çeşitler olarak kabul edilmişlerdir. Bazı kısa gün ('Alba', 'Asya', 'Favette', 'Fortuna', 'Petaluma', 'Roxana') ve nötr gün çeşitleri ('Redlands Hope' ve 'San Andreas') 200 - 260 arasında puan almışlar ve yüksek sıcaklıklara orta derecede tolerant çeşitler olarak belirlenmişlerdir. 'Albion', 'Portola', 'Osmanlı' (380), 'Monterey' (360), 'Calinda', 'Splendor' (340) ve 'Sweet Ann' (320) olmak üzere 7 çeşit de yüksek sıcaklıklara tolerant olarak değerlendirilmişlerdir (Tablo 4.7). Tablo 4.7 Çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklığa hassasiyet/toleranslarının "Tartılı Derecelendirme" yöntemi ile belirlenmesi

Çeşitler	MSİ (%)*	MSİ (Puan)	Prolin içeriği (%)*	Prolin içeriği (Puan)	Görünüm (Puan)	Toplam puan	Grup**
Albion	40.08	3	77.25	3	5	380	Tolerant
Monterey	14.97	5	53.28	3	3	360	Tolerant
Portola	38.81	3	50.46	3	5	380	Tolerant
Redlands							
Hope	39.05	3	16.07	1	3	240	Orta
San Andreas	22.56	5	34.18	1	2	260	Orta
Sweet Ann	36.57	3	14.48	1	5	320	Tolerant
Alba	32.29	3	24.65	1	3	240	Orta
Asia	35.73	3	57.52	3	2	260	Orta
Amiga	30.13	3	9.81	1	1	160	Hassas
Calinda	23.82	5	120.41	5	1	340	Tolerant
Favette	16.71	5	23.91	1	1	220	Orta
Festival	44.88	1	25.02	1	2	140	Hassas
Fortuna	45.09	1	55.79	3	2	200	Orta
Fronteras	50.79	1	10.22	1	1	100	Hassas
Jive	45.64	1	41.05	3	1	160	Hassas
Osmanlı	34.69	3	38.19	3	5	380	Tolerant
Petaluma	36.02	3	3.96	1	2	200	Orta
Roxana	52.93	1	10.31	1	4	220	Orta
Sabrina	49.94	1	31.93	1	1	100	Hassas
Splendor	39.86	3	42.17	3	4	340	Tolerant
Tillamook	35.40	3	20.32	1	1	160	Hassas

*25 °C ve 40 °C'ye maruz kalan bitkilerdeki MSİ ve Prolin içeriğindeki değişimin oranı; ** Hassas: <193.36; Orta: 193.36-286.67; Tolerant: >286.67

Tolerant çeşitler



Hassas çeşitler



Şekil 4.7 Yüksek sıcaklık stresi (45°C) altında tolerant ve hassas çilek çeşitlerinin görünümü

4.3. Yüksek sıcaklık stresi altında çilek çeşitlerindeki moleküler değişimler

4.3.1. Toplam RNA izolasyonu ve analizi

Yeni nesil RNA dizileme (RNA-seq) reaksiyonları ve qRT-PCR analizleri için, kontrol (25°C) ve stres koşulları (40°C) altında ‘Portola’ (P) ve ‘Fronteras’ (F) çeşitlerinin genç yapraklarından örnekler toplanmıştır. Bu örneklerden RNA izolasyonu CTAB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8). RNA izolasyonundan sonra jel görüntüsünde gözlenen 28S ve 18S ribozomal RNA bantları Image J programı ile analiz edilmiş ve 28S:18S oranı Tablo 4.9’de sunulmuştur.

RNA dizileme kütüphanelerinin hazırlanması için kullanılacak toplam RNA’ların kalitesi ve miktarı Agilent 5400 Bioanalyzer ile belirlenmiştir. Bu tür kütüphanelerin başarılı bir şekilde oluşturulması için minimum 5.70 olarak kabul edilir.

Tablo 4.8. RNA bütünlüğünü gösteren değer (RIN)

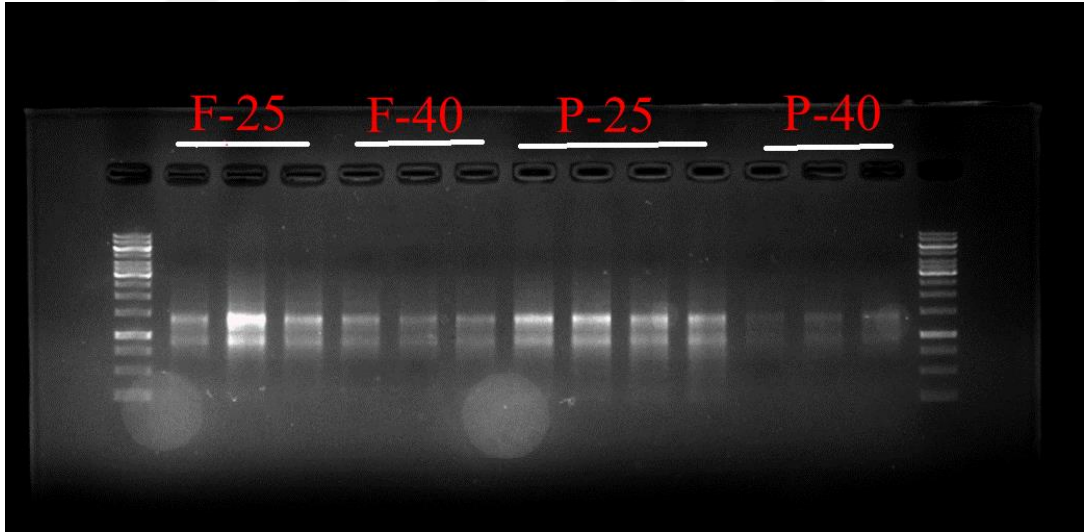
Örnek adı	Nükleik Asit ID	Konsantrasyon (ng/ul)	Hacim (ul)	Toplam miktarı (ug)	Bütünlük değeri	Örnek kalite kontrol sonuçları	Elektroforez için örnek hacmi (ul)
P25_1	FKRN230071717-1A	138.000	24.00	3.31200	7.20	Pass	1.00
P25_2	FKRN230071718-1A	131.000	26.00	3.40600	7.30	Pass	1.00
P25_3	FKRN230071719-1A	115.000	25.00	2.87500	6.30	Pass	1.00
P40_1	FKRN230071720-1A	134.000	23.00	3.08200	7.10	Pass	1.00
P40_2	FKRN230071721-1A	82.000	31.00	2.54200	7.20	Pass	1.00
P40_3	FKRN230071722-1A	111.000	33.00	3.66300	7.70	Pass	1.00
F25_1	FKRN230071723-1A	114.000	28.00	3.19200	5.70	Pass	1.00
F25_2	FKRN230071724-1A	209.000	25.00	5.22500	8.20	Pass	1.00
F25_3	FKRN230071725-1A	161.000	24.00	3.86400	6.50	Pass	1.00
F40_1	FKRN230071726-1A	160.000	28.00	4.48000	7.80	Pass	1.00
F40_2	FKRN230071727-1A	193.000	30.00	5.79000	8.30	Pass	1.00
F40_3	FKRN230071728-1A	192.000	22.00	4.22400	8.60	Pass	1.00

İzolasyonlarımızda en düşük 28S:18S oranı (1.02) ile F25-3 örneğinden elde edilmiştir. En yüksek 28S:18S oranı (1.33) ise P40-1'de ölçülmüştür (Tablo 4.9).

Tablo 4.9 Portola ve Fronteras çeşidi örneklerinden kontrol ve stres koşullarında elde edilen RNA'ların izolasyonu sonrası jel görüntüsündeki 28S:18S oranı

Kontrol (25 °C)	28S:18S oranı	Yüksek sıcaklık (40°C)	28S:18S oranı
P25-1	1.12	P40-1	1.33
P25-2	1.24	P40-2	1.11
P25-3	1.21	P40-3	1.09
F25-1	1.07	F40-1	1.14
F25-2	1.04	F40-2	1.07
F25-3	1.02	F40-3	1.18

1,2,3 (Biyolojik tekerrürler)

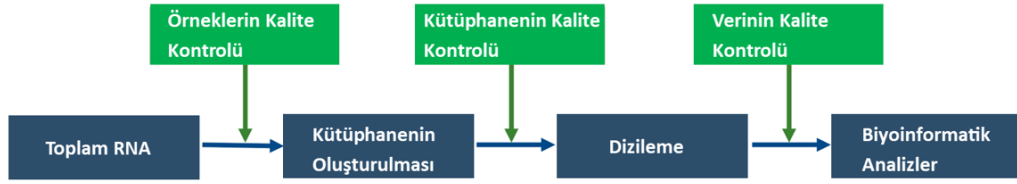


Şekil 4.8 Portola ve Fronteras çeşitlerinde RNA izolasyonundan sonra elde edilen örneklere ait 28S ve 18S ribozomal RNA'nın jel görüntüleri

4.3.2. Dizileme için kütüphanelerin oluşturulması

Kontrol (25°C) ve stres koşullarında (40°C) yetiştirilen iki çeşitten ('Portola' ve 'Fronteras') elde edilen doku örneklerinden, her dokudan 3 biyolojik tekerrür olmak üzere toplam 12 toplam RNA elde edilmiştir. Bu toplam RNA örnekleri daha sonra kalite, bütünlük ve miktar açısından kontrol edilmiştir. Daha sonra, bu total RNA'ların kütüphaneleri ve diğer başlıklar altında detaylandırılacak olan kalite

kontrolleri yapılmış ve dizileme gerçekleştirilmiştir. Sekans verilerinin kalite kontrolleri yapıldıktan sonra biyoinformatik analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu süreci özetleyen iş akış diyagramı Şekil 4.9’da sunulmuştur.



Şekil 4.9 Tüm kütüphaneler için toplam RNA işleminden biyoinformatik analizlere kadar özet iş akış şeması

Yüksek sıcaklık stresi altında transkriptomik düzeyde gen ifadesi, tek kütüphaneden elde edilen mRNA ve LncRNA’lar kullanılarak oluşturulmuştur. cDNA kütüphaneleri “paired-end 150 bp” kütüphaneleri olarak oluşturulmuştur. Bu, dizilenen her parçanın 150 baz çifti uzunluğunda olduğu ve bu parçaların her iki ucundan eşleştirilmiş okumalar elde edildiği anlamına gelir ve her kütüphane dizileme sırasında minimum 80 milyon baz okuma vermiştir. Kütüphanelerden elde edilen okuma sayısı 79-84 milyon arasında değişmiştir ve bu da örnekler arasında tutarlı bir dizileme çıktısı olduğunu göstermektedir. Ham sekanslama verileri filtrelendikten sonra örneklerden yaklaşık 1 milyon baz çıkarılmıştır. Tüm kütüphanelerdeki hata oranı %0.03 olarak rapor edilmiştir. Bu, baz çağrılarında yalnızca minimum hata yüzdesiyle sekanslama işleminde yüksek düzeyde doğruluk olduğunu gösterir. Kalite skorları, sekanslama verilerinin doğruluğunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Bu durumda, elde edilen dizilerin en düşük ve en yüksek Q20 puanları sırasıyla %96.17 ve %96.61 olmuştur. Q20, çağrılan 100 bazda 1’lik bir hata oranını temsil eder. Her bir kütüphanenin Q30 değerleri %89.89 ile %91.41 arasında değişmektedir ve Q30, hata oranının 1000 bazda 1 olduğu daha yüksek bir doğruluk seviyesine karşılık gelmektedir. Genel olarak bu sonuçlar, Illumina NovaSeq 6000 sistemi kullanılarak hazırlanan cDNA kütüphanelerinden elde edilen dizileme verilerinin, yüksek kalitede olduğunu ve Tablo 4.10 ve Şekil 4.10’da sunulan lncRNA analizleri için sağlam bir temel sağladığını göstermektedir.

Tablo 4.10 12 veri setinin toplam okumalarının kalite kontrolünün özeti

Örnek	Ham dizi okumaları	Ham bazlar	Temiz okumalar	Temiz_bazlar	Hata oranı	Q20	Q30	GC_oranı
P25_1	81731052	12.26G	80475294	12.07G	0.03	96.59	91.23	41.79
P25_2	80118904	12.02G	78870944	11.83G	0.03	96.41	90.81	41.93
P25_3	79939264	11.99G	78476172	11.77G	0.03	96.02	89.89	41.88
P40_1	84998472	12.75G	83567588	12.54G	0.03	96.22	90.40	41.93
P40_2	81690864	12.25G	80406914	12.06G	0.03	96.40	90.74	41.75
P40_3	82302882	12.35G	81073574	12.16G	0.03	96.17	90.28	41.88
F25_1	82800952	12.42G	81451396	12.22G	0.03	96.69	91.31	42.5
F25_2	82082094	12.31G	80585738	12.09G	0.03	96.71	91.41	42.18
F25-3	83348018	12.5G	80401454	12.06G	0.03	96.36	90.74	42.24
F40_1	82549830	12.38G	80060232	12.01G	0.03	96.44	90.87	41.93
F40_2	80221524	12.03G	78888820	11.83G	0.03	96.28	90.52	41.96
F40-3	82981316	12.45G	81576542	12.24G	0.03	96.57	91.13	41.91

Hata oranı: $Q_{phred} = -10 \log_{10}(e)$; Q20 ile hesaplanan ortalama sıralama hata oranı: Q Phred 20'den büyük olan bazların yüzdesi. $(Q \text{ Phred} > 20 \text{ olan baz sayısı}) / (\text{Toplam baz sayısı}) * 100$; Q30: Q Phred > 30 olan bazların yüzdesi. $(Q \text{ Phred değeri} > 30 \text{ olan baz sayısı}) / (\text{Toplam baz sayısı}) * 100$; GC oranı: G&C baz sayılarının toplam bazlara yüzdesi $(G\&C \text{ baz sayısı}) / (\text{Toplam baz sayısı}) * 100$



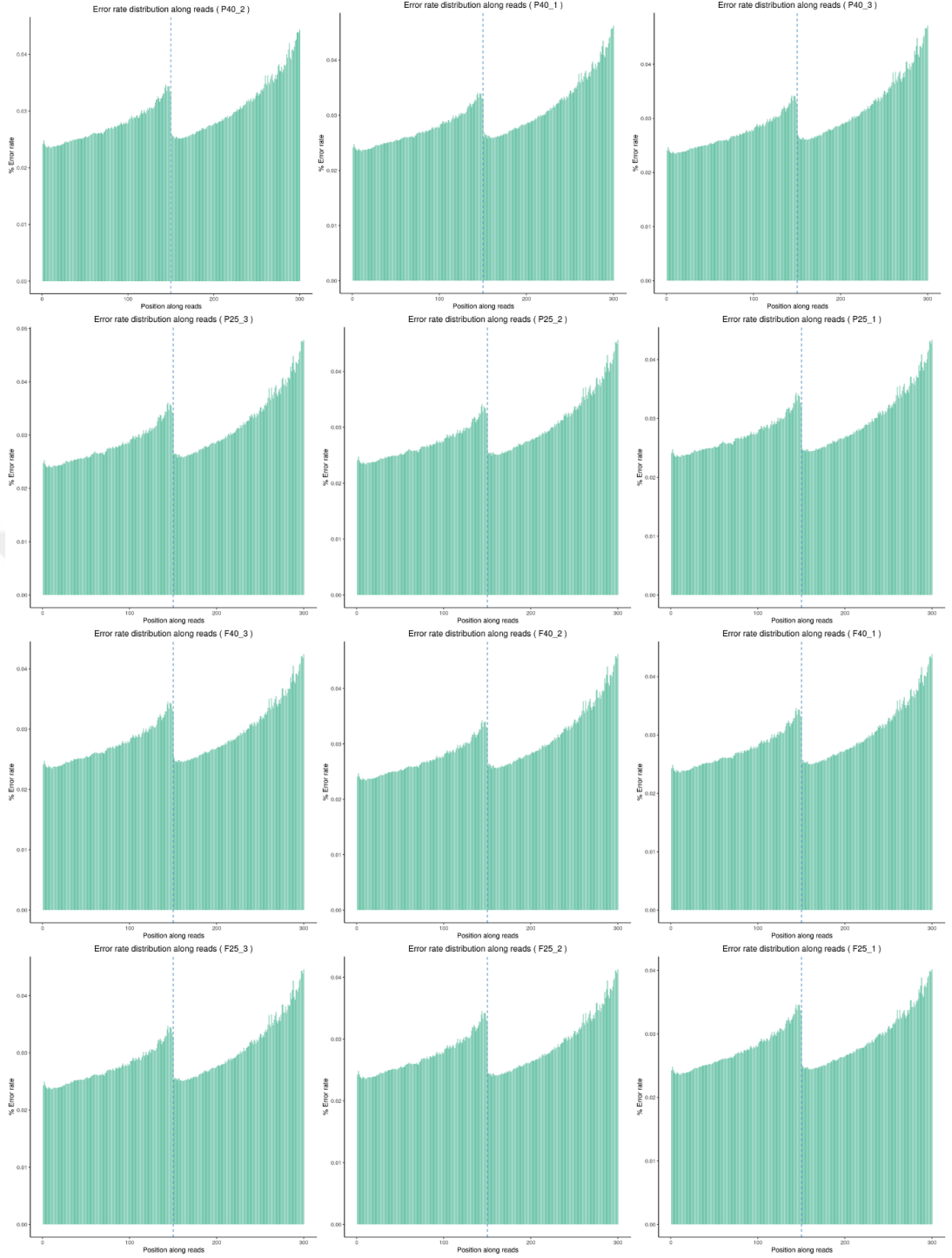
Şekil 4.10 12 kütüphanedeki bilgilerin temiz okumalar, bağdaştırıcıyla ilişkili okumalar, bilinmeyen bazlar (N) içeren okumalar, düşük kaliteli okumalar olarak sınıflandırılması

Sekanslama hata oranı baz kalitesiyle ilgilidir ve sekanslama cihazının türü, sekanslama reaktifleri ve numuneler gibi birçok faktörden etkilenir. RNA-Seq teknolojisi için dizileme hata oranının iki ana özelliği vardır:

1. Sekans okumalarının uzunluğu arttıkça hata oranı da artar. Bunun nedeni, tüm Illumina yüksek verimli sekanslama platformlarında ortak olan kimyasal reaktiflerin kullanılmasıdır (Hardwick vd., 2016).

2. İlk altı baz daha yüksek bir dizileme hata oranına sahiptir. Bunun nedeni muhtemelen ters transkripsiyon sırasında kullanılan rastgele hekzamer primerlerin tam olarak bağlanmamasıdır (Hardwick vd., 2016).

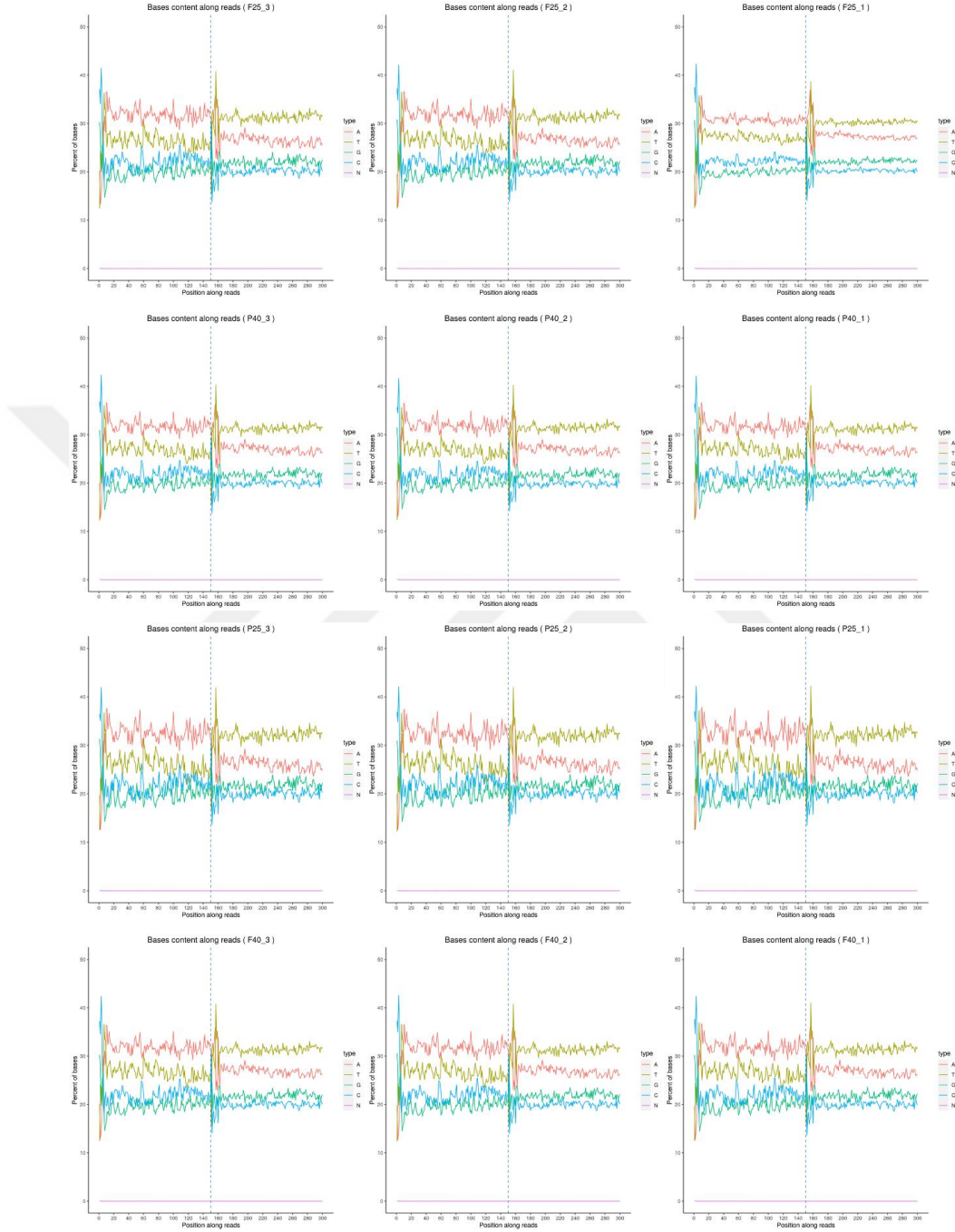
Bu nedenle, hata oranları ve baz dağılımları dizileme sonuçlarını değerlendirmek için kullanılan önemli verilerdir. Her iki parametre açısından da kütüphaneler arasında uyum olması beklenir. Bu projede gerçekleştirilen dizileme nedeniyle 4 farklı kütüphaneye ait verilerin hata oranı dağılımı ve baz içeriği dağılımı Şekil 4.11’de verilmiştir. Analiz, farklı kütüphanelerden elde edilen dizilerin hata oranı ve baz içeriği dağılımı açısından önemli bir farklılık göstermediğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.11 Toplam 12 dizi verisi için sıralama hata oranı dağılımı (yatay eksen okumaların konumunu, dikey eksen ise hata oranını temsil eder)

Benzer bir değerlendirme temel içerik ve özellikle GC içeriği açısından da yapılabilir. RNA dizilimi için G/C içeriği ile A/T içeriğinin eşit olması beklenir. Kütüphane yapımında rastgele primerlerin kullanımı göz önüne alındığında, ilk 6-7 bazda çok çeşitli sıralama hataları meydana gelebilir. Şekil 4.12, kitaplığın

beklendiği gibi 150bp civarında küme okuduğunu ve tabanların eşit olarak dağıldığını göstermektedir.

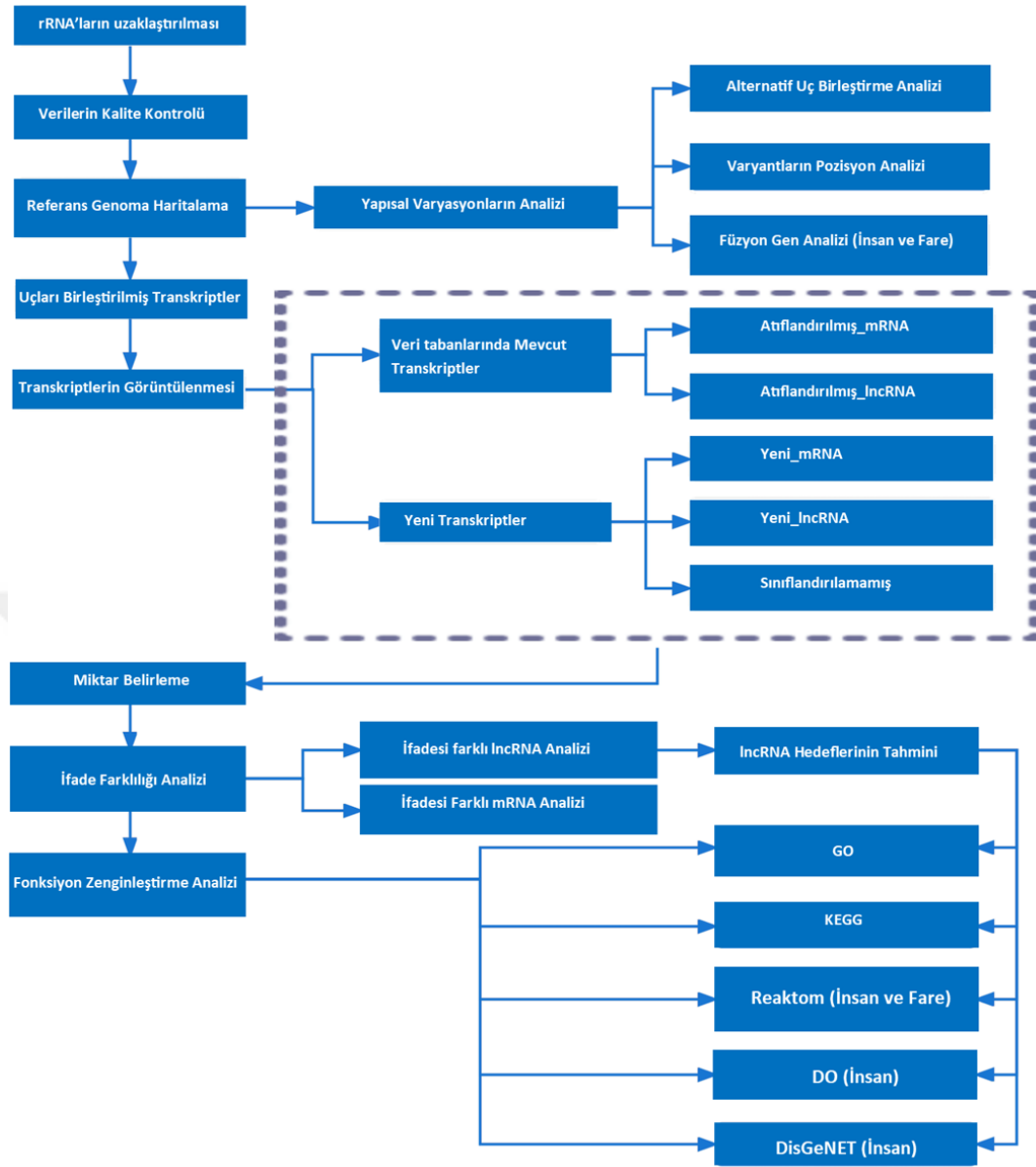


Şekil 4.12 Toplam 12 dizi verisinin GC içeriği (yatay eksen okuma konumunu, dikey eksen tek taban yüzdesini, farklı renkler farklı taban tiplerini temsil eder)

4.3.3. mRNA ve lncRNA analizi

4.3.3.1. Okumaların hizalanması ve hizalama başarısının belirlenmesi

Bu bölümde gerçekleştirilen analizler Şekil 4.13'te özetlenmiştir. Sekans temizliğinden sonra elde edilen temiz okumalar ilk olarak Hisat2 programı kullanılarak referans genoma hizalanmıştır. Grafik tabanlı bir hizalama aracı olan HISAT2, yeni nesil dizileme okumalarını haritalamak için hızlı ve hassas bir hizalama programıdır. HISAT2, bir küresel GFM indeksinin yanı sıra toplu olarak tüm genomu kapsayan küçük bir GFM indeks seti içerir. Bu küçük dizinler (yerel dizinler), birden çok hizalama stratejisiyle birleştğinde, RNA-seq okumalarının, özellikle birden çok ekzonu kapsayan okumaların etkili bir şekilde hizalanmasını sağlamaktadır (Kim vd., 2015). Hizalama için Phytozome v13 veritabanından indirilen çilek genomu (*Fragaria ananassa*) kullanılmıştır. Böylece her bir gen, kromozom veya iskele için elde edilen okumalar ilgili bölümlerle eşleştirilmiştir. Hizalama sonucunda elde edilen bam dosyaları bam_stat betiği ile analiz edilerek hizalamaların başarısı değerlendirilmiştir. Bu kapsamda yapılan analizler sonucunda referans genom üzerine eşlenen kütüphanelerden elde edilen dizilerin okuma oranlarının %42.47 ile %62.69 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Eşlenen okumaların tek bir bölgeye veya birden fazla bölgeye eşlenmesi incelendiğinde ise eşlenen dizilerin sadece %3.5-6.15'inin birden fazla bölgeye eşlendiği, geri kalanının ise tek bir bölgeye eşlendiği tespit edilmiştir. Dizileme kütüphanelerinden elde edilen okumaların hizalanmasına ilişkin veriler Tablo 4.11'da ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.13 lncRNA ve mRNA'ların biyoinformatik analizinde izlenen iş akışları

Tablo 4.11.Referans genomla eşlenen okumaların özeti

Örnek	Toplam okuma	Toplam harita	Benzersiz Eşleme	Çoklu haritalama	Okuma 1 harıstası	Okuma 2 harıstası	Pozitif harita	Negatif harita	Ekleme harıstası	unsplce map	Uygun harıstası
P25_1	80475294	34181508 (42.47%)	31367387 (38.98%)	2814121 (3.5%)	15917866 (19.78%)	15449521 (19.2%)	15389003 (19.12%)	15978384 (19.86%)	5418953 (6.73%)	25948434 (32.24%)	24679780 (30.67%)
P25_2	78870944	35299743 (44.76%)	32302649 (40.96%)	2997094 (3.8%)	16418050 (20.82%)	15884599 (20.14%)	15829962 (20.07%)	16472687 (20.89%)	5851935 (7.42%)	26450714 (33.54%)	25544360 (32.39%)
P25_3	78476172	34206651 (43.59%)	31391866 (40.0%)	2814785 (3.59%)	15941008 (20.31%)	15450858 (19.69%)	15426206 (19.66%)	15965660 (20.34%)	5465426 (6.96%)	25926440 (33.04%)	24642240 (31.4%)
P40_1	83567588	44320759 (53.04%)	40164052 (48.06%)	4156707 (4.97%)	20283275 (24.27%)	19880777 (23.79%)	19822261 (23.72%)	20341791 (24.34%)	8639235 (10.34%)	31524817 (37.72%)	33570222 (40.17%)
P40_2	80406914	42635737 (53.02%)	38767927 (48.21%)	3867810 (4.81%)	19500275 (24.25%)	19267652 (23.96%)	19233543 (23.92%)	19534384 (24.29%)	7614706 (9.47%)	31153221 (38.74%)	31992390 (39.79%)
P40_3	81073574	42999106 (53.04%)	39089307 (48.21%)	3909799 (4.82%)	19732991 (24.34%)	19356316 (23.88%)	19308748 (23.82%)	19780559 (24.4%)	8121462 (10.02%)	30967845 (38.2%)	32574820 (40.18%)
F25_1	81451396	51065338 (62.69%)	46052579 (56.54%)	5012759 (6.15%)	23073358 (28.33%)	22979221 (28.21%)	22885710 (28.1%)	23166869 (28.44%)	9539368 (11.71%)	36513211 (44.83%)	40273568 (49.44%)
F25_2	80585738	40998204 (50.88%)	37255351 (46.23%)	3742853 (4.64%)	18785382 (23.31%)	18469969 (22.92%)	18369408 (22.79%)	18885943 (23.44%)	7528594 (9.34%)	29726757 (36.89%)	30992472 (38.46%)
F25_3	80401454	40147430 (49.93%)	36340400 (45.2%)	3807030 (4.74%)	18345136 (22.82%)	17995264 (22.38%)	17957989 (22.34%)	18382411 (22.86%)	7094978 (8.82%)	29245422 (36.37%)	30189458 (37.55%)
F40_1	80060232	40172447 (50.18%)	36787863 (45.95%)	3384584 (4.23%)	18568964 (23.19%)	18218899 (22.76%)	18140018 (22.66%)	18647845 (23.29%)	6789585 (8.48%)	29998278 (37.47%)	30440044 (38.02%)
F40_2	78888820	40336770 (51.13%)	36954382 (46.84%)	3382388 (4.29%)	18741051 (23.76%)	18213331 (23.09%)	18155034 (23.01%)	18799348 (23.83%)	7303816 (9.26%)	29650566 (37.59%)	30476896 (38.63%)
F40_3	81576542	42095142 (51.6%)	38581304 (47.29%)	3513838 (4.31%)	19476764 (23.88%)	19104540 (23.42%)	19003221 (23.29%)	19578083 (24.0%)	7376013 (9.04%)	31205291 (38.25%)	31908870 (39.12%)

Hisat2 ile oluşturulan hizalamalar incelendiğinde, eşleşmelerin çoğunun genomun gen kodlayan bölgelerinde, yani ekzonlarda olduğu görülmektedir. Harita üzerinde tanımlanan bölgeler ekzonlar, intronlar veya genler arası bölgeler olarak kategorize edilebilir. Kapsamlı açıklamalara sahip yüksek kaliteli bir referans genomun kullanıldığı durumlarda, ekzon bölgelerine hizalanan okumaların baskın okuma türünü oluşturması beklenir. İntronik okumalar pre-mRNA kontaminasyonundan veya uç birleştirme işlemleri sırasında intron tutulmasından kaynaklanabilir. İntergenik bölgelere eşlenen okumalar, Breschi vd. (2017) tarafından belirtildiği gibi kodlamayan RNA'ya (ncRNA) veya DNA kontaminasyonunun minimal bir kısmına atfedilebilir. Referans genom üzerinde hizalanan dizilerin eşleştikleri bölgeye göre dağılımını gösteren grafikler Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Grafikler incelendiğinde, eşlenen dizilerin çoğunun ekzonlar, yani gen kodlama bölgeleri üzerinde hizalandığı belirlenmiştir. Ekzonik hizalamaların 'Fronteras'ta daha yüksek, 'Portola'da ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda, 'Fronteras'ta ekzonlara hizalanan okuma oranı %55.28-58.37 arasında değişirken, 'Portola'da bu oran 52.80-56.15 arasında değişmiştir. Biyolojik tekrarlar da yüksek tutarlılık bulunmuştur. Örneğin, bu oran F25-1'de %58.37, F25-2'de %58.07 ve F25-3'te %56.32 olarak hesaplanmıştır. Ekzon hizalamalarının geri kalanı %7.68-9.13 oranında intronlarla ve %32.49-35.81 oranında intergenik bölgelerle hizalanmıştır. Bu sonuçlar, elde edilen dizilerin büyük çoğunluğunun gen kodlama ve mRNA'daki ekzon bölgelerine karşılık geldiğini ve bu nedenle bu verilerin gen ekspresyon analizi için uygun olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.14 Referans genoma hizalandığında ekzonlar veya intergenik bölgeler arasındaki dizileme kitaplıklarından okumaların dağılımını gösteren grafikler

4.3.3.2. Transkriptlerin bir araya getirilmesi ve lncRNA'ların tanımlanması

Hizalama dosyalarından transkriptleri çıkarmak için Stringtie 1.3.3 programı kullanılmıştır. Stringtie 1.3.3, farklı kütüphaneler için özel parametrelere sahiptir ve transkriptlerin doğru bir şekilde birleştirilmesine olanak tanıyarak farklı ifade edilen transkriptlerin tanımlanmasını sağlar (Ghosh vd., 2016). Bu nedenle, okumaları transkriptlere birleştirmek ve referans genomla karşılaştırmalara dayanarak bunları nicelleştirmek için Stringtie yazılımı kullanılmıştır (Pertea vd., 2015) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12 Stringtie programından elde edilen sonuçların özet gösterimi, transkriptlerin birleştirilmesi ve lncRNA'ların tanımlanması

Seqname	Source	Feature	Start	End	Score	Strand	Attributes		
Fvb1_1	StringTie	transcript	5831	7575	1000	-	gene_id "STRG.1"; transcript		
Fvb1_1	StringTie	exon	5831	5900	1000	-	gene_id "STRG.1"; transcript		
Fvb1_1	StringTie	exon	7394	7575	1000	-	gene_id "STRG.1"; transcript		
Fvb1_1	StringTie	transcript	221018	221322	1000	-	gene_id "STRG.2"; transcript		
Fvb1_1	StringTie	exon	221018	221322	1000	-	gene_id "STRG.2"; transcript		
Fvb1_1	StringTie	transcript	257349	257591	1000	-	gene_id "STRG.3"; transcript		
Fvb1_1	StringTie	exon	257349	257591	1000	-	gene_id "STRG.3"; transcript		
Fvb1_1	StringTie	transcript	84797	86199	1000	+	gene_id "STRG.4"; transcript		
Fvb1_1	StringTie	exon	84797	84997	1000	+	gene_id "STRG.4"; transcript		
Fvb1_1	StringTie	exon	85090	85266	1000	+	gene_id "STRG.4"; transcript		

Birleştirilmiş transkriptlerden uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) tanımlanması, çeşitli biyoinformatik araçlar ve filtreler kullanılarak çok adımlı bir süreci içermektedir. Bu analizlerde izlenen adımlar aşağıda belirtilmiştir:

Ekzon Sayısı Filtresi (Adım 1):

Düşük ifade seviyelerine sahip transkriptler ve düşük güvenilirliğe sahip tek eksonlu transkriptler filtrelenmiştir. Yalnızca iki veya daha fazla ekzona sahip transkriptler ileri analiz için seçilmiştir.

Transkript Uzunluğu Filtresi (Adım 2):

200 baz çiftinden (bp) daha kısa transkriptler filtrelenmiştir.

Bilinen Transkript Filtresi (Adım 3):

Bilinen veritabanındaki açıklamalı ekzon bölgeleri ile örtüşen transkriptler gffcompare yazılımı kullanılarak filtrelenmiştir.

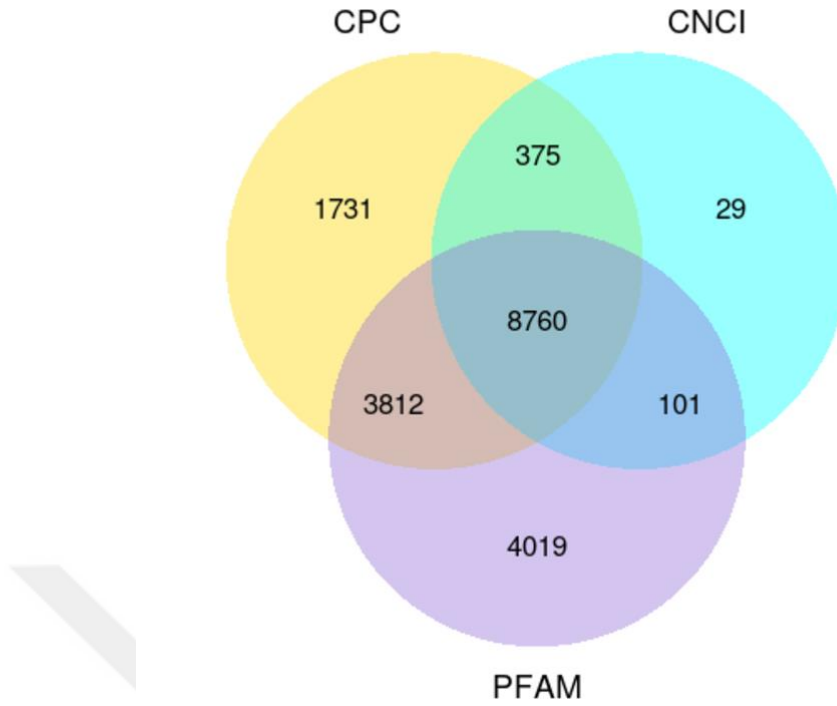
Kodlama Potansiyeli Taraması (Adım 4):

Bir transkriptin kodlama potansiyeline sahip olup olmadığını belirlemek için, önceki adımlarda elde edilen transkriptlerin kodlama potansiyelini değerlendirmek üzere CPC2, Pfam ve CNCI gibi çeşitli veritabanları kullanılmıştır. Kodlama potansiyeli olmadığı tespit edilen transkriptler lncRNA adayı olarak tutulmuştur. Bu adım, lncRNA'ların kodlayıcı RNA'lardan ayırt edilmesinde çok önemlidir.

HGNC Yönergelerine Göre Adlandırma (Adım 5):

HGNC'nin (The HUGO Gene Nomenclature Committee) (Wright, 2014) uzun kodlamayan RNA üzerindeki adlandırma yönergelerine göre, Novel_lncRNA adayları taranmış ve kodlayıcı genlerle olan konum ilişkisine göre adlandırılmıştır.

Bu filtreleme ve kodlama potansiyeli analizleri sonucunda, her üç veri tabanında da kodlama potansiyeli olmayan toplam 8.760 lncRNA tanımlanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Farklı veri tabanlarında tahmin edilen lncRNA'ların Venn diyagramı

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) HUGO Gen İsimlendirme Komitesi (HGNC) tarafından bilinen mRNA'larla olan konumsal ilişkilerine göre dört tipe ayrılmıştır:

Antisens

Bu lncRNA'lar protein kodlayan genlerin bir veya daha fazla ekzonuyla örtüşür, ancak zıt sarmallar üzerindedirler. Antisens lncRNA'lar genellikle örtüşen protein kodlayan genlerin ekspresyonunu kontrol etmede düzenleyici bir role sahiptir.

lncRNA (Uzun İntergenik Kodlamayan RNA)

Bu tür lncRNA, herhangi bir bilinen protein kodlayan gen ile örtüşmeyen intergenik bölgede yer alır. lncRNA'lar genler arasında bulunur ve yakındaki genlerin düzenlenmesi veya çeşitli hücrel süreçlere katılım gibi çeşitli işlevlere sahip olabilir.

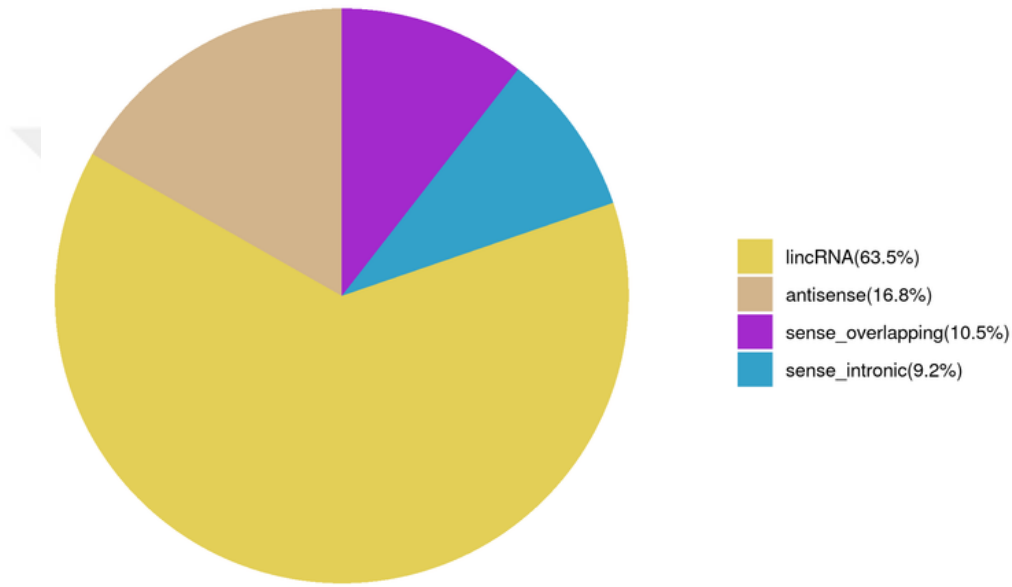
Aynı yönde çakışan (sense overlapping)

Aynı anlamlı örtüşen lncRNA'lar, aynı iplikteki aynı protein kodlayan genin bir veya daha fazla eksonu ile örtüşür.

Duyarlı intronik (sense intronic)

Duyarlı intronik lncRNA'lar bir kodlayıcı genin intronik bölgesinde yer alır, ancak aynı gendeki herhangi bir ekson ile örtüşmez. Bu lncRNA'lar bir genin kodlamayan kısmında yer alır ve içinde bulundukları gen ile ilgili düzenleyici işlevlere sahip olabilir.

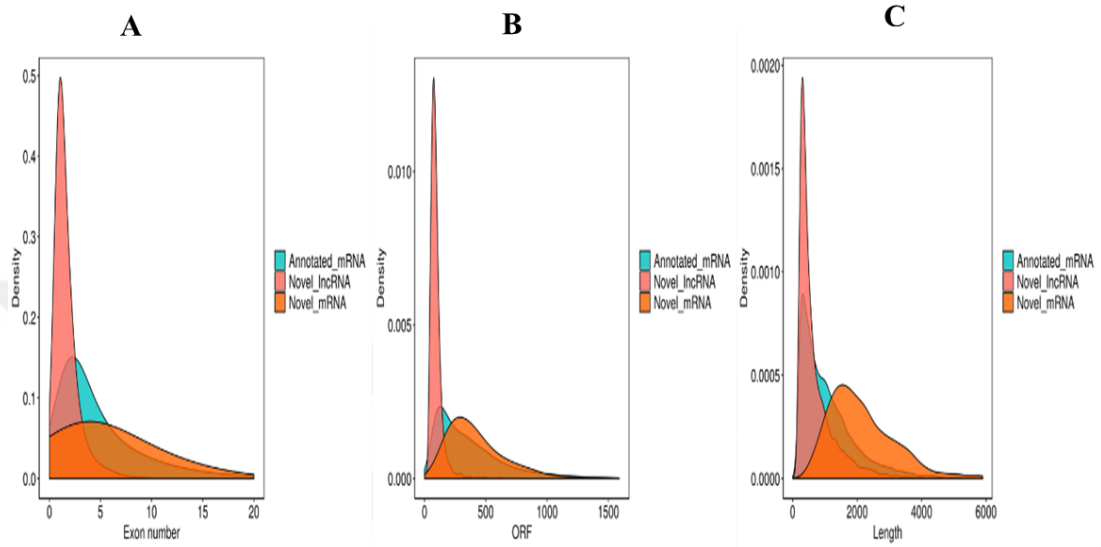
Elde edilen lncRNA'ların bu parametrelere göre sınıflandırılması Şekil 4.18'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre %63.5 lncRNA, %16.8 antisense, %10.5 aynı yönde çakışan ve %9.2 duyarlı intronik lncRNA tespit edilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Filtrelemeden sonra farklı lncRNA türlerinin sınıflandırılması

Uzun kodlamayan RNA (lncRNA) molekülleri ile mRNA arasında ayırım yapmak için transkript uzunluğu, ekson sayısı ve açık okuma çerçevesi (ORF) uzunluğu dahil olmak üzere çeşitli özellikler karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada vurgulanan temel farklılıklar şunlardır (Şekil 4.17): lncRNA'lar tipik olarak az sayıda ekzona sahiptir, genellikle iki civarındadır. Buna karşılık, mRNA'lar birkaç taneden 20 veya daha fazlasına kadar değişen, önemli ölçüde daha fazla sayıda ekzona sahip olabilir. Ekzonlar, genin nihai mRNA molekülüne kopyalanan kodlama bölgeleridir. lncRNA'ların uzunluğu genellikle daha kısadır, tipik olarak 1000'den az nükleotid (baz) içerir. mRNA moleküllerinin uzunluğu daha uzun olabilir ve daha geniş bir boyut aralığını kapsayabilir. lncRNA'lar tam bir ORF'ye sahip değildir ve ORF uzunlukları tipik olarak sınırlıdır, genellikle yaklaşık 100-200 bazdır. mRNA molekülleri ise daha büyük ORF'lere sahip olabilir. ORF, mRNA'nın fonksiyonel bir

proteine çevrilebilen kısmını temsil eder. Ekzon sayısı, transkript uzunluğu ve ORF uzunluğundaki bu farklılıklar, lncRNA'lar ve mRNA'lar arasındaki önemli ayrımlardır. mRNA'lar öncelikle proteinlerin kodlanmasından sorumluyken, lncRNA'lar gen regülasyonunda ve diğer hücresel süreçlerde çeşitli rollere sahiptir ve genellikle protein sentezi için şablonlardan ziyade düzenleyiciler veya iskeleler olarak hareket eder.



Şekil 4.17 Tanımlanan lncRNA ve mRNA moleküllerinin yapısal karşılaştırması (A: Ekzon sayısı, B: Uzunluk, C: ORF uzunluğu)

4.3.3.3. Farklı ifade olan mRNA'ların tanımlanması

Stringtie tarafından oluşturulan gen_count dosyaları kullanılarak farklı ifade olan genlerin (DEG'ler) ve uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) analizinde, her örnek için Eşlenen Milyon Parça Başına Ekzon Kilobaz Başına Fragman (FPKM) değeri hesaplanmıştır. Bu hesaplama, <http://deweylab.biostat.wisc.edu/RSEM> adresinde bulunan RSEM (RNA-Seq by Expectation-Maximization) yazılımı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. FPKM, RNA-Seq analizinde yaygın olarak kullanılan bir ifade düzeyi normalleştirme yöntemidir. Hem genin uzunluğunu hem de ona hizalanan dizileme parçalarının sayısını dikkate alarak gen ifadesini ölçer. FPKM değerleri, okuma derinliği ve genom boyutundaki varyasyonları dikkate alan gen ifadesinin normalleştirilmiş bir temsilini sağlamak için hesaplanır. Normalleştirme için FPKM'nin kullanılması esastır çünkü numuneler arasındaki dizileme derinliği farklılıkları ve genlerin uzunluklarındaki farklılıklar nedeniyle ortaya çıkan önyargıların düzeltilmesine yardımcı olur. Bu normalleştirme yaklaşımı, örnekler arasında gen ifade düzeylerinin daha doğru karşılaştırılmasını sağlayarak RNA-Seq

deneylerinde DEG'lerin ve lncRNA'ların tanımlanması için uygun hale getirir. Özetle, RSEM ile hesaplanan FPKM değerleri, RNA-Seq analizinin çok önemli bir bileşenidir ve araştırmacıların gen ifade düzeylerini doğru bir şekilde değerlendirmesine olanak tanırken, okuma derinliği ve gen uzunluğundaki varyasyonlar gibi RNA-Seq verilerinin karmaşıklıklarını da hesaba katar (Tablo 4.13).



Tablo 4.13. 4 farklı kütüphaneden elde edilen çileğin kromozomundaki ilk 10 genin FPKM değerlerinin gösterimi

gen_id	Gen adı	Gen açıklaması	Gen lokus	P25_1	P25_2	P25_3	P40_1	P40_2	P40_3	F25_1	F25_2	F25_3	F40_1	F40_2	F40_3
maker-Fib1-1-augustus-gene-0_13_v1_0_a1	maker-Fib1-1-augustus-gene-0_13	-88 -88 -	Fib1_1:5831-7575	9.832199	8.389169	9.471956	18.79014	13.11977	12.65468	12.17217	7.94392	9.396794	9.386034	9.736816	8.646512
XLOC_000003	XLOC_000003	.	Fib1_1:41925-42687	0.040619	0.263782	0	4.229381	5.58388	5.581274	0.077219	0	0	0.054631	0	0.220403
maker-Fib1-1-snap-gene-0_18_v1_0_a1	maker-Fib1-1-snap-gene-0_18	-88 -88 -	Fib1_1:8487-9797	351.5431	291.1107	316.6031	281.1508	528.4988	504.8733	804.9667	235.7593	451.333	339.723	211.2695	254.9962
snap_masked-Fib1-1-processed-gene-0_6_v1_0_a1	snap_masked-Fib1-1-processed-gene-0_6	-88 -88 -	Fib1_1:9361-9658	128.684	178.9391	180.8246	86.491	271.6898	155.313	394.193	114.7087	275.3604	171.4524	92.55344	119.5527
augustus_masked-Fib1-1-processed-gene-0_4_v1_0_a1	augustus_masked-Fib1-1-processed-gene-0_4	-88 -88 -	Fib1_1:11127-11411	67.54433	74.57169	88.51689	134.8221	173.6508	155.1728	103.9507	53.98171	68.23885	102.229	71.0573	91.67251
maker-Fib1-1-snap-gene-0_16_v1_0_a1	maker-Fib1-1-snap-gene-0_16	-88 -88 -	Fib1_1:184797-86712	24.74372	26.74684	22.04798	20.08759	21.22622	22.23619	19.14815	36.14447	34.00219	14.28081	12.08159	13.2166
augustus_masked-Fib1-1-processed-gene-3_0_v1_0_a1	augustus_masked-Fib1-1-processed-gene-3_0	-88 -88 -	spQ10M18 TRL12_ORF1 tFib1_1:319026-320584	0.051988	0	0	0	0	0	0	0	0.105652	0.239158	0	0.138614
XLOC_001871	XLOC_001871	.	Fib1_1:338963-338176	0.047586	0	0	0	0.091461	0	0.516368	0.459427	0	1.797977	2.026217	1.266015
maker-Fib1-1-augustus-gene-3_17_v1_0_a1	maker-Fib1-1-augustus-gene-3_17	-88 -88 -	spQ81M4C3 ARL8C_ARATH_Fib1_1:356220-357581	1.136938	0.986372	0.958913	2.24131	2.873137	2.654737	3.845346	2.247919	1.461107	2.721344	1.982241	2.457403
XLOC_000009	XLOC_000009	.	Fib1_1:353178-354683	0.527057	0.634795	0.9083	1.416887	1.16837	0.981112	0.119484	0	0.222392	0.716215	0.177433	0.337437

RNA-Seq veri analizi için yaygın olarak kullanılan bir araç olan DESeq2 kullanılarak farklı ifade olan genlerin (DEG'ler) analizinde birkaç temel parametre ve kriter uygulanmıştır.

DESeq2 analizinde kullanılan ana adımlar ve kriterler aşağıda verilmiştir: DESeq2, sayım verilerini modellemek ve DEG'leri tanımlamak için negatif binom dağılımı kullanmaktadır. DEG'ler, kat değişimi 2.00'den büyük veya eşit olan genler olarak tanımlanmıştır. Bu, bu genlerin ifadesinin bir koşulda diğerine kıyasla en az iki kat daha yüksek veya daha düşük olduğu anlamına gelir. DEG'ler, 0.05'e eşit veya daha düşük bir düzeltilmiş p-değerine (genellikle Yanlış Keşif Oranı veya FDR olarak adlandırılır) göre seçilmiştir. Bu eşik, tanımlanan DEG'ler arasında beklenen yanlış pozitif oranını kontrol eder. Analizlerde P40×P25; P40×F25; P40×F40 ve P25×F25 olmak üzere dört spesifik ikili karşılaştırma yapılmıştır. Analiz, mRNA ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA) olmak üzere çeşitli transkript türlerini dikkate almıştır. Belirlenen DEG'lere ilişkin bilgiler Tablo 4.14'te sunulmuştur. Genel olarak DESeq2 analizi, stres koşulları altında ifadesi önemli ölçüde değişen genlerin belirlenmesine yardımcı olmuş ve incelenen çeşitlerin yüksek sıcaklık stresine verdiği moleküler tepkilere ışık tutmuştur.

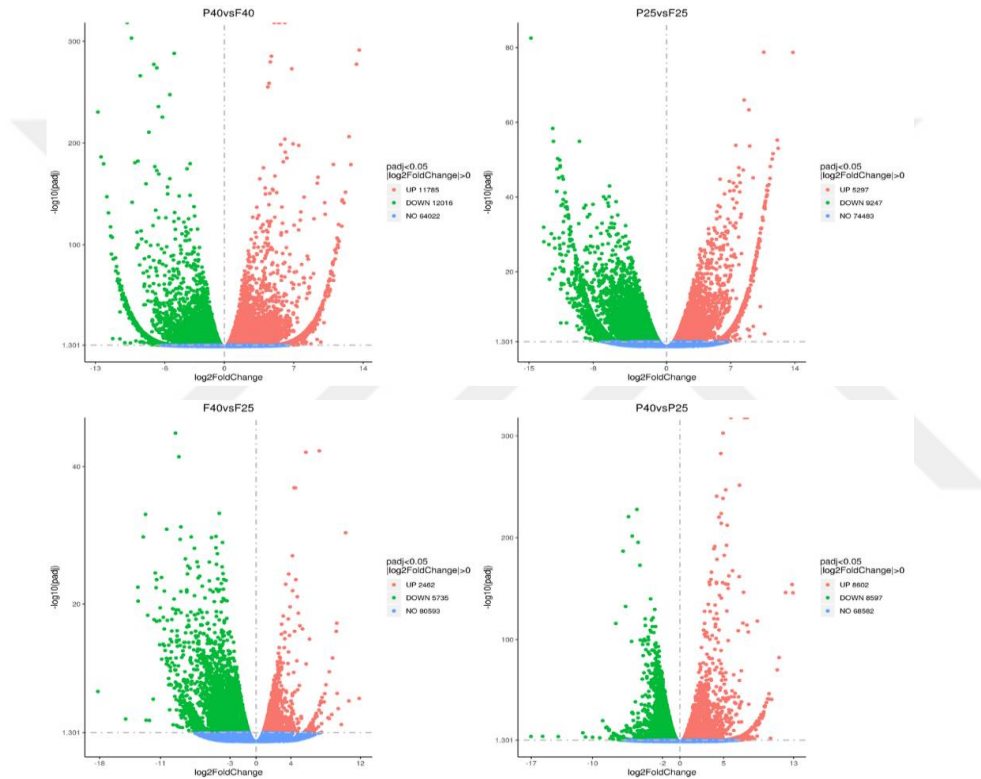
Karşılaştırmalar incelendiğinde, farklı ifade edilen genlerin en yüksek sayısının P40 ve F40 kütüphanelerinin karşılaştırılmasından elde edildiği görülmektedir. Toplam 23801 mRNA geninin farklı olarak ifade edildiği belirlenmiştir. Farklı ifadeye sahip bu genler (DEG'ler) arasında 11785 mRNA geninin artmış ifadeye sahip olduğu ve 12016 mRNA geninin azalmış ifadeye sahip olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.14 Kütüphaneler arası karşılaştırmalar sonucunda mRNA'ların DEG gen sayıları

Karşılaştırma	İfade Olan Gen Sayısı	İfadesi Artan Gen Sayısı	İfadesi Azalan Gen Sayısı
P40×P25	17199	8602	8597
F40×F25	8197	2462	5735
P40×F40	23801	11785	12016
P25×F25	14544	5297	9247

4.3.3.3.1. Volkan grafiği ile farklı ifade olan genlerin görselleştirilmesi

Farklı ifade olan genlerin ifade sonuçları 'volcanoplot' grafiği ile görselleştirilmiştir. Eşik değeri q-değeri <0.05'tir. Biyolojik olarak anlamlı farklı ifade edilen genleri belirlemek için katı kriterler uygulanmıştır. Özellikle, genler aşağıdaki kriterleri karşılıyorsa farklı ifade edilmiş olarak kabul edilmiştir: ≤ 0.05 'lik bir p-değeri ve ≥ 2 'lik bir log2 kat değişimi (ifadesi artmış) veya ≤ -2 (ifadesi azalmış). P40×F40 kombinasyonu yüksek derecede farklı ifade edilen genlere sahip olurken; diğer kombinasyonlar daha düşük derecede farklı ifade edilen genlere sahip olmuşlardır (Şekil 4.18).



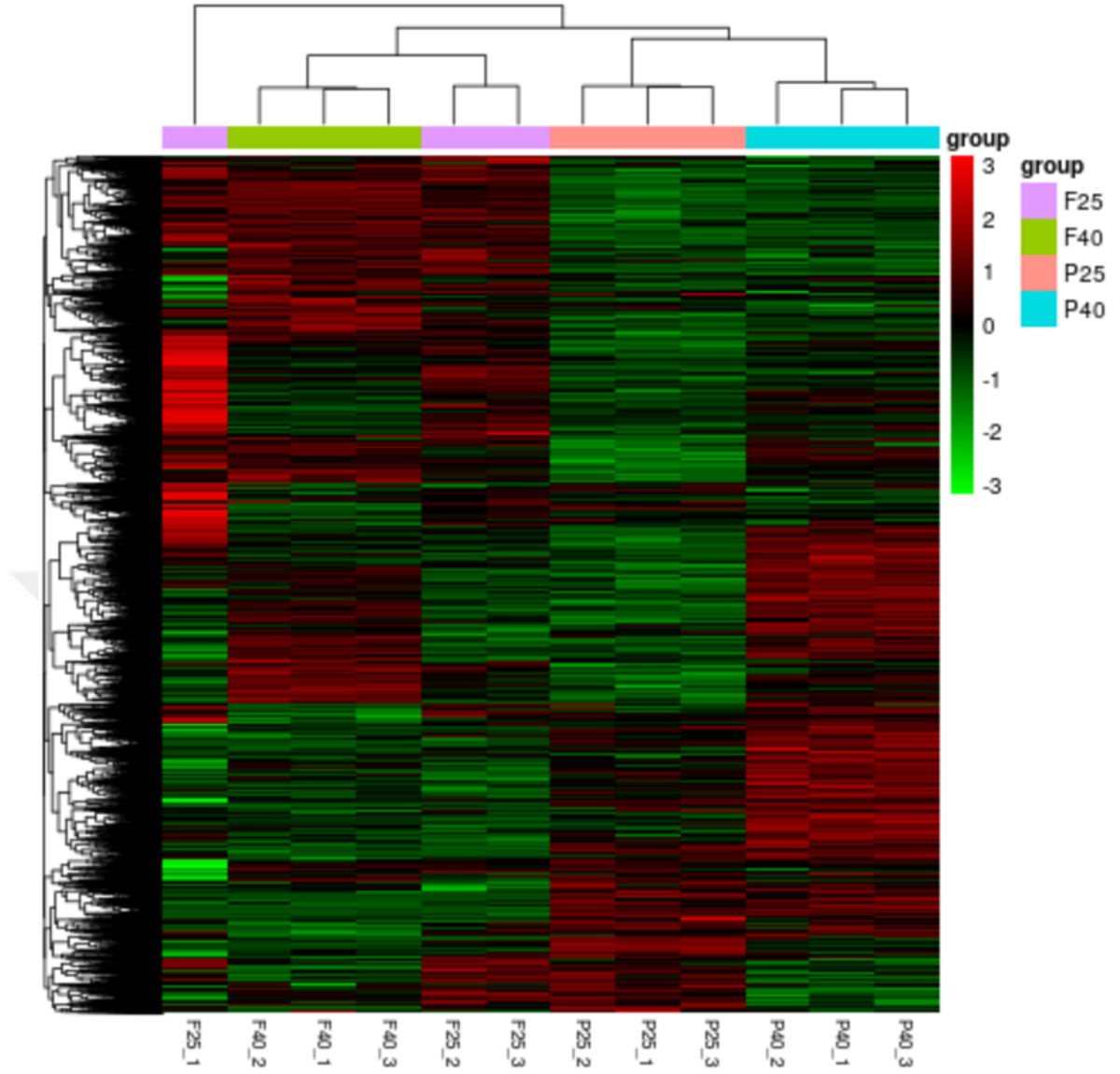
Şekil 4.18 'Dağılım grafiği' ile 4 farklı karşılaştırmada farklı ifade olan gen ifadesine genel bir bakış (x eksen, gen ifadesindeki kat değişimini; y eksen, kat değişiminin istatistiksel önemini; kırmızı renk ifadesi önemli ölçüde artış gösteren gen ifadelerini; yeşil renk ifadesi önemli ölçüde azalış gösteren gen ifadelerini; mavi renk stres ve kontrol grupları arasında farklı ifade göstermeyen gen ifadelerini temsil etmektedir)

4.3.3.3.2. Farklı ifade olan genlerin kümelenmiş ısı haritası

Genomikte küme analizi, genleri ifade şekillerine göre gruplandırmak için kullanılan güçlü bir tekniktir. Denemede P40, F40, P25, F25 uygulamalarına ait örnekler farklı ifade olan genlerin (DEG'ler), benzer ifade olan genlerle birlikte gruplandırıldığı küme analizine tabi tutulmuştur. Aynı kümedeki genler ortak biyolojik rolleri veya yolları paylaşabilir. Küme analizi yapmak için genlerin Milyon

Eşlenen Parça Başına Ekzon Kilobaz Başına Fragman (FPKM) değerleri kullanılır. Bu değerler genellikle anlamlı karşılaştırmalar sağlamak için normalize edilir, tipik olarak Z-skoru normalizasyonu ile veriler 0 ortalama ve 1 standart sapmaya sahip olacak şekilde ölçeklendirilir. Bu çalışmada kümeleme sonuçları bir ısı haritası kullanılarak görselleştirilmiştir. Isı haritasında, her satır bir geni temsil eder ve renk ölçeklendirilmiş ifade değerini temsil eder (genellikle -2 ile 2 arasında). Benzer gen ifade modellerini tanımlamak için yatay karşılaştırmalar (farklı örnekler arasında) yapılabilir. Kümeleme genellikle hiyerarşiktir ve aynı biyolojik süreçlerde benzer işlevlere sahip farklı gen gruplarını (kümeleri) ortaya çıkarır. Isı haritasındaki farklı renkli alanlar farklı gen kümelerini gösterir. Hiyerarşik kümeler incelenerek genlerin stres koşullarına nasıl tepki verdiğine dair bilgi edinilebilir.

Şekil 4.19'a göre, P40'ta diğer örneklerle (F40, P25, F25) kıyasla daha yüksek gen ifade seviyeleri belirlenmiştir. Benzer şekilde F25 ve P25'te düşük gen ifade seviyelerine sahip genler fark edilmiştir.



Şekil 4.19 Önemli derecede farklı ifade edilen genlerin kümelenmiş ısı haritası ($\log_2(\text{FPKM}+1)$) kullanılarak kümelenmiş FPKM küme analizinin genel sonuçları. Kırmızı renk yüksek ifade düzeyine sahip genleri; yeşil renk düşük ifade düzeyine sahip genleri göstermektedir. Kırmızıdan maviye değişen renk, $\log_2(\text{FPKM}+1)$ değerlerinin büyüktan küçüğe doğru olduğunu göstermektedir)

4.3.3.3.3. DEG'lerin GO fonksiyonel analizi

ClusterProfiler yazılımı, gen ifadesi verilerinin analizinde, özellikle de yol zenginleştirme ve Gen Ontolojisi (GO) fonksiyonel zenginleştirme analizinde çok önemli bir rol oynamaktadır. ClusterProfiler analizi farklı ifade edilen genler arasında önemli ölçüde zenginleştirilmiş biyolojik yolları veya süreçleri tanımlamayı amaçlamaktadır. Zenginleştirme analizi, hipergeometrik dağılım ilkelerine dayalı olarak gerçekleştirilmiştir.

GO, gen fonksiyonlarını Hücresel Bileşen (CC), Moleküler fonksiyon (MF) ve Biyolojik süreç (BP)) şeklinde üç ana kategoriye ayıran standartlaştırılmış bir

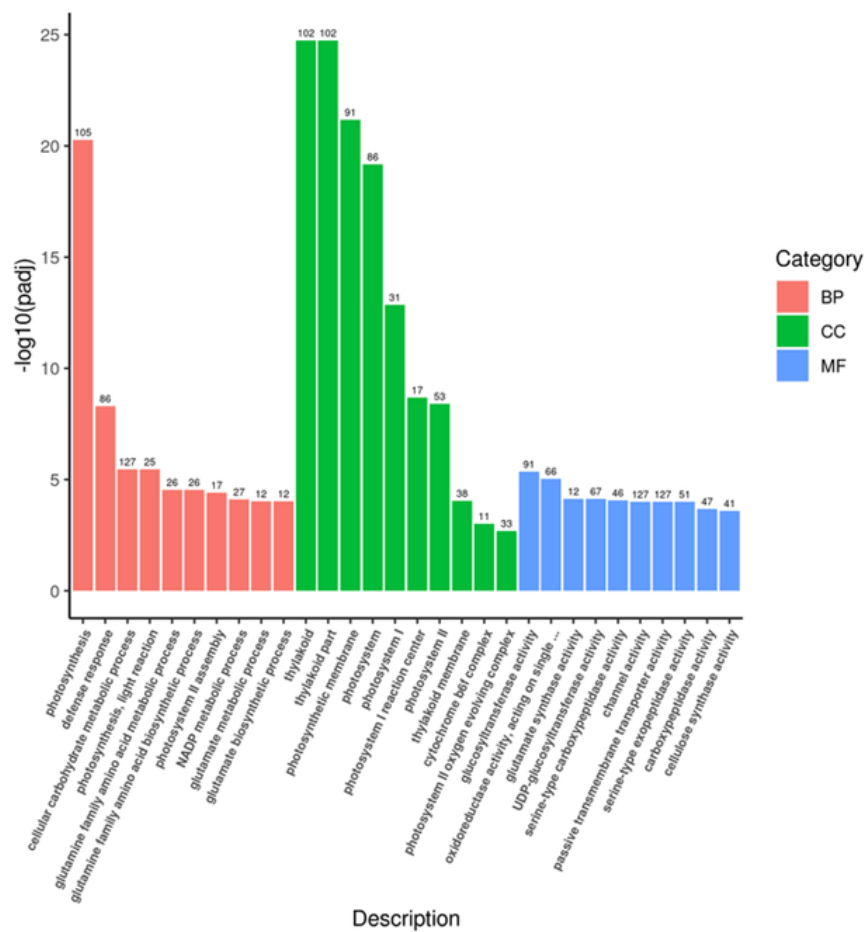
sınıflandırma sistemidir. Zenginleştirmenin önemi $p_{adj} < 0.05$ istatistiksel değerlendirmesi ile belirlenir. GO zenginleştirme analizinin sonuçlarında, en önemli 30 GO terimi tipik olarak görüntülenmek üzere seçilir. Eğer 30'dan az önemli terim varsa, bunların hepsi gösterime dahil edilir. Bu bilgiler Şekil 4.20, 4.21, 4.22 ve 4.23'deki grafiklerde sunulmuştur. DAG (Directed Acyclic Graph) analizi, zenginleştirilmiş GO terimleri arasındaki hiyerarşiyi ve ilişkileri gösterir; genlerin fonksiyonel hiyerarşisini ve çeşitli biyolojik süreçlerle nasıl ilişkili olduklarının anlaşılmasına yardımcı olur. DAG analizi, histogramlardan elde edilen sonuçları tamamlar ve hangi fonksiyonel alanların daha zengin olduğunun daha net anlaşılmasını sağlar.

GO zenginleştirme analizinin histogram ve DAG ile sunulması sonucunda P40×P25'ta biyolojik süreçlerden karbonhidrat metabolik süreci ve fotosentez yollarında önemli bir zenginleşme gözlenirken, F40×F25'te aminoglikan metabolik süreci, aminoglikan katabolik süreci, kitin metabolik süreci ve kitin katabolik sürecinde daha düşük zenginleşme değeri gözlenmiştir. Hücresel konum açısından, P40×F40'ta en yüksek zenginleşme değeri tilakoid, tilakoid kısım, fotosentetik membran ve fotosistemde kaydedilmiştir. P25×F25'teki zenginleşme değerinin ise membranın ekstrinsik bileşeninde önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir. Moleküler fonksiyon açısından, P40×F40'ta izomeraz ve ATPaz aktivitesi önemli ölçüde yüksek, P25×F25'te kanal aktivitesi ve pasif transmembran taşıyıcı aktivitesi önemli ölçüde düşük olmuştur.

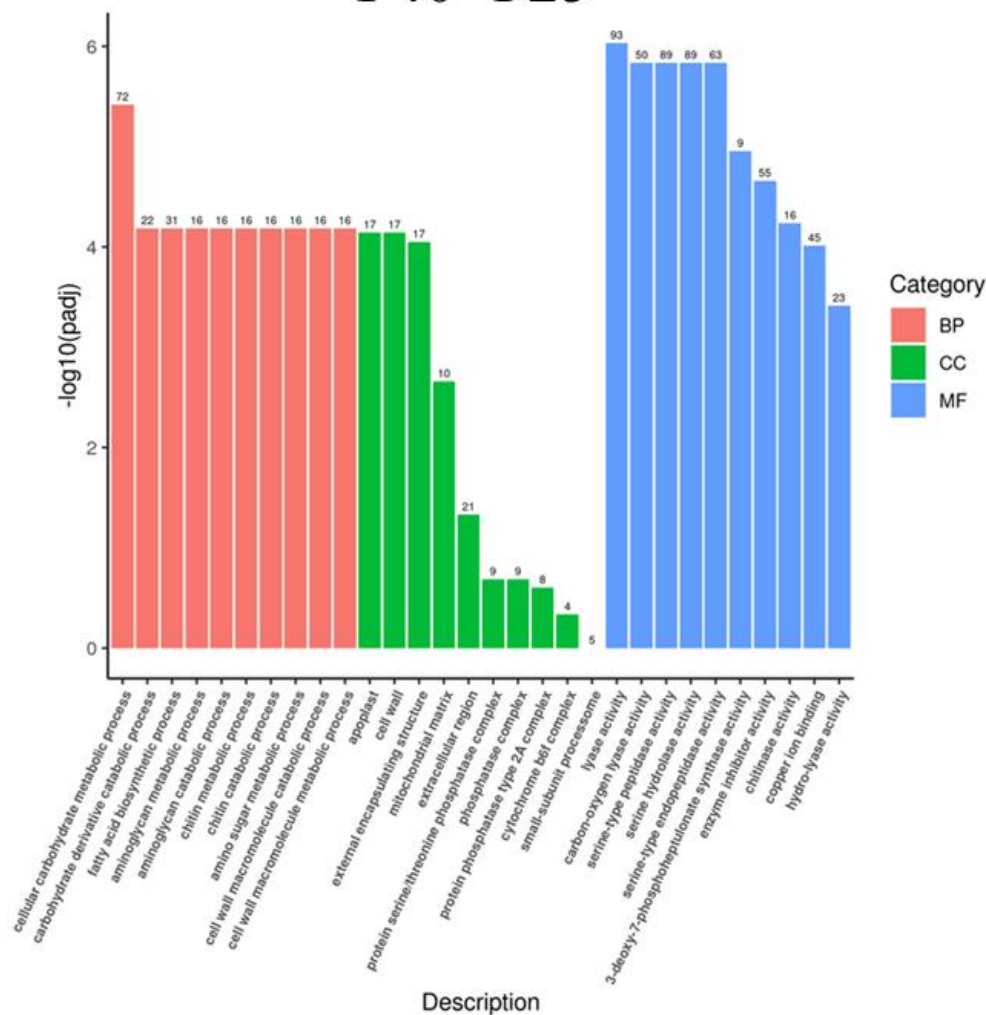
Hücresel konum bakımından P40×P25 ve F40×F25'te tilakoid ve tilakoid kısım için önemli bir farklılık bulunmamıştır. Benzer şekilde F40×F25 ve P25×F25 karşılaştırmalarında apoplast, hücre duvarı ve dış kapsülleme için önemli farklılık görülmemiştir.

P40×P25'in biyolojik sürecinde fotosentez ve hücresel karbonhidrat metabolik süreci; P40×F25'in hücresel karbonhidrat metabolik sürecinde; F40×F25 de fotosentez için anlamlı farklılıklar bulunmuştur. P25×F25'in biyolojik işlevinde hücresel glukan metabolik süreci, glukan metabolik süreci ve hücresel polisakkarit metabolik süreci için önemli farklılık görülmemiştir. Biyolojik fonksiyon için, P40×P25'de kanal aktivitesi, F40×F25'de liyaz aktivitesi, P40×F40'da izomeraz aktivitesi ve P25×F25'de hücre iskelet protein bağlarının önemli ölçüde zenginleştiği bulunmuştur (Şekil 4.20).

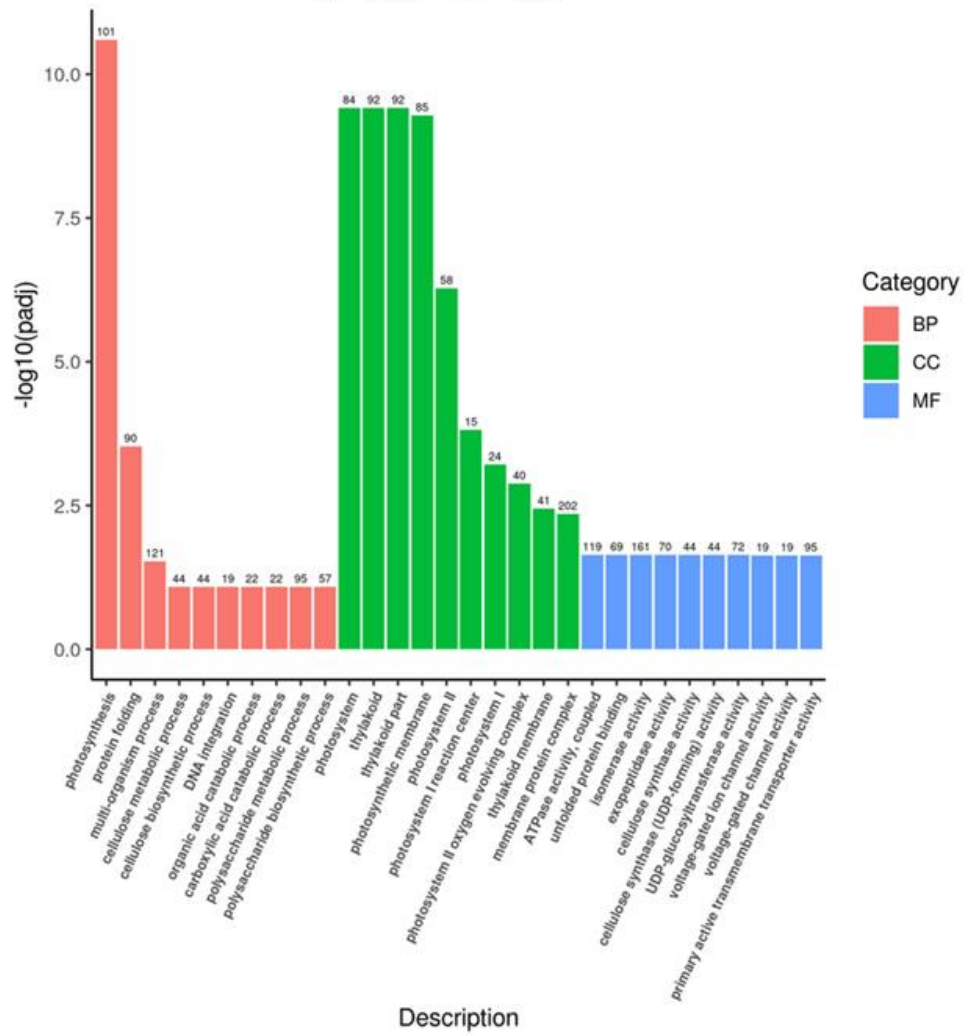
P40×P25

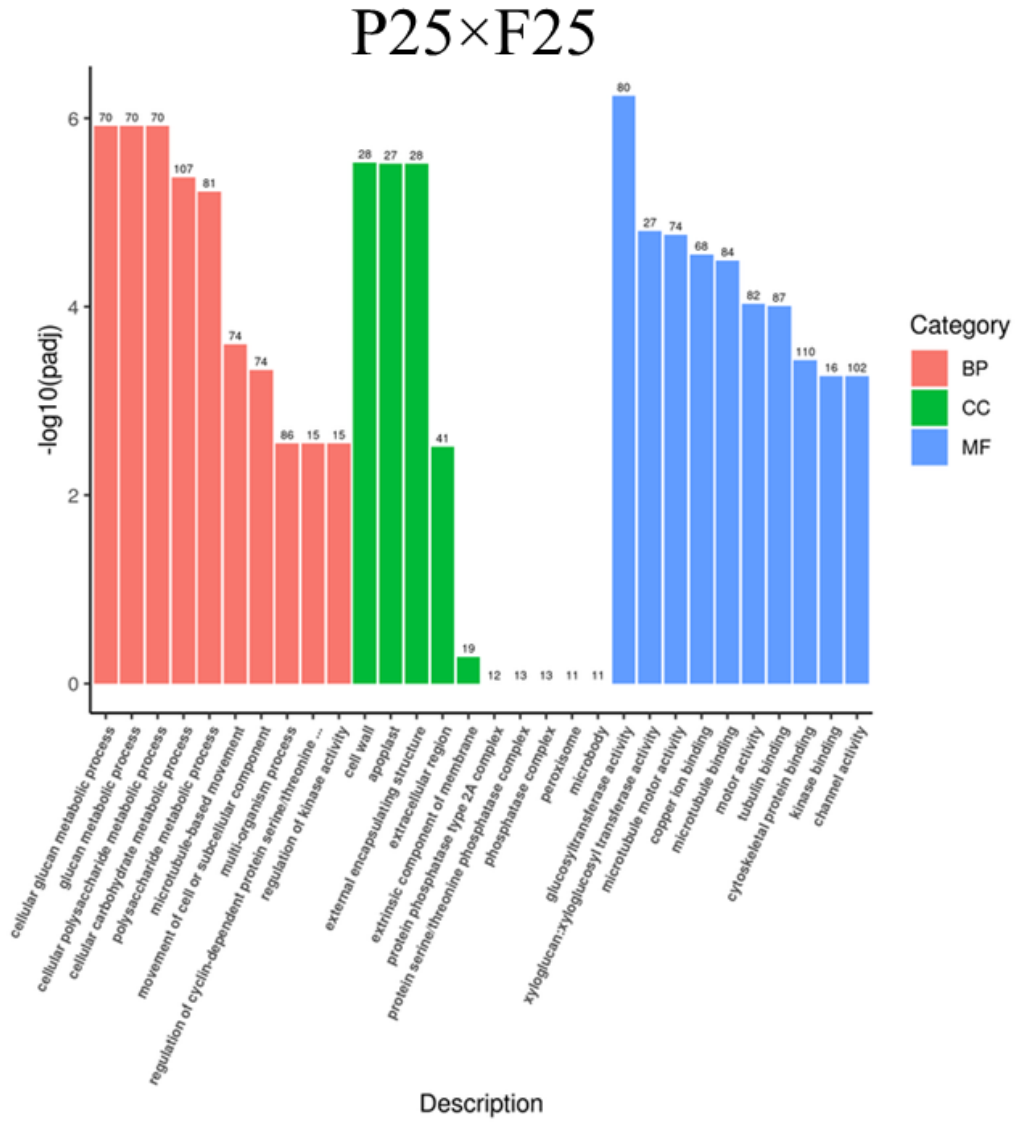


F40×F25



P40×F40



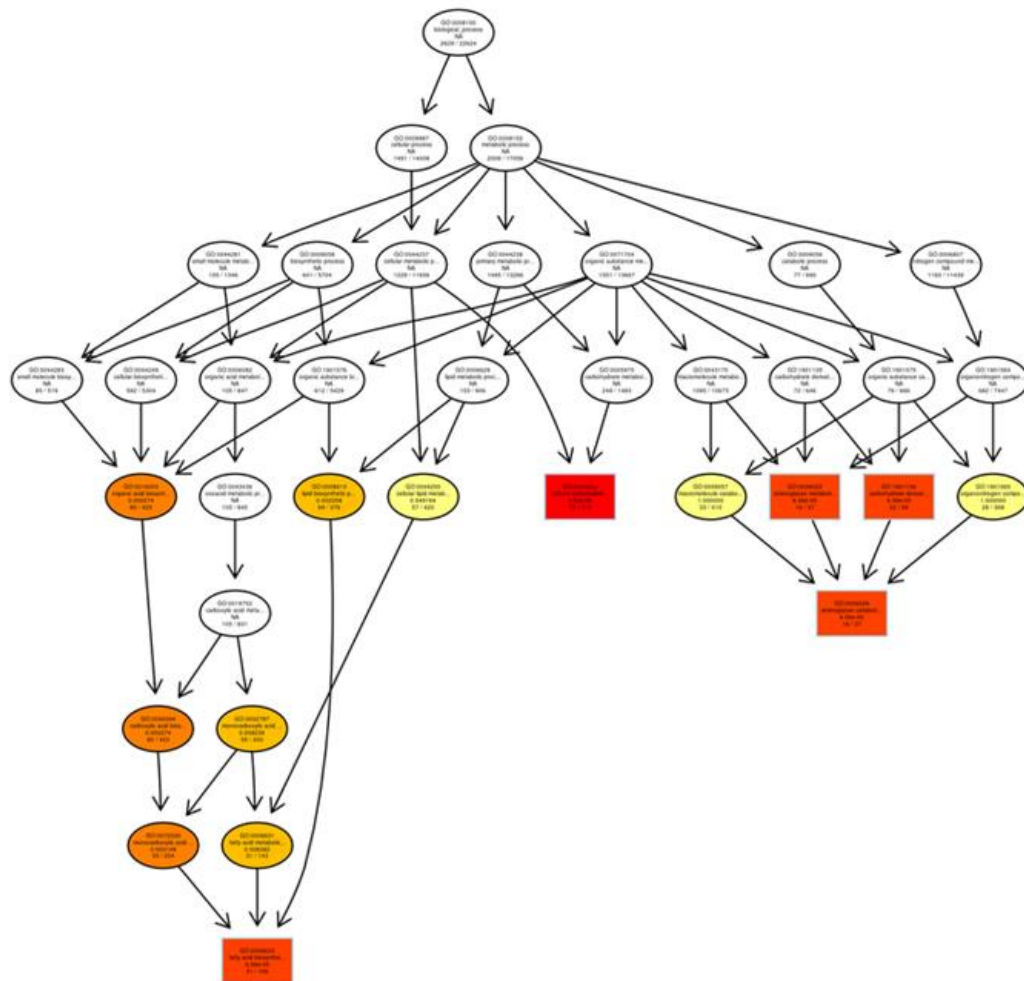


Şekil 4.20 4 farklı karşılaştırmaya ait GO zenginleştirme analizinin histogramı (X eksenini GO Terimi; y eksenini $\log_{10}(\text{padj})$ olarak ifade edilen GO teriminin zenginleştirme önem düzeyini ifade etmektedir. Farklı renkler farklı işlevsel kategorileri temsil etmektedir)

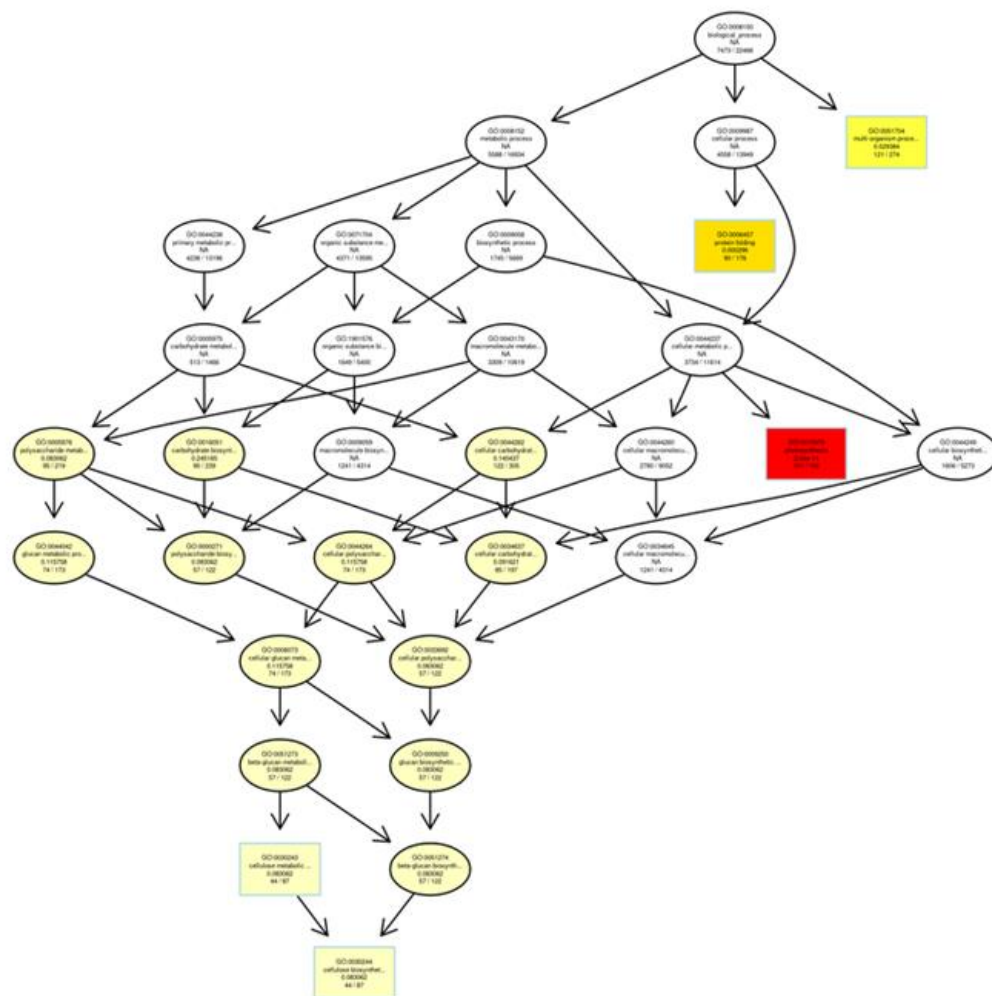
4.3.3.3.4. GO zenginleştirme analizi DAG grafiği

Yönlendirilmiş asiklik grafik (DAG), bir Gen Ontolojisi (GO) zenginleştirme analizinin sonuçlarını yorumlamak için yaygın bir görselleştirme yöntemidir. GO terimleri, en üstte daha genel terimler ve altta daha spesifik terimler olmak üzere bir hiyerarşi içinde düzenlenir. DAG, zenginleştirilmiş GO terimlerini ve bunların ilişkilerini görselleştirerek daha geniş işlevsel kategorilerin tanımlanmasına olanak sağlar. Düğüm rengi zenginleştirmenin önemini gösterir, daha koyu renkler daha önemli terimler içindir. Kenarlar, genel (ebeveyn) terimlerden daha spesifik (alt)

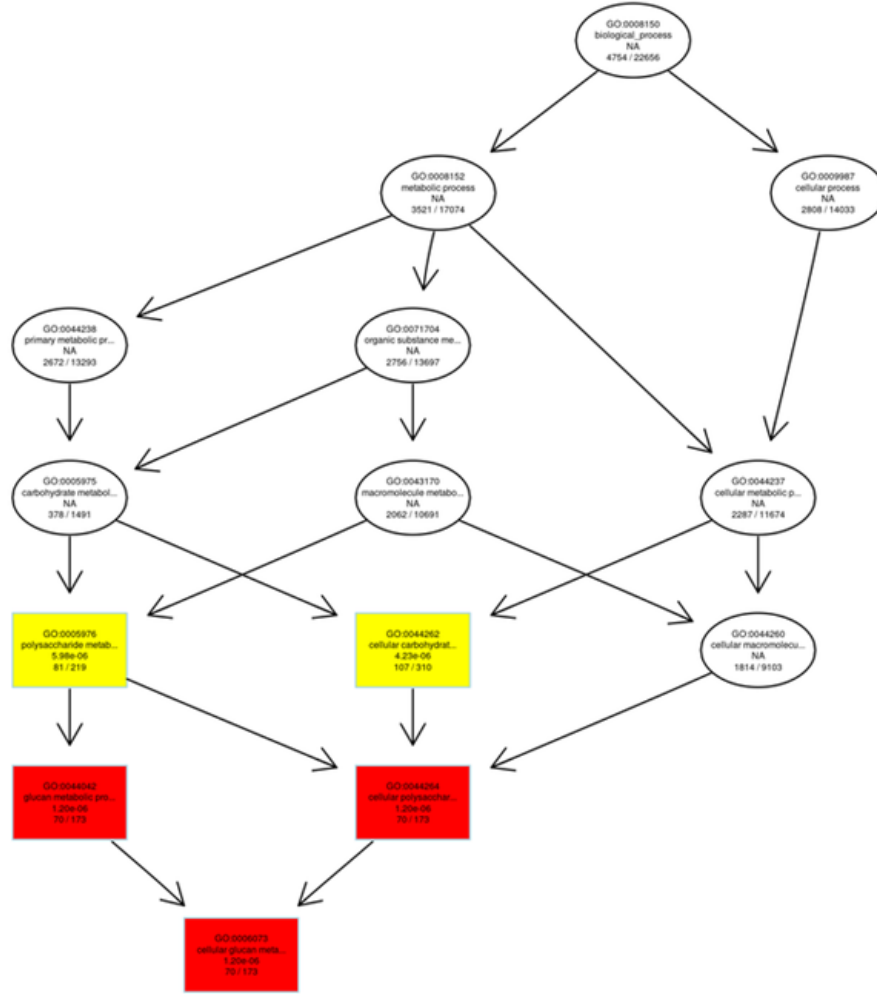
F40×F25



100

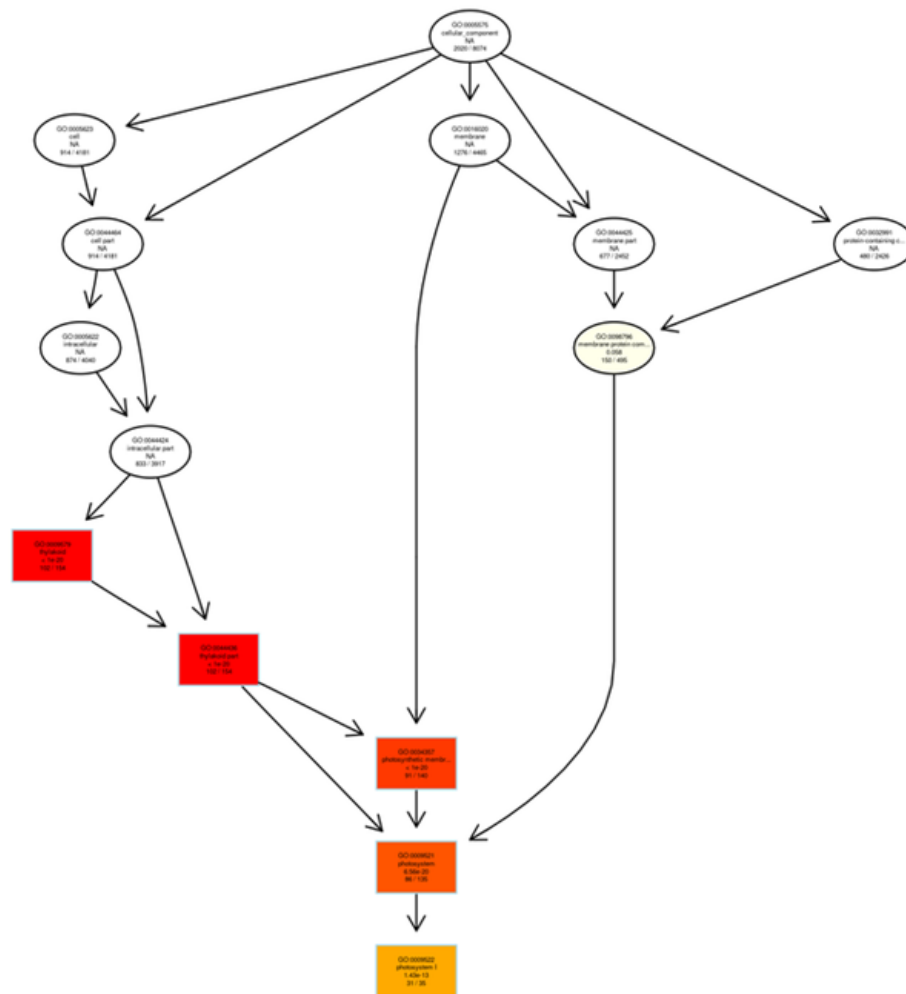


P25×F25

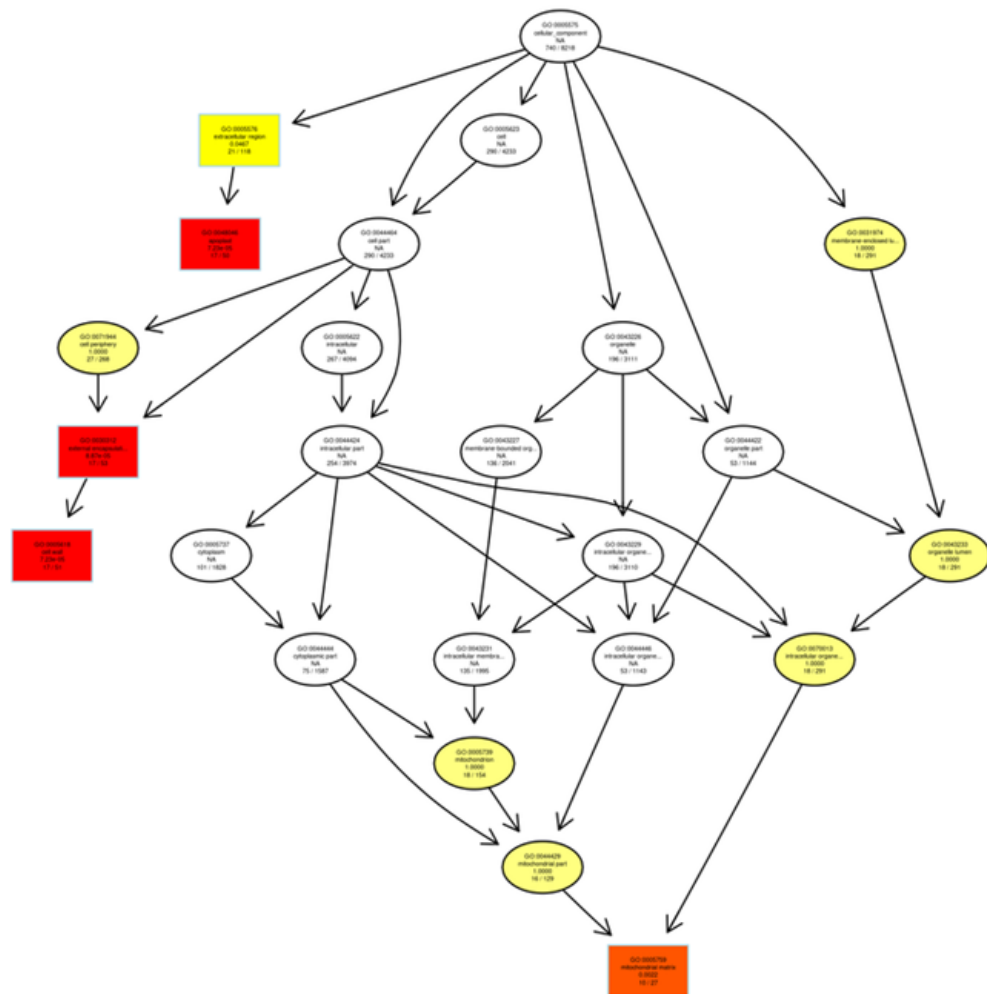


Şekil 4.21 GO zenginleştirme analizi DAG grafiği (Biyolojik fonksiyon)

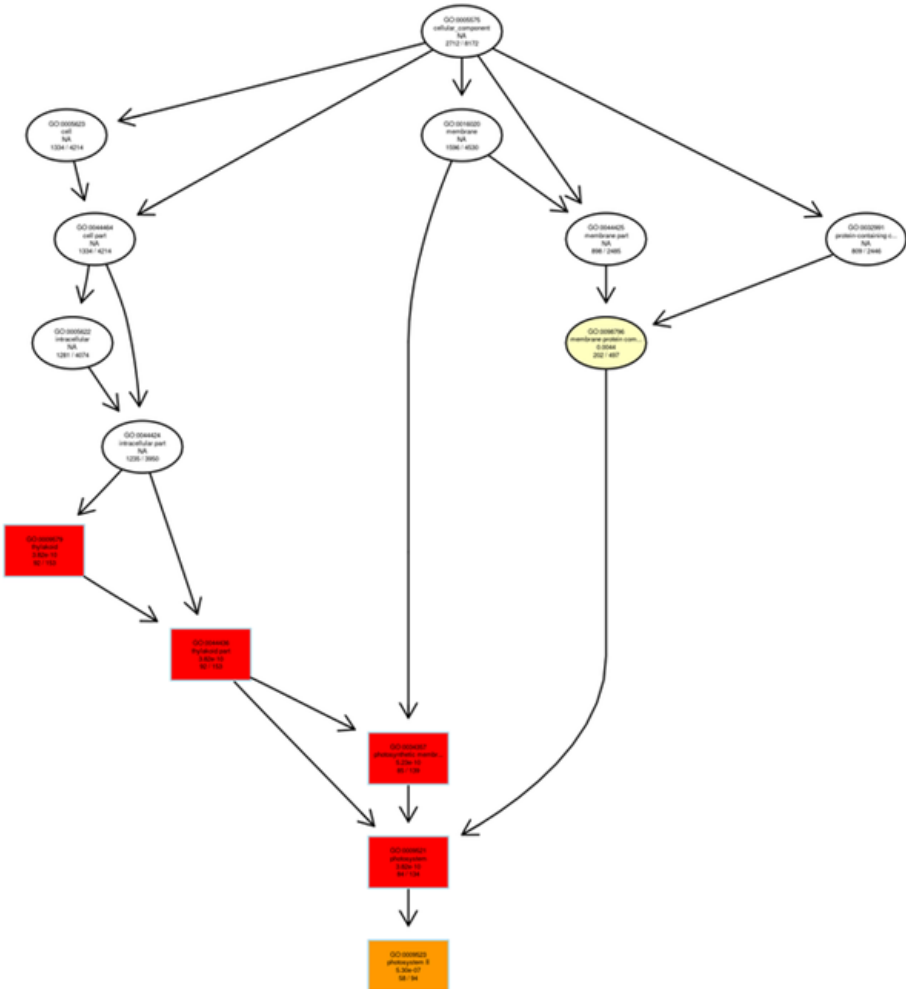
P40×P25



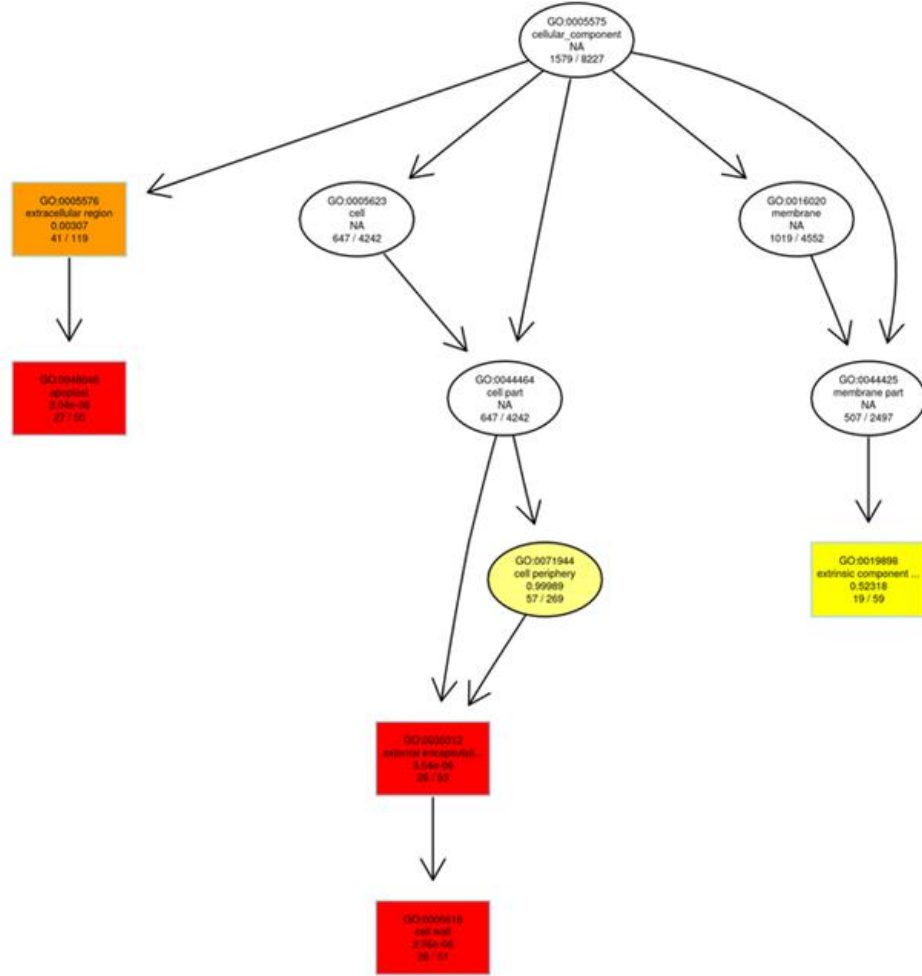
F40×F25



P40×F40

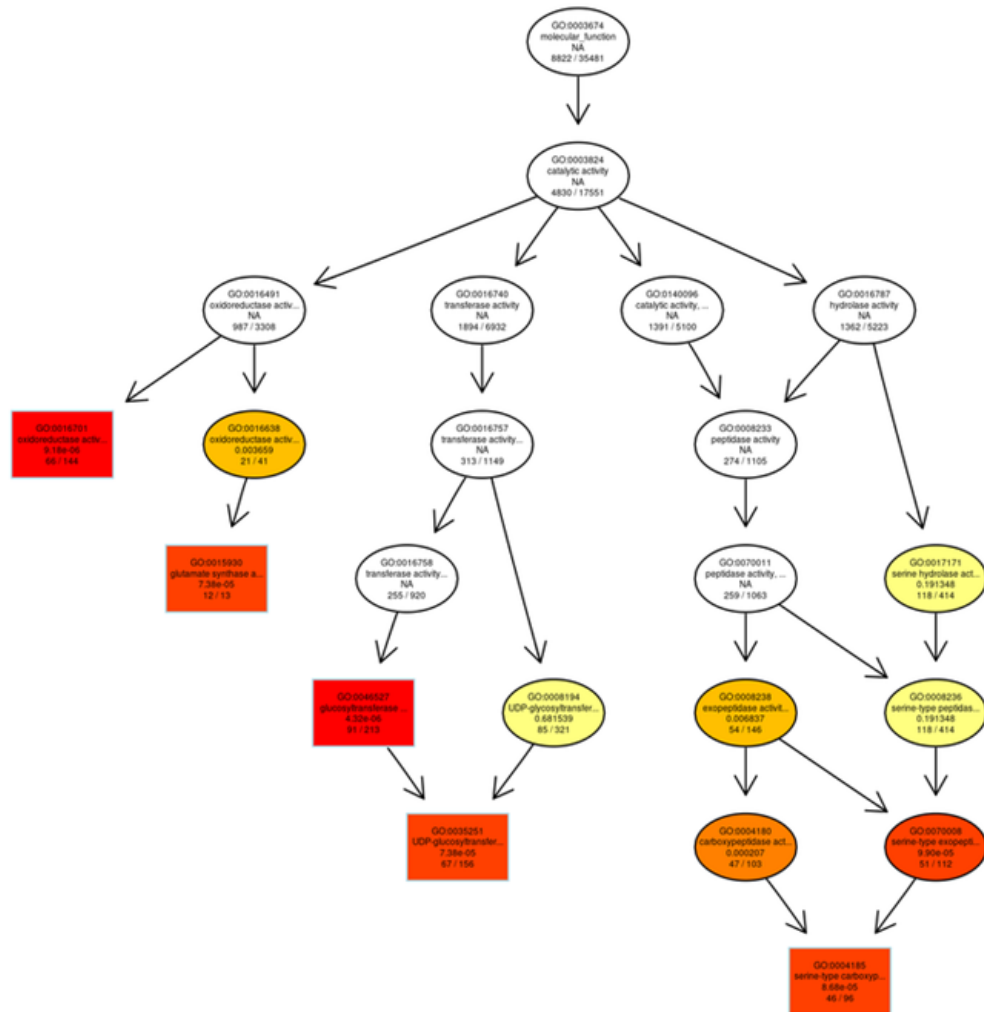


P25×F25

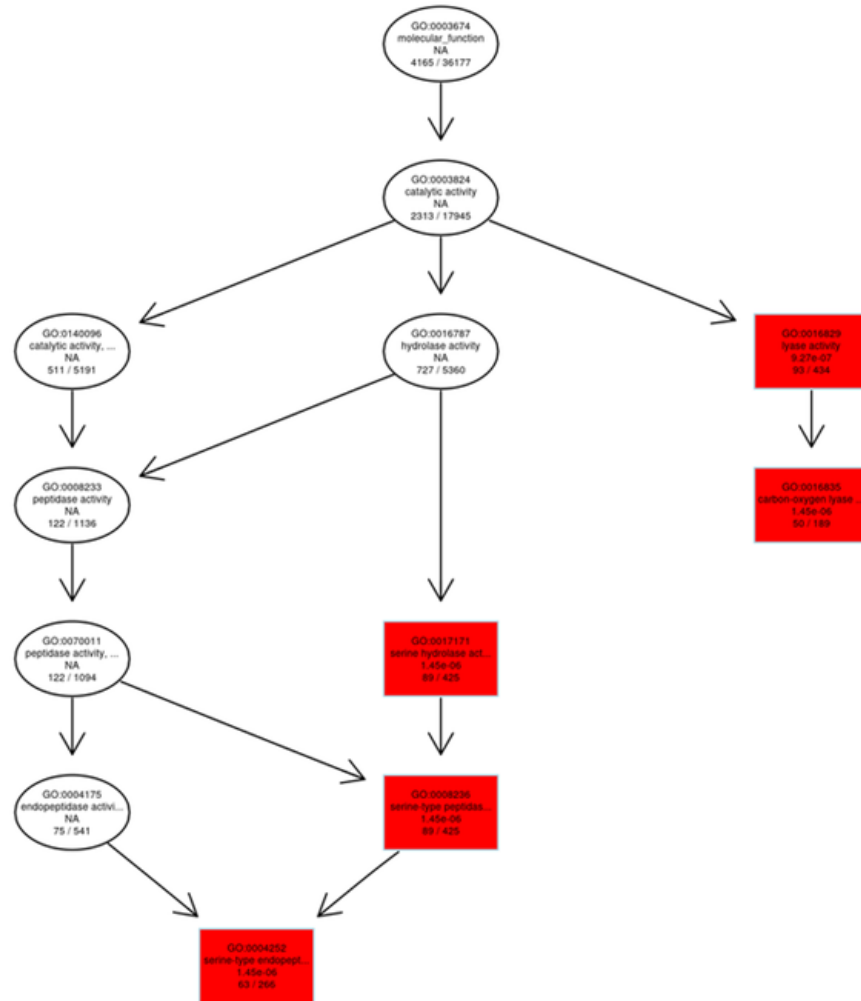


Şekil 4.22 GO zenginleştirme analizi DAG grafiği (Hücresel bileşen)

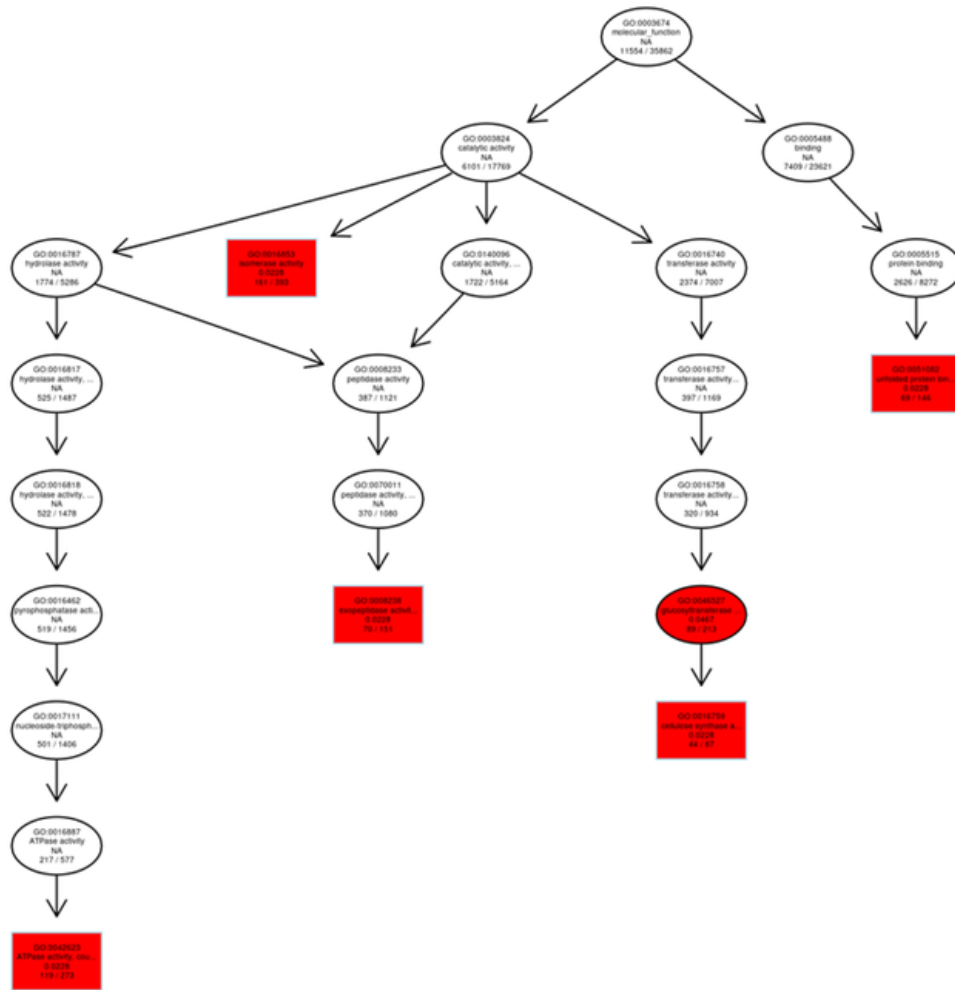
P40×F25



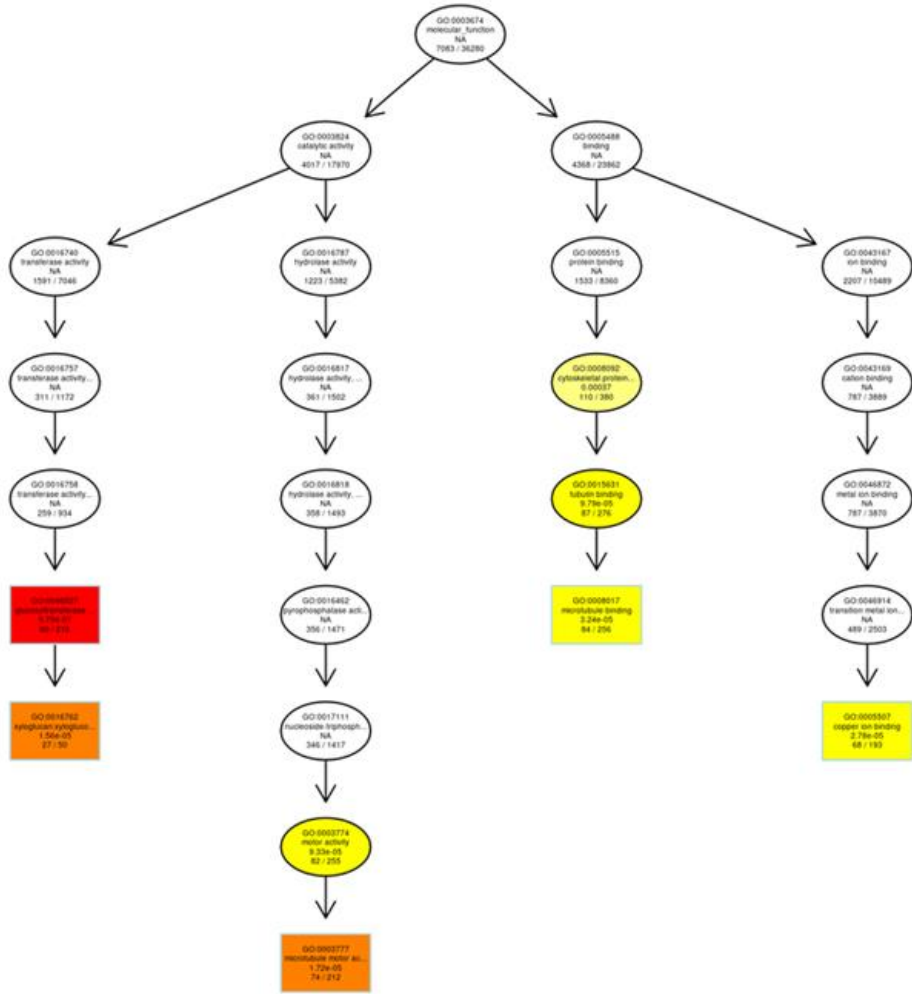
F40×F25



P40×F40



P25×F25



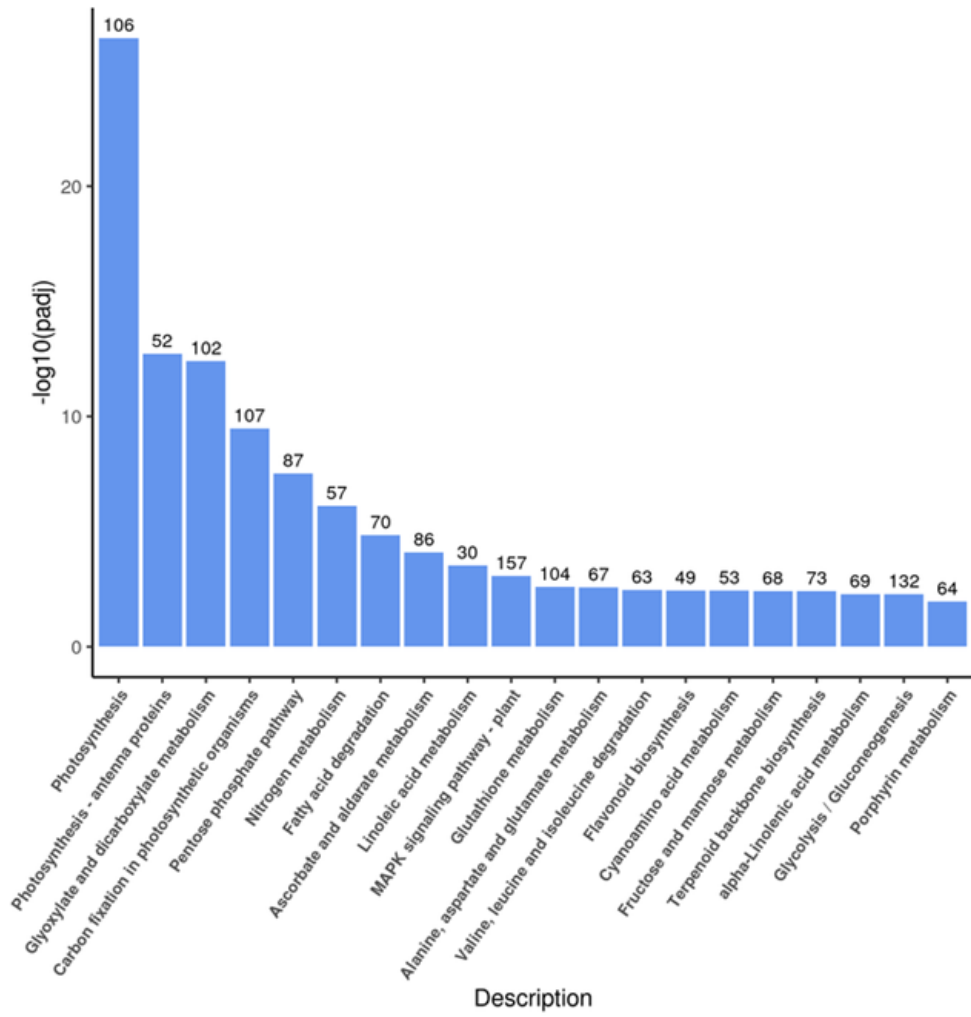
Şekil 4.23 GO Zenginleştirme Analizi DAG Çizelgesi (moleküler işlev) (Her düğüm bir GO terimini temsil eder ve kutu TOP5 GO Terms'in zenginleştirme seviyesini temsil eder. Rengin koyuluğu zenginleşme derecesini temsil eder, renk ne kadar koyu ise zenginleşme derecesi o kadar yüksektir. Her düğüm, terimin adını ve zenginleştirme analizinin padj'ini gösterir)

4.3.3.3.5. KEGG zenginleştirme analizi histogramı

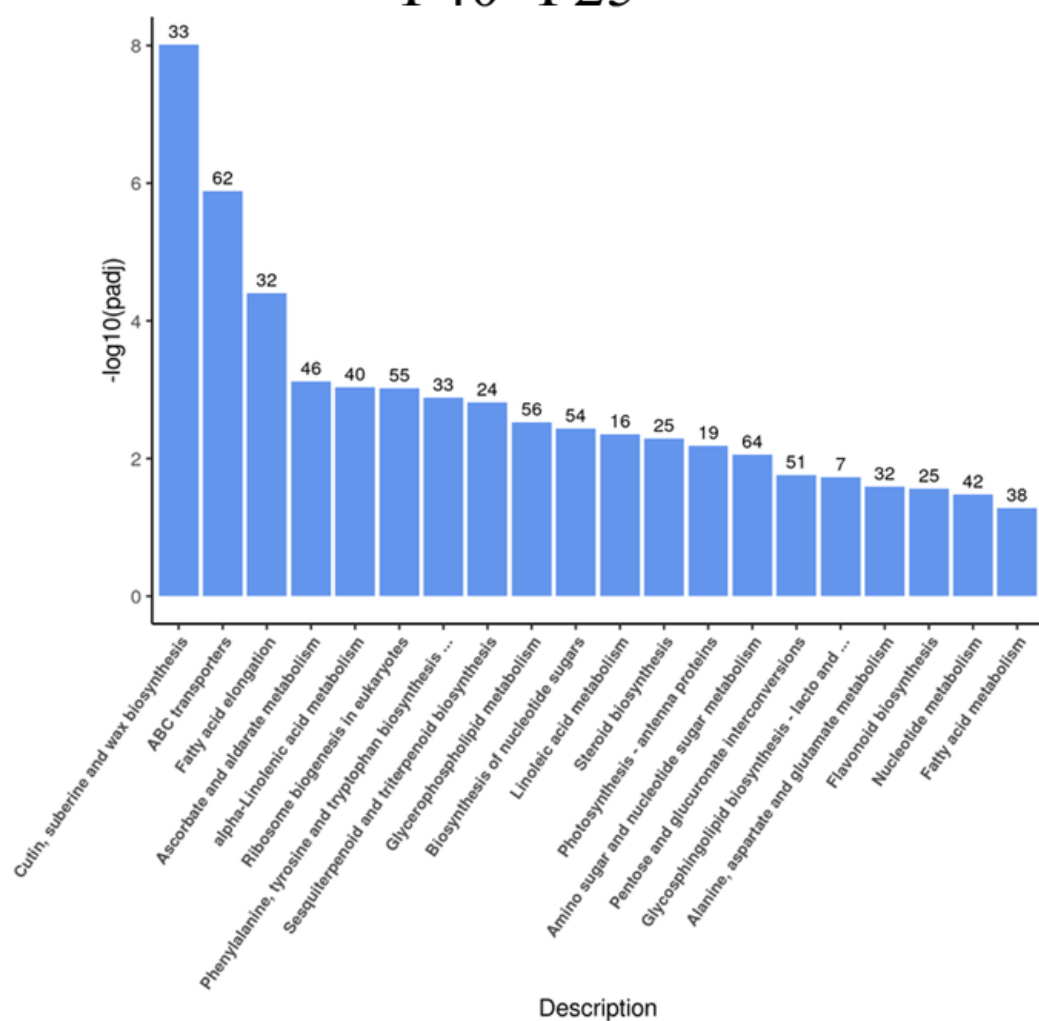
KEGG (Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi) genomik, metagenomik, metabolomik ve diğer omik çalışmalarda veri analizi de dahil olmak üzere biyoinformatik araştırmalar için kullanılır. KEGG yol zenginleştirme analizi, tüm genom arka planına kıyasla farklı şekilde ifade edilen genlerle ilişkili önemli ölçüde zenginleştirilmiş metabolik yolları veya sinyal iletim yollarını tanımlar. Bu çalışmadaki KEGG zenginleştirme sonuçları için, temsil edilmek üzere en önemli 20 KEGG yolu seçilmiştir. Seçilen tüm yollar Şekil 4.24'de gösterilmiştir. KEGG

zenginleştirme analizi, birden fazla gen arasındaki etkileşimlerin spesifik biyolojik işlevlerde rol oynayabilmesi nedeniyle gerçekleştirilmiştir. F40×F25'te ABC taşıyıcıları, Gliserofosfolipid metabolizması ve nükleotid şeker biyosentezinde önemli biyolojik fonksiyonlar gözlenmiştir. P25×F25'te ABC taşıyıcılarının biyosentezi, fenilpropanoid biyosentezi ve Gliserofosfolipid metabolizması gözlenmiştir. Ayrıca, P40×F40'ta ökaryotlarda ribozom biyogenezi, peroksizom ve fotosentez biyosentezi önemli ölçüde zenginleşirken, P25×F25'te Fenilpropanoid biyosentezi, ABC taşıyıcıları ve Gliserofosfolipid metabolizması gözlenmiştir.

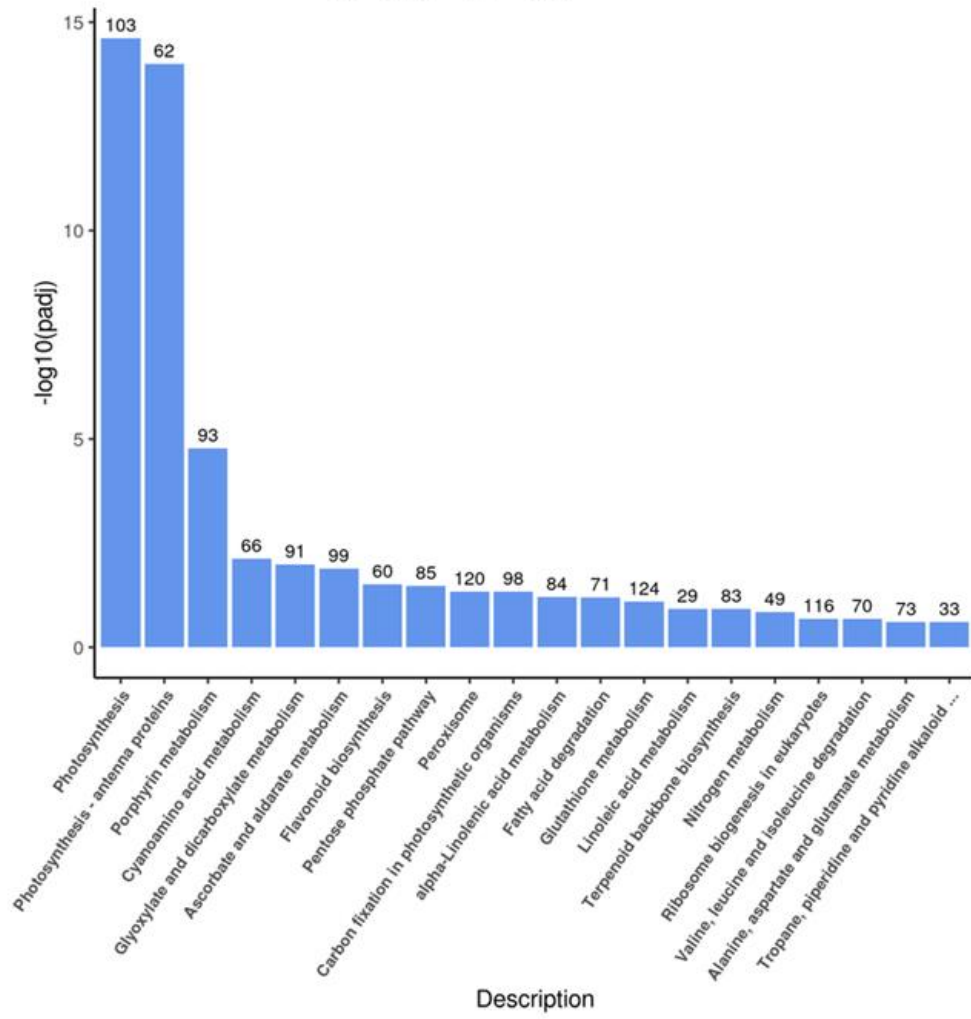
P40×P25



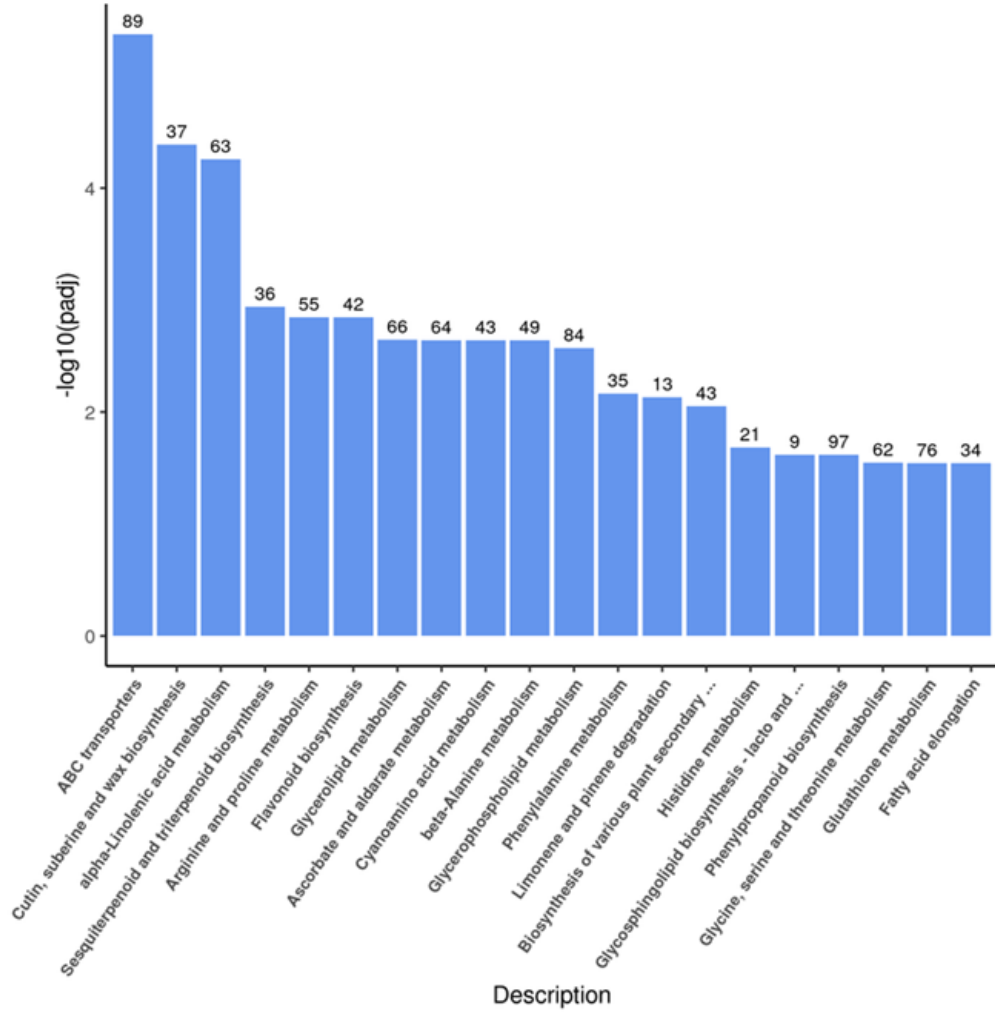
F40×F25



P40×F40



P25×F25



Şekil 4.24 KEGG zenginleştirme analiz histogramı (X eksenı KEGG yolunu; y eksenı yol zenginleştirmesinin önemlilik düzeyini göstermektedir)

4.3.3.3.6. Farklı ifade olan genlerin (DEG'ler) KEGG zenginleştirme analizi

KEGG (Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi) zenginleştirme analizi, RNA-seq gibi bir omik deneyinden elde edilen farklı ifade edilen genler (DEG'ler) listesinde önemli ölçüde zenginleştirilmiş biyolojik yolları tanımlamak için kullanılan bir yöntemdir. DEG'lerle ilişkili biyolojik süreçler ve moleküler yollar hakkında bilgi edinilmesine yardımcı olur. Şekil 4.25'te KEGG zenginleştirmesi ile bulunan hedef genlerin dağılım grafiği verilmiştir.

GO zenginleştirme analizinin 'scatter plot' ile sunulması ve DAG karşılaştırması sonrasında elde edilen sonuçlara göre, F40×F25'te en fazla zenginleşme gösteren yollar hücrel karbonhidrat metabolik süreci ve hücre dışı

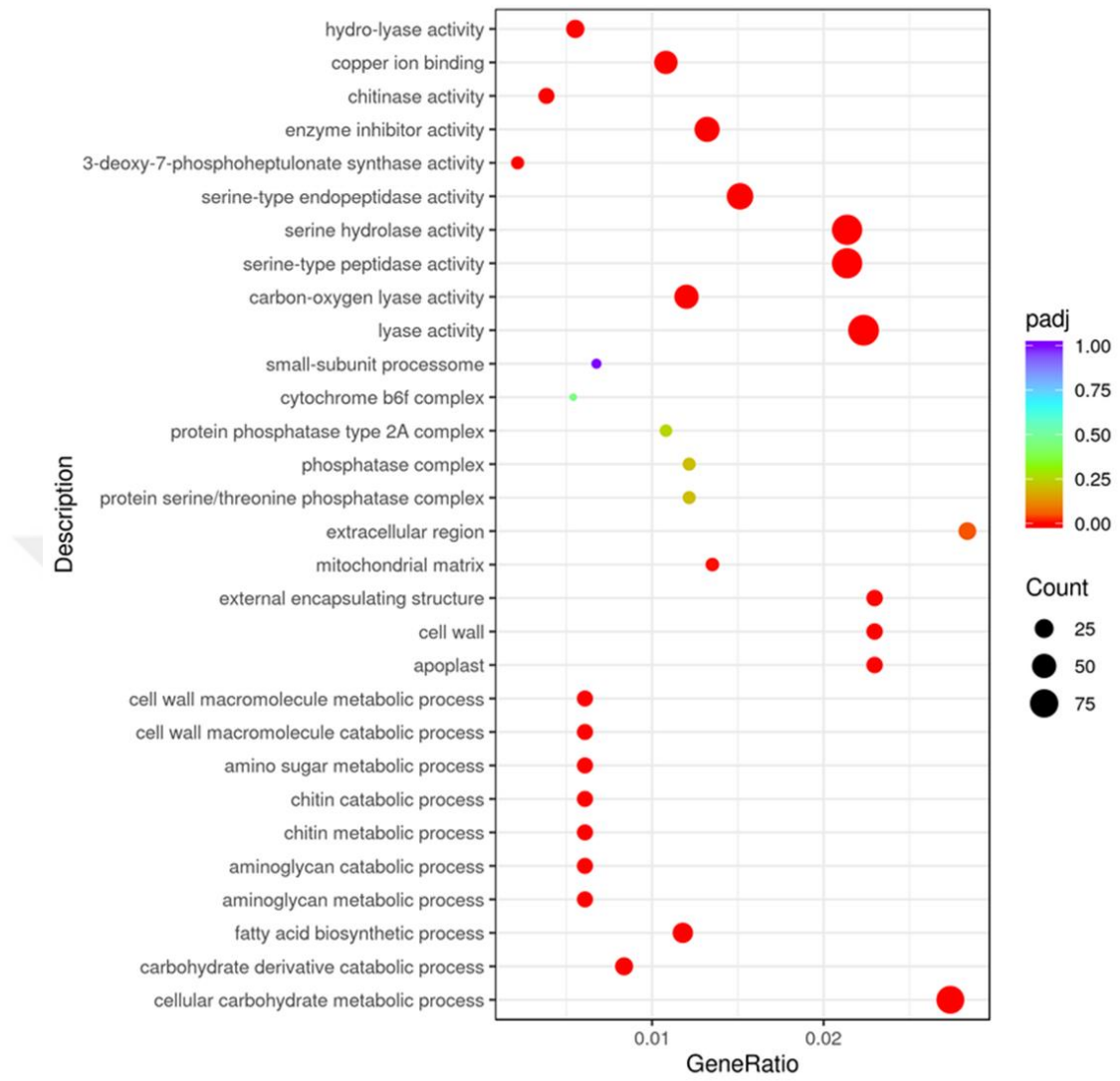
bölgede elde edilirken, en az zenginleşme gösteren yolaklar kitinaz aktivitesi, 3-deoksi-7-fosfoheptolunat sentez aktivitesinde gözlenmiştir. Benzer şekilde F40×F25'te en fazla DEG gösteren ilk üç yolak serin hidrolaz, serin peptidaz ve liyaz aktivitesi olmuştur.

P25×F25'te hücre dışı bölge ve hücrel karbonhidrat metabolik sürecinin yüksek oranda zenginleştiği, kinaz aktivitesi ve siklin bağımlı proteinin düzenlenmesinin ise en düşük zenginleşen yolaklar olduğu belirlenmiştir. P25×F25 uygulamasında en fazla DEG gösteren ilk 3 yolak kanal aktivitesi, hücrel karbonhidrat metabolik süreci ve kinaz aktivitesi olmuştur.

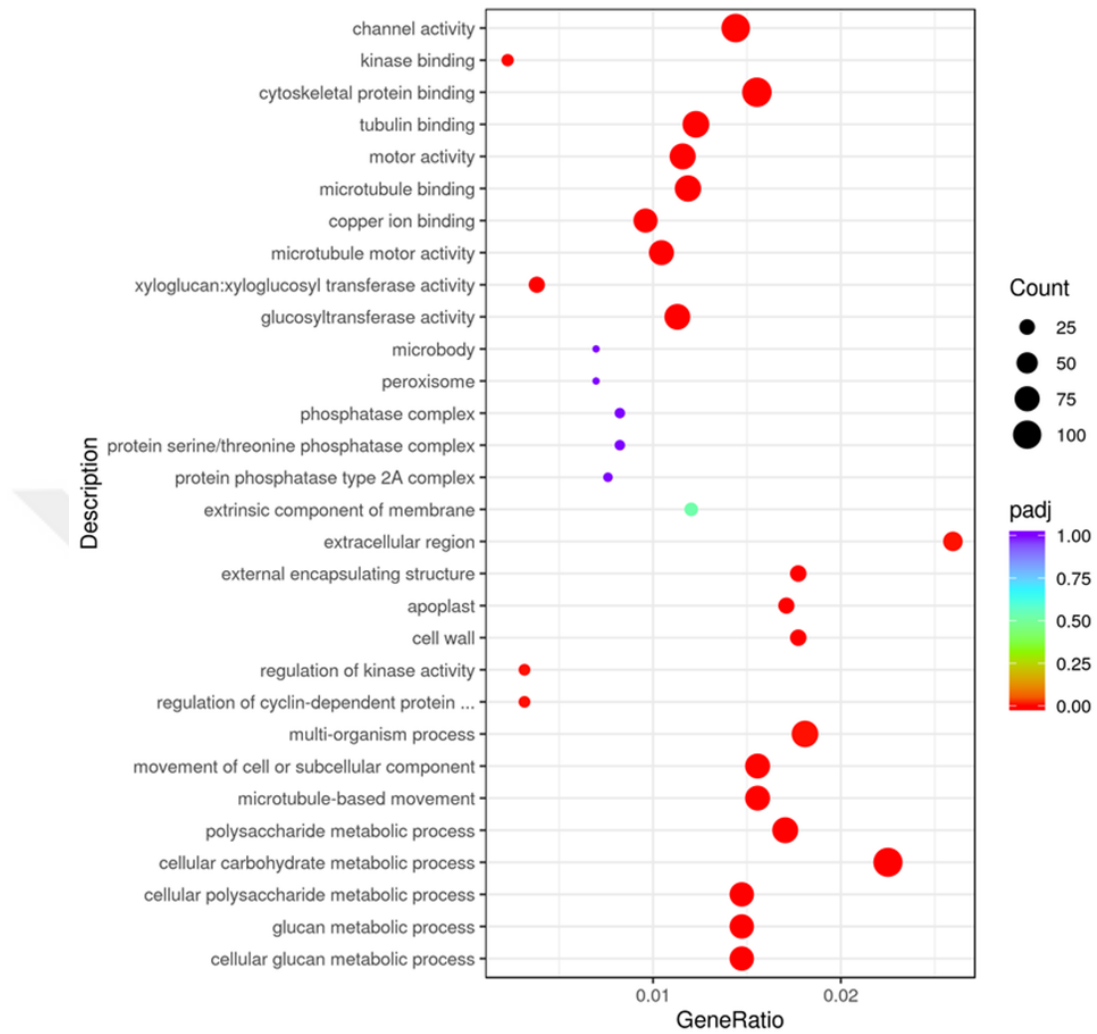
P40×F40'ta DEG'lerin çoğunlukla membran konsantre bölgesinde yoğunlaştığı gözlenmiştir. En düşük zenginleşme değeri karboksilik asit ve organik asit katabolik süreci ile DNA entegrasyonunda fark edilmiştir. En fazla DEG gösteren ilk 3 yolak izomeraz aktivitesi, membran protein kompleksi, fotosentez olarak belirlenmiştir.

P40×P25'te DEG'lerin tilakoid kısım, tilakoid ve fotosentetik membran yolaklarında en fazla yoğunlaştığı; glutamat sentez aktivitesi, glutamat biyosentezi ve metabolik süreçlerinde en düşük değerleri gösterdiği belirlenmiştir.

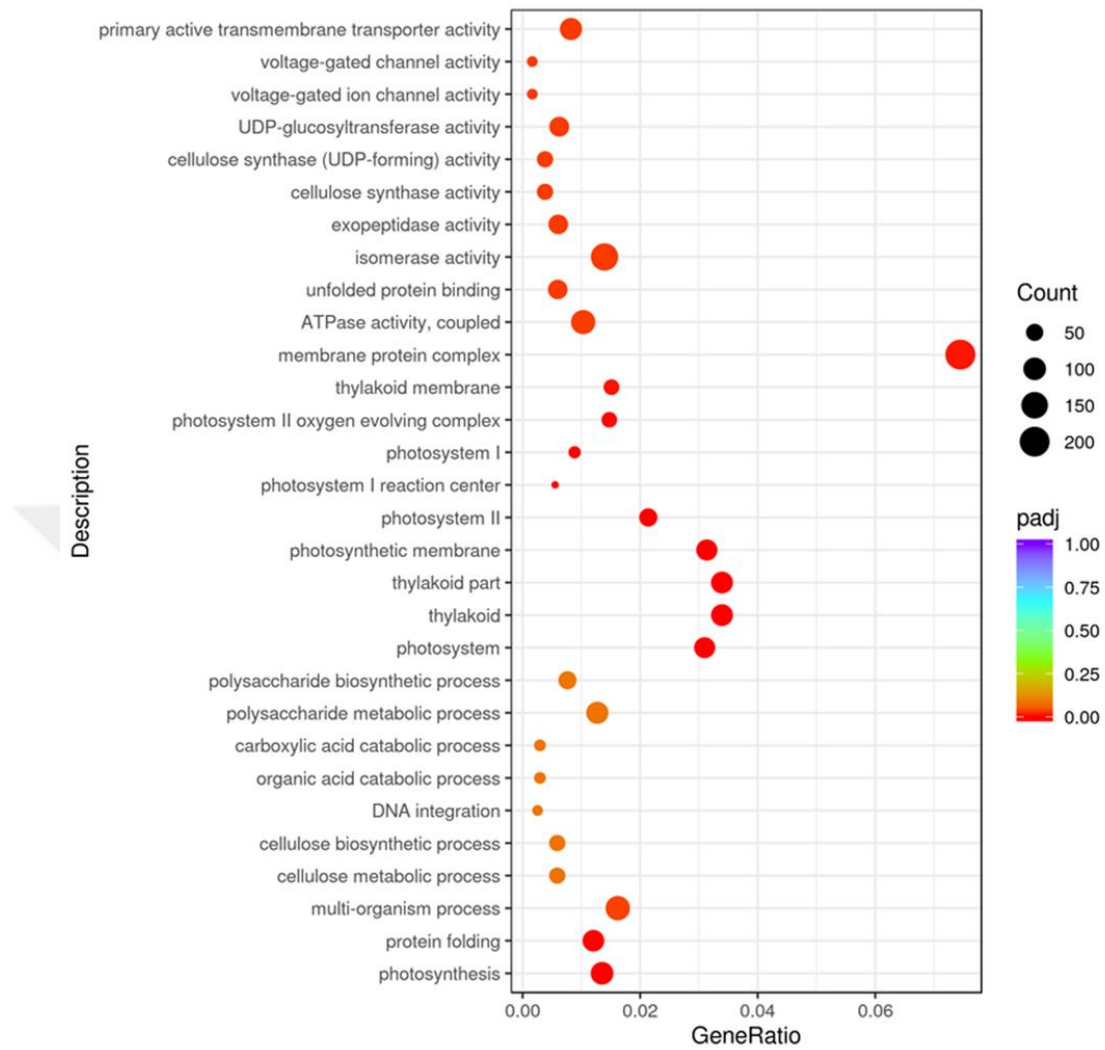
F40 × F25

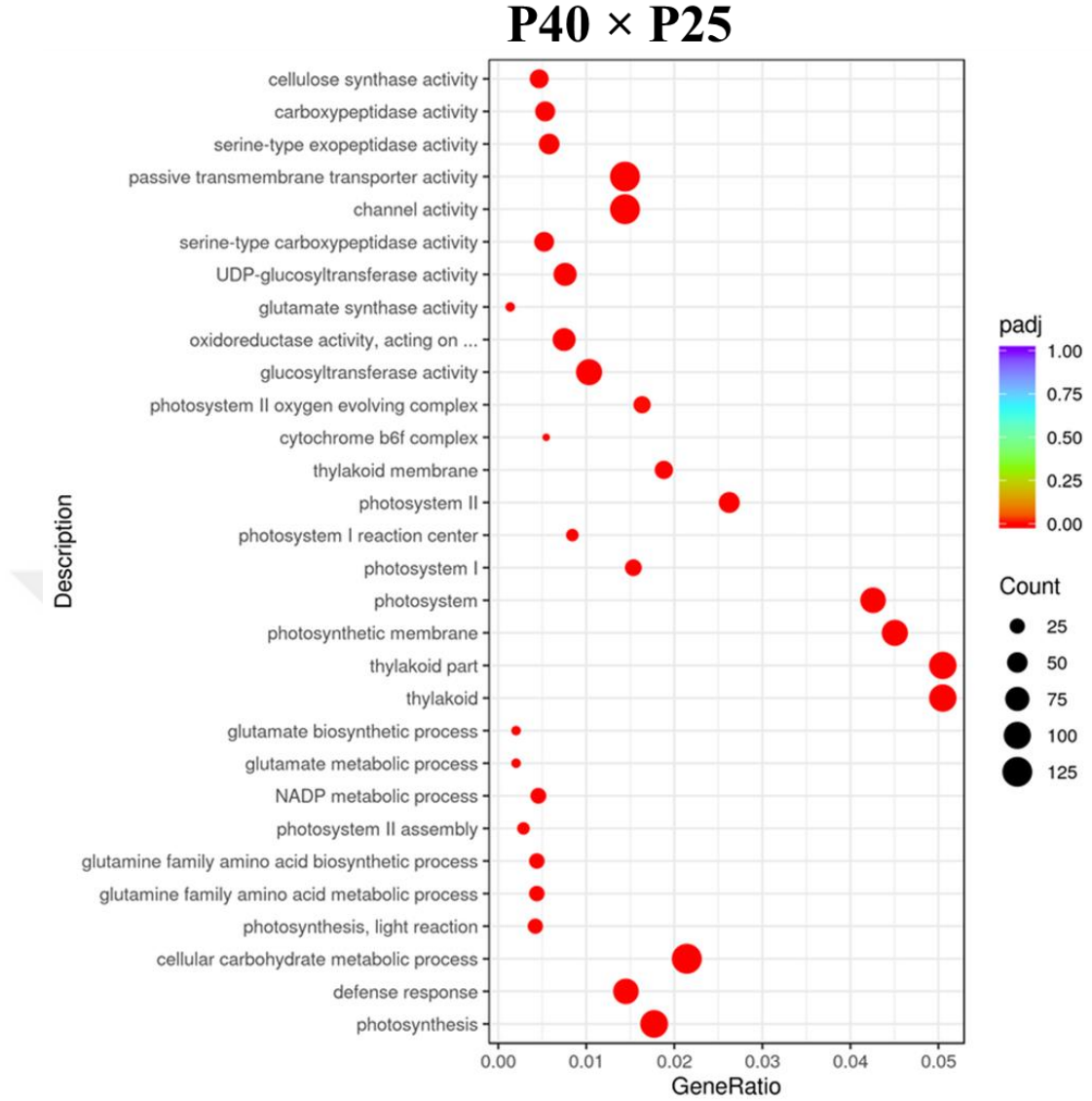


P25×F25



P40×F40





Şekil 4.25 KEGG zenginleştirilmesi ile bulunan hedef genlerin dağılım grafiği (x eksenini zenginleştirme kat sayısını; y eksenini yol adını; nokta boyutu hedef genlerin sayısını; renk q-değerini temsil eder, kırmızıdan mora doğru renk değişimi, önemli zenginleşme seviyesini gösterir)

4.3.3.3.7. Farklı ifade olan (DEG'ler) lncRNA'ların tanımlanması

P40×P25, F40×F25, P40×F40, P25×F25 karşılaştırmalarında belirlenen lncRNA sayıları Tablo 4.15'de verilmiştir. P40×F40'ta toplam 2603 ile en yüksek sayıda farklı ifade edilen lncRNA belirlenmiştir. Buna karşılık F40×F25 toplam 392 ile en düşük sayıda farklı ifade edilen lncRNA'ya sahip olmuştur (Tablo 4.15).

Tablo 4.15 Kütüphane karşılaştırmalarında farklı şekilde ifade edilen lncRNA'ların sayısı

Karşılaştırma	Toplam lncRNA Sayısı
P40×P25	893
F40×F25	392
P40×F40	2603
P25×F25	1825

Tablo 4.16'de farklı kütüphanelerde (P40×P25, F40×F25, P40×F40, P25×F25) farklı ifade gösteren lncRNA'lara ait bilgiler verilmiştir. Özellikle P40×F40 ve P40×P25 karşılaştırmalarının her ikisinde de lncRNA TCONS_00125145 farklı ifade olmuştur. Bu durum TCONS_00125145'in, farklı sıcaklık koşullarında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Tablo 4.16 Kütüphane karşılaştırmalarında bazı farklı ifade edilen lncRNA'ların bilgileri

lncRNA_id	log2FC	VS	lncRNA_id	log2FC	VS	lncRNA_id	log2FC	VS	lncRNA_id	log2FC	VS
TCONS_00023081	-2,66	F40×F25	TCONS_00018340	14.44	P25×F25	TCONS_00094455	-7.94	P40×F40	TCONS_00094455	-14.52	P40×P25
TCONS_00011235	7,27	F40×F25	TCONS_00018339	-11.03	P25×F25	TCONS_00079333	6.88	P40×F40	TCONS_00079333	10.74	P40×P25
TCONS_00136973	-6,54	F40×F25	TCONS_00161006	9.37	P25×F25	TCONS_00129020	-5.65	P40×F40	TCONS_00129020	-12.38	P40×P25
TCONS_00166306	11,68	F40×F25	TCONS_00068574	11.87	P25×F25	TCONS_00034442	-6.78	P40×F40	TCONS_00034442	7.10	P40×P25
TCONS_00143327	-11,63	F40×F25	TCONS_00127470	-9.24	P25×F25	TCONS_00157248	-12.16	P40×F40	TCONS_00157248	4.25	P40×P25
TCONS_00022315	-11,70	F40×F25	TCONS_00133873	6.31	P25×F25	TCONS_00040865	-6.30	P40×F40	TCONS_00040865	5.95	P40×P25
TCONS_00178612	8,26	F40×F25	TCONS_00021207	12.30	P25×F25	TCONS_00008846	-7.79	P40×F40	TCONS_00008846	3.07	P40×P25
TCONS_00108567	7,46	F40×F25	TCONS_00014546	11.11	P25×F25	TCONS_00127470	-7.28	P40×F40	TCONS_00127470	10.79	P40×P25
TCONS_00180363	10,50	F40×F25	TCONS_00094455	-6.15	P25×F25	TCONS_00086129	12.20	P40×F40	TCONS_00086129	-6.16	P40×P25
TCONS_00073398	4,31	F40×F25	TCONS_00129020	-6.12	P25×F25	TCONS_00125145	5.16	P40×F40	TCONS_00125145	4.28	P40×P25

4.3.4. Yüksek sıcaklık stresinde farklı ifade olan gen tepkileri

Bu tez çalışmasında incelenen çilek çeşitlerinin ('Portola' ve 'Fronteras') yüksek sıcaklık stresine tepkileri, yüksek sıcaklığa duyarlı 21 gen seçilerek araştırılmıştır. qRT-PCR bulguları, seçilen genlerin ifade seviyelerinin incelenen çeşitler arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymuş ve çilek genotiplerinin yüksek sıcaklık toleransı altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında bilgiler sağlamıştır. qRT-PCR'den elde edilen bulgular, RNA-seq analizi ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile tutarlı olmuştur. Denemede yüksek sıcaklığa duyarlı olarak seçilen genlerin (21 adet), incelenen çeşitler ve yüksek sıcaklık stresi altındaki ifade seviyeleri Şekil 4.26, 4.27, 4.28, 4.29'da gösterilmiştir.

FxaYL_131g0769800 geni, Fosfogliserat mutaz proteini ailesinin bir üyesidir. Bu gen glikolitik yolda hayati bir işleve sahiptir ve kloroplast içinde yer alır. 2,3-bisphosphoglycerate-bağlı fosfogliserat mutaz aktivitesini kolaylaştırır. Ayrıca stomaların bekçi hücreleri, kökler, sürgünler ve çiçekler olmak üzere çeşitli bitki kısımlarında farklı ifade sergiler. Şekil 4.26'ya göre, FxaYL_131g0769800 geninin ifadesi P40×F40'ta 12.29 kat artmış; P25×F25'te ise oldukça düşük kalmıştır (2.18 kat).

FxaYL_121g0718900 geni, hem sitozol hem de çekirdekte aktiftir. Yüksek sıcaklık stresine yanıt olarak ifade edilir. Miyosin fosfatazı ve protein serin/treonin fosfataz aktivitelerini sağlar. Çiçeklenme, embriyosu olgunlaşması, vasküler yaprak yaşlanması ve petal farklılaşması ve genişlemesi gibi bitki gelişim aşamalarında ifade sergiler. Bu genin ifadesi P40×F40'ta 23.18 kat artarken; P25×F25'te sadece 2.05 kat artmıştır (Şekil 4.26).

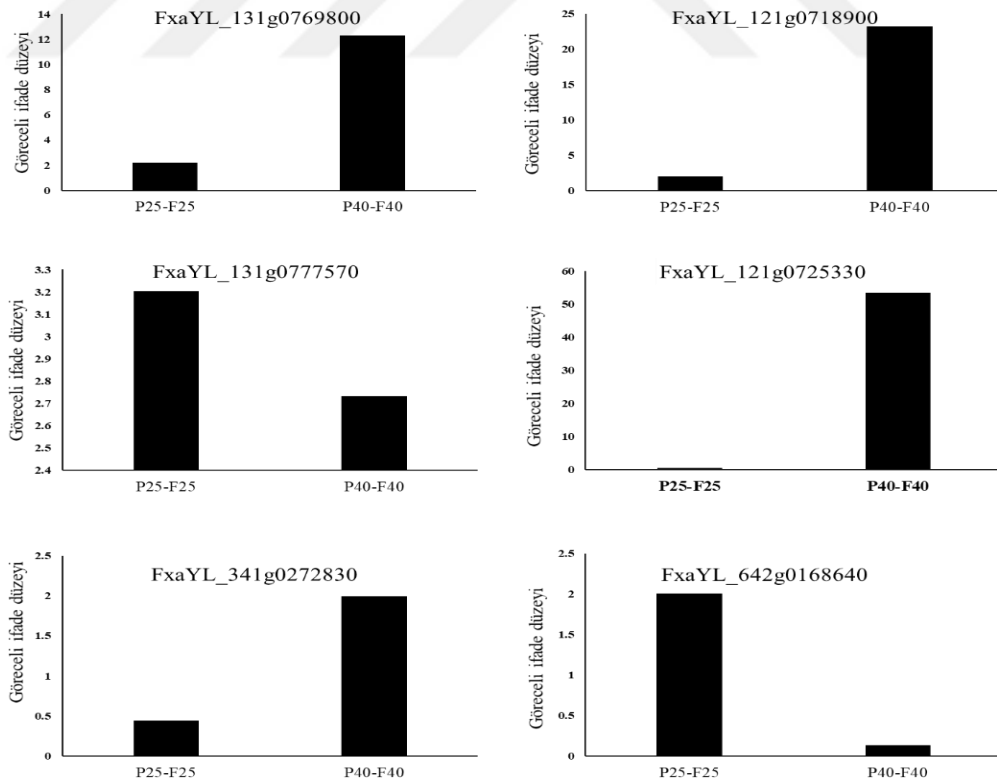
FxaYL_131g0777570 geni, membran füzyonu ve hücre içi protein taşınımının yukarı akış düzenleyicisi olarak hizmet eder. Hem çekirdekte hem de zarda bulunur ve SNARE kompleksinin bir bileşenidir. Bu gen, plazma membranı ve endomembran sisteminde aktiftir ve vezikül füzyonuna, hücre içi protein taşınmasına, ekzositoza ve vezikül kenetlenmesine katılır. Stomaların bekçi hücreleri, çiçekler ve sperm hücreleri gibi bitki kısımlarında ifadesi gözlenir. Bu tez çalışmasında FxaYL_131g0777570'in ifadesi P25×F25'te 3.20 kat artış gösterirken; P40-F40'ta düşük düzeyde kalmıştır (2.73 kat) (Şekil 4.26).

Sitoplazmada yer alan xoglu/Fe-dep_dioksijenazın bir üyesi olan FxaYL_121g0725330 geni, biyolojik süreçlerde kritik bir rol oynar ve moleküler işlevleri kolaylaştırır. Petal, çiçek, hipokotil ve kökün genişleme ve farklılaşma

aşamalarında çeşitli ifadeler gösterir. Bu çalışmada FxaYL_121g0725330'un ifadesi P40×F40'ta artarken, P25×F25'te düşük düzeyde ifade göstermiştir (Şekil 4.26).

FxaYL_341g0272830 geni, olgunlaşan tohumlardaki sHSP'lerin çoğunluğunu oluşturan I. sınıf küçük ısı şoku proteini (sHSP) ailesine aittir. Protein katlanmasında çok önemli bir rol oynar. Tuz stresi, yüksek sıcaklık stresi ve hidrojen peroksit duyarlıdır. Bu genin ifadesi, çimlenme ve çiçeklenme gibi çeşitli bitki gelişim aşamalarında gözlenir. Bu tez çalışmasında FxaYL_341g0272830'ın ifadesi P40×F40'ta 1.99 kat artarken, P25×F25'te düşük düzeyde ifade göstermiştir (0.44 kat) (Şekil 4.26).

FxaYL_642g0168640 geni, bitkilerin savunma tepkisinde çok önemli bir rol oynayan Patogenezle ilişkili taumatin süper aile proteinine aittir. Hem hücre dışı bölgede hem de membranda bulunur. Moleküler fonksiyonun sağlanmasından sorumludur. Bu gen özellikle çiçeklenme, taç yaprak farklılaşması ve genişlemesi, bilateral ve kotiledon embriyosu aşamaları gibi bitki büyümesinin farklı aşamalarında değişen seviyelerde ifade sergiler. Bu gen ifadesinin P25×F25'te artış gösterdiği, P40×F40'ta ise çok düşük düzeyde kaldığı bulunmuştur (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresine bağlı qRT-PCR aracılığı ile belirlenen gen ifade sonuçları

FxaYL_121g0724030 geni, mRNA işlemede düzenleyici roller oynayan bir grup RNA bağlayıcı protein olan Çinko parmak (CCCH tipi) ailesi proteinine aittir. Bu proteinler birleştirme, taşıma, stabilite ve translasyon regülasyonu gibi RNA metabolizmasının birçok yönüyle ilgilidir. Bitkilerde bu gen çiçeklenme, embriyo olgunlaşması, taç yaprak farklılaşması ve genişlemesi, vasküler yaprak yaşlanması gibi bitki gelişim aşamalarında ifade sergiler. Bu gen P25×F25'te P40×F40'a kıyasla önemli ölçüde yüksek ifade göstermiştir (Şekil 4.27).

FxaYL_642g0168640 taumatin benzeri proteinler (TLP'ler), bitkilerde biyotik ve abiyotik streslere karşı bir savunma tepkisi olarak indüklenen patogenezele ilgili bir protein ailesidir. TLP'ler antifungal özelliklere sahiptir. Savunma rolleri, pH'a, proteazlara ve ısıya dayanmalarını sağlayan kararlı üç boyutlu yapılarına atfedilir. Bu tez çalışmasında bu genin ifadesi P40×F402'ta 2.29 kat artış sergilerken; P25×F25'te daha düşük düzeyde ifade göstermiştir (1.57 kat) (Şekil 4.27).

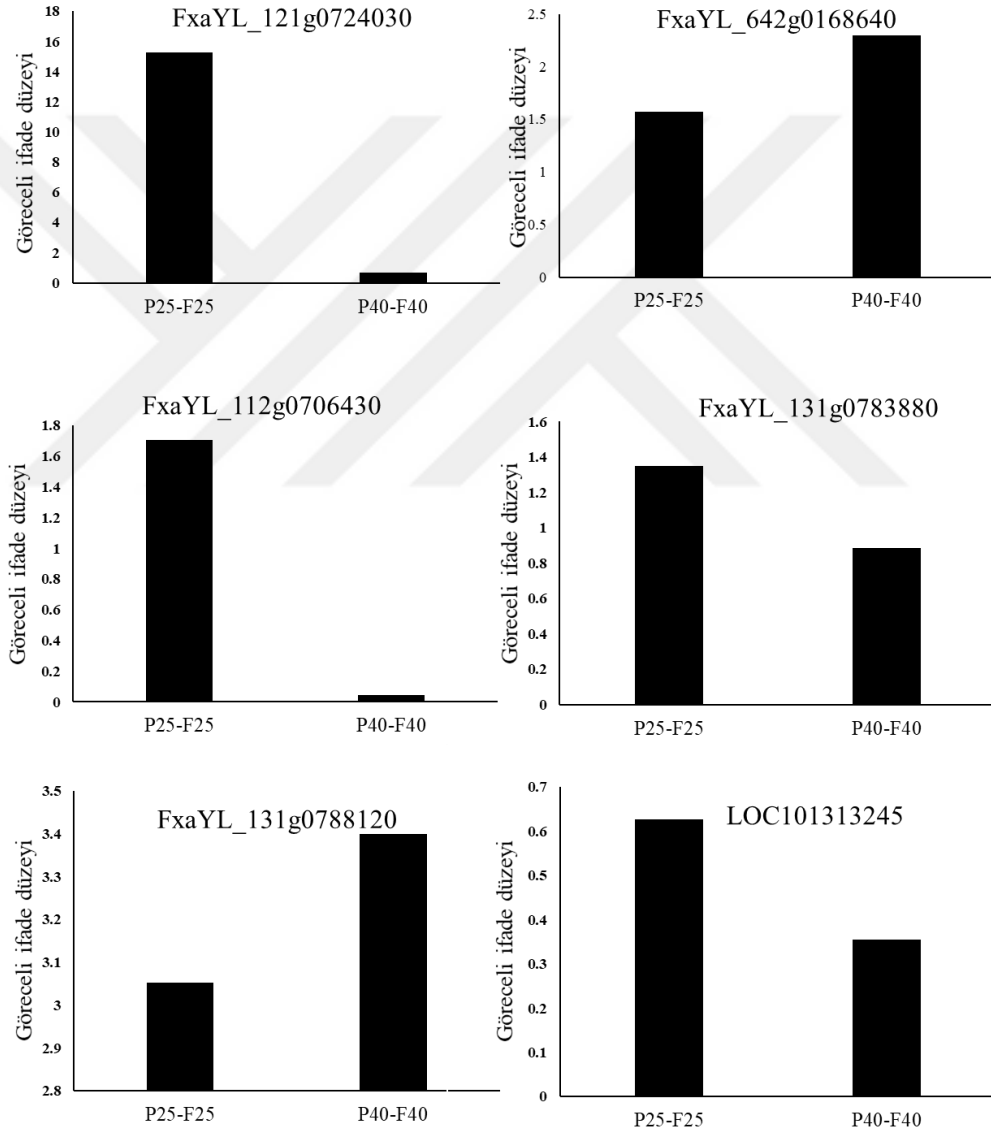
FxaYL_112g0706430 geni, Osmotin/taumatin benzeri süper ailenin bir üyesidir. Taumatin benzeri protein (TLP) ailesi, hem yapısal hem de stres kaynaklı proteinlerden oluşur. Bu aile taumatin, ozmotinler, tohum permeatinleri, stresle ilişkili PR-5 proteinleri ve meyve ve çiçeklerle ilişkili TLP'ler gibi çeşitli proteinleri içerir. Bu proteinler bitki savunma mekanizmalarında çeşitli roller oynar ve biyotik ve abiyotik streslere yanıt olarak indüklenir. TLP'lerin çeşitli işlevleri arasında antifungal aktivite, membran geçirgenliği ve gen ekspresyonunun modülasyonu yer alır. Bu gen P25×F25'te önemli ölçüde yüksek düzeyde ifade gösterirken, P40×F40'ta oldukça düşük seviyede ifade sergilemiştir (Şekil 4.27).

FxaYL_131g0783880 geni, Myb benzeri transkripsiyon faktörü MYB38 tarafından kodlanır ve aksiller meristem oluşumunun düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. MYB transkripsiyon faktörleri (TF'ler), çeşitli biyolojik süreçlerdeki önemli rolleri ile bilinen, bitkilerde önemli bir gen ailesidir. Bu süreçler arasında bitki büyümesi ve gelişimi, hücre morfolojisinin düzenlenmesi ve model oluşumu, fizyolojik aktivite ve metabolizmanın modülasyonu, birincil ve ikincil metabolik reaksiyonların kontrolü ve çevresel streslere verilen tepkiler yer alır. Bu sınıfa ait anahtar genin ifade seviyesi P25×F25'te önemli ölçüde yüksek bulunurken (1.34 kat); P40×F40'ta daha düşük seviyede kalmıştır (0.88 kat) (Şekil 4.27).

FxaYL_131g0788120 Ubikuitin ile ilişkili (UBA) proteinler, ubikuitin ile etkileşime giren ve proteazomal bozunma gibi ubikuitin aracılı süreçlere katılan bir protein grubudur. Bu gen, lipid biyosentetik sürecinin yukarı akışında hareket eder ve

moleküler işlevini yerine getirdiği hücrede yerleşir. Çiçeklenme, taç yaprak farklılaşması ve genişlemesi, vasküler yaprak yaşlanması gibi çeşitli gelişim aşamalarında ifade sergiler. İlgili gen P40×F40'ta önemli ölçüde artan bir ifade gösterirken (3.39 kat); P25×F25'te düşük düzeyde ifade göstermiştir (3.05 kat) (Şekil 4.27).

LOC101313245 geni, *Fragaria vesca* subsp. *vesca* 15.7kDa HSP peroksizomal ailesinin bir üyesidir. Bu tez çalışmasında bu genin ifadesi P25×F25'te 0.63 kat artış gösterirken; P40×F40'ta sadece 0.35 kat artış göstermiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 Çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresine bağlı qRT-PCR aracılığı ile belirlenen gen ifade sonuçları

LOC101304168 geni *Fragaria vesca* subsp. *vesca* 18.1 kDa sınıfı HSP peroksizomal ailesine aittir. Bu aile stres tepkisi, protein katlanması ve bozunması

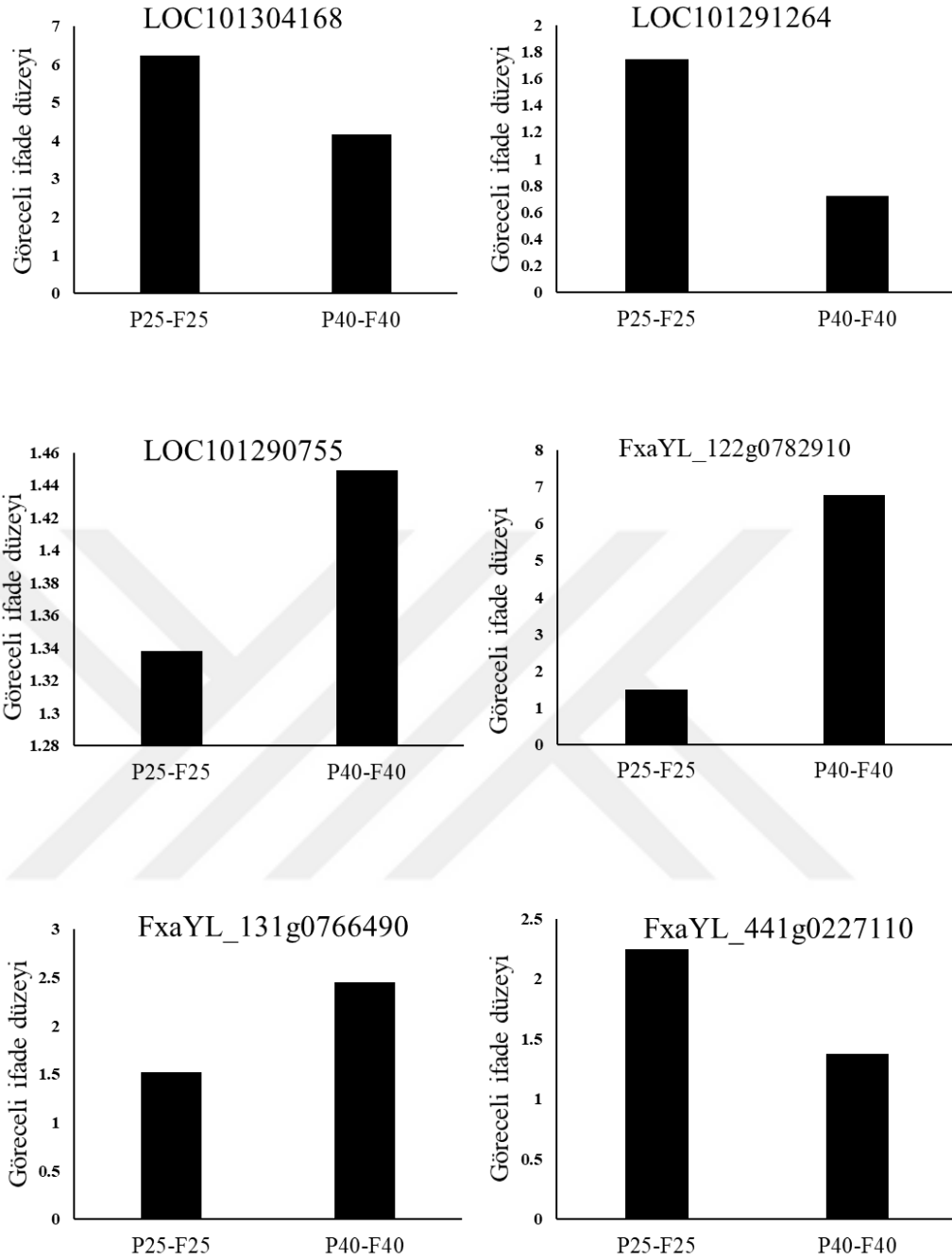
gibi çeşitli hücrel süreçlerde yer alan proteinleri içerir. Bu gen lipid metabolizması ve detoksifikasyon gibi metabolik süreçlerden sorumlu organeller olan peroksizomlara lokalize olan bir HSP'yi kodlar. Bu gen P25×F25'te (6.23 kat); P40×F40'a (4.15kat) göre daha yüksek düzeyde ifade olmuştur (Şekil 4.28).

LOC101291264 geni, *Fragaria vesca* subsp. *vesca*'nın bir üyesidir. Vesca sınıf 1 HSP benzeri bir ailedir ve orman çileği *Fragaria vesca*'da bir ısı şoku transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu gen, sıcak, soğuk ve kuraklık gibi çeşitli abiyotik streslere yanıt olarak ifade edilir. Araştırmamızda bu genin ifadesinin P25×F25'te önemli ölçüde yüksek (1.74 kat); P40×F40'ta ise daha düşük (0.71 kat) olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.28).

LOC101290755 geni, *Fragaria vesca* subsp. *vesca* yüksek sıcaklık stresi transkripsiyon proteini A-1 benzeri transkript varyant 2'nin bir üyesidir. Bu gen P40×F40'ta yüksek seviyede ifade gösterirken, P25×F25'te ifadesi oldukça düşük seviyede kalmıştır (Şekil 4.28).

FxaYL_122g0782910 geni, Homeobox-lösin fermuar proteini TF'nin bir üyesidir. Homeodomain-lösin fermuar (HD-Zip) proteinleri, bitkilere özgü bir transkripsiyon faktörleri sınıfıdır. Bu proteinler, embriyo şekillenmesi, kök gelişimi, yaprak morfolojisi ve çevresel uyaranlara tepkiler olmak üzere bitki büyüme ve gelişiminin çeşitli yönlerini düzenlemede önemli roller oynar. Bu genin ifadesi P40×F40'ta önemli derecede artış göstermiş, P25×F25'te ise düşük düzeyde olmuştur (Şekil 4.28).

FxaYL_131g0766490 ve FxaYL_441g0227110 genleri, ubiquitin protein ligaz aktivitesinin bir üyesidir. Ubikuitin protein ligaz aktivitesi, ubiquitinasyon sürecinde E3 ubiquitin ligazlarının enzimatik işlevini ifade eder. Protein bozunması, DNA onarımı, hücre sinyalizasyonu gibi çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde kritik roller oynarlar. P40×F40'ta FxaYL_131g0766490'in ifadesi önemli ölçüde artarken; FxaYL_441g0227110'nin ifadesi azalmıştır (Şekil 4.28).

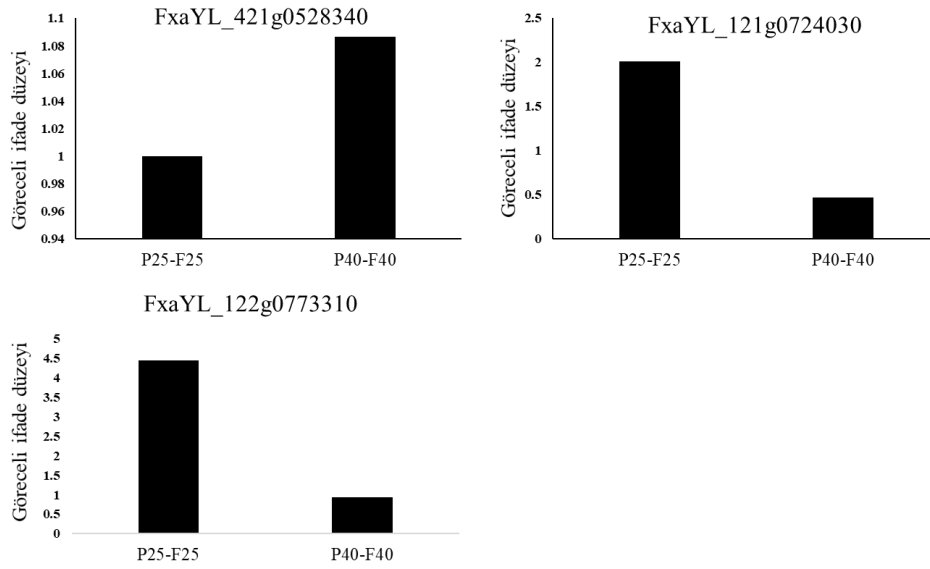


Şekil 4.28 Çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresine bağlı qRT-PCR aracılığı ile belirlenen gen ifade sonuçları

FxaYL_421g0528340 geni, Elek elemanı oklüzyonu, C-terminali/floem gelişiminde önemli bir rol oynar. Bu genin ifadesi P40×F40'ta 1.08 kat artış gösterirken, P25×F25'te 1 kat artış göstermiştir.

FxaYL_121g0724030 geni, E3 ligazın bir üyesi, CCCH tipi çinko parmak/RNA bağlayıcı protein ZFP36 benzeridir. İfade düzeyleri P25×F25'te anlamlı olarak daha yüksek, P40×F40'ta ise düşük olarak belirlenmiştir (Şekil 4.29).

FxaYL_122g0773310 geni, Çinko parmağın, RING / FYVE / PHD tipinin bir üyesidir ve bitkilerin abiyotik stres toleransında önemli bir role sahiptir. Çalışmada bu genin ifade düzeyinin P25×F25'te oldukça yüksek olduğu; buna karşın P40×F40'ta oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 Çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresine bağlı qRT-PCR aracılığı ile belirlenen gen ifade sonuçları

5. TARTIŞMA

5.1. Yaprak yüzey sıcaklığı

Denemede, yüksek sıcaklığın yaprak yüzey sıcaklığı üzerine etkisi önemli bulunmuştur. Çeşitler ve yüksek sıcaklık $\times$ çeşit etkileşimi yaprak yüzey sıcaklıklarını etkilememiştir. Yüksek sıcaklık stresi altındaki çilek bitkilerinde yaprak yüzey sıcaklığı önemli ölçüde yüksek olmuştur. Sıcaklığın kademeli olarak 25°C'den 45°C'ye çıkmasıyla yaprak yüzey sıcaklıkları da 24.00°C'den 38.90°C'ye yükselmiştir (Tablo 4.1). Yaprak yüzey sıcaklığı kontrole göre (25°C) 30 ve 35°C'de sırasıyla yaklaşık %12 ve %29 oranında artarken, 40 ve 45°C'de sırasıyla %47 ve %62 oranında artmıştır. Böylece 35°C'den sonra yaprak yüzey sıcaklığında daha büyük bir artış olmuştur (Tablo 4.1, Şekil 4.1). Aynı sıcaklıkta, çeşitler benzer yaprak yüzey sıcaklıklarına sahip olmuşlardır (Şekil 4.1).

Yaprak yüzey sıcaklığı, bitkilerin yüksek sıcaklık stresine tepkisini anlamada önemli bir rol oynar. Bitkilerde yaprak yüzey sıcaklığının yüksek sıcaklık stresine tepkisi, hasarı en aza indirmeyi ve hücrel işlevi sürdürmeyi amaçlayan çeşitli mekanizmaları içeren karmaşık bir fizyolojik süreçtir. Yüksek yaprak yüzey sıcaklıkları fotosentezi olumsuz etkileyebilir. Sıcaklıklar belirli eşiklerin üzerine çıktığında, bitkiler transpirasyon yoluyla daha hızlı su kaybetme eğiliminde olurlar ve fotosentezde yer alan enzimler daha az verimli hale gelebilirler, bu da karbon asimilasyonu ve verimliliğin azalmasına neden olabilir. Yüksek yaprak yüzey sıcaklıkları besin alımı, su taşınması ve hormon sinyali gibi çeşitli fizyolojik süreçleri bozarak büyümenin azalmasına ve potansiyel verim kaybına neden olabilir. Yaprak sıcaklığı, yaprağa özgü özellikler ve fizyolojik süreçler nedeniyle genellikle hava sıcaklığından sapar (Savvides vd., 2016). Artan yaprak yüzey sıcaklığı, bitkilerde yüksek sıcaklık stresinin bir göstergesi olarak işlev görebilir. Savvides vd. (2016) domates bitkilerinin yaprak yüzey sıcaklığının, yüksek sıcaklık stresine yanıt olarak önemli ölçüde arttığını, artışın derecesinin stresin şiddetine ve süresine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Yaprak yüzey sıcaklığındaki artışın, fotosentetik verimlilikte bir azalma ve oksidatif strese bir artış ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Wahid vd. (2007), yüksek sıcaklık stresine maruz kalan buğday bitkilerinde yaprak yüzey sıcaklığının önemli ölçüde arttığını, bunun da fotosentetik verimlilikte bir azalmaya ve oksidatif strese bir artışa yol açtığını bulmuştur. Benzer şekilde Blum (2009) abiyotik stres koşullarında kanopi sıcaklığında bir artış

meydana geldiğini ve bu artışın verim ile negatif ilişkili olduğunu bildirmiştir. Klamkowski ve Treder (2008) da çilek bitkilerinin yaprak sıcaklığının abiyotik stres koşulları altında önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, yaprak yüzey sıcaklığının, yüksek sıcaklık stresinin bitkiler üzerindeki etkilerini değerlendirmede yararlı bir araç olabileceğini düşündürmektedir. Denemeden elde ettiğimiz sonuçlar, yüksek sıcaklık stresine bağlı olarak yaprak yüzey sıcaklığının arttığını bildiren literatürle uyum içerisindedir.

5.2. Yaprak oransal su içeriği

Yaprak oransal su içeriği üzerine yüksek sıcaklık uygulamaları, çeşitler ve yüksek sıcaklık $\times$ çeşit interaksiyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 4.2). Yüksek sıcaklık uygulamalarının oransal su içeriği üzerindeki etkisine baktığımızda, sıcaklık 25°C'den (kontrol) 30°C'ye yükseldiğinde oransal su içeriği %1.72 oranında hafif bir artış göstermiştir. Sıcaklığın 25°C'den (kontrol) 30°C'ye yükselmesi, daha hızlı transpirasyona, yaprak hücrelerinin ozmotik potansiyelinin artmasına ve böylece bitkinin köklerden su alımının artmasına yol açmış olabilir. 30°C yüksek sıcaklık uygulamasında yaprak yüzey sıcaklığının yaklaşık 27°C olduğu görülmektedir (Tablo 4.1), ki bu sıcaklık çilek için bildirilen ideal yetiştirme sıcaklıklarına (18-26 °C) (Strik, 1985) oldukça yakındır. Bu nedenle, 30°C sıcaklık uygulamasında görülen yaprak oransal su içeriğindeki artışa dayanarak, 30°C civarındaki sıcaklıkların özellikle çok uzun süreli olmayan stres koşullarında, çilek bitkilerinin büyümesinde önemli bir strese neden olmayabileceği söylenebilir. Sıcaklığın 35°C'den 45°C'ye yükselmesi, oransal su içeriğinde önemli bir düşüşe neden olmuş; 35°C'de yaklaşık %3, 40°C'de %2 ve 45°C'de %16 oranında azalma meydana gelmiştir. Gulen ve Eris (2003), 'Camarosa' çilek çeşidinde yüksek sıcaklık uygulamaları ile yaprak oransal su içeriğinin önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, sıcaklık stresinin 30°C'den 50°C'ye yükselmesiyle çileğin oransal su içeriğinde %84.13'ten %47.10'a bir azalma olduğunu gözlemleyen Kesici (2009)'nin bulguları ile uyumludur. Wassie vd. (2019) de yüksek sıcaklık stresinde (38/35°C) yonca çeşitlerinin yaprak oransal su içeriğinde kontrole (25°C) göre bir azalma gözlemlemiştir.

Denemede incelenen çeşitlerin 25°C ve 30°C'deki oransal su içerikleri %88 veya biraz daha yüksek olmuş, her iki sıcaklıkta da çeşitlerin oransal su içerikleri arasında genel olarak bariz farklılıklar olmamıştır. Ancak 30°C'den sonra, 40°C'ye kadar artan sıcaklık ile çeşitlerin oransal su içeriğinde hafif bir azalma, 45°C'de ise

oldukça belirgin bir azalma meydana gelmiştir. 45°C sıcaklıkta oransal su içeriğindeki en dikkat çekici düşüş ‘Jive’, ‘Fronteras’, ‘Alba’ ve ‘Roxana’da meydana gelmiş; ‘Portola’, ‘Osmanlı’, ‘Splendor’ ve ‘Sweet Ann’ ise daha yüksek oransal su içeriğine sahip olmuşlardır (Şekil 4.2). Bu sonuçlar farklı çeşitler arasında oransal su içeriği bakımından önemli değişiklikler için eşik sıcaklık olarak 45°C’ye işaret etmektedir (Şekil 4.2). Isıya duyarlı çeşitlerde oransal su içeriğindeki daha yüksek azalma, büyüme ve verimliliği azaltan solma ve dehidrasyona karşı duyarlılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Buna karşılık, ısıya dayanıklı çeşitlerdeki daha yüksek yaprak oransal su içeriği, bu çeşitlerin 45°C’de daha düşük transpirasyon yapmalarından kaynaklanıyor olabilir. Bu da toprak neminden bağımsız olarak, su talebinin maksimum olduğu zamanda daha iyi bir su durumunun korunmasına katkıda bulunuyor olabilir (Rodríguez, 2013).

Çalışmada, çilek çeşitlerinden ‘Portola’ın en yüksek ve ‘Tillamook’un en düşük yaprak oransal su içeriğine sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu bulgular, Tablo 4.7’de tartılı derecelendirme metodu ile ‘Portola’yı yüksek sıcaklığa tolerant ve ‘Tillamook’u hassas bir çeşit olarak belirlediğimiz sonuçlarla doğrulanmaktadır. Ayrıca denemede düşük oransal su içeriğine sahip olan ‘Sabrina’, ‘Roxana’, ‘Jive’, ‘Fronteras’, ‘Festival’ ve ‘Alba’ (%79.80-83.28) çeşitlerinin genellikle yüksek sıcaklığa duyarlı grupta yer alması (Tablo 4.10), oransal su içeriğinin çileklerde yüksek sıcaklık toleransının belirlenmesinde önemli bir kriter olduğunu göstermektedir. Yaprak oransal su içeriği buğday (Hameed vd., 2012) ve çeltik (Fahad vd, 2016) türlerinde yüksek sıcaklık stresine duyarlılığın bir göstergesi olarak önerilmiştir. ‘Portola’da daha yüksek oransal su içeriğinin korunması, hücre duvarı elastikiyeti ve ozmotik düzenlemedeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Çilekte (Kesici, 2009) ve yonca’da (Sita vd, 2017) ısıya dayanıklı çeşitlerin, hassas çeşitlere kıyasla yüksek oransal su içeriğini koruduğu ileri sürülmüştür. Kumar vd. (2005) ısıya duyarlı çeşitlerin toprak suyunu tüketmeye devam ettiğini ve bu nedenle ısıya dayanıklı çeşitlere kıyasla oransal su içeriğinde daha büyük bir kayıp gösterdiklerini bildirmektedir.

Bitkilerin su içeriği, sıcaklık dalgalanmalarına tepkilerinde çok önemli bir kriterdir. Tipik olarak bitkiler normal büyüme gerçekleştirmek için dengeli bir doku su durumunu devam ettirmeye çalışırlar. Bununla birlikte, yüksek sıcaklıklar genellikle transpirasyonun artmasına neden olarak yaprak oransal su içeriğinde azalmaya ve turgor kaybına yol açar (Cansev, 2012; Demirel vd., 2020). Su

mevcudiyetindeki azalma, hücresel sinyal iletimini tetikleyerek stres tepki mekanizmasının bir parçası olarak bir dizi geni aktive eder (González ve González-Vilar, 2001). Else ve Atkinson (2010), artan sıcaklıkların buharlaşmanın artmasına, bitki terleme oranının yükselmesine ve özellikle çilek gibi yumuşak meyvelerde ürün su kullanımının artmasına katkıda bulunduğunu belirtmektedir. Bu nedenle, yaprak oransal su içeriği ve turgor kaybının değerlendirilmesinin, bir bitkinin su dengesini anlamak için değerli göstergeler olduğu bildirilmektedir. Bunlardan ilki bitkinin tam doyumluk seviyesine ulaşması için gerekli olan mutlak su içeriğini, diğeri kaybedilen su miktarını ifade eder (Qariani vd., 2000).

5.3. Membran stabilite indeksi

Yüksek sıcaklığın teşvik ettiği hücre membran sızıntısı nedeniyle oluşan elektrolit difüzyonunun ölçülmesi yoluyla termal membran stabilitesinin değerlendirilmesi, genotiplerin yüksek sıcaklıklara toleransını değerlendirmek için çok önemli bir ölçüttür. Stres altında hücresel zarların işlevselliğini korumak, fotosentez ve solunum gibi temel süreçler için gereklidir (Blum, 1988). Yüksek sıcaklık stresi, zarlar boyunca kinetik enerjiyi ve moleküler hareketi yükselterek biyolojik zar molekülleri içindeki kimyasal bağların gevşemesine neden olur. Bu, ya protein denatürasyonu veya doymamış yağ asitlerinde bir artma yoluyla çift lipid tabakasının akışkanlığın artmasına neden olur (Savchenko vd., 2002). Membran protein yapısındaki bu tür modifikasyonlar, membran geçirgenliğini ve elektrolit kaybını artırır. Termal membran stabilitesinin azaldığını gösteren çözünür madde sızıntısında gözlenen artış soya fasulyesi (Martineau vd., 1979), patates ve domates (Chen vd., 1982), buğday (Blum vd., 2001), pamuk (Ashraf vd., 1994), sorgum (Marcum, 1998), börülce (İsmail ve Hall, 1999) ve arpa (Wahid ve Shabbir, 2005) gibi çeşitli bitki türlerinde yüksek sıcaklık stresine toleransın bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Sıcaklık uygulamaları, çeşitler ve sıcaklık $\times$ çeşit etkileşimi, çilek yapraklarının membran stabilite indeksini önemli ölçüde etkilemiştir (Tablo 4.3). Yüksek sıcaklık stresi altındaki bitkilerde kontrol bitkilerine göre, membran stabilite indeksinde 30 °C'de %13.67, 35 °C'de %28.65, 40°C'de %58.83 ve 45°C'de %34.59 oranında azalma gözlemlenmiştir. Yüksek sıcaklık stresinin hücre zarına zarar verdiği, böylece çeltik (Wahid vd., 2007) ve buğday (Hasanuzzaman vd., 2013) bitkilerinde elektrolit sızıntısı içeriğinde artışa yol açtığı bulunmuştur.

Herbir sıcaklık derecesinde çeşitlerin membran stabilite indeksi, sıcaklık uygulamalarından önemli ölçüde etkilenmiştir. Membran stabilite indeksinde tüm çeşitlerde 30°C’de hafif bir azalma olurken, 40 ve 45°C’lerde önemli ölçüde azalma gözlenmiştir. Çeşitler arasında ‘Portola’, tüm sıcaklıklarda kararlı olarak yüksek membran stabilite indeksini korumuş, bu da yüksek sıcaklık stresi altında bu çeşidin hücrel işlevlerini sürdürdüğü ve güçlü bir tolerans gösterdiğine işaret etmiştir. ‘Portola’ya ek olarak, ‘Monterey’, ‘San Andreas’ ve ‘Sweet Ann’ gibi nötr gün çeşitler 35, 40 ve 45°C yüksek sıcaklıklarda diğer çeşitlerden sürekli olarak daha yüksek membran stabilite indeksine sahip olmuşlardır (Şekil 4.3). Amiga çeşidi ise her sıcaklık derecesinde düşük bir membran stabilite indeksi göstermiş, bu durum çeşidin yüksek sıcaklık stresi koşullarında membran hasarına duyarlı olacağına işaret etmiştir. Bu bulgular, farklı çeşitlerin yüksek sıcaklık stresine karşı toleransında membran stabilitesinin belirgin rolünü vurgulamaktadır.

Çilek çeşitlerinin membran stabilite indeksi %20.81 (‘Portola’) ile %13.38 (‘Amiga’) aralığında bulunmuştur. Membran stabilitesi, farklı çilek çeşitleri arasında önemli ölçüde değişmiştir, en yüksek membran stabilite indeksi ‘Portola’da ve en düşük membran stabilite indeksi ‘Amiga’da görülmüştür. Bu bulgular, dayanıklı çeşit grubunda ‘Portola’yı ve hassas çeşit grubunda ‘Amiga’yı işaret eden Tablo 4.7 ile desteklenmektedir. Prasad vd. (2015) yüksek sıcaklık stresine maruz kalan buğday genotiplerinin membran stabilite indeksinde bir azalma gözlemlemiştir. Yüksek sığa tolerant çeşitlerin, membran lipidlerinde daha yüksek oranda doymuş yağ asidi birikmesi nedeniyle yüksek bir membran stabilite indeksini korudukları; bu çeşitlerde yüksek sıcaklık stresi altında HSP’lerin oluşumunun lipid peroksidasyonunu azaltarak ve membran akışkanlığını koruyarak membran stabilitesine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Zhang vd., 2005).

5.4. Toplam klorofil içeriği

Yüksek sıcaklıklar, klorofil biyosentezinin iki öncü molekülü, 5-aminolevulinik asit ve protoklorofilitin sentezinden sorumlu enzimlerin inhibisyonuna neden olur (Havaux, 1998). Yüksek sıcaklıklar, öncelikle klorofil biyosentezinin inhibisyonuna atfedilen fotosentetik aktivitede bir azalmaya yol açar. Ayrıca yüksek sıcaklıkların pigmentler ve diğer fotosentetik araçlar üzerindeki etkisi, toksik oksijen türlerinin üretilmesiyle daha da kötüleşir ve bu da oksidatif hasara neden olur. Aynı zamanda, antioksidatif savunma mekanizmalarının etkinliğinde de bir azalma olur.

Toplam klorofil içeriği, kontrol bitkileri ve 30°C'ye maruz kalan bitkilerde benzer ve en yüksek bulunmuştur. 30°C yüksek sıcaklık uygulamasından sonra, çilek bitkilerinin klorofil içeriği azalmıştır. 35, 40 ve 45°C yüksek sıcaklık uygulamaları arasında klorofil içeriği açısından farklılık olmamıştır (Tablo 4.4). Benzer şekilde Chaitanya vd. (2001) dut bitkilerinde ve Sangwan vd. (2018) ekmeklik buğday hatlarında yüksek sıcaklıklarda klorofil içeriğinde azalma tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların aksine, Gulen vd. (2003) 'Camarosa' çeşidinde artan sıcaklıklarla klorofil içeriğinin arttığını bulmuşlardır. Farklı bitki türleri üzerinde yapılan çalışmalarda, klorofil içeriği ile yüksek sıcaklıklara tolerans arasındaki ilişkiler belirlenmiştir. Buğday (Hasanuzzaman vd., 2013; Fu vd., 2022) ve sorgumda (Gosavi vd.,2014) klorofil içeriğinin korunması, ısıya tolerant çeşitlerde duyarlı çeşitlere göre daha fazla bulunmuştur.

Farklı çeşitlerin klorofil içeriğinde 30°C'de hafif bir artış olmuş ve 30°C'den sonra, artan sıcaklık klorofil içeriğinde kontrol uygulamasına göre 35°C'de %13.85, 40°C'de %18.02, 45°C'de %17.15 oranında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.4). Çeşitlerin klorofil içeriği açısından davranışları her sıcaklık derecesinde değişmiş ve bu konuda tutarlı bir eğilim belirlenememiştir. Ancak daha önceki çalışmalarda Kesici vd. (2013) yüksek sıcaklığa dirençli olduğu tespit edilen 'Redlands Hope'un klorofil içeriğinin nispeten stabil bir davranış izleyerek 40°C'ye kadar fazla değişiklik göstermemesi ve 35°C'den sonra fazla azalmaması dikkat çekmiştir. Buna karşılık, 'Amiga' 30°C'den sonra klorofil içeriğinde önemli bir azalma sergilemiştir. Bu duruma göre klorofil içeriğinin yüksek sığa tolerans ile bağlantılı olabileceği söylenebilir. Nitekim 'Redlands Hope' hem bahsedilen önceki çalışmada hem de bu çalışmada yüksek sığa tolerant olarak tanımlanırken, 'Amiga' çeşidi bu tez çalışmasında duyarlı olarak tanımlanmıştır.

Çeşitler arasında toplam klorofil içerikleri bakımından en yüksek değer 'Redlands Hope' (31.61 µg/ml), en düşük değer ise 'Festival' (25.02 µg/ml) çeşitlerinde belirlenmiştir (Tablo 4.4). 'Festival'in düşük klorofil içeriği, yüksek sığa hassasiyet ile ilişkilendirilebilir. Nitekim 'Festival' çeşidi Tablo 4.7'de gösterildiği gibi bu çalışmada yüksek sığa duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Kesici (2009) de yaptığı çalışmalarda Festival çeşidini yüksek sığa oldukça duyarlı olarak tanımlamıştır.

5.5. Malondialdehit (MDA) içeriği

Malondialdehit, membranlardaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile ilişkilidir ve hücresele bütünlüğün korunmasında çok önemli bir rol oynar. Lipid peroksidasyonu H_2O_2 , süperoksit ve hidroksil radikallerinin neden olduğu oksidatif doku hasarının önemli bir göstergesi olarak hizmet eder. Bu süreç, membranlarda yapısal değişikliklere yol açarak hücresele ve organel içeriklerin salınmasına, esansiyel yağ asitlerinin tükenmesine ve sitozolik aldehit ve peroksit ürünlerinin oluşmasına neden olur. Reaktif oksijen türleri, oldukça aktif peroksi radikallerine yol açarak lipitlerle etkileşime girerler. Membran lipid peroksidasyonunun derecesi MDA seviyesi tarafından belirlenir (Ali vd., 2005). Yüksek sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde gözlemlenen hasar, fotosentezin bozulması ve hücre membranı akışkanlığının değişmesi olarak kendini gösterir (Choudhury vd., 2013).

Denemede MDA içeriği bakımından yüksek sıcaklık uygulamaları arasında önemli bir fark olduğu ortaya konmuştur. Malondialdehit içeriği 25 °C’den (kontrol) 45 °C’ye (25.06-50.64 nmol/g) önemli ölçüde artmıştır (Tablo 4.5). 30-45°C’lik yüksek sıcaklıklarla bitkilerin MDA içeriği, kontrole kıyasla 30°C’de %49, 35°C’de %68.40°C’de %112 ve 45°C’de %101 oranında artış göstermiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, sıcaklığın 30°C’den 50°C’ye yükselmesiyle MDA içeriğinde önemli bir artış (26.95–71.05 nmol/g) gözlemleyen Kesici (2009)’nin bulgularıyla uyumludur. Liu ve Huang (2000)’a göre, yüksek sıcaklık uygulamaları ile *Agrostis palustris* bitkilerinde MDA oluşumunda 2.6 kat artış gözlenmiştir. Ayrıca ayçiçeği (Amutha vd., 2007), eltik (Wahid vd., 2007), buğday (Savicka ve şkute, 2010; Hasanuzzaman vd., 2013) ve *Paeonia ostia* (Hong vd., 2023) türleri üzerinde yapılan çalışmalarda yüksek sıcaklık stresi altında MDA miktarında artış olduğu tespit edilmiştir.

Çeşitlerin MDA içerikleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. İncelenen tüm çeşitlerin MDA içeriği 26.33-54.16 nmol/g arasında değişim göstermiştir (Tablo 4.5). ‘Fronteras’ ve ‘Alba’ en yüksek (54.16 ve 52.30 nmol/g); ‘Osmanlı’ ve ‘Roxana’ en düşük (26.33 ve 30.48 nmol/g) MDA içeriğine sahip çeşitler olmuştur. Yüksek sıcaklığa duyarlı bir çeşit olarak belirlediğimiz ‘Fronteras’ eşidinin yüksek MDA içeriğini dikkate alarak, yüksek MDA içeriğini yüksek sıcağa duyarlılıkla ilişkilendirebiliriz. Nitekim Kesici (2013), ‘Festival’ ve ‘Honeoye’ çeşitlerini yüksek sıcaklık stresine duyarlı olduğunu; bu çeşitlerin MDA

içeriklerinin (sırasıyla 120 ve 110 nmol/g), sıcağa dayanıklı ‘Fern’, ‘Cal-Giant 3’ ve ‘Elsanta’ (50-60 nmol/g) çeşitlerinden daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Yaptığımız denemede ‘Osmanlı’ çeşidi yüksek sıcaklıklara dayanıklı olarak değerlendirilmiştir. Yukarıda belirtilen literatüre benzer şekilde bu çeşidin düşük MDA içeriği, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olduğu yönündeki iddiamızı destekleyebilir. Bununla birlikte, bu çalışmada ulaşılan diğer fizyolojik bulgular da bu çeşidin yüksek sıcaklık toleransını tam olarak desteklememektedir. Elde edilen bulgular ‘Osmanlı’ çeşidi için ilktir, sonuçları destekleyecek bu çeşitle ilgili başka bir çalışma sonucu yoktur.

5.6. Prolin içeriği

Sıcaklık dalgalanmaları, özellikle yüksek sıcaklık stresi, bitki gelişimi üzerinde önemli bir etki yaratarak verim ve kalitede kayıplara yol açar. Yüksek sıcaklık stresi plazma membranına zarar verir, nükleik asit yapısını bozar, protein sentezini engeller ve mitokondri ve kloroplastların aktivitelerini bozarak ROS’ların üretimine ve oksidatif strese yol açar (Raza vd., 2021). Prolin, bitki hücrelerini yüksek sıcaklık stresinin neden olduğu hasara karşı korumada çok önemli bir işlev üstlenir. Ozmoprotektan görevi görür, hücre turgorunu korur ve su kaybını önler, membranlar ve proteinler gibi hücresel yapıları stabilize eder, serbest radikalleri temizler ve stresli koşullar altında hücresel redoks potansiyelini tamponlar (Srinivas ve Balasubramanian, 1995).

Çilek yapraklarının prolin içeriği, sıcaklık uygulamalarından önemli ölçüde etkilenebilir. (Tablo 4.6). En yüksek prolin içeriği değeri (31.55- 32.87 µg/g) 35-45°C’lik yüksek sıcaklıklarda; en düşük prolin içeriği değeri (24.61µg/g) kontrol (25°C) uygulamasında belirlenmiştir. Prolin içeriği genel olarak 25°C’den itibaren sıcaklık artışına paralel olarak artmış, bu artış 30°C’de %13.37, 35°C’de %28.20, 40°C’de %33.56 ve 45°C’de % 29.46 oranında gerçekleşmiştir.

Tüm çeşitlerin prolin içeriği her sıcaklık seviyesinde farklılık göstermiştir (Şekil 4.6). Bu da farklı çeşitlerin yüksek sıcaklık stresine karşı farklı tepki mekanizmalarına sahip olduğunu ifade edebilir. Tüm çeşitler genellikle, yüksek sıcaklık stres toleransı için prolinin adaptif mekanizmasını işaret edecek şekilde, artan sıcaklıkla prolin birikiminde bir artış göstermiştir. 30°C’den sonra, tüm çeşitlerin prolin içeriği önemli ölçüde artmıştır. Ancak en belirgin prolin artışı 40 °C’de kaydedilmiştir, ki bu da bitkilerin hücresel yapılarını stabilize etmek, ozmotik dengeyi korumak ve ROS’ları temizlemek için bu sıcaklık seviyesinde şiddetli stres

tepkinin geliştirilmesinden kaynaklanıyor olabilir. Bunların tümü bitkinin yüksek sıcaklıklara tolerans yeteneğine katkıda bulunmaktadır.

Prolin içeriği bakımından çeşitler arasındaki farklılık önemli olmamıştır. Genel olarak, incelenen çeşitler arasında 'Portola'daki prolin içeriği daha yüksek olmuştur (Tablo 4.6). Bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde önceki çalışmalarda da, prolin birikiminin yüksek sıcaklık stresine dayanıklı bitkilerde hassas olanlara göre daha yoğun olduğu bildirilmiştir (Chaitanya vd., 2001; Kumar vd., 2011; Naji ve Devaraj, 2011). Çok sayıda bitki türünde stres koşulları altında prolin üretimi, strese tolerans ile bir korelasyon göstermiştir ve konsantrasyonu genellikle strese dayanıklı bitkilerde strese duyarlı olanlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Gosavi vd. (2014), prolin birikiminin, ısıya dayanıklı sorgum çeşitlerinde ısıya duyarlı olanlara kıyasla belirgin şekilde arttığını bulmuşlardır. Ayrıca bezelye (Shahid vd., 2014), domates (Kahlaoui vd., 2018), mercimek (Molla vd., 2014) ve fasulyede (Mahmud vd., 2020) farklı streslere karşı koruyucu olarak prolinin etkisi belgelenmiştir. Ergin vd. (2016), çilek bitkilerinin HSP'leri sentezleye bildiğini ve yüksek sıcaklık stresinin olumsuz etkisini hafifletmek için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar üretebildiğini, böylece yüksek sıcaklığın neden olduğu ısı hasarı ve oksidatif stresle başa çıkabildiğini bildirmişlerdir.

5.7. Çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklığa tolerans/hassasiyetlerinin belirlenmesi

21 çilek çeşidinin yüksek sıcaklığa duyarlılığı, 25°C (kontrol) ve 40°C sıcaklıklara maruz kalan bitkilerin membran stabilite indeksi ve prolin içeriğindeki değişim oranı (%) ve 45°C'ye maruz kalan bitkilerin görünümleri dikkate alınarak "Tartılı Derecelendirme" metoduna göre belirlenmiştir. Çilek çeşitleri yukarıda belirtilen özelliklerinden elde edilen kümülatif puanlarına göre hassas, orta ve tolerant olarak gruplandırılmışlardır. 'Amiga', 'Festival', 'Fronteras', 'Jive', 'Sabrina' ve 'Tillamook' gibi kısa gün çeşitleri en düşük puanlara sahip olmuşlar ve yüksek sıcaklığa hassas çeşitler olarak kategorize edilmişlerdir. 'Alba', 'Asya', 'Favette', 'Fortuna', 'Petaluma', 'Roxana' kısa gün çeşitleri ile 'Redlands Hope' ve 'San Andrea' nötr gün çeşitleri, 200-260 arasında puan alarak yüksek sıcaklıklara orta derecede tolerant çeşitler olarak gruplanmışlardır. 'Osmanlı', 'Calinda', 'Splendor' kısa gün çeşitleri ile 'Albion', 'Monterey', 'Portola' ve 'Sweet Ann' nötr gün çeşitleri 320-380 arasında puan alarak yüksek sıcaklığa tolerant çeşitler olarak gruplanmışlardır (Tablo 4.7). Çeşitlerin yüksek sıcaklıklara duyarlılıklarını, iyon sızıntı testleri ile belirleyen Kesici (2009) 11 çilek çeşidinden 'Elsanta', 'Redlands

Hope' ve 'Camarosa'yı yüksek sıcaklığa tolerant, 'Whitney', 'Fern' ve 'Festival' çeşitlerini duyarlı olarak sınıflandırmıştır. Bu çalışmada kullanılan 'Redlands Hope' ve 'Festival' çeşitleri bu tez çalışmasında ortak olarak kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, 'Festival' benzer şekilde hassas bir çeşit olarak tanımlanırken, 'Redlands Hope' orta derecede tolerant olarak belirlenmiştir. Bu nedenle Kesici (2009)'nin bulguları ile bu çalışmada elde edilen bulgular birbirini desteklemektedir. Denememizde kullandığımız 6 nötr gün çeşidinden 4'ünün tolerant ('Albion', 'Monterey', 'Portola' ve 'Sweet Ann') ve 2'sinin ('Redlands Hope' ve 'San Andreas') orta derecede tolerant olarak belirlenmesi dikkati çekmektedir. Bu durumda, nötr gün çeşitlerin yüksek sıcaklıklara karşı iyi tolerans gösterdikleri söylenebilir. Nitekim Durner vd. (1984) çilekleri yüksek sıcaklığa duyarlılık açısından duyarlıdan dayanıklıya doğru kısa gün, uzun gün ve nötr gün çilekleri olarak gruplandırmıştır. Nötr gün çileklerin yüksek sıcaklık toleransı, 'Portola' üzerinde yaptığımız moleküler çalışmalarla da desteklenmektedir.

5.8. Yüksek sıcaklık stresine farklı ifade olan gen tepkileri

Yüksek sıcaklık, bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde, verimde ciddi kayıplara yol açabilecek şekilde önemli etkilere sahiptir. Biyoteknolojideki gelişmelere rağmen, yüksek sıcaklık stres toleransı için kritik genleri tanımlamak ve toleransın moleküler mekanizmalarını anlamak zorlu bir görev olmaya devam etmektedir.

Araştırmamızda her iki çeşitte ('Fronteras' ve 'Portola') yüksek sıcaklık stresi koşullarında (40°C) çok sayıdaki genin ifade seviyelerinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.18). Yapılan çalışmalarda Avrupa mısır akraba hatlarının (Frey vd., 2015) ve *Medicago falcata*'nın (Miao vd., 2015) transkriptomik profilleri, tuzluluk ve yüksek sıcaklık stresi altında ifadesi artan gen sayılarının (DEG'ler), ifadesi azalan genlerden önemli ölçüde fazla olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, çilekte yüksek sıcaklık stresi altında pek çok genin ifadesinin arttığını ortaya koyan bu tez çalışmasında elde edilen bulgularla benzerdir.

Denemede fotosentezle alakalı FxaYL_131g0769800 geninin ifadesi P40×F40'ta artış göstermiştir (Şekil 4.26). Yüksek sıcaklık stresi altında (40°C) FxaYL_131g0769800'in ifadesinin artması, stres koşullarında glikolitik aktivitenin arttığına işaret etmektedir. Yüksek sıcaklık stresi bitkilerde fotosentezi ve klorofil içeriğini olumsuz yönde etkilemektedir. Yüksek sıcaklık stresi, glikolitik yolu inhibe ederek fotosentez için gerekli olan ATP ve NADH üretimini azaltmaktadır. İnhibe

edilen glikoliz, TCA döngüsünü geciktirir ve TCA döngüsü ara ürünlerine ihtiyaç duyduğundan klorofil biyosentezini etkiler (Allakhverdiev vd., 2008). Yüksek sıcaklık stresi fotosistem II'ye zarar vererek klorofil içeriğini ve fotosentetik verimliliği azaltır (Mathur vd., 2011). Glikolizi ilerleten maddeler, yüksek sıcaklık stresi etkilerini hafifletebilir ve klorofil içeriğini ve fotosentezi koruyabilir (Wang vd., 2016). Yüksek sıcaklık stresi, hücresel süreçlerin dengesini bozarak klorofil içeriğinin ve membran stabilitesinin azalmasına sebebiyet vermektedir (Wahid vd., 2007; Rizhsky vd., 2002; Scafaro vd., 2010; Hasanuzzaman vd., 2013). Birçok çalışma, yüksek sıcaklık stresi altında tolerans arttırıcı bir mekanizma olarak ATP üretimini arttırmak için, glikolizde yer alan genlerin ifadelerinin önemli derecede yükselebileceğini öne sürmüştür. Transkriptomik profillemeye üzerine yapılan çalışmalarda amino asit biyosentezi, şeker metabolizması ve lipid metabolizması ile ilgili metabolik yolların buğdayda (Zhang vd., 2019) yüksek sıcaklık stresi altında önemli ölçüde zenginleştiğini göstermiştir. Dolayısıyla bu sonuçlar FxaYL_131g0769800 geninin artan ifadesinin glikolitik aktivitenin artmasına işaret ettiği yönündeki görüşlemizi desteklemektedir.

Denemede FxaYL_121g0718900 genin ifadesi P40×F40'ta 23.18 kat artarken; P25×F25'te sadece 2.05 kat artmıştır (Şekil 4.26). Yüksek sıcaklık stresi, proteazlar, lipazlar ve karbohidrazlar dahil olmak üzere hidrolaz aktivitesi ile ilgili genlerin ifadesini etkileyebilir. Bu enzimler, proteinlerin, lipidlerin ve karbonhidratların parçalanmasında rol oynar. Yüksek sıcaklık stresi koşulları altında bitkiler, ROS'ların neden olduğu oksidatif hasara karşı koymak için savunma mekanizmalarını harekete geçirir. Bu, hasarlı proteinlerin parçalanmasına yardımcı olan proteazlar gibi hidrolazları kodlayan genlerin ifadesini artırır (Suzuki ve Mittler, 2006). Bu çalışmada elde edilen bulgular, yüksek sıcaklık stresi altında hidrolaz süreciyle ilgili genlerde bir artış olduğunu göstermiştir (Şekil 4.26). Yüksek sıcaklık stresi altındaki bitkilerin transkriptomik profili üzerine yapılan çalışmalar, *Arabidopsis thaliana* (Fragkostefanakis vd., 2015), bitkilerinde proteazlar, lipazlar ve nükleazlar dahil olmak üzere çeşitli hidrolazları kodlayan genlerin ifadesinin arttığını göstermiştir.

Bu tez çalışmasında FxaYL_131g0777570'in ifadesi P25×F25'te 3.20 kat artış gösterirken; P40×F40'ta düşük düzeyde kalmıştır (2.73 kat) (Şekil 4.26). Syntaxin proteinleri, membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olan vezikül taşıma sistemi ve membran füzyonunu düzenler. Syntaxin genleri, membran

süreçlerini düzenleyerek stres koşulları altında membran stabilitesini ve klorofil içeriğini artırır. Bu çalışmada elde edilen bulgular, Syntaxin proteinleri ile ilişkili FxaYL_131g0777570 geninin, yüksek sıcaklık stresi koşulları altında ifadesinin azaldığını göstermiştir (Şekil 4.26). Bu bulgular, Syntaxin ile ilgili genin ifadesinin yüksek sıcaklık stresi altında önemli ölçüde azaldığını, bunun da klorofil içeriği ve membran stabilite indeksinde azalmaya yol açtığını bildiren bulgularla (Liu vd., 2013) tutarlıdır. Sonuç olarak Syntaxin ile ilgili genin, yüksek sıcaklık stresi altında klorofil içeriği ve membran stabilite indeksinin düzenlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülebilir.

Yüksek sıcaklık stresi altında çilekte FxaYL_121g0725330 genin ifadesi önemli düzeyde artış göstermiştir (Şekil 4.26). Oxoglu/Fe-dep_dioxygenase genleri, flavonoid biyosentezinde yer alan enzimleri kodlayan ve abiyotik streslere karşı bitki tepkilerini düzenleyen edinilmiş termotolerans seviyesini gösterir (Falcone vd., 2012; Wang vd., 2007). Flavonoidler, reaktif oksijen türlerini temizleyerek stres koşulları altında membran stabilitesinin korunmasına yardımcı olur (Agati vd., 2012). Oxoglu/Fe-dep_dioxygenas'lar, bitkinin strese karşı adaptif tepkilerine aracılık eden hücrel oksijen sensörleri olarak işlev görür (Wilson vd., 2008). Özetle, Oxoglu/Fe-dep_dioxygenase genleri flavonoid üretimini ve redoks homeostazını düzenler, böylece stres altında membran stabilitesini ve klorofil içeriğini etkiler.

Bu tez çalışmasında FxaYL_341g0272830'ın ifadesi P40×F40'ta 1.99 kat artarken, P25×F25'te düşük düzeyde ifade göstermiştir (0.44 kat) (Şekil 4.26). Küçük ısı şoku proteinleri (sHSP'ler), yüksek sıcaklık stresi altında proteinleri korumaya yardımcı olan moleküler şaperonlardır (Sun vd., 2002). Küçük ısı şok protein (sHSP) genlerinin, yüksek sıcaklık stresine yanıt olarak transkripsiyonel düzeyde artış gösterdiğini ortaya koyan bulgular (Sarkar vd., 2009; Waters vd., 1996) ile sHSP ile ilişkili genlerin yüksek sıcaklık stresinde ifadesinin arttığı yönündeki bu tez çalışmasında elde edilen bulguları doğrulamaktadır. sHSP genlerinin aşırı ifadesi, transgenik bitkilerde termotoleransı artırdığı belirtilmiştir (Wang vd., 2003). Lin vd. (2011), Swindell vd. (2007), yüksek sıcaklık stresi koşulları altında sHSP de dahil olmak üzere genlerin ekspresyon modellerini araştırmış, sHSP'lerin yüksek sıcaklık stresi sırasında proteinleri korumada ve hücrel homeostazı sürdürmedeki rolüne dair kanıtlar elde etmişlerdir.

FxaYL_642g0168640 gen ifadesinin P25×F25'te artış gösterdiği, P40×F40'ta ise çok düşük düzeyde kaldığı bulunmuştur (Şekil 4.26). Osmotinler ve thaumatin

benzeri proteinler, bitkilerde ozmotik stres toleransının düzenlenmesinde rol oynar. Yüksek sıcaklıkta, su kaybı hızlanır, bu yüzden ozmotik ayarlamaların önemi azalır ve hücreler sıcaktan koruma mekanizmalarına odaklandığından bazı osmotin genlerinin baskılanmasına izin verilir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde, Zhang vd. (2016), bir çalışmada, ön işlem ısı şoku uygulaması, bitkilerde osmotin ve ısı şoku proteinlerini biriktirerek çimlenen buğday (*Triticum aestivum*) tohumlarında termo-toleransı indüklemiştir. Tatlı patates türlerinde (Li vd., 2018a) osmotin ve thaumatin benzeri proteinlerle ilişkili genlerin kuraklık stresi koşulları altında yukarı doğru düzenlendiği belirlenmiştir.

FxaYL_121g0724030 (Şekil 4.27) ve FxaYL_122g0773310 (Şekil 4.29) genleri P25×F25'te P40×F40'a kıyasla önemli ölçüde yüksek ifade göstermiştir. Yani kontrol koşullarına kıyasla, yüksek sıcaklık stresi altında E3 ligaz ve CCCH tipi çinko parmak proteinlerini kodlayan genlerin aktiviteleri düşük seviyede kalmıştır. Stres altında hasarlı proteinlerin birikmesiyle E3 ubiquitin ligazları ve CCCH parmakları aktive olur (Han vd., 2022). Ancak uzun süreli şiddetli sıcaklık proteasom, translasyon ve transkripsiyon makinelerini bozabilir. Bu da protein kalite kontrolü ve yıkım işlevlerinin zayıflamasına yol açar (Ding vd., 2020). Ayrıca aşırı sıcaklık şokuna yanıtta görevli transkripsiyon faktörleri ve sinyal proteinleri de fonksiyonunu yitirir. Sonuç olarak, kontrole kıyasla yüksek ısı stresi koşullarında hücresel homeostazın ciddi bozulması, bu genlerin baskılanmasına neden olabilir.

Bu tez çalışmasında FxaYL_642g0168640 genin ifadesi P40×F40'ta artış sergilerken (2.29 kat); P25×F25'te daha düşük düzeyde ifade göstermiştir (1.57 kat) (Şekil 4.27). Osmotin/taumatin benzeri süper aile, ozmotik dengeyi düzenleyerek, protein hasarını önleyerek ve antioksidan savunma mekanizmalarını geliştirerek bitkilerin yüksek sıcaklık stresine dayanmasına yardımcı olan bir protein grubudur. Bu proteinler, protein katlanmasına yardımcı olan ve yüksek sıcaklık stresi koşulları altında denatüre proteinlerin toplanmasını önleyen şaperon benzeri aktiviteye sahiptir. Osmotin/taumatin benzeri süper aile genlerinin ekspresyonu, HSF ailesi, AP2/ERF ailesi ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu gibi spesifik sinyal yollarının ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla yüksek sıcaklık stresi koşulları altında düzenlenebilir. Bu proteinler ayrıca reaktif oksijen türleri (ROS) ve absisik asit (ABA) gibi diğer sinyal molekülleri ile etkileşime girebilir ve bu da bitkinin yüksek sıcaklık stresine dayanma yeteneğini artırır (Kumar vd., 2015; Mishra vd., 2016; Zhu, 2016;.

Almadanim vd., 2017). Zhang vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, 48 saat boyunca yüksek sıcaklığa maruz kalan domates bitkilerinde taumatin geninin ifadesinin 3 kat arttığı bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında FxaYL_112g0706430 genin ifadesi P25×F25'te önemli ölçüde yüksek düzeyde ifade gösterirken, P40×F40'ta oldukça düşük seviyede ifade sergilemiştir (Şekil 4.27). Yüksek sıcaklık stresi altında bu genin aşağı regülasyonu, mRNA transkriptlerinin ve proteinlerinin stabilitesi üzerindeki etkiden kaynaklanıyor olabilir. Osmotin ve taumatin proteinleri yüksek sıcaklık stresi altında daha az stabil olabilir, bu da hızlı bozulmalarına ve birikimlerinin azalmasına yol açabilir. Osmotin ve taumatin genlerinin ifadesi çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. Yüksek sıcaklık stresi, bu transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini etkileyerek osmotin ve taumatin genlerinin transkripsiyonunda bir azalmaya yol açabilir. Yüksek sıcaklıklar, osmotin ve taumatin proteinlerinin translasyon sonrası modifikasyonlarını indükleyerek aktivitelerini veya stabiliteilerini değiştirebilir. Bu modifikasyonlar, bu proteinlerin işlevini veya lokalizasyonunu etkileyerek yüksek sıcaklık stresi altında etkinliklerinin azalmasına yol açabilir (Priya vd.,2019; Li vd.,2017).

MYB sınıfına ait anahtar FxaYL_131g0783880 genin ifade seviyesi P25×F25'te önemli ölçüde yüksek bulunurken (1.34 kat); P40×F40'ta düşük seviyede kalmıştır (0.88 kat) (Şekil 4.27). MYB ve lipoksijenaz genlerinin yüksek sıcaklık stresi altında ifadesinin azaldığı; edinilmiş termotoleransın indüksiyonu sırasında ısı şoku faktörleri, HSP'ler, stresle ilişkili proteinler, ROS'ları süpürme ve yağ asidi metabolizması ile ilişkili genlerde önemli bir yukarı regülasyon gözlemlendiği belirtilmiştir (Vidya vd., 2018). Bu tez çalışmasında yüksek sıcaklıkta FxaYL_131g0783880 geninin ifadesindeki azalış, SANT/Myb alanı içeren genlerin HSP'lerin düzenlenmesinde rol oynamasından kaynaklanabilir. HSP'ler, yüksek sıcaklık gibi stres koşullarına yanıt olarak üretilen proteinlerdir ve hücreleri hasardan korumaya yardımcı olurlar. SANT/Myb alanı içeren genlerin aşağı regülasyonu, HSP üretiminde bir azalmaya yol açabilir ve bu da hücreleri yüksek sıcaklık stresinden kaynaklanan hasara karşı daha duyarlı hale getirebilir (Sangster ve Queitsch, 2005). Apoptoz, stres koşullarına yanıt olarak tetiklenen bir programlanmış hücre ölümü şeklindedir. SANT/Myb alanı içeren genlerin aşağı regülasyonu apoptozda bir artışa yol açabilir ve bu da yüksek sıcaklık stresine yanıt olarak gözlenen hücre ölümüne katkıda bulunabilir (Li ve Dewey, 2011).

FxaYL_131g0788120 Ubikuitin ile ilişkili (UBA) proteinler, P40×F40'ta önemli ölçüde artan bir ifade gösterirken (3.39 kat); P25×F25'te düşük düzeyde ifade göstermiştir (3.05 kat) (Şekil 4.27). Ubikitinasyon ve UBA proteinlerinin hücrel iyileşme, proteazom aktivasyonu, termotolerans düzenlemesi ve ısı stresine yanıt olarak önemli rol oynarlar. Morimoto ve Santoro (1998), ubikitinasyonun, yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olarak ısı stresi koşullarında hücrel iyileşmeye katkıda bulunduğunu bildirmiştir.

Bu tez çalışmasında LOC101313245 (Şekil 4.27), LOC101304168 (Şekil 4.28), LOC101291264 (Şekil 4.28) genlerinin ifadesi P25×F25'te artış gösterirken; P40×F40'ta düşük düzeyde kalmıştır. Isı şok proteini ile ilgili genlerin aşağı regülasyonu, yüksek sıcaklık stresinin protein bozunma oranını artırmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu, HSP'lerin ifade seviyelerinin korunmasında rol oynayan düzenleyici proteinlerin azalmasını ifade eder (Feder ve Hofmann,1999).

LOC101290755 geni, P40×F40'ta yüksek seviyede ifade gösterirken, P25×F25'te ifadesi oldukça düşük seviyede kalmıştır (Şekil 4.28). Isı şokuna yanıt olarak HSP'lerin yukarı regülasyonunun koruyucu bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Isı şoku proteinleri protein homeostazının korunmasına yardımcı olur ve hücre ölümüne yol açabilecek protein agregasyonunu önler (Kumar vd., 2022 vd.,1993). Isı şokuna yanıt olarak HSP'lerin yukarı regülasyonuna, ısı şoku faktörü 1 (HSF1) de dahil olmak üzere bir dizi transkripsiyon faktörünün aracılık ettiği düşünülmektedir. HSF1, ısı şokuna ve diğer hücrel stres biçimlerine yanıt olarak aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. HSF1, HSP genlerinin promotör bölgelerindeki ısı şoku elementlerine (HSE'ler) bağlanarak HSP'lerin transkripsiyonuna yol açar (Zhang vd., 2011)). Kesici (2015), yüksek sıcaklık stresi (45°C) altında çilekte HSP'lerin yukarı regülasyonunu gözlemlemiştir. Hsp70'in domates bitkilerinde yüksek sıcaklık toleransında çok önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Fragkostefanakis vd., 2016). Bitkilerde Hsp90 ve Hsp70'in ısı şoku transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenleyerek yüksek sıcaklık stresi toleransına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kang vd., 2022). Ayrıca, Hsp'lerin aşırı ekspresyonunun, domates (Waters vd., 2008), dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerinde termotoleransı arttırdığı bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında FxaYL_131g0766490 geninin ifade seviyesi yüksek sıcaklık stresi altında, hücrel yanıtlarda ubikitin-proteazom sisteminin önemli rolüne işaret edecek şekilde artmıştır (Şekil 4.28). Yüksek sıcaklık stresi, toplam

ubikitinasyonda hızlı bir artış ve ubikitinasyo alanında kaymaya neden olur. Bu ubikitinasyon, hedef proteinlerin proteazom tarafından bozulmasına yol açabilir ve sonuçta ısı şokunu takiben hücresel aktivitelerin geri kazanılmasına yardımcı olabilir (Maxwell vd., 2021; Sheng vd., 2023; Zhang vd., 2021). Ek olarak, AtPPRT1 ve SlCHIP gibi E3 ubikitin ligazlarının, yüksek sıcaklık stresine yanıt olarak spesifik hedef proteinlerin bozulmasına aracılık ederek bitkilerde termotoleransı arttırdığı bulunmuştur (Zhang vd., 2021; Sheng vd., 2023). Bu bulgular, ubikuitin protein ligaz aktivitesinin protein yıkımını ve yüksek sıcaklık stresine hücresel tepkileri düzenlemedeki önemli rolünü vurgulamaktadır (Liu vd., 2020).

P40×F40'ta FxaYL_441g0227110 geninin ifadesi önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.28). Yüksek sıcaklık stresi, protein katlanmasını ve stabilitesini bozarak hücresel strese yol açabilir. Bu nedenle, yüksek sıcaklık stresi altında ubikitin protein ligaz aktivitesiyle ilgili genlerin aşağı regülasyonunun, hücrede hasarlı proteinlerin birikimine yol açması, hücresel stresi şiddetlendirmesi olasıdır. Bitkilerde yapılan bir çalışmada Li vd. (2018b) yüksek sıcak stresinin, protein yıkımında rol oynayan ubikitin aracılı çeşitli genlerin ekspresyonunu azalttığını göstermiştir.

FxaYL_421g0528340 genin ifadesi P40×F40'ta 1.08 kat artış gösterirken, P25×F25'te 1 kat artış göstermiştir (Şekil 4.28). Elek elemanı oklüzyonu (SEO) genleri, floem yapısal proteinlerini kodlar. Bu proteinlerin, yaralanmayı takiben elek elemanlarının tıkanmasını kolaylaştırmada ve çeşitli streslere karşı savunma sağlamada rol oynadığına inanılmaktadır (Wang vd., 2022). Yüksek sıcaklık stresi altında Elek Elemanı Oklüzyonu (SEO) ve C-terminal'in rolü, bitkilerin yüksek sıcaklıklara tepkileri bakımından incelenmiştir. Yüksek sıcaklık stresi koşullarında bitkiler floem dokularını korumak ve floem işlevselliğini sürdürmek için çeşitli savunma mekanizmalarını harekete geçirirler. Bu mekanizmalardan biri, kalloz ve diğer maddelerin elek plakaları üzerinde birikmesini içeren Elek Elemanı Oklüzyonunun (SEO) oluşumudur. Bu tıkanıklık, hasarlı veya gerilmiş elek elemanlarının sızdırmaz hale getirilmesine yardımcı olarak floem özsuyunun kaybını önler ve floem taşıma sisteminin bütünlüğünü korur (Wang vd., 2022).

6. SONUÇ

Yüksek sıcaklıklar çilek bitkilerinin büyümesini, meyve verimi, kalitesi ve raf ömrünü olumsuz etkiler. Yüksek sıcaklıklar, fotosentezin azalması, solunumun artması, membran stabilitesinin bozulması, fitohormon seviyelerinin değişmesi ve oksidatif hasara yol açan reaktif oksijen türlerinin birikmesi gibi fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olur. Yüksek sıcaklığa duyarlı ve tolerant çeşitlerin karşılaştırmalı transkriptomikleri, fotosentez, hücre duvarı metabolizması, hormon sinyali, antioksidan sistemler ve termotolerans sağlayan HSP'lerin gen ifadesindeki farklılıkları ortaya koymaktadır. Fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalarla birlikte transkriptomik analizler, markör destekli seleksiyon veya genetik mühendislik, olumsuz iklim şartlarına dayanıklı çilek çeşitlerinin ıslahı için yüksek sıcaklık toleransı ile ilişkili aday genlerin ve moleküler belirteçlerin tanımlanmasına olanak tanır. Bu çalışmada, 6 nötr gün ve 15 kısa gün çeşidi olmak üzere 21 çilek çeşidi yüksek sıcaklık stresine (25-45°C) maruz bırakılmıştır. Sıcaklığın 45°C'ye kadar kademeli olarak her 48 saatte bir 5°C artırılması sonucunda çilek çeşitlerinde meydana gelen fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikler, her bir sıcaklık uygulamasından sonra kaydedilmiştir. Verilerin analizi, yüksek sıcaklık uygulamalarının çilek çeşitlerinin incelenen özelliklerini önemli ölçüde etkilediğini ortaya koymuştur.

Çileklerin yaprak yüzey sıcaklığı, yüksek sıcaklık uygulamalarından önemli ölçüde etkilenmiştir. Yaprak yüzey sıcaklığı 25°C'de 24.00'dan 45°C'de 38.90'a yükselmiştir. Yaprak yüzey sıcaklığı, 30°C'de ılımlı derecede artarken, 30°C'den sonra oldukça fazla artış göstermiştir. Çeşitler arasında yaprak yüzey sıcaklığı bakımından önemli bir fark olmamıştır. Bununla birlikte 'Tillamook', 'Roxana', 'Redlands Hope' ve 'Sweet Ann' 32.00-32.10°C ile diğer çeşitlere kıyasla biraz daha yüksek yaprak yüzey sıcaklıklarına sahip olmuşlardır.

Sıcaklık 25°C'den 30°C'ye yükseldikçe çilek yapraklarının oransal su içeriği (YOSİ) %88.22'den %89.74'e yükselmiştir. Buna karşın sıcaklığın 35°C'den 45°C'ye artışıyla, YOSİ 25°C'ye kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. En düşük YOSİ 45°C'de kaydedilmiştir. Yaprak oransal su içeriği, çeşitler arasında %79.03-91.48 arasında değişim göstermiş, 'Portola' en yüksek (%91,48) ve 'Tillamook' en düşük (%79.03) YOSİ'ne sahip olmuştur.

Membran stabilite indeksi bulguları karşılaştırıldığında, 25°C'den (%21.57) 40°C'ye (%13.58) sıcaklık artışlarının membran stabilite indeksinde önemli bir düşüşe yol açtığı fark edilmiştir. Membran stabilite indeksinin en yüksek değeri 'Portola' (%20.81), en düşük ise 'Amiga' (%13.38) çeşidinde gözlenmiştir.

Toplam klorofil içeriğinin en yüksek değeri kontrol bitkilerinde (25°C) (30.97 µg/ml), en düşük değeri 35, 40 ve 45°C'ye (sırasıyla 26.68, 25.39 ve 25.66 µg/ml) maruz kalan bitkilerde kaydedilmiştir. Çeşitlerle ilgili olarak, toplam klorofil içeriği 'Redlands Hope' çeşidinde en yüksek, 'Festival' çeşidinde en düşük olarak belirlenmiştir.

Malondialdehid içeriği sıcaklık uygulamalarına göre karşılaştırıldığında, sıcaklığın 25°C'den (25.06 nmol/g) 45°C'ye (50.64 nmol/g) yükselmesi, MDA içeriğinde önemli bir artışa yol açmıştır. Çilek çeşitlerinden 'Fronteras' (54.16 nmol/g) ve 'Alba' (52.30 nmol/g) en yüksek MDA içeriği değerlerine sahipken, en düşük MDA içeriği değeri 'Osmanlı' (26.33nmol/g) çeşidinde saptanmıştır.

Çalışmada farklı sıcaklıklara maruz bırakılan çilek bitkilerinin prolin içeriği 24.49-32.25 µg/g arasında değişmiştir. Prolin içeriğinin en yüksek değeri 35, 40 ve 45°C'ye maruz kalan bitkilerde, en düşük değeri ise 25°C'ye (kontrol) maruz kalan bitkilerde belirlenmiştir. Tüm çeşitler genellikle artan sıcaklıkla birlikte prolin içeriği birikiminde bir artış göstermiştir. 30°C'den sonra, tüm çeşitlerin prolin içeriği önemli ölçüde artmış, ancak en belirgin prolin artışı 40°C'de fark edilmiştir. Çeşitlerle ilgili olarak, 'Portola' diğer çeşitlere kıyasla daha yüksek prolin içeriğine sahip olma eğilimi göstermiştir.

Denemede incelenen 21 çilek çeşidi, 25°C (kontrol) ve 40°C sıcaklıklara maruz kalan bitkilerin membran stabilite indeksi ve prolin içeriğindeki değişim oranı (%) ve 45°C'ye maruz kaldıktan sonraki görünümüleri dikkate alınarak hassas, orta ve tolerant olarak gruplanmıştır. Kısa gün çeşitleri arasında 'Amiga', 'Festival', 'Fronteras', 'Jive', 'Sabrina' ve 'Tillamook', 100-160 arasında değişen puanlarla hassas çeşitler olarak tanımlanmışlardır. 'Alba', 'Asia', 'Favette', 'Fortuna', 'Petaluma', 'Roxana', 'Redlands Hope' ve 'San Andreas' dahil olmak üzere bazı kısa gün ve nötr gün çeşitleri 200- 260 arasındaki puanlarla orta derecede tolerant çeşitler olarak kabul edilmişlerdir. 'Albion', 'Calinda', 'Monterey', 'Osmanlı', 'Portola', 'Splendor' ve 'Sweet Ann' 320- 380 arasında değişen puanlarla yüksek sıcaklıklara tolerant çeşitler olarak değerlendirilmişlerdir. Denemede nötr-gün çeşitler orta-tolerant grupta yer almışlardır.

‘Portola’ (yüksek sıcaklığa tolerant) ve ‘Fronteras’ (yüksek sıcaklığa hassas) çeşitlerinin kontrol (25°C) bitkileri ve stres koşullarına (40°C) maruz kalan bitkilerinden alınan genç yaprak örneklerinde yeni nesil RNA dizileme ve qRT-PCR analizleri yapılmıştır. Minimum RNA bütünlük sayısı (RIN) 5.7’den fazla olduğu görülerek örneklerin dizileme çalışmaları için yeterli düzeyde kaliteli olduğu gözlemlenmiştir.

Yüksek sıcaklık stresi altında transkriptomik seviyedeki gen ekspresyonu, tek kütüphaneden elde edilen mRNA ve LncRNA’lar kullanılarak oluşturulmuştur. cDNA kütüphanesi, dizilenen her parçanın 150 baz çifti uzunluğuna sahip ve dizileme sırasında minimum 80 milyon baz okumasına sahip 150 bp ile eşleştirilmiştir. Kütüphanelerden elde edilen okuma sayısı 79-84 milyon arasında değişmiştir. Ham dizileme verileri filtrelendikten sonra örneklerden yaklaşık 1 milyon baz çıkarılmış ve tüm kütüphanelerdeki hata oranı %0.03 olarak bulunmuştur. Her kitaplığın Q30 değerleri %89.89 ile %91.41 arasında değişmiş, hata oranı 1,000 bazda 1 olacak şekilde yüksek bir doğruluk düzeyi göstermiştir.

Referans genom üzerine eşlenen kütüphanelerden elde edilen dizilerin okunma oranlarının %30-40 üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Eşlenen dizilerin yalnızca %3.5-6.15’i birden fazla bölgeye eşlenirken, geri kalanı tek bir bölgeye eşlenmiştir. Haritalanan dizilerin çoğunun ekzonlar, yani gen kodlama bölgeleri üzerinde hizalandığı belirlenmiştir. Ekzonik hizalamalar Fronteras çeşidinde daha yüksek, Portola çeşidinde daha düşük olarak gözlenmiştir. Her üç veri tabanında da kodlama potansiyeli olmayan 8,760 lncRNA kaydedilmiştir. Bu sonuç, yeni lncRNA’ların tanımlaması ve karakterize edilmesine yardımcı olarak ilgili kodlamayan LncRNA’ların anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Bu sonuçlara göre %63.5 lincRNA, %16.8 antisens, %10.5 sens overlapping ve %9.2 sense intronik lncRNA tespit edilmiştir.

En fazla sayıda DEG geni P40×F40 kütüphanesinden elde edilmiştir. P40×F40’ta 11 785 ifadesi artan ve 12 016 ifadesi azalan olmak üzere toplam 23 801; P25×F25’te ise 5 297 ifadesi artan ve 9 247 ifadesi azalan olmak üzere toplam 14 544 DEG mRNA elde edilmiştir. P40×F40’ta 1 698 ifadesi artan ve 905 ifadesi azalan olmak üzere toplam 2 603; P25×F25’te ise 1 057 ifadesi artan ve 768 ifadesi azalan olmak üzere toplam 1 825 DEG lncRNA elde edilmiştir.

Farklı gen ekspresyonunun ısı haritası ile kümelenmesine göre, P40'ta daha yüksek gen ekspresyon seviyeleri bulunmuştur. Her iki çeşidin kontrol koşullarında düşük ekspresyon seviyelerine sahip genler olduğu gözlemlenmiştir.

Histogram ve DAG kullanılarak yapılan GO zenginleştirme analizi, P40×P25'te biyolojik süreçlerin karbonhidrat metabolik süreci ve fotosentez yollarında önemli bir zenginleştirme olduğunu ortaya çıkarmıştır. F40×F25'te aminoglikan metabolik süreci, aminoglikan katabolik süreci, kitin metabolik süreci ve kitin katabolik sürecinde daha düşük zenginleştirme değerleri bulunmuştur. Ayrıca, P40×P25'te hücrel lokalizasyon bakımından tilakoid, tilakoid kısım, fotosentetik membran ve fotosistemde daha yüksek zenginleştirme değeri tespit edilmiştir. P40× F40'ta moleküler fonksiyon açısından, izomeras aktivitesi ve ATPaz aktivitesi önemli ölçüde zenginleşme gösterirken, P40×F25'te kanal aktivitesi ve pasif transmembran taşıyıcı aktivitesi önemli ölçüde zenginleşme göstermiştir.

Birden fazla gen arasındaki etkileşimleri içeren spesifik biyolojik fonksiyonları tanımlamak için KEGG zenginleştirme analizi yapılmıştır. 'Portola' ve 'Fronteras' çeşidlerine ait kontrol (25°C) ve stres (40°C) koşulları karşılaştırıldığında, ABC taşıyıcılarında, Gliserofosfolipid metabolizmasında önemli bir zenginleşme olduğu gözlemlenmiştir. F40×F25'te nükleotid şekerinin biyosentezinde önemli biyolojik fonksiyonlar olduğu gözlenirken, P25×F25'te çeşitli ABC taşıyıcılarının biyosentezi, fenilpropanoid biyosentezi ve Gliserofosfolipid metabolizmasına ait yollarla önemli derecede zenginleşme olduğu tespit edilmiştir. İlaveten P40×F40'ta ökaryotlarda, peroksizomda ve fotosentezde Ribozom biyogenezinin biyosentezi önemli ölçüde zenginleştiği belirlenmiştir.

P40×F40 ve P25×F25 karşılaştırmalarının qRT-PCR sonuçları, transkriptom sonucundaki veriler ile paralellik göstermiştir. qRT-PCR analizi sonuçlarına göre, P40×F40'ta P25×F25'e göre glikolitik yol, hidralaz aktivitesi, oksogli, thaumatin/osmotin ubikuitin, homeobox-leucine zip kodlu protein ve floem gelişimi ile ilişkilendirilmiş genlerin ifadelerinin arttığı; syntaxin, Myb/SANT, ubikuitin protein ligaz aktivitesi, E3 ligaz, CCCH-tipi çinko parmak, floem, C-terminal ve RING/FYVE/PHD-çinko parmak tipi genlerin ifadelerinin azaldığı bulunmuştur. P40×F40'ta P25×F25'e göre HSP'ler LOC101290755'in ifadesi artarken, LOC101313245, LOC101304168 ve LOC101291264'ün azaldığı gözlenmiştir.

Çilek üretimini sınırlayan birçok biyotik ve abiyotik stres faktörü vardır. Yüksek sıcaklık stresi, bitki büyümesi ve gelişmesinde geri dönüşü olmayan hasarlara neden olan en önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir. Son yıllarda küresel ısınmanın artması ile birlikte bu faktörün çilek üretimi üzerindeki etkisi daha da artmıştır. Bu nedenle çilekte yüksek sıcaklık stresinin mekanizmalarını öğrenmek önemlidir. Özellikle yüksek sıcaklık stresinin moleküler mekanizması üzerine elde edilen sonuçlar ve kodlanmayan lncRNA'ların ortaya çıkarılması octaploid çilekler için literatürde ilk olma özelliğini taşımaktadır. Yüksek sıcaklık stresine duyarlı ve tolerant çeşitlerin karşılaştırmalı transkriptomikleri, çilekte yüksek sıcaklık stresinin çeşitli biyolojik süreçler, hücresel lokalizasyon ve moleküler fonksiyon bakımından önemli farklılıklara yol açtığını göstermiştir. Bu bulgular, yüksek sıcaklık stresine dayanıklı çilek çeşitlerinin ıslahı için aday genlerin ve moleküler belirteçlerin tanımlanmasına yardımcı olacaktır.

RNA dizilimi ve analizi, yüksek sıcaklık stresi altında gen ekspresyon modellerine ilişkin önemli ip uçları sağlamaktadır. GO zenginleştirme analizi, biyolojik süreçlerde, hücresel konumlarda ve moleküler fonksiyonlarda önemli değişiklikler ortaya çıkarmıştır. KEGG zenginleştirme analizi, yüksek sıcaklıklardan etkilenen belirli biyolojik işlevlerin tespiti noktasında oldukça verimli sonuçlar sunmuştur. Bu çalışma kapsamında çok fazla veri üretilmiş olup, tanımlanan bu genlerin hedef moleküler yolaktaki rollerinin yeni projelerle açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, çilek yetiştiriciliğinde yüksek sıcaklık stresinin mekanizmalarının açıklanmasına yardımcı olacak, özellikle kısa gün ve nötr gün çeşitlerindeki mekanizmalar açısından bu konudaki bilimsel bilgi birikimine katkı sağlayacak ve bu yönüyle önceki çalışmalardan farklılaşacaktır. Yakın gelecekte çilek yetiştiriciliğinde daha da önem kazanacak olan “yüksek sıcaklık stresine dayanıklı çeşitlerin ıslahı” açısından da önemli bilgiler sağlayacaktır. Küresel ısınmanın etkileri göz önünde bulundurularak kuzey ve güney bölgelere uygun nötr gün ve kısa gün çeşitlerinin ıslahı gibi konularda yeni fikir ve projelerin geliştirilmesine önemli katkılar sunacaktır.

KAYNAKLAR

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- Aghdam, O. A., Hajilou, J., Bolandnazar, S., & Dehghan, G. (2020). Effect of 24-Epi Brassinolide on some biochemical characteristics of Parus and Gaviota strawberry cultivars under heat stress conditions. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 30(2), 429-437. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.724780>.
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., & Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2), 161-175. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>
- Ahmadi, H., Bringhurst, R. S., & Voth, V. (1990). Modes of inheritance of photoperiodism in *Fragaria*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(1), 146-152.
- Ainsworth, E. A., & Ort, D. R. (2010). How do we improve crop production in a warming world? *Plant Physiology*, 154(2), 526-530. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161349>
- Ali, M.B., Hahn, E., & Paek, K. (2005). Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 213-223.
- Allakhverdiev, S.I., Kreslavski, V.D., Klimov, V.V., Los, D.A., Carpentier, R., & Mohanty, P. (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98(1), 541-550.
- Almeselmani, M., Deshmukh, P. S., Sairam, R. K., Kushwaha, S. R., & Singh, T. P. (2006). Protective role of antioxidant enzymes under high-temperature stress. *Plant Science*, 171(3), 382-388.
- Almadanim, M. C., Alexandre, B. M., Rosa, M. T. G., Sapeta, H., Leitão, A. E., Ramalho, J. C., ... & Fevereiro, P. (2017). Rice calcium-dependent protein kinase OsCPK17 targets plasma membrane intrinsic protein and sucrose-phosphate synthase and is required for a proper cold stress response. *Plant Cell and Environment*, 40(7), 1191-1207.
- Almeselmani, M., Deshmukh, P.S., Sairam, S.R., Kuswaha, S.R., & Singh, T.P. (2006). Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science*, 171, 382-388.
- Amutha, R., Muthulaksmi, S., Baby Rani, W., Indira, K., & Mareeswari, P. (2007). Studies on biochemical basis of heat tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Research Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3(4), 234-238.
- Anderson, J.A. (2002). Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. *Scientia Horticulturae*, 95, 277-284.
- Anonymous. (2014). Küresel iklim değişikliği ve Türkiye. http://www.wwf.org.tr/ne_yapiyoruz/ayak_izinin_azaltilmasi/iklim_degisikligi_ve_nerji/iklim_degisikligi/kuresel_iklim_degisikligi_ve_turkiye/ (Access date: 24.10.2014)
- Anonymous. (2019). 2018 Yılı İklim Değerlendirmesi. Tarım ve Orman Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü Türkiye. (<https://mgm.gov.tr/files/iklim/yillikiklim/2018-iklim-raporu.pdf>).
- Anonymous. (2020). 2019 Yılı İklim Değerlendirmesi. Tarım ve Orman Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü (<https://www.mgm.gov.tr/files/iklim/yillikiklim/2019-iklim-raporu.pdf>).
- Ashraf, M., & Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216.

- Ashraf, M., Saeed, M.M., & Qureshi, M.J. (1994). Tolerance to high temperature in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) at initial growth stages. *Environmental and Experimental Botany*, 34(3), 275–283.
- Badenes, M. L., & Byrne, D. H. (2012). *Fruit breeding*. Springer Science and Business Media, 8, 369.
- Balasoorya, B.L.H.N., Dassanayake, K., & Ajlouni, S. (2016). High-temperature effects on strawberry fruit quality and antioxidant contents. *Acta Horticulturae*, 1278, 225-234.
- Barnabás, B., Jäger, K., & Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment*, 31(1), 11-38.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. (1977). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
- Batley, N. (2000). Aspects of seasonality. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 1769-1780.
- Batley, N.H., LeMiere, P., Tehranifar, A., Cekic, C., Taylor, S., Shrivs, K.J., Hadley, P., Greenland, A.J., Darby, D., & Wilkinson M.J. (1998). Genetic and environmental control of flowering in strawberry. In K.E. Cockshull, D. Gray, G.B. Seymour, & B. Thomas (Eds.), *Genetic and environmental manipulation of horticultural crops* (pp. 111-131). CAB International.
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K.K. (2008). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: Prospects and limitations. *Plant Cell Reports*, 27(3), 411-424.
- Bitá, C.E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273>
- Blum, A. (1988). *Plant breeding for stress environments*. CRC Press.
- Blum, A. (2009). Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*, 112(2-3), 119-123.
- Blum, A., Klueva, N., & Nguyen, H.T. (2001). Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress. *Euphytica*, 117(1), 117-123.
- Bolton, A., Nijabat, A., Mahmood-ur-Rehman, M., Naveed, N.H., Mannan, A.M., Ali, A., ... & Simon, P. (2019). Variation for heat tolerance during seed germination in diverse carrot [*Daucus carota* (L.)] germplasm. *HortScience*, 54(9), 1470-1476.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In W. Gruissem, B. Buchanan, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 1158-1249). American Society of Plant Physiologists.
- Breschi, A., Gingeras, T. R., & Guigó, R. (2017). Comparative transcriptomics in human and mouse. *Nature Reviews Genetics*, 18(7), 425-440.
- Bringhurst, R.S., & Voth, V. (1980). Six new strawberry varieties released. *California Agriculture*, 34(2), 12-15.
- Bringhurst, R.S., & Voth, V. (1984). Breeding octoploid strawberries. *Iowa State Journal of Research*, 58, 371-381.
- Brown, T., & Wareing, P.F. (1965). The genetical control of the everbearing habit and three other characters in varieties of *Fragaria vesca*. *Euphytica*, 14(1), 97-112.
- Cansev, A. (2012). Physiological effects of high temperature treatments on leaves of olive cv. Gemlik. *Plant Archives*, 12(1), 521-525.
- Chaitanya, K.V., Sundar, D., & Reddy, A.R. (2001). Mulberry leaf metabolism under high temperature stress. *Biologia Plantarum*, 44(3), 379-384.

- Chen, D. (2013). The effect of heat on fruit size of day-neutral strawberries (Doctoral dissertation, University of Guelph).
- Chen, T.H.H., & Murata, N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: Mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment*, 34(1), 1-20.
- Chen, T.H.H., Shen, Z.Y., & Lee, P.H. (1982). Adaptability of crop plants to high temperature stress. *Crop Science*, 22(4), 719-725.
- Cheng, F., Yin, L.L., Zhou, J., Xia, X.J., Shi, K., Yu, J.Q., ... & Foyer, C. H. (2016). Interactions between 2-Cys peroxiredoxins and ascorbate in autophagosome formation during the heat stress response in *Solanum lycopersicum*. *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1919-1933.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., & Panda, S.K. (2013). Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 8(4). <https://doi.org/10.4161/psb.23681>
- Christou, A., Georgiadou, E.C., Filippou, P., Manganaris, G.A., & Fotopoulos, V. (2014). Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. *Gene*, 537, 169-173.
- Celikel, G., Demirsoy, L., & Demirsoy, H. (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 118(2), 115-119.
- Dalla Costa, L., Tomasi, N., Gottardi, S., Iacuzzo, F., Cortella, G., Manzocco, L., ... & Cesco, S. (2011). The effect of growth medium temperature on corn salad [*Valerianella locusta* (L.) Laterr] baby leaf yield and quality. *HortScience*, 46(12), 1619-1625.
- Dana, M.N. (1980). The strawberry plant and its environment. In N.F. Childers (Ed.), *The strawberry: Cultivars to marketing* (pp. 32-44). Horticultural Publications.
- Darnell, R.L., Cantliffe, D.J., Kirschbaum, D.S., & Chandler, C.K. (2003). The physiology of flowering in strawberry. *Horticultural Reviews*, 28, 325-349.
- Darrow, G.M. (1966). *The strawberry: History, breeding and physiology*. Holt, Rinehart and Winston. New York, USA.
- Darrow, G.M., & Waldo, G.F. (1934). Responses of strawberry varieties and species to duration of the daily light period (Technical Bulletin No. 453). United States Department of Agriculture.
- Demirel, U., Morris, W. L., Ducreux, L. J., Yavuz, C., Asim, A., Tindas, I., ... & Hancock, R. D. (2020). Physiological, biochemical, and transcriptional responses to single and combined abiotic stress in stress-tolerant and stress-sensitive potato genotypes. *Frontiers in Plant Science*, 169.
- Demirsoy, L., & Lizalo, A. (2022). Nötr gün çileklerle yaz-sonbahar çilek üretimi. *E Çilek Çalıştayı*, 234, 28-40.
- Demirsoy, L., Demirsoy, H., & Balci, G. (2012). Different growing conditions affect nutrient content, fruit yield, and growth in strawberry. *Pakistan Journal of Botany*, 44(1), 125-129.
- Ding, Y., Shi, Y., & Yang, S. (2020). Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures. *Molecular plant*, 13(4), 544-564.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P. V., Murugan, M., Perumal, R., & Reddy, U. K. (2014). Physiological differences among sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) genotypes under high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 43-54.
- Draper, A.D., Galletta, G.J., & Swartz, H.J. (1981). 'Tribute' and 'Tristar' everbearing strawberries. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 106(6), 794-795.

- Durner, E.F., & Poling (1988). Strawberry developmental responses to photoperiod and temperature. *Advances in Strawberry Production*, 7, 6-14.
- Durner, E.F., Barden, J.A., Himelrick, D.G., & Poling, E.B. (1984). Photoperiod and temperature effects on flower and runner development in day-neutral, Junebearing, and everbearing strawberries. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 109, 396-400.
- Else, M., & Atkinson, C. (2010). Climate change impacts on UK top and soft fruit production. *Outlook on Agriculture*, 39(4), 257-262.
- Ergin, S., Gülen, H., Kesici, M., Turhan, E., Ipek, A., & Köksal, N. (2016). Effects of high temperature stress on enzymatic and nonenzymatic antioxidants and proteins in strawberry plants. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(6), 908-917.
- Ergin, S., Kesici, M., & Gulen, H. (2012a). Changes in H₂O₂ and peroxidase activities in strawberry plants under heat stress. *Harran Journal of Agricultural and Food Science*, 16, 25-35.
- Ergin, S., Gulen, H., Turhan, E., Ipek, A., Koksall, N., & Kesici, M. (2012b). Proteins in strawberry plants (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) under heat stress. *New Biotechnology*, 29 (Supplement), S22.
- Escobar-Galvis, M.L., Marttila, S., Håkansson, G., Forsberg, J., & Knorpp, C. (2001). Heat stress response in peas involves the interaction of mitochondrial nucleoside diphosphate kinase with a novel 86-kilodalton protein. *Plant Physiology*, 126, 69-77.
- Fahad, S., Hussain, S., Saud, S., Hassan, S., & Tanveer, M. (2016). A combined application of biochar and phosphorus alleviates heat-induced adversities on physiological, agronomical, and quality attributes of rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 191–198.
- Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P. & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 222.
- FAO. (2023). Food and Agriculture Organization. Retrieved from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61(1), 243-282.
- Fletcher, R. S., Slimmon, T., McAuley, C. Y., & Kott, L. S. (2005). Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), 2429-2436.
- Fragkostefanakis, S., Roeth, S., Schleiff, E., & SCHARF, K. D. (2015). Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks. *Plant, cell & environment*, 38(9), 1881-1895.
- Frank, G., Pressman, E., Ophir, R., Althan, L., Shaked, R., Freedman, M., Shen, S., & Firon, N. (2009). Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat stress response. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3891-3908.
- Frey, F. P., Urbany, C., Huttel, B., Reinhardt, R., & Stich, B. (2015). Genome-wide expression profiling and phenotypic evaluation of European maize inbreds at seedling stage in response to heat stress. *BMC Genomics*, 16, 123. doi: 10.1186/s12864-015-1282-1.
- Fu, J., Krishna Jagadish, S. V., & Bowden, R. L. (2022). Effects of post-flowering heat stress on chlorophyll content and yield components of a spring wheat diversity panel. *Crop Science*, 62(5), 1926-1936.
- Galletta, G. J., & Bringhurst, R. S. (1990). Strawberry management. In *Small fruit crop management* (pp. 83-156). Prentice Hall.

- Ghosh, S., & Chan, C. K. K. (2016). Analysis of RNA-Seq data using TopHat and Cufflinks. *Plant Bioinformatics: Methods and Protocols*, 339-361.
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Grillo, S., Scharf, K-D., Vriezen, V.H., Mariani, C. (2010). Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *Journal of Experimental Botany*, 61(2), 453–462.
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Mariani, C., & Rieu, I. (2013). Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. *Plants*, 2(3), 489-506.
- González, L., & González-Vilar, M. (2001). Determination of relative water content. In *Handbook of plant ecophysiology techniques* (pp. 207-212). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Gosavi, G. U., Jadhav, A. S., Kale, A. A., Gadakh, S. R., Pawar, B. D., & Chimote, V. P. (2014). Effect of heat stress on proline, chlorophyll content, heat shock proteins and antioxidant enzyme activity in sorghum (*Sorghum bicolor*) at seedlings stage. *Indian Journal of Biotechnology*, 13, 356-363
- Gulen, H., & Eris, A. (2003). Some physiological changes in strawberry (*Fragaria × ananassa* 'Camarosa') plants under heat stress. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(6), 894-898.
- Gulen, H., & Eris, A. (2004). Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science*, 166(3), 739-744.
- Gülen, H., Ergin, S., Kesici, M., Turhan, E., İpek, A., & Köksal, N. (2011). Çilekte yüksek sıcaklığa bağlı çiçek tozu canlılığı ve çimlenme oranı. *Uluslararası Katılımlı I. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi ve Fuarı*, 1, 817-822.
- Hameed, A., Goher, M., & Iqbal, N. (2012). Heat Stress-Induced Cell Death, Changes in Antioxidants, Lipid Peroxidation, and Protease Activity in Wheat Leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(3), 283-291.
- Han, G., Qiao, Z., Li, Y., Yang, Z., Wang, C., Zhang, Y., ... & Wang, B. (2022). RING zinc finger proteins in plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 13, 877011.
- Hancock, J. F. (1999). *Strawberries*. CAB International. Wallingford, UK. 233-237.
- Hancock, J. F. (2000). Strawberries. In *Temperate fruit crops in warm exposed to high-temperature stress*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(3), 341-347.
- Hancock, J. F. (2006). California public strawberry breeders: a perfect marriage of genetics and culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 41(1), 16-16.
- Hancock, J., Weebadde, C., & Serçe, S. (2008). Challenges faced by day-neutral strawberry breeders in the continental climates of the Eastern United States and Canada. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 43(6), 1635-1636.
- Hancock, J.F., Sjulín, T.M., Lobos, G.A, (2008). *Strawberries. Temperate fruit crops crop breedings Germplasm to Genomics*. Springer.393-437. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9>.
- Hardwick, S. A., Chen, W. Y., Wong, T., Deveson, I. W., Blackburn, J., Andersen, S. B., ... & Mercer, T. R. (2016). Spliced synthetic genes as internal controls in RNA sequencing experiments. *Nature Methods*, 13(9), 792-798.
- Hartl, F.U., Bracher, A., & Hartl, M.H. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324-332.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9643-9684.

- Hassan, M. U., Chattha, M. U., Khan, I., Chattha, M. B., Barbanti, L., Aamer, M., Iqbal, M. M., Nawaz, M., Mahmood, A., Ali, A. (2021). Heat stress in cultivated plants: nature, impact, mechanisms, and mitigation strategies—A review. *Plant Biosystems*, 155, 211–234.
- Havaux, M. (1998). Probing electron transport through and around Photosystem II in vivo by the combined use of photoacoustic spectroscopy and chlorophyll fluorometry. *Israel Journal of Chemistry*, 38, 247–256.
- Heide, O. M. (1977). Photoperiod and temperature interactions in growth and flowering of strawberry. *Physiologia Plantarum*, 40(1), 21–26.
- Heide, O. M., & Sønsteby, A. (2007). Interactions of temperature and photoperiod in the control of flowering of latitudinal and altitudinal populations of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Physiologia Plantarum*, 130, 280–289.
- Hellman, E. W., & Travis, J. D. (1988). Growth inhibition of strawberry at high temperatures. *Advances in Strawberry Production*, 7, 36–38.
- Hong, B., Ma, C., Yang, Y., Wang, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Gao, J. (2009). Overexpression of AtDREB1A in chrysanthemum enhances tolerance to heat stress. *Plant Molecular Biology*, 70, 231–240.
- Hong, E., Xia, X., Ji, W., Li, T., Xu, X., Chen, J., ... & Zhu, X. (2023). Effects of High temperature Stress on the physiological and biochemical characteristics of *Paeonia ostii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11180.
- Hu, Z., Li, J., Ding, S., Cheng, F., Li, X., Jiang, Y., ... & Shi, K. (2021). The protein kinase CPK28 phosphorylates ascorbate peroxidase and enhances thermotolerance in tomato. *Plant Physiology*, 186(2), 1302–1317.
- Huey, R.B., Margen, C., Lisa, C., Melanie, F., Hayden, H., Christopher, H., Anhthu, H., & Joel, G.K. (2002). Plants Versus Animals: Do They Deal with Stress in Different Ways? *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 415–423
- Husaini, A. M., & Neri, D. (2016). Strawberry: growth, development and diseases. CABI.
- Hytönen, T. (2009). Regulation of strawberry growth and development. Doctoral Dissertation. University of Helsinki Finland.
- IPCC (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC.
- Masson-Delmotte, V. (2018). Global warming of 1.5°C: An IPCC Special Report on impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty.
- Ismail, A.M., & Hall, A.E. (1999). Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability, and plant morphology in cowpea. *Crop Science*, 39(6), 1762–1768.
- Ito, H., & Saito, T. (1962). Studies on the flower formation in the strawberry plants. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 13, 191–203.
- Jiang Y., & Huang B. (2001). Drought and Heat Stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science*, 41(2), 436–442.
- Kadir, S., Sidhu, G., & Al-Khatib, K. (2006). Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) growth and productivity as affected by temperature. *HortScience*, 41(6), 1423–1430.
- Kahlaoui, B., Hachicha, M., Misle, E., Fidalgo, F., & Teixeira, J. (2018). Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(1), 17–23.

- Kang, Y., Lee, K., Hoshikawa, K., Kang, M., & Jang, S. (2022). Molecular bases of heat stress responses in vegetable crops with focusing on heat shock factors and heat shock proteins. *Frontiers in Plant Science*, 13, 896.
- Kesici, M. (2009). Bazı Çilek (*Fragaria* × *ananassa*) Çeşitlerinin Yüksek Sıcaklığa Toleransları. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, TÜRKİYE. 49 p.
- Kesici, M., Ergin, S., Gulen, H., Turhan, E., İpek, A., & Köksal, N. (2013). Heat-stress tolerance of some strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 1-6.
- Kesici, Z. M. (2015). Çilekte (*Fragaria* × *ananassa*) Yüksek Sıcaklık Stresinde Farklı İfade Edilen Genlerin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı.
- Kesici, M., Ipek, A., Ersoy, F., Ergin, S., & Gülen, H. (2020). Genotype Dependent gene expression in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) plants under high temperature stress. *Biochemical Genetics*, 58, 848-866.
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*, 12(4), 357-360.
- Klamkowski, K., & Treder, W. (2008). Response to drought stress of three strawberry cultivars grown under greenhouse conditions. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16(16), 179-188.
- Konarlı, O. (1986). Çilek. Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı, Yayın no: 12. Yalova.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., & Scharf, K. D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 310-316.
- Krishnamurthy, A., & Rathinasabapathi, B. (2013). Oxidative stress tolerance in plants: novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. *Plant Signal Behav*, 8(10).
- Kumakura, H., & Shishido, Y. (1994). The effect of daytime, nighttime, and mean diurnal temperatures on the growth of 'Morioka-16' strawberry fruit and plants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 62(4), 827-832.
- Kumar, A., Omae, H., Egawa, Y., Kashiwaba, K., & Shono, M. (2005). Influence of water and high temperature stresses on leaf water status of high temperature tolerant and sensitive cultivars of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 49(2), 109-118.
- Kumar, M., Lee, S. C., & Kim, J. Y. (2015). Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. *Frontiers in Plant Science*, 6, 163.
- Kumar, N., Suyal, D. C., Sharma, I. P., Verma, A., & Singh, H. (2017). Elucidating stress proteins in rice (*Oryza sativa* L.) genotype under elevated temperature: a proteomic approach to understand heat stress response. *3 Biotech*, 7(3), 205.
- Kumar, R. R., Karajol, K., & Naik, G. R. (2011). Effect of polyethylene glycol induced water stress on physiological and biochemical responses in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *Recent Research in Science and Technology*, 3, 148-152.
- Kumar, S., Thakur, P., Kaushal, N., Malik, J. A., Gaur, P., & Nayyar, H. (2013). Effect of varying high temperatures during reproductive growth on reproductive function, oxidative stress and seed yield in chickpea genotypes differing in heat sensitivity. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59(6), 823-843.

- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., & Das, B. K. (2022). Heat shock proteins (Hsps) in cellular homeostasis: A promising tool for health management in crustacean aquaculture. *Life*, 12(11), 1777.
- Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., & Bekkaoui, F. (2018). Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6(26).
- Lamichaney, A., Parihar, A. K., Hazra, K. K., Dixit, G. P., Katiyar, P. K., & Singh, D. (2021). Untangling the influence of heat stress on crop phenology, seed set, seed weight, and germination in field pea (*Pisum sativum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12, 635868.
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 559. doi: 10.1186/1471-2105-9-559.
- Lavorgna, G., Guffanti, A., Borsani, G., Ballabio, A., & Boncinelli, E. (1999). TargetFinder: searching annotated sequence databases for target genes of transcription factors. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(2), 172-173.
- Ledesma, N.A., & Sugiyama, N. (2005). Pollen quality and performance in strawberry plants. *HortScience*, 40(6), 1624-1628.
- Ledesma, N.A., Nakata, M., & Sugiyama, N. (2008). Effect of high temperature stress on the reproductive growth of strawberry cvs. "Nyoho" and "Toyonoka". *Scientia Horticulturae*, 116, 186-193.
- Lee, D. G., Ahsan, N., Lee, S. H., Kang, K. Y., Bahk, J. D., Lee, I. J., & Lee, B. H. (2007). A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics*, 7(18), 3369-3383.
- Levitt J. (1980). Responses of plants to environmental stress, Volume 1: Chilling, freezing, and high temperature stresses. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press.
- Li, Y., Zhao, F., Li, X., Zhang, X., & Li, Z. (2018a). Physiological and transcriptomic analyses reveal the response mechanisms of sweet potato to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 327-338.
- Li, X., Liu, Y., Yin, H., & Zhang, X. (2018b). Insights into the response and adaptation mechanisms of *Populus euphratica* to salt stress. *Trees*, 32(3), 733-751.
- Li, S., Zhou, X., Chen, L., Huang, W., & Yu, D. (2010). Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress. *Molecular Cells*, 29(6), 475-483.
- Li, Y., Ding, Y., & Zhang, Y. (2017). Transcriptional regulation of heat tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1317.
- Li, Z., Palmer, W. M., Martin, A. P., Wang, R., Rainsford, F., Jin, Y., ... & Ruan, Y. L. (2012). High invertase activity in tomato reproductive organs correlates with enhanced sucrose import into, and heat tolerance of, young fruit. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1155-1166.
- Li, Z., Palmer, W.M., Martin, A.P., Wang, R., Rainsford, F., Jin, Y., Patrick, J.W., Yang, Y., & Ruan, Y-L. (2011). High invertase activity in tomato reproductive organs correlates with enhanced sucrose import into, and heat tolerance of, young fruit. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2835-2846.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 591-592.
- Lindsey, R., & Dahlman, L. (2023). Climate Change: Global Temperature (Retrieved from <https://www.climate.gov/news-features/understanding-climate/climate-change-global-temperature>)

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Liu, A. L., Zou, J., Liu, C. F., Zhou, X. Y., Zhang, X. W., Luo, G. Y., & Chen, X. B. (2013). Over-expression of OsHsfA7 enhanced salt and drought tolerance in transgenic rice. *BMB reports*, 46(1), 31.
- Liu, X., & Huang, B. (2000). Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science*, 40(2), 503-510.
- Liu, Y., Xiao, S., Sun, H., Pei, L., Liu, Y., Peng, L., Gao, X., Liu, Y., & Wang, J. (2020). AtPPRT1, an E3 ubiquitin ligase, enhances the thermotolerance in Arabidopsis. *Plants*, 9(9), 1074.
- Lohmann, C., Eggers-Schumacher, G., Wunderlich, M., & Schöffl, F. (2004). Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(1), 11-21.
- Luhua, S., Hegieb, A., Suzukia, N., Shulaeva, E., Luoa, X., Cenariub, D., Mab, V., Kaob, S., Limb, J., Gunay, M.B., Oosumid, T., Leed, S.C., Harperb, J., Cushmanb, J., Golleryc, M., Girked, T., Bailey-Serresd, J., Stevensone, R.A., Zhue, J-K., & Mittler, R. (2013). Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiologia Plantarum*, 148(3), 322-333.
- Machado, S., & Paulsen, G. M. (2001). Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. *Plant and Soil*, 233(1), 179-187.
- Mackenzie, S. J., & Chandler, C. K. (2009). The late season decline in strawberry fruit soluble solid content observed in Florida is caused by rising temperatures. *Acta Horticulturae*, 842, 843-846.
- Mahmud J Al, Bhuyan MHM, Nahar K et al. (2020). Response and tolerance of fabaceae plants to metal/metalloid toxicity. In M. Hasanuzzaman, S. Araújo & S. Gill (Eds.), *The plant family fabaceae* (pp. 435-482). Springer.
- Majoul, T., Bancel, E., Triboui, E., Hamida, J. B., & Branlard, G. (2003). Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from total endosperm. *Proteomics*, 3(2), 175-183.
- Malik, M. K., Slovin, J. P., Hwang, C. H., & Zimmerman, J. L. (1999). Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, Hsp17.7, results in increased or decreased thermotolerance. *The Plant Journal*, 20(1), 89-99.
- Manakasem, Y., & Goodwin, P. B. (2001). Responses of dayneutral and Junebearing strawberries to temperature and daylength. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76(5), 629-635.
- Marcum, K. B. (1998). Cell membrane thermostability and whole plant heat tolerance of Kentucky bluegrass. *Crop Science*, 38(5), 1214-1218.
- Martineau, J. R., Specht, J. E., Williams, J. H., & Sullivan, C. Y. (1979). Temperature tolerance in soybean: I. Evaluation of technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Science*, 19(1), 75-78.
- Mathur, S., Jajoo, A., Mehta, P., & Bharti, S. (2011). Analysis of elevated temperature-induced inhibition of photosystem II using chlorophyll a fluorescence induction kinetics in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Plant Biology*, 13(1), 1-6.
- Matsubara, Y. I., Hirano, I., Sassa, D., & Koshikawa, K. (2004). Alleviation of high temperature stress in strawberry plants infected with arbuscular mycorrhizal fungi. *environment control in biology*, 42(2), 105-111.

- Mattick, J. S., & Rinn, J. L. (2015). Discovery and annotation of long noncoding RNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), 5-7.
- Maxwell, B. A., Gwon, Y., Mishra, A., Peng, J., Nakamura, H., Zhang, K., ... & Taylor, J. P. (2021). Ubiquitination is essential for recovery of cellular activities after heat shock. *Science*, 372(6549).
- Miao, Z.Y., Xu W., Li D.F., Hu X.N., Liu J.X., Zhang R.X., et al. (2015). De novo transcriptome analysis of *Medicago falcata* reveals novel insights about the mechanisms underlying abiotic stress-responsive pathway. *BMC Genomics* 16:818.
- Michelson, L.F., W.H. Lachman, and D.D. Allen. 1958. The use of the "Weighted-Rankit" method in variety trials. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 71:334-338.
- Mishra R.C., Ghosh R., & Bae H.(2016).Plant acclimation to elevated temperature: an overview.*Archives of Biochemistry and Biophysics*, 576 , 30-35.
- Mishra, S. K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., Nover, L., & Scharf, K. D. (2002). In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes & Development*, 16(12), 1555-1567.
- Mittler, R. , Finka, A .,& Goloubinoff P . (2012). How do plants feel the heat? *Trends Biochem.Sci* .37 ,118-125.
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11(1), 15-19.
- Mohammadi V ., Bihamta M.R .,& Zali A.A.(2007).Evaluation of Screening Techniques for Heat Tolerance in Wheat.*Pakistan Journal of Biological Sciences* ,10(6),887–892.
- Molla, R., Ali, M.R., Hasanuzzaman, M., et al. (2014). Exogenous proline and betaine-induced upregulation of glutathione transferase and glyoxalase I in lentil (*Lens culinaris*) under drought stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42, 73-80.
- Mookerjee, S., Mathey, M. M., Finn, C. E., Zhang, Z., & Hancock, J. F. (2013). Heat tolerance plays an important role in regulating remontant flowering in an F 1 population of octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Journal of Berry Research*, 3(3), 151-158.
- Mori, T. (1998). Effect of temperature during flower bud formation on achene number and fresh weight of strawberries. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67(3), 396-399.
- Morimoto R.I . , & Santoro M.G . (1998).Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection.*Nature Biotechnology*, 16(9), 833-838.
- Morrison M.J . , & Stewart D.W. (2002).Heat stress during flowering in summer Brassica.*Crop Science*,42(3),797-803.
- Nagarajan, S., Jagadish, S. V. K., Prasad, A. H., Thomar, A. K., Anand, A., Pal, M., & Agarwal, P. K. (2010). Local climate affects growth, yield and grain quality of aromatic and non-aromatic rice in northwestern India. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 138(3-4), 274-281.
- Naji, K. M., & Devaraj, V. R. (2011). Antioxidant and other biochemical defense responses of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. (Horse gram) induced by high temperature and salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23, 187-195.
- Nathewet, P. (2017). Effects of heat stress on physiological index in cultivated strawberries. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 45(S1), 314-320.
- Neta-Sharir, I., Isaacson, T., Lurie, S., & Weiss, D. (2005). Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell*, 17(6), 1829-1838.

- Nijabat, A., Bolton, A., Mahmood-ur-Rehman, M., Shah, A. I., Hussain, R., Naveed, N. H., ... & Simon, P. (2020). Cell membrane stability and relative cell injury in response to heat stress during early and late seedling stages of diverse carrot (*Daucus carota* L.) germplasm. *HortScience*, 55(9), 1446-1452.
- Nishiyama, M., & Kanahama, K. (2000). Effects of temperature and photoperiod on flower bud initiation of day-neutral and everbearing strawberries. In *Acta Horticulturae* (Vol. 567, pp. 253-255).
- NOAA. (2019). National Oceanic and Atmospheric Administration Global Climate Report Annual 2018. Retrieved from <https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/201813>
- NOAA. (2020). National Oceanic and Atmospheric Administration Global Climate Report Annual 2019. Retrieved from <https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/201913>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Omae, H., Kumar, A., & Shono, M. (2012). Adaptation to high temperature and water deficit in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the reproductive period. *Journal of Botany*, 2012, 803413.
- Öztürk, A., & Demirsoy, L. (2013). Promising pear genotypes from North Anatolia, Turkey: preliminary observations. *Journal of the American Pomological Society*, 67(4), 217-227.
- Palencia, P., Martinez, F., Medina, J., & Lopez Medina, J. (2013). Strawberry yield efficiency and its correlation with temperature and solar radiation. *Horticultura Brasileira*, 31(1), 93-99.
- Panchuk, I. I., Volkov, R. A., & Schöffl, F. (2002). Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129(2), 838-853.
- Peleg, Z., Walia, H., & Blumwald, E. (2012). Integrating genomics and genetics to accelerate development of drought and salinity tolerant crops. In *Plant Biotechnology and Agriculture Prospects for the 21st Century* (pp. 271-286).
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290-295.
- Pompelli, M. F., Endres, L., & de Almeida, L. F. R. (2010a). Strawberry tolerance to high temperatures: a review. *Scientia Horticulturae*, 126(1), 1-12
- Pompelli, M.F., Barata-Luis, R., Vitorino, H., Gonclaves, E., Rolim, E., Santos, M., Almeida-Cortez, J., & Endrez, L. (2010b). Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass and Bioenergy*, 34(8), 1207-1215.
- Prasad, P. V. V., Djanaguiraman, M., Perumal, R., & Ciampitti, I. A. (2015). Impact of high temperature stress on floret fertility and individual grain weight of grain sorghum: Sensitive stages and thresholds for temperature and duration. *Frontiers in Plant Science*, 6, 820.
- Pritts, M., & Dale, A. (1989). Day neutral strawberry production guide. Cornell Cooperative Extension, 148-200.
- Priya, M., Dhanker, O. P., Siddique, K. H., HanumanthaRao, B., Nair, R. M., Pandey, S., ... & Nayyar, H. (2019). Drought and heat stress-related proteins: an update about their functional relevance in imparting stress tolerance in agricultural crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 132, 1607-1638.
- Qariani, L., El Jaafari, S., Dekkaki, M., & Araus, J. L. (2000). Cuticular conductance, water use efficiency and drought tolerance of durum wheat isolines of differing glaucousness. *Options Méditerranéennes Série A, séminaires Méditerranéens*, 40, 315-318.

- Queitsch, C., Hong, S.-W., Vierling, E., & Lindquist, S. (2000). Heat shock 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12(4), 479-492.
- Raza, A., Charagh, S., García-Caparrós, P., Rahman, M. A., Ogwugwa, V. H., Saeed, F., & Jin, W. (2022). Melatonin-mediated temperature stress tolerance in plants. *GM Crops & Food*, 13, 196–217.
- Raza, A., Wei, S., Ang, G., et al. (2021). Catalase (Cat) gene family in rapeseed (*Brassica napus* L.): Genome-wide analysis, identification and expression pattern in response to multiple hormones and abiotic stress conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22084281>.
- Reddy, R. A., Chaitanya, K. V., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161, 1189-1202.
- Rekika, D., Khanizadeh, S., Deschênes, M., Levasseur, A., Charles, M. T., Tsao, R., & Yang, R. (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of selected strawberry genotypes. *HortScience*, 40(6), 1777-1781.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., & Samaha, R. R. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499), 2105-2110.
- Risser, G., & Robert, F. (1993). What cold treatments promote growth in strawberry? *Acta Horticulturae*, 348, 381–383.
- Rizhsky, L., Liang, H., & Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*, 130(3), 1143-1151.
- Rodríguez, L. (2013). Growth, relative water content, transpiration and photosynthetic pigment content in coffee trees (*Coffea arabica* L.) growing at different sunlight regimes. *Cultivos Tropicales*, 22(4), 37-41.
- Ruan, J., Lee, Y. H., & Yeoung, Y. R. (2013). Flowering and fruiting of day-neutral and ever-bearing strawberry cultivars in high-elevation for summer and autumn fruit production in Korea. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54(2), 109-120.
- Sabagh A.E., Mbarki S., Hossain A., Iqbal M., Islam M., Raza A., Llanes A., Reginato M., Rahman M., Mahboob W., Singhal R., Kumari A. (2021) Potential role of plant growth regulators in administering crucial processes against abiotic stresses. *Frontiers in Agronomy*, 3, 648694.
- Sabagh, A. E., Hossain, A., Islam, M. S., Iqbal, M. A., Raza, A., Karademir, Ç., Karademir, E., Rehman, A., Rahman, M. A., & Singhal, R. K. (2020). Elevated CO₂ concentration improves heat-tolerant ability in crops. In *Abiotic Stress in Plants* (pp. 47-61). London, UK: IntechOpen.
- Saeed, F., Chaudhry, U. K., Raza, A., Charagh, S., Bakhsh, A., Bohra, A., ... & Varshney, R. K. (2023). Developing future heat-resilient vegetable crops. *Functional & integrative genomics*, 23(1), 47.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S., & Shukla, D. S. (1997). Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 178, 171-178.
- Sairam, R. K., Srivastava, G. C., & Saxena, D. C. (2000). Increased antioxidant activity under elevated temperatures: A mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologica Plantarum*, 43(2), 245-251.
- Salvucci, M. E., & Crafts-Brandner, S. J. (2004). Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology*, 134, 1460–1470.

- Sangster, T. A., & Queitsch, C. (2005). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(1), 44-48.
- Sangwan, S., Ram, K., Rani, P., & Munjal, R. (2018). Effect of terminal high temperature on chlorophyll content and normalized difference vegetation index in recombinant inbred lines of bread wheat. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(6), 1174-1183.
- Sanmiya, K., Suzuki, K., Egawa, Y., & Shono, M. (2004). Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *FEBS letters*, 557(1-3), 265-268.
- Sarıdaş, M. (2022). Çilek ıslahında ülkemizin mevcut durumu ve hedef [The current situation and goals of strawberry breeding in our country]. *E-Çilek Antalya İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Antalya Ticaret Borsası, Antalya Tarım Konseyi*, 234, 14-22.
- Sarkar, N.K., Kim, Y.K., & Grover, A. (2009). Rice sHSP genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. *BMC genomics*, 10(1), 1-17.
- Savchenko, G.E., Klyuchareva, E.A., Abrabchik, L.M., & Serdyuchenko, E.V. (2002). Effect of periodic heat shock on the membrane system of etioplasts. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49(3), 349-359.
- Savicka, M., Škute, N. (2010). Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija [Ecology]*, 56, 26-33.
- Savvides, A., Ali, S., Tester, M., & Fotopoulos, V. (2016). Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: Mission possible?. *Trends in Plant Science*, 21(4), 329-340.
- Scafaro, A. P., Haynes, P. A., & Atwell, B. J. (2010). Physiological and molecular changes in *Oryza meridionalis* Ng., a heat-tolerant species of wild rice. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 191-202.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carnici, P., Hayashizaki, Y., & Shinozaki, K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 13(1), 61-72.
- Shahid, M.A., Balal, R.M., Pervez, M.A., et al. (2014). Exogenous proline and proline-enriched *Lolium perenne* leaf extract protects against phytotoxic effects of nickel and salinity in *Pisum sativum* by altering polyamine metabolism in leaves. *Turkish Journal of Botany*, 38(5), 914-926.
- Shahzad, A., Ullah, S., Dar, A. A., Sardar, M. F., Mehmood, T., Tufail, M. A., ... & Haris, M. (2021). Nexus on climate change: Agriculture and possible solution to cope future climate change stresses. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 14211-14232.
- Sharkey, T.D. (2005). Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant Cell and Environment*, 28(3), 269-277.
- Sharma, N., Thakur, M., Suryakumar, P., Mukherjee, P., Raza, A., Prakash, C. S., & Anand, A. (2022). 'Breathing Out' under heat stress—respiratory control of crop yield under high temperature. *Agronomy*, 12(4), 806.
- Shaw, D. V., & Famula, T. R. (2005). Complex segregation analysis of day neutrality in domestic strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Euphytica*, 145(3), 331-338.
- Sheng, X., Xia, Z., Yang, H., & Hu, R. (2024). The ubiquitin codes in cellular stress responses. *Protein & Cell*, 15(3), 157-190.

- Shiber, A., Breuer, W., Brandeis, M., & Ravid, T. (2013). Ubiquitin conjugation triggers misfolded protein sequestration into quality control foci when Hsp70 chaperone levels are limiting. *Molecular Biology of the Cell*, 24(13), 2076-2087.
- Singh, K. B., Foley, R. C., & Onate-Sanchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 430-436.
- Sita, K., Sehgal, A., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K.H.M., & Nayyar, H. (2017). Identification of High-Temperature tolerant Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Genotypes through leaf and pollen traits. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-27.
- Sorkel, K., S., Gaganpreet, & Kassim Al-K. (2006). Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Growth and productivity as affected by temperature. *Horticultural Science*, 41(6), 1423-1430.
- Srinivas, V., & Balasubramanian, D. (1995). Proline is a protein-compatible hydrotrope. *Langmuir*, 11, 2830–2833.
- Srivastava, S., Pathak, A.D., Gupta, P.S., Shrivastava, A.K., & Srivastava, A.K. (2012). Hydrogen peroxide-scavenging enzymes impart tolerance to high temperature-induced oxidative stress in sugarcane. *Journal of Environmental Biology*, 33, 657–661.
- Stewart, P.J., & Folta K.M. (2010). A review of photoperiodic flowering research in strawberry (*Fragaria* spp.). *Critical Reviews in Plant Science*, 29(1), 1-13.
- Stone, S.L., & Callis, J. (2007). Ubiquitin ligases mediate growth and development by promoting protein death. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(6), 624-632.
- Strik, B.C. (1985). Flower bud initiation in strawberry cultivars. *Fruit Varieties Journal (USA)*, 31(1), 5-9.
- Su, P.H., & Li, H.M. (2008). Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology*, 146, 1231–1241.
- Sun, W., Montagu, M.V., & Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1577(1), 1-9.
- Suzuki, N., & Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 45-51.
- Swindell W.R., et al. (2007). Global expression profiling of long-lived proteins during aging in transparent to segmental aneuploidy (TSA) mice. *Aging Cell*, 6(6), 673-684.
- Taylor, D.R. (2002). The Physiology of Flowering in Strawberry. *Acta Horticulturae*, 567, 245-251.
- Tyagi A., & Chandra A. (2006). Isolation of stress responsive PsbA gene from rice (*Oryza sativa* L.) using differential display. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 43, 244-246.
- Verheul M.J., Sønsteby A., & Grimstad S.O. (2005). Interactions of photoperiod, temperature, duration of short-day treatment and plant age on flowering of *Fragaria × ananassa* Duch. cv. Korona. *Scientia Horticulturae*, 103(2), 167–177.
- Vidya, S. M., Kumar, H. V., Bhatt, R. M., Laxman, R. H., & Ravishankar, K. V. (2018). Transcriptional profiling and genes involved in acquired thermotolerance in Banana: a non-model crop. *Scientific Reports*, 8(1), 10683.
- Wagstaffe, A., & Battey, N. H. (2004). The optimum temperature for long-season cropping in the everbearing strawberry everest. *Acta Horticulturae*, 708, 45-50.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199-223.

- Wahid, A., & Close, T. J. (2007). Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum*, 51(1), 104–109.
- Wahid, A., & Shabbir, A. (2005). Induction of heat stress tolerance in barley seedlings by pre-sowing seed treatment with glycinebetaine. *Plant Growth Regulation*, 46, 133-141.
- Wang W., Vinocur B. and Altman A. (2003). Plant responses to drought ,salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance.Planta , 218(1), 1-14.
- Wang J., Cui L., Wang Y., Li J. (2009) Growth, lipid peroxidation and photosynthesis in two tall fescue cultivars differing in heat tolerance. *Biologia Plantarum*, 53, 237–242.
- Wang, H., Guo, X., Lambert, K.N., Lin, Y.,& Zhang, J. (2007). Developmental control of Arabidopsis seed oil biosynthesis pathway by a histone H3 K4 demethylase. *Science*, 316(5830), 1460-1462.
- Wang, S. Y., & Camp, M. J. (2000). Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. *Journal American Society for Horticultural Science*, 85(3), 183-199.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2006). Effect of plant growth temperature on membrane lipids in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 108(1), 35-42.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wang, X., Cai, X., Xu, C., Wang, Q.,& Dai, S. (2016). Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1706.
- Wang, X., Cheng, L., Peng, W., Xie, G., Liu, Z., & An, F. (2022). Identification of Sieve Element Occlusion Gene (SEOs) Family in Rubber Trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) provides insights to the mechanism of Laticifer Plugging. *Forests*, 13(3), 433.
- Waraich, E. A., Ahmad, R., Halim, A., & Aziz, T. (2012). Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12(2), 221-244.
- Wassie, M., Zhang, W., Zhang, Q., Ji, K., & Chen, L. (2019). Effect of heat stress on growth and physiological traits of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and a comprehensive evaluation for heat tolerance. *Agronomy*, 9(10), 597.
- Waters, E. R., Aebermann, B. D., & Sanders-Reed, Z. (2008). Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. *Cell Stress and Chaperones*, 13(2), 127-142.
- Wilson, I. D., Neill, S. J., & Hancock, J. T. (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*, 31(5), 622-631.
- Wise, R. R., Olson, A. J., Schrader, S. M., & Sharkey, T. D. (2004). Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant, Cell & Environment*, 27(6), 717-724.
- Wright, M. W. (2014). A short guide to long non-coding RNA gene nomenclature. *Human genomics*, 8, 1-4.
- Wu, X., Shiroto, Y., Kishitani, S., Ito, Y., & Toriyama, K. (2009). Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant cell reports*, 28, 21-30.
- Yamori, W., Hikosaka, K., & Way, D. A. (2014). Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research*, 119, 101-117.

- Yin, H., Chen, Q., & Yi, M. (2008). Effects of short-term heat stress on oxidative damage and responses of antioxidant system in *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regulation*, 54, 45-54.
- Yokotani, N., et al. (2008). Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*.
- Yu, D., Tang, H., Zhang, Y., Du, Z., Yu, H., & Chen, Q. (2012). Comparison and improvement of different methods of RNA isolation from strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Journal of Agricultural Science*, 4(7), 51.
- Zhang, X., Zhou, Q., Wang, X., Cai, J., Dai, T., Cao, W., & Jiang, D. (2016). Physiological and transcriptional analyses of induced post-anthesis thermo-tolerance by heat-shock pretreatment on germinating seeds of winter wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 131, 181-189.
- Zhang, C., Feng, B., Chen, T., Zhang, X., Tao, L., & Fu, G. (2017). Sugars, antioxidant enzymes and IAA mediate salicylic acid to prevent rice spikelet degeneration caused by heat stress. *Plant Growth Regulation*, 83(3), 313-323.
- Zhang, H., Li, W., Dai, Y., & Liang, Z. (2019). Transcriptome analysis of wheat seedlings in response to high temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1040.
- Zhang, J. H., Huang, W. D., Liu, Y. P., & Pan, Q. H. (2005). Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(8), 959-970.
- Zhang, J., Klueva, N. Y., Wang, Z., Wu, R., David Ro, T.-H., & Nguyen, H. T. (2000). Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 36(2), 108-114.
- Zhang, M., Barg, R., Yin, M., Gueta-Dahan, Y., Leikin-Frenkel, A., & Salts, Y. (2005). Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct omega-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *Plant Journal*, 44(3), 361-371.
- Zhang, Y., Chou, S. D., Murshid, A., Prince, T. L., Schreiner, S., Stevenson, M. A., & Calderwood, S. K. (2011). The role of heat shock factors in stress-induced transcription. *Molecular Chaperones: Methods and Protocols*, 21-32.
- Zhang, Y., Lai, X., Yang, S., Ren, H., Yuan, J., Jin, H., ... & Xia, G. (2021). Functional analysis of tomato CHIP ubiquitin E3 ligase in heat tolerance. *Scientific Reports*, 11(1), 1713.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.

ÖZ GEÇMİŞ

2016 yılında Peşaver-Pakistan Ziraat Üniversitesi, Bitkisel Üretim Bilimleri Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nden mezun oldu. Konu: "Yapraktan Hümik Asit Uygulamasının Chandler Çilek Çesidin Büyüme ve Verimine Etkisi ". 2018 yılında Peşaver-Pakistan Ziraat Üniversitesi, Bitkisel Üretim Bilimleri Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nden yüksek lisans derecesi, aldım. Konu: "Hasat Aşamalarının Greyfurtun Hasat Sonrası Performansına Etkisi ".

İletişim Bilgileri

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0293-1979>

Yayınlar:

1. Toor, M. D., Kizilkaya, R., Ullah, I., Koleva, L., Basit, A., & Mohamed, H. I. (2023). Potential Role of Vermicompost in Abiotic Stress Tolerance of Crop Plants: a Review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-23 (Impact Factor: 3.9).
2. Izhar Ullah, Kamel, E. A., Shah, S. T., Basit, A., Mohamed, H. I., & Sajid, M. (2022). Application of RNAi technology: a novel approach to navigate abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*, 49(11), 10975-10993. (Impact Factor: 2.7)
3. Izhar Ullah, Syed Tanveer Shah, Abdul Basit, Muhammad Sajid, Muhammad Arif, Noman Ahmad and Fahad Noor. Mulching: A New Concept for climate Smart Agriculture. Under publication in book entitled "Mulching in Agroecosystems. Akhtar et al. (eds). Springer Nature Singapore Pte Ltd. 152 Beach Road, #21-01/04 Gateway East, Singapore 189721, Singapore
4. Izhar ULLAH, Adis LIZALO, Derviş Emre Doğan, Yahya URAY, Hasan Hamid RASHID, Ahmed alkarkookli. 2021. Relevance of mulching in strawberry cultivation. *International Cappadocia scientific research Congress Cappadocia-Nevşehir*. 318-325
5. Dakheel, M. G., Ullah, I., Doğan, D. E., & Demirsoy, L. (2022). Potential role of salicylic acid on drought stress tolerance of strawberry plants. *Eurasians Soil symposium on Soil Science and Plant Nutrition Samsun Turkey*. 269-275/

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. Lisansüstü öğrenciler için Türkiye Bursları " (2018-2023) – Türkiye
2. Erasmus +Program- Türkiye
3. "PM Gençlik Staj Programı" (2016-2017) – Pakistan Hükümeti
4. Naway Sahar dizüstü bilgisayar Programı - Yüksek Öğrenim - Khyber Pakhtunkhwa Hükümeti Pakistan.