



**AĞIR METAL STRESİ ALTINDA *Phaseolus vulgaris* L.
miR172 GEN AİLESİ ÜYELERİNİN GENOM ÇAPLI
ANALİZİ**

Burak Muhammed ÖNER

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Emre İLHAN**

**2024
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AĞIR METAL STRESİ ALTINDA *Phaseolus vulgaris* L. miR172 GEN AİLESİ
ÜYELERİNİN GENOM ÇAPLI ANALİZİ**

Burak Muhammed ÖNER

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emre İLHAN

Ana Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2024

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

09 / 02 / 2024

İmzası

Burak Muhammed ÖNER

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AĞIR METAL STRESİ ALTINDA *Phaseolus vulgaris* L. miR172 GEN AİLESİ ÜYELERİNİN GENOM ÇAPLI ANALİZİ

Burak Muhammed ÖNER

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emre İLHAN

Fasulye insan beslenmesinde kullanılan önemli bir baklagildir. Ancak bitkiler sesil organizmalar olmaları nedeniyle doğal ekosistem içerisinde birçok biyotik ve abiyotik stres faktörleri ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu zorlayıcı faktörlerden biri de antropojenik faaliyetler sonucu meydana gelen ağır metal stresidir. Ağır metaller bitkinin büyümesini, verimi ve kalitesini etkileyerek ciddi bir toksisiteye neden olmaktadır. Bitkiler bu stres faktörleri ile başa çıkmak için hedef genlerin ifadesini düzenleyen mikroRNA'ları kullanmaktadır. miRNA'lar bitki büyümesi ve gelişimi ile ilgili yollarda yer alan genleri hedeflemektedir. Ayrıca stres ile ilişkili genlerinin ifadesini düzenleyerek bitkinin stres toleransı kazanmasına da yardımcı olmaktadır. Bu miRNA'lardan biri olan miR172 bitki büyüme ve gelişim süreçlerinde önemli roller oynamaktadır. miRNA'ların uygulanan türe ve ağır metal dozuna bağlı olarak farklı seviyede ifade olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı dört farklı ağır metal stresinde miR172 ve hedef genlerinin yanıtlarını öğrenmek ve biyoinformatik olarak miR172 gen ailesi üyelerinin genom çaplı analizidir. Yapılan çalışmada 6 *Pvul-miR172* tanımlanmıştır. Bu miRNA'ların stres ile ilişkili cis-etkili elementlere sahip olduğu bulunmuştur. Hedef genlerinin membran üzerinde bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri olduğu tespit edilmiştir. *Pvul-miR172* ve hedef genlerinin strese ve genotipe bağlı olarak farklı ifade seviyeleri gösterdiği görülmüştür. Elde edilen sonuçların miRNA tabanlı genetik mühendisliği uygulamalarıyla ağır metal stresine dayanıklı mahsul çeşitlerinin geliştirilmesine katkıda bulunulması amaçlanmaktadır.

2024, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Fasulye, Ağır metal stresi, miRNA, miR172, AP2, Genom çaplı analiz, qRT-PCR, Biyoinformatik

ABSTRACT

MS. Thesis

GENOME WIDE ANALYSIS of *Phaseolus vulgaris* L. miR172 GENE FAMILY MEMBERS under HEAVY METAL STRESS

Burak Muhammed ÖNER

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emre İLHAN

Common Beans are an important legume used in human nutrition. However, since plants are sessile organisms, they face many biotic and abiotic stress factors in the natural ecosystem. One of these challenging factors is heavy metal stress caused by anthropogenic activities. Heavy metals cause serious toxicity by affecting plant growth, yield and quality. To cope with these stress factors, plants use microRNAs that regulate the expression of target genes. miRNAs target genes involved in pathways related to plant growth and development. It also helps the plant gain stress tolerance by regulating the expression of stress-related genes. One of these miRNAs, miR172, plays important roles in plant growth and development processes. It is known that miRNAs are expressed at different levels depending on the applied species and heavy metal dose. The aim of this study is to learn the responses of miR172 and its target genes to four different heavy metal stresses and to bioinformatically perform genome-wide analysis of miR172 gene family members. In the study, 6 *Pvul-miR172* were identified. These miRNAs were found to have cis-acting elements associated with stress. It has been determined that their target genes have binding and carrier functions on the membrane. *Pvul-miR172* and its target genes were observed to show different expression levels depending on stress and genotype. The results obtained are aimed to contribute to the development of crop varieties resistant to heavy metal stress through miRNA-based genetic engineering applications.

2024, 60 pages

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, Heavy metal stress, miRNA, miR172, AP2, Genome-wide analysis, qRT-PCR, Bioinformatics

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, oluşturduğu çalışma ortamı ile donanımlı bir araştırmacı olabilme imkânı sunan ve tez çalışmamın tüm aşamalarında her türlü desteği sakınmadan gösteren çok değerli hocam ve danışmanım Sayın Doç. Dr. Emre İLHAN'a,

Çalışmalarım sırasında istatistiksel analiz ve tez yazımında bana yardımcı olan ve bilimsel olarak farklı bakış açıları kazandıran Sayın Prof. Dr. Murat AYDIN'a (Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı),

Hem yüksek lisans eğitimi ve laboratuvar çalışmalarına uyum sağlama aşamasında hem de tez çalışmamın yazım ve laboratuvar deneyleri sırasında bana destek olan değerli çalışma arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Ayşe Gül KASAPOĞLU'na, doktora öğrencileri Uzman Selman MUSLU'ya ve Ahmed Sidar AYGÖREN'e, Ziraat Yüksek Mühendisi Sümeyra UÇAR'a ve Esra YAPRAK'a, Moleküler Biyolog Recep AYDINYURT'a ve Murat ISİYEL'e, yüksek lisans öğrencileri Cemile GÜNEŞ'e, Azize BUTTANRI'ya, Bilgehan YILDIRIM'a ve Zeliha DOLAŞ'a, lisans öğrencisi Sevim ÇAPAR'a,

Laboratuvar kullanım imkânı sağlayan Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvar Koordinatörlüğüne,

Tez çalışmama sundukları maddi kaynaklar sebebiyle Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Yorucu tez sürecinde her daim yanımda olan ve hiçbir zaman esirgemediği desteğiyle bana güç veren Simay ALDAĞ'a,

Hayatım boyunca her koşulda gerek maddi gerekse manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, her verdiğim kararda arkamda duran, bana gösterdikleri güven ile

özgürce, cesaret içerisinde hareket edebilmemi sağlayan çok kıymetli ve saygıdeğer annem Reyhan ÖNER'e, babam Coşkun ÖNER'e ve kardeşim Ahmet Salih ÖNER'e,

Desteklerinden ötürü sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Burak Muhammed ÖNER

Şubat 2024



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Fasulyedeki miR172 Gen Ailesinin Tanımlanması	20
3.2. <i>Pvul-miR172</i> Gen Ailesi Üyelerinin Korunmuşluk Düzeyi ve Filogenetik Analizi	20
3.3. <i>Pvul-miR172</i> Gen Ailesi Üyelerinin Düzenleyici Element Analizi	20
3.4. <i>Pvul-miR172</i> Gen Ailesi Üyelerinin Hedef Genlerinin GO Analizi	21
3.5. Çalışmada Kullanılacak Bitki Materyalinin Belirlenmesi	21
3.6. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulamaları	21
3.7. Bitkilerden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	22
3.7.1. Total RNA izolasyonu.....	22
3.7.2. RNA konsantrasyon tayini ve agaroz jel elektroforezi	23
3.7.3. cDNA sentezi	23
3.7.4. miRNA'ların saptanması ve miR-cDNA sentezi	24
3.8. miRNA Kantitatif Real Time (qRT PCR) Analizleri	26
3.8.1. qRT PCR yardımıyla miRNA ifade seviyelerinin tespiti	26
3.8.2. <i>Pvul-mir172</i> hedef genlerin tahmini ve qRT PCR yardımıyla ifade seviyelerinin analizi.....	27
3.9. qRT PCR Analizi İçin Tasarlanmış Stem-Loop, miRNA ve Hedef Gen Primerleri	28
3.10. Analiz Verilerinin Değerlendirilmesi.....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	30
4.1. Fasulyedeki miR172 Gen Ailesi Üyelerin Genom Çaplı Analizi	30
4.2. <i>Pvul-miR172</i> Gen Ailesi Üyelerin Evrimsel İlişkisi	32

4.3. Pvul-miR172 Gen Ailesi Üyelerinin Cis-Etkili Elementlerin Tahmini	34
4.4. <i>Pvul-miR172</i> Hedef Genlerinin Fonksiyonel Analizi	35
4.5. Pvul-miR172 ve Hedef Genlerin Kantitatif Real Time Analizi	36
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR	44



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
-----------------	-----------------

°	Derece
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram
C	Santigrat
cm ⁻³	Santimetre küp
mM	Milimolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram

Kısaltmalar

AP2	APETALLA2
cDNA	Komplementer DNA
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FAOSTAT	Gıda ve Tarım Örgütü Kurumsal İstatistik Veritabanı
GA	Giberellik Asit
miRNA	MikroRNA
ncRNA	KodlanmayanRNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sncRNA	Küçük kodlanmayan RNA
SPL	SQUAMOSA PROMOTÖR BAĞLAYICI PROTEİN BENZERİ
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>Pvul-miR172</i> gen ailesi üyelerinin kromozomal lokasyonları.....	31
Şekil 4.2. <i>Pvul-miR172</i> gen ailesi üyelerinin ikincil yapıları	32
Şekil 4.3. <i>Pvul-miR172</i> gen ailesi üyelerinin korunmuşluk analizi	33
Şekil 4.4. <i>Pvul-miR172</i> gen ailesi üyelerinin filogenetik analizi.....	34
Şekil 4.5. <i>Pvul-miR172</i> gen ailesi üyelerinin farklı süreçlerde görev alan cis-etkili elementlerinin tahmini	35
Şekil 4.6. <i>Pvul-miR172</i> hedef genlerinin GO analizi.....	36
Şekil 4.7. G53 ve G68 genotiplerinde ağır metal stresleri altında <i>Pvul-miR172</i> hedef genlerinin qRT-PCR analizi	37
Şekil 4.8. G53 ve G68 genotiplerinde ağır metal stresleri altında <i>Pvul-miR172</i> gen aile üyelerinin qRT-PCR analiz	38
Şekil 4.9. Ağır metal stresleri altında G53 ve G68 genotiplerinde <i>Pvul-miR172a</i> ve hedef genlerinin qRT-PCR analizleri	39
Şekil 4.10. Ağır metal stresleri altında G53 ve G68 genotiplerinde <i>Pvul-miR172c</i> ve hedef genlerinin qRT-PCR analizleri.....	40
Şekil 4.11. Ağır metal stresleri altında G53 ve G68 genotiplerinde <i>Pvul-miR172d</i> ve hedef genlerinin qRT-PCR analizleri.....	41
Şekil 4.12. Ağır metal stresleri altında G53 ve G68 genotiplerinde <i>Pvul-miR172f</i> ve hedef genlerinin qRT-PCR analizleri.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. RNA-stem-loop sentez düzeni.....	26
Çizelge 3.2. qRT PCR analizinde kullanılan <i>Pvul-miR172</i> primerleri	28
Çizelge 3.3. qRT PCR analizinde kullanılan <i>Pvul-miR172</i> hedef genlerin primerleri ...	29
Çizelge 4.1. <i>P. vulgaris</i> miR172 gen ailesi üyelerinin bilgileri.....	30



1. GİRİŞ

Tahminler 2030 yılında 600 milyon insanın yetersiz beslenme yüzünden açlık ile karşı karşıya kalacağını öngörmektedir (FAO 2023). Bu nedenle insanların beslenme ihtiyaçlarını karşılamak adına alternatif protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Baklagiller sahip oldukları agronomik ve besinsel özellikler bakımından bu gereksinimlerin karşılanmasında önemli bir tarımsal ürün olarak öne çıkmaktadır (Multari et al. 2015). Düşük maliyeti, yüksek protein içeriği ve sağlık açısından sunduğu çeşitli faydalar sebebiyle oldukça önemli bir besin kaynağı olarak görülmektedir (Klupšaitė and Juodeikienė 2015). Dünya genelinde üretimi en fazla yapılan baklagil olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) 54,3 g/100g karbonhidrat, 20,9 g/100g protein ve 8,55 g/100g lif içeriğine sahiptir (de Almeida Costa et al. 2006). FAOSTAT'da yer alan verilere göre dünyadaki fasulye üretimi 2021 yılında yaklaşık 36,5 milyon hektar ekim alanında 28,53 milyon ton iken 2022 yılında bu sayı yaklaşık 36,7 milyon hektar ekim alanında 28,34 milyon ton olarak gerçekleştirmiş ve 2022 yılında üretimi en fazla yapılan baklagil olmuştur. Ancak 2022 yılında dünyadaki baklagiller verim açısından değerlendirildiğinde fasulye diğer baklagillerin gerisinde kalmıştır (Anonymous 2024a). TÜİK verilerine göre ülkemizdeki fasulye üretimi ise 2021 yılında yaklaşık 107 bin hektar alanda 305 bin ton iken 2022 yılında yaklaşık 97 bin hektar alanda 270 bin ton olarak gerçekleştirilmiştir. 2023 yılında ise 240 bin ton üretilerek giderek azalan bir seyir izlemiş ve nohut (580 bin ton) ile mercimeğin (424 bin ton) gerisinde kalmıştır (Anonim 2024).

Bitkiler yaşadıkları ortamda iki tür stres faktörüne maruz kalmaktadır. Bunlardan biri araknidler, bakteriler, böcekler, mantarlar, nematodlar ve yabancı otların sebep olduğu biyotik streslerdir. Diğeri ise aşırı sulama, aşırı yüksek ya da düşük sıcaklık, ağır metal, kuraklık ve tuzluluk gibi bitki büyümesi, gelişimi, tohum kalitesi ve verimini etkileyen abiyotik streslerdir (Gull et al. 2019). Çevresel koşulların artarak kötüleşmesiyle beraber meydana gelen biyotik ve abiyotik stresler bitkisel üretim kalitesi ve miktarını önemli ölçüde azaltmaktadır (Wang et al. 2013). Bitkisel üretim verimi abiyotik streslerden kaynaklı ciddi şekilde etkilenirken küresel ısınma, kentlerdeki nüfus artışı ve çevrede meydana gelen değişiklikler ile birlikte bu etkinin gelecekte daha da artması beklenmektedir (Praveen et al. 2023). Doğal ve antropojenik faaliyetler sonucunda tarım

arazilerinde meydana gelen ağır metal konsantrasyonlarındaki artış bitkisel üretimin yanı sıra insan sağlığı açısından ciddi derecede olumsuz etkiler yaratmaktadır (Bhat et al. 2019). Ayrıca atıkların hatalı biçimde yönetimi ve hızlı sanayileşme faaliyetleri çevre kirliliğinin artmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı insan sağlığı ve ekolojik tehlikeler nedeniyle kirlenmiş alanların yönetilmesi ve iyileştirilmesine yönelik çalışmaların ihtiyacı ortaya çıkmıştır (Hakeem et al. 2014). Ağır metallerin kontrolsüz şekilde bitkiler tarafından alınması, yer altı ve yüzey sularına karışması ve gıda zincirine dahil olma olasılığı sebebiyle halk sağlığı ve tüm ekosistemler için büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Grobelaç and Kowalska 2020).

Bitki, hayvan ve insan yaşamında bulunan elementler makro ve mikro (iz) elementler olarak sınıflandırılabilir. İz elementler ise hem temel hem de temel olmayan elementleri içermektedir (Asati et al. 2016). Bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), kalsiyum (Ca), kobalt (Co), krom (Cr), mangan (Mn) ve nikel (Ni) gibi metaller bitkiler ve insanlar için temel metaller sınıfına girmektedir. Bu metaller canlı organizmalarda çeşitli biyolojik süreçlerin devam etmesi için önemli roller oynamaktadır. Arsenik (As), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve civa (Hg) gibi metaller de temel olmayan metal sınıfına girmektedir. Bu metal sınıfı hem bitkiler hem de insanlar üzerinde toksik etkiler yaratabilmektedir (Mekassa and Chandravanshi 2015; Bibi et al. 2023). Ağır metal terimi bazen 7 g/cm³ yoğunluğun üzerinde ya da 5 g/cm³ yoğunluğun altındaki metaller için kullanılsa da genellikle 5 g/cm³ yoğunluğun üzerindeki metaller için kullanılan bir terimdir (Barakat 2011; Ali and Khan 2018). Önemli ağır metallerden arsenik 5,776 g/cm³, kadmiyum 8,69 g/cm³, nikel 8,912 g/cm³ ve kurşun 11,342 g/cm³ yoğunluğa sahiptir (Anonymous 2024b).

Biyolojik sistemler doğası gereği dinamik yapılara sahip olmaları nedeniyle çevresel ve genetik değişikliklere yanıt vererek adaptasyon sağlamaya çalışmaktadırlar. Bitki büyümesi, gelişimi ve verimliliğini etkileyen abiyotik stresler bitkilerde bir dizi biyokimyasal, fizyolojik, moleküler ve morfolojik değişikliğe neden olmaktadır (Wani et al. 2016). Ağır metal toksisitesinin belirtileri arasında bodur bitki boyu, düşük biyokütle üretimi, kloroz, nekroz, sınırlı tohum sayısı, solgunluk, yaprak sararması, yaşlanma ve sonunda bitki ölümü yer almaktadır. Meydana gelen bu belirtiler ağır metallerin enzim aktivitesine ve iyon homeostazına müdahalesinin bir sonucudur (DalCorso et al. 2013).

Bu fitotoksik etkiler hücresel yapılara zarar veren ve metabolik faaliyetleri durduran besin dengesizliğine sebep olmaktadır. Ayrıca bitki hücrelerinde oksidatif yıkımın tetiklenmesi, toksik ağır metallerin birikmesi ve sitoplazmik enzim inhibisyonları şiddetlendirici izler bırakmaktadır (Jamla et al. 2021). Reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi enzimlerin inhibisyonuna, DNA ve RNA hasarına, membran lipid peroksidasyonuna ve protein oksidasyonuna sebep olarak bitki hücre ölümüne yol açacak olan oksidatif süreçlerin başlaması ile sonuçlanmaktadır (Mittler 2002; Sahu et al. 2022). Ağır metallerin organeller ve hücresel makromoleküller ile etkileşime girebildiği gösterilmiştir. Ağır metaller yaygın olarak bitki hücresi içerisinde yer alan katyonlarla yer değiştirerek veya ağır metal iyonlarının kofaktörlerin aktif gruplarına bağlanması ile hasar verici etkilere yol açmaktadır. Ağır metallerin bitki hücre ve dokularına alımı, yer değişimi ve hareketliği çoğunlukla ağır metal konsantrasyonuna, ağır metal çeşidine ve bitki türüne bağlıdır (Emamverdian et al. 2015).

Ağır metaller bitkilerdeki toksik etkilerini göstermek için temel olarak dört mekanizma kullanmaktadır (DalCorso et al. 2013). İlk yol bitki köklerinde benzer besin katyonlarının ve oksianyonların emilim için rekabete girmesidir. Örnek olarak arsenat (AsO_4^{3-}) ve fosfat (PO_4^{3-}) oksianyonları verilebilir (Vetterlein et al. 2007). İkinci etki mekanizması ağır metallerin sülfhidril (-SH) grupları ile etkileşime girmesidir. As, Cd ve Pb proteinlerde bulunan sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girerek sistein rezidülerine bağlanmakta ve enzimler de dahil olmak üzere birçok proteinin yapısı ve işlevini bozmaktadır. Ayrıca Pb gibi bazı metaller de proteinlerin karboksil ($-\text{COOH}$) gruplarıyla etkileşime girerek benzer olumsuz etkilere sebep olabilmektedir (Morel et al. 1986; Quig 1998). Üçüncü yol Cu ve Zn gibi redoks aktif metallerin doğrudan fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss döngüsü yoluyla ROT üretmesidir. Bunun yanında Cd ve Pb gibi redoks inaktif metaller ise özellikle Glutasyon (GSH) ve taurin gibi tiyol içeren antioksidanlar ile enzimlere hasar vermektedir. Böylelikle oksidatif stresin indüklenmesine neden olabilmektedirler (Ercal et al. 2001; DalCorso 2012). Son etki mekanizması ise enzim ve sinyal proteinlerindeki temel iyonların ağır metal iyonları ile yer değiştirmesidir (DalCorso et al. 2013). Cd ile Pb, kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2}) gibi iki değerliğe sahip minerallere karşı biyofizikokimyasal olarak benzerlikleri nedeniyle onları taklit etme ve belli bölgelerde onların yerini alma kapasitesine sahiptir (Witkowska et al. 2021). Cd'un Ca^{+2} ile yer değiştirmesi sonucunda hücre sinyalizasyonunda görev alan

kalmoduline bağlı fosfodiesteraz aktivitesinin inhibisyona uğradığı gözlemlenmiştir (Rivetta et al. 1997). Ayrıca Pb'un protein kinaz C enzimindeki C2 domaininde Ca^{+2} bağlanma motifinde meydana gelen etkileşimler yoluyla kinaz aktivitesinin inhibisyonuna sebep olduğu bulunmuştur (Sun et al. 1999).

Bitkiler maruz kaldığı çeşitli stres faktörleri karşısında bu streslere yanıt verecek birçok mekanizma geliştirmiştir (Verma et al. 2013). Bitkiler ağır metal alımı ve birikimini kontrol ederek bu değişikliklere cevap verebilmektedir. Bu cevaplardan biri bitkilerin hücrel metal homeostazını ve detoksifikasyonunu sağlamak için fitoşelatin ve metalloprotein gibi belirli ligandlar tarafından ağır metallerin şelasyonu ve sekretasyonu yapmasıdır (Rauser 1999; Cobbett and Goldsbrough 2002). Bunun yanında ağır metal toleransında ABC (ATP bağlanma kaseti) taşıyıcıları, CDF (katyon difüzyon kolaylaştırıcısı) ve NRAMP (doğal dirençle ilişkili makrofaj proteinleri) gibi metal taşıyıcıları da görev almaktadır (Thomine et al. 2000; Blaudez et al. 2003; Huang et al. 2012). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda ağır metal stresinde bZIP (bazik lösin fermuar), ERF (etilen duyarlı faktör), MYB (miyeloblastoz protein) ve WRKY gibi transkripsiyon faktörlerinin stres yanıtlarında transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası evrelerde gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli roller aldığı gösterilmiştir (Huang et al. 2016; Tian et al. 2022; Xie et al. 2022; Khan et al. 2023). Ağır metal stresi sonucu meydana gelen oksidatif strese yanıt olarak bitkiler enzimatik yol olan apoplast, kloroplast, mitokondri, peroksizom ve sitozolde askorbat peroksidaz (APX), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) içeren askorbat-glutatyon döngüsüne sahiptir. Ayrıca kloroplastlarda süperoksit dismutaz (SOD) içeren su döngüsü ve peroksizomlarda katalaz (CAT) üretimine de sahiptir.

Bitkilerin çeşitli stres koşullarına yanıt olarak verdiği hücrel tepkiler arasında, iç içe geçmiş ve karmaşık ağlara sahip düzenleyici gen etkileşimleri yer almaktadır. Bu tepkiler içerisinde transkripsiyon sonrası düzenleyiciler olarak görev alan miRNA (mikro RNA)'lar ayrılmaz bir parçadır (Budak et al. 2015). ncRNA (non-coding; kodlanmayan RNA)'lar bitkiler arasında korunmuş olmalarına rağmen aynı abiyotik strese karşı her bitkide aynı ifade profili sergilememektedir. Bazı ncRNA'lar dokuya özgü bir ifade profili sergilerken bazıları ise belirli çevresel strese karşı oldukça duyarlıdır (Waititu et

al. 2020). ncRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesi, proteinler ve diğer ncRNA'lar ile etkileşim gibi hücre içerisinde farklı roller alabilmektedir. Ayrıca bitki gelişim ve biyotik strese yanıt olarak pleiotropik etkiler gösterebilmektedir (Samarfard et al. 2022).

ncRNA'lar temel biyolojik süreçlerde görev alan housekeeping ncRNA'lar (tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA) ve düzenleyici ncRNA'lar (miRNA, siRNA, tsRNA, circRNA, lncRNA) olmak üzere iki farklı sınıfa ayrılmaktadır (Chao et al. 2022). Ayrıca düzenleyici ncRNA'lar uzunluklarına göre küçük kodlanmayan RNA'lar (sncRNA, <200 nt) ve uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA, >200 nt) olmak üzere kategorize edilebilmektedir (Yang et al. 2016). miRNA (mikroRNA), piRNA (piwi-etkileşimli RNA) ve siRNA (kısa susturucu RNA) küçük kodlanmayan RNA'lar sınıfına girerken circRNA (sirküler RNA) ve lncRNA (uzun kodlanmayan RNA) ise uzun kodlanmayan RNA'lar sınıfına girmektedir (Morris and Mattick 2014; Hombach and Kretz 2016). Ancak bu sınıflamanın içerisinde yer alan piRNA bitkilerde bulunmamaktadır. Bu ncRNA'lara ek olarak tsRNA (tRNA'dan türetilmiş küçük RNA) ve siRNA'lar; hci-siRNA (heterokromatik siRNA), nat-siRNA (doğal antisens transkript siRNA) ve ikincil siRNA'lar da bulunmaktadır. İkincil siRNA'ların içerisinde ise siRNA'ların ikincil yapılarından oluşan phasiRNA (aşamalı ikincil siRNA) ve tasiRNA (trans-etkili siRNA) gibi ncRNA'lar da bulunmaktadır (Axtell 2013; Komiya and Nonomura 2014; Morgado and Johannes 2019; Chao et al. 2022).

Bitkilerde bulunan küçük RNA'lar sarmal yapılarına göre iki kısma ayrılır. Bunlardan birincisi tek iplikli hairpin (saç tokası) RNA öncüllerden üretilen hsRNA'lardır. İkincisi ise çift sarmallı RNA öncüllerinden üretilen siRNA'lardır. hsRNA'lar önemli küçük RNA üyesi olan miRNA'ları meydana getirir (Axtell 2013; Morgado and Johannes 2019). Bitkilerin gelişim süreçlerindeki ihtiyaçlara ve çevresel stres elementlerinin meydana getirdiği zorluklara karşı ncRNA biyogenezinin gerçekleştiği görülmüştür (Bhogireddy et al. 2021). Bitki miRNA'ları bitkilerin maruz kaldığı abiyotik stres yanıtlarında transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesi yolu ile önemli bir işleve sahiptir (Begum 2022). miRNA'lar çiçeklenme tipi, meristem yapısı ve yaprak gelişimi gibi önemli bitki gelişim olaylarının düzenlenmesinin kontrolünde kilit roller oynamaktadır (D'Ario et al. 2017).

miR156, miR159, miR160, miR164, miR166, miR167, miR171, miR172, miR390, miR395, miR398 ve miR399 gibi miRNA'lar bitki büyümesi ve gelişim aşamalarında (Reinhart et al. 2002; Meng et al. 2010; Hong and Jackson 2015; Liang et al. 2015; Wang et al. 2015; Wen et al. 2022), miR160, miR167, miR390, miR393, miR396, miR477 gibi miRNA'lar hormon biyosentezi ve sinyal ağlarında (Rubio-Somoza et al. 2009; Zhang et al. 2011; Tang et al. 2018; Tahir et al. 2022), miR156, miR166, miR169, miR172, miR408 ve miR417 gibi miRNA'lar ise çeşitli abiyotik stres yanıtlarında görev almaktadır (Jung and Kang 2007; Zhao et al. 2007; Lee et al. 2010; Yin et al. 2012; Ma et al. 2015; Yadav et al. 2023).

Çiçekli bitkiler yaşam döngüleri boyunca farklı büyüme aşamalarından geçmektedir. Eksojen ve endojen uyaranlar sayesinde bu aşamalar arasındaki geçiş düzenlenmektedir. Bu geçiş fotoperiyot, hormon biyosentezi ile sinyalleşme, ışık kalitesi ve ortam sıcaklığına bağlı olarak gerçekleşebilmektedir (Boss et al. 2004). Bitkilerde çimlenmeden sonra çiçek açmaya ve üreme yeteneğini kazanmaya başlamadan önce bitki sürgünleri belirli bir vejetatif büyüme aşamasından geçmektedir. Bu geçişin doğru zamanda sağlanması bitki üreme başarısı için bir zorunluluktur (Mathieu et al. 2009; Amasino 2010; Huijser and Schmid 2011). Bitkilerdeki vejetatif aşamadan üreme aşamasına geçişte beş ana yol bulunmaktadır. Bunlardan ilki gün uzunluğuna bağlı olarak çiçeklenme zamanının düzenlendiği fotoperiyot yoludur. İkinci yol elverişsiz koşullar sonucunda çiçeklenme için gerekli olan giberellik asit (GA) gereksiniminin karşılandığı giberellin yoludur. Üçüncü yol bitkilerin düşük sıcaklığa tepki verdiği ve sıcaklık artışı sonucunda çiçeklenmenin meydana geldiği vernalizasyon yoludur. Dördüncü yol bitkinin yaşlanmaya bağlı olarak çiçeklenmeye başladığı yaşlanma yoludur. Son yol ise fotoperiyot ve vernalizasyon yollarından bağımsız olarak hareket eden otonom yoldur. Çiçeklenme Lokusu C (FLC), Çiçeklenme Lokusu T (FT), LEAFY (LFY), Constans (CO) ve Constans 1'in Aşırı İfadesinin Baskılayıcısı (SOC1) genleri bu yolların önemli düzenleyici elemanları arasında yer almaktadır (Srikanth and Schmid 2011; Yamaguchi and Abe 2012).

Fotoperiyodik yolda gün uzunluğuna bağlı olarak CO geninin ifadesi sonucunda FT geni aktivasyonu ve sonunda çiçeklenmenin meydana gelmesi yer almaktadır. Uzun fotoperiyodik günlerde Gigantea (GI) ve CO'nun ortak aktivitesi sonrasında

yapraklardaki FT ifadesi pozitif olarak düzenlenmektedir. CO'nun transkripsiyonu ise gün ışığı ve sirkadiyen saat tarafından kontrol edilmektedir. CO işlevini fitokrom A (PHYA)'nın destekleyici ve fitokrom B (PHYB)'nin baskılayıcı etkileri yardımıyla gerçekleştirmektedir. CO geni tarafından indüklenen FT çiçeklenmenin başlatılması için yapraklardan sürgün apikal meristemlerine (SAM) doğru hareket eden uzun bir sinyal görevi görmektedir. FT'nin apikal meristeme taşınması sonucunda burada Çiçeklenme Lokusu D (FD) ve SOC1 aracılığıyla meristem kimlik düzenleyicileri indüklenmektedir (Hepworth et al. 2002; An et al. 2004; Corbesier et al. 2007; Andrés and Coupland 2012; Teotia and Tang 2015).

Vernalizasyon yolunda Vernalizasyon Duyarlı 3 (VIN3), Vernalizasyon 1 (VRN1), Vernalizasyon 2 (VRN2) ve FLC'nin yer aldığı ve çiçeklenmenin baskılanması ile sonuçlanan bir çiçeklenme kontrol mekanizması bulunmaktadır. Soğuğa bağlı olarak aktifleşen VRN1, VRN2 ve VIN3 proteinleri FLC'nin baskılanmasını sağlamaktadır. Ayrıca FLC geni diğer çiçeklenme yollarında görev alan FT ve SOC1'i baskılamaktadır. FT'nin FLC tarafından baskılanması sistemik sinyal oluşumunu engellemekte ve meristemdeki çiçeklenme zamanı geni olan SOC1'in ifadesinin baskılanmasına yol açmaktadır. Ayrıca ortam sıcaklığına bağlı olarak aktifleşen Kısa Vejetatif Faz (SVP) geninin de FT ve SOC1 ifadesini negatif yönde düzenlediği bulunmuştur. SVP geni SOC1'i baskılayarak vejetatif fazın sürdürülmesini sağlamaktadır. Bu düzenleme sırasında FLC ile etkileşimli olarak çalıştığı tespit edilmiştir (Hepworth et al. 2002; Helliwell et al. 2006; Wood et al. 2006; Searle et al. 2006; Lee et al. 2007; De Lucia et al. 2008; Li et al. 2008; Teotia and Tang 2015).

Otonom yolda bulunan FRIGIDA (FRI) FLC'nin ifade seviyesini yukarı yönde düzenlemektedir. Ayrıca FCA, FPA ve FVE proteinleri FLC ifadesini baskılayıcı aktivite göstererek çiçeklenme kontrolünde görev almaktadır. Otonom ve vernalizasyon yollarında FLC'nin aktivitesinin baskılanması sonucunda hedefleri olan FT ve SOC1'in aktivitesi pozitif olarak düzenlenir ve bu durum sonucunda çiçek oluşumunun başlaması için gerekli olan meristem kimlik düzenleyicilerinin (LFY, AP1, AG ve SEP) ifadesi tetiklenmektedir (Michaels and Amasino 1999; Geraldo et al. 2009; Amasino and Michaels 2010; Andrés and Coupland 2012; Teotia and Tang 2015).

Giberellin yolunda kısa günlerdeki GA aktivitesinin çiçek meristemindeki önemli genlerden biri olan LFY ve SOC1 genleri aktivitesinin artmasına yol açtığı görülmüştür. Bu yoldaki bir diğer önemli bileşen DELLA proteindir. DELLA çiçeklenme için gerekli olan giberellik asit ve onun etkilediği FT ifade seviyelerinin kontrolünde bir baskılayıcı olarak görev almaktadır. DELLA geninin LFY ve SOC1'i baskılayarak çiçeklenmeyi geciktirdiği gösterilmiştir (Blázquez et al. 1998; Moon et al. 2003; Achard et al. 2007; Willige et al. 2007; Hisamatsu and King 2008).

Yaşlanma yolunda ise miR156 ve miR172'nin hedef genleri yoluyla çiçeklenme sürecini yönetmesi yer almaktadır. miR156 ifadesi bitkilerin gençlik dönemi ve gelişimi için oldukça gereklidir. Bitkiler yaşlandıkça miR156'nın ifade seviyelerinde bir azalış meydana gelirken miR172'nin ifade seviyeleri giderek artmaktadır. SPL (SQUAMOSA PROMOTÖR BAĞLAYICI PROTEİN BENZERİ) genleri bu ifade profilini AP2 (APETALA 2) genini düzenleyerek yönetmektedir. miR172 hedefleri yoluyla (TOE1, TOE2, TOE3 SMZ, SNZ) çiçeklenme zamanını düzenleyebilmektedir. Bu genler FT ve SOC1 ifadesini etkileyebilmektedir (Jung et al. 2007; Mathieu et al. 2009; Wu et al. 2009; Yamaguchi and Abe 2012). miR172'nin AP2 benzeri hedef genleri çiçeklenme baskılayıcıları olarak görev almaktadırlar. Bitkilerin erken gelişim evresinde ifade seviyeleri yüksekken yetişkin evrede ifade seviyeleri düşmekte ve çiçeklenme üzerindeki baskıları azalmaktadır (Aukerman and Sakai 2003; Chen 2004; Jung et al. 2007).

FT genlerinin uzun fotoperiyodik günlerde SOC1 geni yardımıyla SPL3, SPL4 ve SPL5 genlerinin ifadesini pozitif yönde düzenlemektedir. Ayrıca giberellin yolundaki GA aracılı SOC1'in de SPL3, SPL4 ve SPL5 genlerinin aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (Jung et al. 2012). *Arabidopsis thaliana*'da miR156'nın hedefi SPL3, SPL4 ve SPL5 genlerinin artan ifadesi sonrasında miR172d ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir (Jung et al. 2011). Benzer şekilde *Hordeum vulgare*'deki mutant miR172 hatlarında SPL3, SPL13, SPL15 ve SPL23 genlerinin de ifadeleri artmıştır (Tripathi et al. 2018). *Zea mays*'da *A. thaliana* SPL3, SPL4 ve SPL5'in homologu *ZmSPL13* ve *ZmSPL29* genlerinin *Zm-miR172C*'yi aktive ederek genç fazdan yetişkin faza geçiş için GI15 ifadesini baskıladığı bulunmuştur (Yang et al. 2023). SPL genleri miR156 tarafından düşük sıcaklık ve bitkinin genç dönemlerinde baskılanmaktadır. Bu nedenle SPL aracılığıyla FT ifadesinin aktivitesi ve çiçeklenme zamanı ayarlanmaktadır. Bitkinin yetişkin döneminde ise

fotosentez yoluyla üretilen şekerin bir sinyal olarak miR156 ifadesinin azalması ile sonuçlandığı bulunmuştur (Kim et al. 2012; Yang et al. 2013; Yu et al. 2013; Kim and Ahn 2014). *Solanum tuberosum* yapraklarına sükroz uygulaması sonucunda miR172 ifadesinin indüklendiği bulunmuştur (Garg et al. 2021). Ayrıca miR156'dan bağımsız olarak kısa fotoperiyodik günlerde SOC1'in SPL genleri yoluyla giberellin yollu çiçeklenmeyi teşvik ettiği tespit edilmiştir. Uzun fotoperiyodik günlerde ise FT ve FD genlerinin SOC1 ile ya da doğrudan SPL3, SPL4 ve SPL5 genlerini düzenlediği ve fotoperiyodik çiçeklenme yolunu kullandığı ortaya çıkmıştır. Ek olarak SPL3, SPL4 ve SPL5 genlerinin giberellin yolunda LFY genini düzenlediği de bulunmuştur. Ayrıca DELLA geninin ise SPL9'u baskılayarak çiçeklenmeyi geciktirdiği de tespit edilmiştir (Jung et al. 2012; Yu et al. 2012). miR156'nın ifadesi SPL9'un pozitif ve SPL15'in negatif düzenlemesi yoluyla kontrol edilmektedir. Ayrıca AP2 ve AGL15 yoluyla da pozitif olarak düzenlenmektedir. TOE1 ve TOE2 genleri SPL3, SPL4 ve SPL5 genlerini baskılamaktadır. miR172, AP2 aracılığıyla negatif olarak düzenlenirken TOE1 ve TOE2 ile pozitif olarak düzenlenmektedir. SPL3, TOE3'ü pozitif olarak düzenlemektedir. Ayrıca AP2 ve SMZ hem kendini hem de miR172 hedeflerini baskılayabilmektedir (Teotia and Tang 2015). AP2, miR172b'ye bağlanarak doğrudan ve miR172 aktiveleştirici SPL9 ifadesini negatif olarak düzenleyerek dolaylı olarak işlem yapabilmektedir (Yant et al. 2010). miR172'nin ifadesinin kontrolü SPL 9 ve SPL 10 tarafından gerçekleştirilmektedir (Wu et al. 2009).

Dikotil bitkilerin çiçekleri dört organ halkası (sepal, petal, stamen, karpel) şeklinde düzenlenmektedir (Coen and Meyerowitz 1991; Meyerowitz et al. 1991). Bu çiçek kimliği A, B ve C transkripsiyon faktör sınıflarının koordinasyonlu faaliyetleriyle oluşmaktadır. A sınıfı genler tek başına sepal oluşumuna ve B sınıfı genler ile birlikte petal oluşumuna yol açmaktadır. C sınıfı genler ise tek başına karpel oluşumuna ve B sınıfı genler yardımıyla stamenlerin oluşumuna sebep olmaktadır (Lohmann and Weigel 2002; Jack 2004; Krizek and Fletcher 2005). İstisna olarak bir A sınıfı üyesi olan AP2 çiçek gelişiminin dört aşamasında bulunmaktadır. Ancak miR172 karpel ve stamen oluşumu sırasında AP2'yi baskılamaktadır (Chen 2004; Jack 2004).

miR172'nin hedefi AP2 ve benzeri genlerdir. miR172'nin yüksek seviyedeki ifadesi AP2'nin aşağı yönlü ifadesi ile ilişkilidir. miR172'nin AP2'ye ek olarak TOE1 ve

TOE2 genlerini de hedef alarak çiçeklenme zamanının düzenlenmesinde görev aldığı bulunmuştur. AP2 miR172 ifadesini doğrudan veya dolaylı olarak aşağı yönde düzenleyebilmektedir (Aukerman and Sakai 2003; Chen 2004; Teotia and Tang 2015). AP2 çiçeklenme zamanında transkripsiyonel bir baskılayıcı olmasının yanında ovül ile tohum kabuğu gelişimi ve çiçek organı morfogenezi üzerine etkileri olan çok yönlü bir proteindir (Yant et al. 2010). Çiçek gelişiminin kontrolü MADS-box transkripsiyon ailesi üyeleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Ditta et al. 2004). AP2'nin miR156 ifadesini arttırdığı ve miR172 ifadesini baskıladığı bulunmuştur (Yant et al. 2010). miR172 bitkilerdeki faz geçişini düzenlemenin yanı sıra vejetatif organ oluşumunu da kontrol etmektedir. miR172'nin kök yapısı, yaprak morfolojisi ve meyve büyümesi gibi olaylarda etkili olduğu anlaşılmıştır (José Ripoll et al. 2015; Debernardi et al. 2017; Li et al. 2019; Chung et al. 2020; Ma et al. 2020). Düşük sıcaklıklarda SVP'nin artan ifade seviyesi miR172'nin düşük ifade seviyesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca *Magnolia × soulangeana*'da vejetatif dönemden çiçeklenme dönemine geçiş sırasında GA sinyallerine yanıt olarak *MsSVP*'nin aşağı yöndeki ifadesinin 4 farklı miR172 gen ailesi üyesinin ifadesini indüklediği tespit edilmiştir (Cho et al. 2012; Sun et al. 2021). *A. thaliana*'da bitkilerin gençlik döneminde SPL ifade seviyelerinin düşük olmasına rağmen miR172'nin bazal seviyede ifade olduğu görülmüştür. Gelişimin bu aşamalarında miR172'nin ifadesinin henüz belirlenemeyen transkripsiyon faktörlerince düzenlendiği düşünülmektedir. Beş miR172'nin de bulunmadığı mutant hatlarda tohumdan yeni tohum üretene kadar geçen zamanın tamamlandığı görülmüştür. Kusurlu fenotipik bulgular elde edilse de miR172'in bitkilerin yaşam döngülerini tamamlamak için gerekli olmadığı görülmektedir (Lian et al. 2021). Kısa fotoperiyodik günlerde miR172 gen ailesinin bir üyesi olan miR172d sürgün apikal meristeminde çiçeklenmeyi destekleyici ana bileşen olarak görev almaktadır (Lian et al. 2021; Zhang and Chen 2021). miR172, fotoperiyodik çiçeklenme yolunda CO'dan bağımsız olarak GI ile düzenlenmektedir. miR172, hedef genleri yardımıyla FT'nin ifadesini pozitif ve FLC'nin ifadesini negatif olarak düzenlemektedir. miR172, FT'yi hedefleri olan TOE1, SMZ ve SNZ yoluyla düzenleyebilmektedir. Ayrıca miR172 hedef genleri AP2 ve benzeri genler DELLA ifadesini yukarı yönde düzenler ve sonucunda FT'nin ifadesi aşağı yönde düzenlenebilmektedir (Yant et al. 2010; Teotia and Tang 2015).

Tuz ve kuraklık stresi altında miR156'nın ifade seviyesinin uzun süre boyunca yüksek seviyelerde kaldığı ve SPL9 yoluyla SOC1 seviyelerinin azaltıldığı görülmüştür. Bu durumun abiyotik stres durumunda bitkinin tolerans sağlamak amacıyla miR156-SPL modülasyonu yoluna başvurduğunu düşündürmüştür (Cui et al. 2014). Soğuk stresine altındaki *Malus domestica*'da miR172'nin aşırı ifade ettirildiği transgenik hatlarda kontrol grubuna göre yüksek büyüme hızı, düşük H₂O₂ miktarı, artan SOD ve CAT aktiviteleri tespit edilmiştir (Shen et al. 2023). *Oryza sativa*'da tuz stresi altında miR172a'nın aşırı ifade edildiği transgenik hatlarda değişen tuz stresi dozlarına tolerans kazandığı görülmüştür. miR172'nin az ifade olduğu hatlarda ise tuz stresine hassas hatlar elde edilmiştir (Cheng et al. 2021). Yüksek sıcaklık stresine toleranslı *Gossypium hirsutum* anterindeki *ghr-miR172* ifadesi önemli ölçüde aşağı yönlü düzenlenirken *ghr-novel-miR172b-5p* artan ifade profili sergilemiştir (Chen et al. 2020). Kuraklık stresine maruz kalmış *Triticum aestivum*'taki miRNA tepkilerinin analizi sonucunda kuraklığa toleranslı çeşitteki miR172'nin kuraklığa duyarlı çeşide göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Akdogan et al. 2016). miR172 çeşitli abiyotik stres yanıtlarında önemli roller aldığı ve bu streslerin toleransında etkili olabileceği görülmektedir.

Ayrıca miR172 gen ailesi üyelerinin ifade profili As (Srivastava et al. 2013), Cu (Jiu et al. 2019), Hg (Zhou et al. 2012), Cd (Ebrahimi Khaksefidi et al. 2015; Kouhi et al. 2020), Cr (Bukhari et al. 2015) ve Pb (He et al. 2014) ağır metalleri altında incelenmiştir. Çeşitli ağır metallere farklı tepkiler veren miR172 hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Ağır metal stresi abiyotik stres faktörleri arasında mücadelesi en zor stres faktörlerinden biridir. Bitkisel ürün verimini olumsuz şekilde etkilemesinin yanı sıra insan sağlığı açısından da ciddi riskler oluşturmaktadır. Yaklaşan gıda problemine karşı önemli bir çözüm olarak görülen fasulye üretimi doğaya insan kaynaklı müdahalenin bir sonucu olarak ortaya çıkan bu stres faktöründen etkilenmektedir. Bitkinin maruz kaldığı bu sorunun çözümünde stres toleransında etkili bir araç olarak görev alan miRNA'lar ve rolleri hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda aynı miRNA'ların farklı ağır metal stres ve dozlarına karşı değişen ifade profili gösterdiği bulunmuştur. Ancak bitki büyümesi ve gelişim süreçlerinde önemli görevleri bulunan miR172 gen ailesinin ağır metal stresinde rolleri ile alakalı yeterli çalışma

bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen literatür taraması sonucunda daha önce yapılan çalışmalarda fasulyede miR172 gen ailesinin As, Cd, Ni ve Pb ağır metal streslerindeki rolü hakkında herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Fasulyede yalnızca miR172'nin Mn toksisitesi altındaki ifade durumu incelenmiştir (Valdés-López et al. 2010). Ancak bu çalışmada miR172'nin bitkinin sadece nodül ve çiçek gibi dokularında ifadesi olduğu diğer dokularda ise ifadesinin ya çok az ya da hiç olmadığı tespit edilmiştir. miRNA'lar türe ve çeşide göre farklı ifade seviyelerine sahip olabilmektedir. Dolayısı ile özellikle miR172 gen ailesinin farklı ağır metal stresleri altındaki etkileri hakkında yeterli bilgiye sahip olunmadığı tespit edilmiş olup bu çalışmada çeşitli veri tabanları ve biyoinformatik araçlar kullanılarak *P. vulgaris* miR172 gen ailesinin genom çaplı karakterizasyonunun yapılması ve As, Cd, Ni ve Pb ağır metallerinin moleküler düzeyde miR172 geni ailesi üyeleri ve hedef genlerinin ifade seviyelerinin yaprak dokusunda meydana getirdiği değişimin tespiti amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

miRNA'nın keşfi *Caenorhabditis elegans*'da gelişim zamanının kontrolünde görev alan lin-4 tanımlanması ile başlamıştır (Lee et al. 1993). 2000'li yılların başında yine *C. elegans*'da tanımlanan ikinci miRNA olan let-7'nin keşfi ve bu miRNA'nın türler arasında korunduğunun bulunması ile miRNA'lar ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (Reinhart et al. 2000; Almeida et al. 2011;). 2002 yılına gelindiğinde ise bitkilerdeki miRNA'lar ile alakalı ilk çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Llave et al. 2002a; Llave et al. 2002b; Mallory et al. 2002; Marker et al. 2002; Park et al. 2002; Reinhart et al. 2002).

Bitkilerdeki miRNA'lar ile alakalı yapılan ilk çalışmaların birinde *A. thaliana*'da miR172, AP2 geninin tamamlayıcısı olarak tanımlanmıştır (Park et al. 2002). Daha sonra miR172'nin aşırı ifadesi sonucunda çiçeklenmede kusurlar meydana geldiği tespit edilmiştir (Aukerman and Sakai 2003). Ardından çiçeklenme zamanının düzenlenmesinde görevli GI geni tarafından düzenlenen miR172'nin CO geni olmadan da FT'yi indükleyerek fotoperiyodik çiçeklenmeyi düzenleyebildiği bulunmuştur. miR172'in artan ifadesi TOE1 ve TOE2'nin ifadesinin azalması ve FT seviyelerin artması ile ilişkili bulunmuştur (Jung et al. 2007). Daha sonra çiçeklenme zamanının kontrolünde işlevsel olarak karakterize edilen miR156'nın mutant *Z. mays*'da erken gelişim dönemlerinde yüksek seviyede ifade profili gösterdiği ve miR172'nin ise düşük seviyede olduğu bulunmuştur (Chuck et al. 2007). Bu bağlantının çiçekli bitkilerde bitkinin genç döneminden yetişkin dönemine faz geçişini sağladığı keşfedilmiştir. Bu iki miRNA'nın SPL genleri yardımıyla birbirleri ile koordineli şekilde hareket ettiği bulunmuştur (Wu et al. 2009). *O. sativa*'da miR172'nin aşırı ifadesinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada miR172b'nin artan ifadesinin çiçek ve tohum gelişiminde kusurlar meydana getirdiği görülmüştür (Zhu et al. 2009). Çiçeklenmenin kontrolüne miR172'in hedeflerinden biri olan AP2 benzeri transkripsiyon faktörü SMZ'nin çiçeklenmenin baskılanmasında görev aldığı tespit edilmiştir (Mathieu et al. 2009). AP2'nin SPL'leri baskılayarak miR156'yı pozitif yönde ve miR172'yi ise negatif olarak düzenlediği tespit edilmiştir (Yant et al. 2010). *A. thaliana*'da çimlenmeden sonraki aşamalarda miR172a ve miR172b'nin SPL13 geninin aşırı birikmesi sonucunda indüklendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca hedeflerin biri olan SCHNARCHZAPFEN (SNZ) geninin aşağı yönde ifade gösterdiği bulunmuştur (Martin et al. 2010).

Çilekteki miRNA'ları tespit etmek için gerçekleştirilen bir çalışmada miR172'nin yaprak dokularında kök ve sürgün dokularına göre daha yüksek seviyede ifade olduğu bulunmuştur (Li et al. 2012). miR172'nin çiçeklenme için önemli olan değişen ortam sıcaklığına bağlı olarak yanıtlar verdiği bulunmuştur. FCA proteinin 23°C'de artan miR172 için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Jung et al. 2012). Ayrıca düşük sıcaklıklarda miR172'nin düşük ifade seviyesi artan SVP proteini ile ilişkilendirilmiştir (Cho et al. 2012). DELLA proteininin SPL9 ile etkileşimi sonrasında miR172 ifadesinin düzenlenebildiği keşfedilmiştir (Yu et al. 2012). Aşırı ifade edilen ve yüksek ATP ile şeker içeriğine sahip *A. thaliana* hatlarında miR172'nin artan seviyede bulunduğu gözlemlenmiştir (Liang et al. 2014). *Nicotiana tabacum*'da dokuya özgü incelenen miRNA ifade seviyeleri sonucunda miR172'nin en çok sırasıyla yaşlı yapraklar, stigma-stil, sepal ve genç yapraklarda bulunduğu tespit edilmiştir (Burklew et al. 2014). *P. vulgaris*'deki miR172c'nin rizobiyal enfeksiyon ve nodülasyonda düzenleyici görevleri olduğu bulunmuştur. Ayrıca miR172c'nin kök gelişimini destekleyici etkilerinin de olduğu görülmüştür (Nova-Franco et al. 2015). *A. thaliana*'da bitkilerin büyüme ve gelişimi için gerekli karbon, kükürt ve azot eksikliği sonucunda miRNA tepkileri incelenmiş ve miR172c ve miR172d'nin karbon eksikliğinde ifadesi aşağı yönde düzenlenirken azot eksikliğinde miR172c ve miR172e yukarı yönde düzenlenmiştir (Liang et al. 2015).

miR172 ailesinin *Glycine max*'taki bir üyesi olan *gma-miR172a*'ın transgenik olarak *A. thaliana*'da aşırı ifade ettirilmesi sonucunda AP1, FT ve LFY ifadesini arttırarak erken çiçeklenmeye sebep olduğu bulunmuştur. Ayrıca *gma-miR172a* ifadesinin bir GI ortoloğu GmGIa tarafından düzenlendiği tespit edilmiştir (Wang et al. 2016). Bitkiler patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkileri verebilmektedir. Bu patojenlerin tanınmasında görev olan FLS2 reseptörünün miR172b ve hedefleri olan TOE1 ile TOE2 tarafından bitki yaşına bağlı olarak düzenlendiği bulunmuştur (Zou et al. 2020). *O. sativa*'da gen hedefleme (GT) yöntemiyle miR172'nin hedef genlerinden biri olan ve çiçeklenmede görev alan Cly1 geninde baz modifikasyonları yaparak miRNA'nın hedef genlere bağlanmasını engelleyen bir çalışma yapılmıştır. miR172'nin Cly1'i ifadesini aşağı yönde düzenlediği ve bu durumun da çiçek kapanmasına yol açtığı için miR172'nin Cly1'i düzenlenmesini engelleyerek açık çiçeklenme sonucunda mahsul verimini arttırma planlanmıştır (Ohtsuki et al. 2021).

S. tuberosum yapraklarına sükröz uygulaması sonucunda miR172 ifadesinin indüklendiği bulunmuştur (Garg et al. 2021). *G. max*'da bir circular RNA olan *Circ-GmCCR2*'nin miR172'yi hedeflediği ve ifadesini azaltabildiği bulunmuştur. *Circ-GmCCR2*'nin aşağı yönde düzenlenmiş ifadesi miR172 ifadesini arttırırken hedefleri olan AP2 ve TOE1'in ifadesinin baskılanması ve bunun sonucunda FT ifadesinin yukarı yönde düzenlenmesini yol açarak çiçeklenme geçişini düzenleyebilmektedir (Babaei et al. 2023). *A. thaliana*'da miR156-miR172 ağının yüksek CO₂ konsantrasyonunda çiçeklenme süresini hızlandırdığı tespit edilmiştir (Zhang et al. 2023). Soğanlı bir süs bitkisi olan *Lilium* sp. tohumunun ticari olarak elde edilmesi için uzun süreler gerekmektedir. miR172e'nin aşırı ifade ettirildiği hatlarda bu sürenin kısaltılabileceği görülmüştür (Feng et al. 2023).

mir172'nin çeşitli biyotik ve abiyotik stresler altındaki rolünü araştıran ilk çalışmada *A. thaliana*'da farklı streslere karşı miRNA'ların ifadeleri analiz edilmiş ve sonucunda miR172'nin düşük sıcaklıkta artan ifade gösterdiği bulunmuştur (Liu et al. 2008). *Brachypodium distachyon*'daki soğuk muamelesi sonucunda miR172b'nin ifadesi yukarı yönde artış göstermiştir (Zhang et al. 2009). *A. thaliana*'da dört miR172 ailesi üyesinin ifadesinin de (miR172a, miR172b, miR172c, miR172e) sıcaklığa yanıt olarak 16°C ve 23°C'de de yukarı yönde düzenlendiği tespit edilmiştir (Lee et al. 2010). Kuraklık stresi altındaki *O. sativa*'da miR172'nin ifadesi aşağı yönlü düzenlemiştir (Zhou et al. 2010). *Solanum lycopersicum*'da yaprak kıvrılma virüsüne maruz kalmış bitkilerde miR172'nin biriktiği gözlemlenmiştir (Naqvi et al. 2010). *P. vulgaris*'de Mn toksisite sırasında miRNA yanıtlarının incelendiği bir çalışmada miR172 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (Valdés-López et al. 2010). Kuraklık stresine maruz kalmış *S. tuberosum*'da *stu-miR172c* ve *stu-miR172d* artan bir ifade profili sergilemiştir (Hwang et al. 2011).

As stresine maruz kalmış *Brassica juncea*'da miR172a, miR172c ve miR172d ifadesi yukarı yönlü olarak düzenlenmiştir (Srivastava et al. 2013). Kuraklık stresine maruz kalmış *A. thaliana*'daki miR172'nin ifadesinin arttığı ve stres altında TOE1 genini baskıladığı görülmüştür (Han et al. 2013). Su eksikliğine maruz kalmış *Ipomoea campanulata* ve *Jacquemontia pentantha*'da miR172 genlerinin zıt ifade profili gösterdiği tespit edilmiştir. *I. campanulata* miR172 geni su eksikliğine karşı düşük ifade seviyesi gösterirken *J. pentantha* geni artan ifade seviyesi göstermiştir (Ghorecha et al.

2014). *T. aestivum*'da üç farklı strese (kuraklık, tuz ve soğuk) yanıt veren miRNA'ların ifade profilleri araştırılmıştır. Yapılan analiz sonucunda miR172 ifadesinin tüm stres koşullarında yukarı yönde düzenlendiği bulunmuştur (Gupta et al. 2014). Pb muamelesi sonrasında *G. hirsutum*'daki miRNA yanıtlarının incelendiği bir çalışmada miR172 ifadesinin yaprak dokusunda artan Pb dozlarına bağlı olarak artış gösterdiği bulunmuştur. Kökler ise doza bağlı olarak azalan bir ifade profili sergilemiştir (He et al. 2014).

Kuraklık ve tuz stresine maruz kalmış *G. hirsutum*'daki miRNA ifade profillerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise *ghr-miR172a*, *ghr-miR172b*, *ghr-miR172c* ve *ghr-miR172f* miRNA'larının düşük ifade profili gösterdiği bulunmuştur (Xie et al. 2015). Soğuk stresine maruz kalmış *S. lycopersicum*'daki bazı miRNA'ların yanıtlarının incelendiği bir çalışmada miR172'nin en yüksek ifade düzeyine sahip bir yanıt verdiği ortaya çıkmıştır (Koc et al. 2015). Dört farklı stres uygulamasına (Cd, kuraklık, sıcaklık ve tuz) maruz kalmış *H. annuus*'taki bazı miRNA'ların stresler karşısındaki ifade profilleri incelenmiştir. Yaprak dokularındaki miR172'nin ifadesi kuraklık stresinde negatif olarak düzenlenmiştir. Sıcaklık stresi uygulamasının 3.ve 6. saatinde hem kök hem de yaprak dokularındaki miR172'nin ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir. Tuz stresi uygulamasında miR172'nin ifadesinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Cd uygulamasında ise miR172 hem yaprak hem de kök dokularında artan ifade profili sergilemiştir (Ebrahimi Khaksefidi et al. 2015). Cr stresi altındaki *N. tabacum*'da hassas ve dayanıklı çeşitler arasında miRNA ifade farklılıklarının araştırıldığı bir çalışmada miR172a ve miR172f her iki genotipte de yüksek seviyede ifade olurken miR172c-e ve miR172g yalnızca hassas genotipte artan ifade profili sergilemiştir (Bukhari et al. 2015).

Fungus patojenitesine maruz kalmış *Pectoralis minor*'taki miRNA'ların ifade durumları incelenmiş ve miR172a ile miR172i'nin ifadesinin yukarı yönde düzenlendiği bulunmuştur (Samad et al. 2016). miR172 ailesinin *G. max*'taki bir üyesi olan *gma-miR172c*'in su eksikliği ve tuz stresi altında aşırı ifade olduğu tespit edilmiştir. *gma-miR172c*'nin transgenik olarak *A. thaliana*'da aşırı ifade ettirilmesi sonucunda bitkilerde su kaybının azaldığı ve stres altında hayat kalan bitki sayısının arttığı görülmüştür. Stres altında *gma-miR172c*'nin aşırı ifade ettirildiği bitkilerde SOD aktivitesinin kontrole göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu nedenle miR172'nin toleransı arttırıcı olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür (Li et al. 2016). Kuraklık stresine maruz kalmış *T.*

aestivum'taki miRNA tepkilerinin analizi sonucunda kuraklığa toleranslı çeşitteki miR172'nin kuraklığa duyarlı çeşide göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Akdogan et al. 2016). Kuraklık stresi altındaki *L. esculentum*'da *sly-miR172a* ifadesi yukarı yönde düzenlenmiştir (Cakir et al. 2016). *B. napus*'ta tuz ve kuraklık stresine yanıt olarak tohum çimlenmesinde miRNA'ların rolleri araştırılmış ve miR172d'nin önemli ölçüde yukarı yönde düzenlendiği bulunmuştur (Jian et al. 2016).

Kuraklık stresine maruz kalmış *Morus alba*'daki miRNA ifadelerinin incelendiği çalışmada miR172'nin ifadesi kontrole göre artmıştır. En yüksek artış kuraklık stresinin 15.gününde olmuştur. Daha sonra 5. günde ve en az artış 10. günde meydana gelmiştir (Li et al. 2017). *J. pentantha*'da kuraklık stresi altında miR172'nin ifadesi artan bir profil sergilemiştir (Ghorecha et al. 2017). Fungal bir patojenle muamele edilmiş *S. lycopersicum*'da transgenik miR172a ve miR172b'nin aşırı seviyedeki ifadesi enfeksiyon etkilerini azaltarak hastalığa direnç kazandırıcı bir etki göstermiştir. Transgenik hatlarda SOD ve POD aktivitelerinin arttığı görülmüştür (Luan et al. 2018). Kuraklık stresi altındaki *Echinacea purpurea*'nın yapraklarında miR172 ifadesi azalış göstermiştir (Moradi and Khalili 2018). Soğuk stresine maruz kalmış *Musa itinerans*'te *mit-miR172a*, *mit-miR172b*, *mit-miR172c* ve *mit-miR172e* ifadeleri kontrole kıyasla önemli derece artış göstermiştir (Liu et al. 2018).

Bor (B) toksisitesi sonrasında *A. thaliana*'daki miR172'nin 1mM H₃BO₃ altında ifadesinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Ancak 3mM H₃BO₃ dozunda miR172 ifadesi kontrole göre artmış olsa da 1mM H₃BO₃ altındaki ifadeden oldukça düşük ifade profili sergilemiştir (Kayıhan et al. 2019). Farklı PVY virüsleri ile enfekte edilmiş *N. tabacum* örneklerinde miRNA'ların değişimlerinin incelendiği diğer bir çalışmada *nat-miR172a*, *nat-miR172e*, *nat-miR172u*, *nat-miR172x* ve *nat-miR172y* miRNA'larının seviyeleri 3 farklı PVY suşunda da enfeksiyondan 14 gün sonra yukarı yönde düzenlenirken *nat-miR172h*, *nat-miR172f* ve *nat-miR172w* miRNA'larının 2 farklı suşta ve *nat-miR172l* miRNA'sının ise ifadesi yalnızca bir suşta yukarı düzenlendiği bulunmuştur. *nat-miR172i* ve *nat-miR172r* miRNA'ları ise herhangi bir anlamlı ifade değişimi göstermemiştir. miR172 hedeflerinden olan TOE3 ise aşağı yönde düzenlenmiştir (Yin et al. 2019). CGMMV virüsünün enfeksiyonu sonucunda *Cucumis sativus*'da gerçekleştirilen mikrodizi analizinde önemli ölçüde ifadesi değişen miRNA'lar

incelenmiş ve miR172'nin ifadesi yaprakta kontrole göre enfeksiyondan sonraki 21 ve 35. günün sonunda artarken 1., 7., 14., 28. ve 42. gün sonunda azalmıştır. En çok azalma 42. gün sonunda görülürken en çok artış 35. gün sonunda olmuştur. Benzer sonuçlar gövde de görülürken kök dokularında kontrole göre azalmalar meydana gelmiştir (Liang et al. 2019). Cu stresine maruz kalmış *Vitis vinifera*'da *vvi-miR172d* ifadesi bakır maruziyeti süresi artmasına bağlı olarak azalış göstermiştir (Jiu et al. 2019).

Yüksek sıcaklık stresine toleranslı *G. hirsutum* anterindeki *ghr-miR172* ifadesi önemli ölçüde aşağı yönlü düzenlenirken *ghr-novel-miR172b-5p* artan ifade profili sergilemiştir (Chen et al. 2020). Çeşitli abiyotik stresler altında (Cd, kuraklık, tuz, sıcaklık ve) *Carthamus tinctorius* kök ve yaprak dokularında bulunan miRNA'ların tepkilerinin araştırıldığı bir çalışmada miR172 kuraklık stresi altında pozitif, sıcaklık stresi altında negatif, tuz stresi altında negatif ifade profili sergilemiştir. Cd stresinde ise yaprak dokusunda 5 µM dozda pozitif ifade düzeyi gösterirken 20 µM dozda negatif ifade düzeyi sergilemiştir. Kök dokusunda ise her iki dozda da pozitif bir ifade seviye göstermiştir. Çoğunlukla SPL ifadesi miR172 ile benzer ifade profilleri sergilerken miR156 ile zıt patern göstermiştir (Kouhi et al. 2020). *Medicago sativa*'da tuz stresi sırasında miRNA yanıtlarını incelemek için tuz stresine toleranslı bir çeşit ile kontrol grubu arasındaki ifade profillerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada miR172'nin toleranslı çeşitte daha fazla ifade olduğu görülmüştür (Ma et al. 2020).

Al toksisitesine maruz kalmış *Cricosaurus grandis* köklerinde *csi-miR172b* ve *csi-miR172d* miRNA'larının ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir (Zhou et al. 2020). B toksisitesine maruz kalmış toleranslı *T. aestivum* çeşidinde miR172'nin 1mM ve 3mM H₃BO₃ altında ifadesinin kontrole göre önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Hassas çeşitte ise miR172'nin ifadesi 1mM H₃BO₃ altında azalırken 3mM H₃BO₃ altında sabit kalmıştır. miR172 hedefi TOE1'in ifadesi toleranslı çeşitte 1mM H₃BO₃ dozunda artarken 3mM H₃BO₃ dozunda azalmıştır. Hassas çeşitte ise TOE1'in ifadesi her iki dozda da önemli ölçüde artış göstermiştir (Kayıhan et al. 2021). *O. sativa*'da tuz stresi altında miR172a'nın ifadesi önemli ölçüde artmıştır. Bunun üzerine miR172a'nın aşırı ifade edildiği transgenik hatlar elde edilmiş ve bu hatların değişen tuz stresi dozlara toleranslı olduğu görülmüştür. Ayrıca miR172'nin hedef taklidi yoluyla az ifade olduğu hatlar geliştirilmiş ve bu hatların tuz stresine hassas olduğu tespit edilmiştir (Cheng et al. 2021).

Kuraklık stresi altındaki *Papaver glaucum*'da *Pg-miR172* ifadesi artan ifade profili sergilemiştir (Palakolanu et al. 2022). Soğuk stresine maruz kalmış *M. domestica*'da *miR172* ifadesinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar sonrasında *miR172*'nin aşırı ifade ettirildiği transgenik hatlar elde edilmiş ve bu hatların kontrol grubuna göre yüksek büyüme hızı, düşük H_2O_2 miktarı, artan SOD ve CAT aktiviteleri bulunduğu tespit edilmiştir (Shen et al. 2023). *Cicer arietinum*'da sıcaklık stresine hassas ve dayanıklı çeşitler arasında *miR172* ifadesi karşılaştırılmış ve dayanıklı çeşitte daha fazla ifade olduğu görülmüştür (Juneja et al. 2023). Tuz stresine maruz kalmış *Xanthoceras sorbifolium*'da *miR172*'in ifadesi yaprak dokusunda başta artış gösterirken NaCl konsantrasyonu arttıkça azalmıştır. Kök dokusunda ise önce azalış gösterirken NaCl konsantrasyonu arttıkça artış göstermiştir (Li et al. 2023).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Fasulyedeki miR172 Gen Ailesinin Tanımlanması

Fasulyedeki miR172 gen ailesi üyelerinin sekans bilgileri sRNAanno ve PmiREN 2.0 veri tabanından elde edilmiştir (Chen et al. 2021; Guo et al. 2022). miR172 gen ailesi üyelerinin fasulye kromozomlarındaki konumları Phytozome v13 (Goodstein et al. 2012) veri tabanında yer alan BLAST aracı yardımıyla *P. vulgaris* (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Pvulgaris5_593_v1_1) genomu üzerinde taranmıştır. Elde edilen kromozom bilgileri MG2C v2.1 web aracı kullanılarak görselleştirilmiştir (Chao et al. 2021). *Pvul-miR172* gen ailesi üyelerinin ikincil yapılarını tahmin etmek için RNAfoldWebServer (Lorenz et al. 2011) web aracı kullanılmıştır.

3.2. *Pvul-miR172* Gen Ailesi Üyelerinin Korunmuşluk Düzeyi ve Filogenetik Analizi

Pvul-mir172 gen ailesi üyelerinin olgun dizi bilgileri kullanılarak TBtools (Chen et al. 2023) programında yer alan SeqLogo aracıyla korunmuş bölgeler görselleştirilmiştir. *A. thaliana*, *G. max*, *M. truncatula*, *O. sativa*, *P. vulgaris*, *Vigna radiata* ve *Z. mays* mir172 genlerinin öncü dizileri sRNAanno (Chen et al. 2021) veri tabanından elde edilmiştir. Elde edilen diziler ClustalW aracı (Thompson et al. 1997) kullanılarak hizalanmış ardından MEGA 11 (Tamura et al. 2021) programında yer alan Maximum Olabilirlik Tahmini yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Oluşturulan filogenetik ağaç Evolveview v2 (He et al. 2016) web aracı yardımıyla görselleştirilmiştir.

3.3. *Pvul-miR172* Gen Ailesi Üyelerinin Düzenleyici Element Analizi

Pvul-mir172 gen ailesi üyelerinin öncü dizilerinin 2000 bp'lik üst akış bölgesi PmiREN (Guo et al. 2022) veri tabanından alınmıştır. Bu genlerin promotör bölgesindeki cis-etkili düzenleyici elementleri tahmin etmek için PlantCARE (Lescot et al. 2002) veri tabanı kullanılmıştır.

3.4. *Pvul-miR172* Gen Ailesi Üyelerinin Hedef Genlerinin GO Analizi

Pvul-mir172 gen ailesi üyelerinin hedef genlerinin protein dizileri kullanılarak EGGNOG-MAPPER (Cantalapiedra et al. 2021) web aracında GO analizi gerçekleştirilmiştir. Ek olarak hedef genlerin Phytozome v13 (Goodstein et al. 2012) veri tabanında yer alan GO bilgileri de alınmıştır. Tüm sonuçlar birleştirilerek son bir GO analiz sonucu oluşturulmuştur.

3.5. Çalışmada Kullanılacak Bitki Materyalinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak bitki materyalini tespit etmek için Gümüşhane ilinden toplanmış ve teksel seleksiyon yoluyla saflaştırılmış olan 29 adet fasulye genotipi kullanılmıştır. Toleranslı ve hassas genotiplerin belirlenmesi için As, Cd Ni ve Pb elementleri yarı maksimal etkili konsantrasyonda (EC_{50}) ve toksik dozda kullanılarak ön deneme yapılmıştır. Stres uygulamaları kapsamında genotiplere ait tohumlar 5 dakika süreyle %1'lik NaOCl içeren çözeltide yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Genotipler 1/4 Hoagland (Hoagland and Arnon 1950) bazal tuz çözeltisi ve ağır metal dozları verilerek petri kaplarında çift kat kurutma kâğıdı kullanılarak çimlendirmeye tabi tutulmuşlardır. Bu amaçla ağır metal karışımları belirtilen dozlarda (0 ve 30 mg/l As, 0 ve 300 mg/l Cd, 0 ve 900 mg/l Ni, 0 ve 500 mg/l Pb) hazırlanmıştır. Tüm petriler 25°C sıcaklıkta 250 mmol 16/8 saat fotoperiyotta bitki büyütme odasında kontrollü koşullarda 7 gün süreyle çimlendirme işlemine tabi tutularak As, Cd, Ni ve Pb için belirlenen ağır metal dozları uygulanmıştır. Yedi günün sonunda genotiplerde fenotipik olarak değişimler gözlemlenmiştir. Bu gözlemler sonunda dört ağır metal ve her bir metal dozu için toleranslı ve hassas genotipler belirlenmiştir.

3.6. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulamaları

Çalışma için toleranslı (G68) ve hassas (G53) genotiplere ait tohumlar 70x50x15 cm boyutlarındaki perlit içeren çimlendirme kaplarında 25°C sıcaklıkta 250 mmol 16 saatlik fotoperiyota sahip bitki büyütme odasındaki kontrollü koşullar altında 3 yapraklı döneme kadar büyütülmüştür. Bu döneme kadar bitkilere her 2 günde bir 1/4 Hoagland solüsyonu ile eşit miktarlarda sulama yapılmıştır. Üç yapraklı döneme gelen ve fenotipik

olarak birbirlerine benzerlik gösteren en sağlıklı bitkiler seçilerek hidroponik ortama aktarılmıştır. Seçilen fideler 1/4 Hoagland çözeltisi içeren 1 L'lik hidroponik ortamda 5 yapraklı döneme kadar yetiştirilmiştir. Beş yapraklı döneme gelen bitkilere 50 mM dozunda As, Cd, Ni ve Pb ağır metalleri uygulanmıştır. Yedi günlük uygulama sonunda moleküler analiz için yaprak örnekleri alınmıştır. Moleküler analiz için bitki doku örnekleri sıvı azot yardımıyla alınarak RNA izolasyon çalışmaları yapılincaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Tüm denemeler iklim odasında 24±1°C ve 16/8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında gerçekleştirilmiştir. Tüm denemeler 3 tekerrürlü olarak ve her tekerrürde 10 bitki olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.7. Bitkilerden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

3.7.1. Toplam RNA izolasyonu

RNA izolasyonu işleminden önce %1'lik NaOCl çözeltisi ve %0,1'lik DEPC çözeltisi ile kullanılacak materyallerin ve ortamın sterilizasyonu yapılmıştır. Ardından ağır metal stresine maruz kalmış fasulye örneklerinin yaprakları önceden soğutulan havan içerisine alınarak sıvı azot yardımı ile iyice ezilmiştir. Ezme işleminden sonra 100 mg tartılan bitki örnekleri soğuk zincir bozulmamasına dikkat edilerek 0,2 ml'lik eppendorf tüplerine aktarılmıştır. RNA izolasyonu için HİBRİZOL (Hibrigen Biyoteknoloji Ar-Ge San. Tic. Ltd. Şti., Türkiye) kullanılmış ve RNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapılmıştır:

1. Örneklerin bulunduğu eppendorf tüplerin üzerine 1 ml Hibrizol solüsyonu eklenmiştir. Ekleme işleminin ardından örnekler 20 saniye boyunca vortekslenmiştir. Daha sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
2. Bekletilen örnekleri üzerine 0,2 ml kloroform eklenmiştir ve hızlı bir şekilde 15 saniye çalkalanmıştır. Ardından 5 dakika oda sıcaklığında bekleme bırakılmıştır.
3. Daha sonra örnekler 4°C'de 20 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj işleminden sonra tüplerde oluşan en üstteki faz yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır.

5. Yeni alınan fazdaki RNA'yı çöktürmek için tüplere 0,5 ml izoporopanol eklenerek birkaç kez alt-üst edilmiştir. Ardından örnekler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. Daha sonra örnekler 4°C'de 10 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj işleminden sonra tüplerde oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırılarak RNA'nın bulunduğu pellet kısmına 1 ml %75 EtOH eklenmiştir. Ardından yavaşça 5-10 saniye vorteks yapılarak EtOH ile yıkama yapılmıştır.
8. Ardından örnekler 4°C'de 5 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant kısmında yer alan EtOH uzaklaştırılmıştır. Kalan EtOH'u da uzaklaştırmak için örnekler 10 dakika kurutmaya bırakılmıştır.
10. Kurutmanın ardından tüplerde kalan RNA peleti 30 µl DEPC'li su ile çözdürülmüştür.
11. Çözdürülen solüsyon 10–15 dakika 55°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra kullanıma kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.7.2. RNA konsantrasyon tayini ve agaroz jel elektroforezi

İzole edilen toplam RNA'ların konsantrasyon tayini için Nanodrop cihazında A_{260/280} O.D. değerinde ölçüm alınmıştır. Daha sonra örnekler için %1,2'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Nanodrop ölçümü sonrasında elde edilen konsantrasyon değerlerine göre 1000 ng/µl miktarında RNA örneği, 3 µl yükleme boyası ve toplam hacim 10 µl edecek oranda TBE eklenerek jele yüklenmiştir. Örnekler 60 dk boyunca 85 voltta yürütülmüştür. Yürütmenin ardından jel Bio-Rad ChemiDoc MP UV-Transillüminatör'de gözlemlenmiştir.

3.7.3. cDNA sentezi

Ölçüm ve agaroz jel elektroforezi sonrasında total RNA'dan cDNA sentezi için Canvax™ cDNA sentez kitinin (PR008) aşağıdaki protokolü kullanılmıştır:

1. Kit içerisinde yer alan bileşenler çözündürülüp hafifçe vortekslenmiştir. Daha sonra buz rakında yer alan steril PCR tüplerinin içerisine aşağıdaki bileşenler eklenmiştir:

RNA	----- μ l (1500 ng)
dNTP	1 μ l
Oligo (dT) Primer	1 μ l
dH ₂ O	----- μ l
Toplam	12,5 μ l

Bileşenler eklendikten sonra PCR tüpleri karıştırılarak mini spin cihazında çöktürülmüş ve G-C içeriği bakımından zengin ve yapısal RNA'lar için PCR cihazında 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra içerisinde aşağıda yer alan diğer bileşenler eklenmiştir:

Buffer	4 μ l
DTT	2 μ l
RNase İnhibitörü	0,5 μ l
Reverse Transkriptaz	1 μ l
Toplam	20 μ l

2. Bileşenler eklendikten sonra PCR tüpleri karıştırılarak mini spin cihazında çöktürülmüştür. Örnekler reaksiyonun gerçekleşmesi için PCR cihazına götürülmüş ve aşağıdaki koşullarda PCR işlemi gerçekleştirilmiştir:

- ⌚ 65°C'de 60 dk (enzim reaksiyon)
- ⌚ 85°C'de 5 dk (enzim inaktivasyon)

3. PCR işlemi sonrasında örnekler -20°C'de saklanmıştır.

3.7.4. miRNA'ların saptanması ve miR-cDNA sentezi

miRNA'ların saptanması ile ilgili olarak Chen et al. (2005) uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu metot iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama tasarlanan stem-loop (sap ilmek) primerinin hedeflenen miRNA'ya yapışması ve onun üzerinden cDNA

sentezini gerçekleştirmesidir. İkincisi ise miRNA'ya özel olarak tasarlanan ileri (forward) primer ile stem-loop'a uygun olarak tasarlanmış olan universal (evrensel) geri (reverse) primerin kullanıldığı qRT-PCR reaksiyonudur. miRNA'lara ait ileri primerler web tabanlı Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) programı kullanılarak tasarlanmış olup U6 referans geni için ise Jyothi et al. (2018) tarafından verilen diziler kullanılmıştır. miRNA'ların tespiti ve miktar tayini (Varkonyi-Gasic et al. 2007) belirttiği protokole göre yapılmıştır. Birinci aşamada her miRNA'ya özgü stem loop RT (sap ilmek Reverse Transkriptaz) primeri kullanılarak miRNA-cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir ve ikinci aşamada ise her miRNA için hazırlanan ileri primeri ve universal geri primer kullanılarak qRT-PCR (kantitatif Gerçek Zamanlı PCR) reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca miRNA-cDNA sentezinde kontrol grubu olarak "No RNA, No RT-primer, No Enzim" karışımı içeren tüpler de hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). miRNA'ların cDNA sentezi için Canvax™ cDNA sentez kitinin (PR008) aşağıdaki protokolü kullanılmıştır: Kit içerisinde yer alan bileşenler çözündürülüp hafifçe vortekslenmiştir. Daha sonra buz rakında yer alan steril PCR tüplerinin içerisine aşağıdaki bileşenler eklenmiştir:

RNA	----- µl (1500 ng)
dNTP	1 µl
Stem-loop Primer	1 µl
dH ₂ O	----- µl
Toplam	12,5 µl

1. Bileşenler eklendikten sonra PCR tüpleri karıştırılarak mini spin cihazında çöktürülmüş ve G-C içeriği bakımından zengin ve yapısal RNA'lar için PCR cihazında 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra içerisinde aşağıda yer alan diğer bileşenler eklenmiştir:

Buffer	4 µl
DTT	2 µl
RNase İnhibitörü	0,5 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
Toplam	20 µl

2. Bileşenler eklendikten sonra PCR tüpleri karıştırılarak mini spin cihazında çöktürülmüştür. Örnekler reaksiyonun gerçekleşmesi için PCR cihazına götürülmüş ve aşağıdaki koşullarda PCR işlemi gerçekleştirilmiştir:

- ⌚ 65°C’de 60 dk (enzim reaksiyon)
- ⌚ 85°C’de 5 dk (enzim inaktivasyon)

3. PCR işlemi sonrasında örnekler -20°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. RNA-stem-loop sentez düzeni

	Örnekler	No Primer	No RNA	No Enzim
Toplam RNA	X µl (1500 ng)	X µl (1500 ng)	-	X µl (1500 ng)
Stem-loop Primeri	1 µl	-	1 µl	1 µl
dNTP	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Buffer	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
DTT	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
RNase İnhibitör	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl	1 µl	1 µl	-
dH ₂ O	20 µl’ye kadar	20 µl’ye kadar	20 µl’ye kadar	20 µl’ye kadar
Toplam Hacim	20	20	20	20

3.8. miRNA Kantitatif Real Time (qRT PCR) Analizleri

3.8.1. qRT PCR yardımıyla miRNA ifade seviyelerin tespiti

Pvul-miR172 gen ailesinin üyelerine özgü primerler tasarlanmıştır. qRT-PCR reaksiyonlarında her bir miRNA’ya özgü tasarlanan miRNA ileri primerleri ve universal olan geri primeri kullanılmıştır. Rölatif kantitasyon yapılmış ve referans gen olarak U6 geni kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizileri Çizelge 3.2’de verilmiştir. qRT-PCR analizlerinde kullanılan cDNA’lar her bir örnek için 1/2, 1/4, ve 1/8 oranında seyreltilmiştir. Kurulan tüm qRT-PCR reaksiyonları 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarında Genius 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (RK21204, ABclonal, Türkiye) kullanılmıştır. Gerçekleştirilen reaksiyonlarda kullanılan bileşenler üreticinin belirttiği oranlara göre ayarlanmıştır. qRT-PCR için gerekli bileşenler ve reaksiyon programı aşağıda verilmiştir:

miR-cDNA (1/2, 1/4, 1/8)	2 µl
SYBR Green Master Mix	5 µl
Primer (F+R)	0,5 µl
dH ₂ O	2,5 µl
Toplam	10 µl

	Ön denatürasyon	65°C	5 dk	1 döngü
	Denatürasyon	95°C	20 sn	50 döngü
	Bağlanma	57,5-60°C	35 sn	
	Uzama	72°C	5 sn	
	Erime Eğrisi	60-95°C	her 3 dk 1 °C	1 döngü

3.8.2. *Pvul-mir172* hedef genlerin tahmini ve qRT PCR yardımıyla ifade seviyelerinin analizi

psRNATarget (Dai and Zhao 2011) veri tabanının varsayılan ayarları kullanılarak *Pvul-miR172*'nin hedef genleri tahmin edilmiştir. Bu genler içerisinde Fang et al. (2023) tarafından fasulyede ağır metal stresi koşullarında ifade seviyeleri değişen ve ağır metal stresi ile ilişkili olduğu bildirilen genler taranmıştır. Eşleşen genler *Pvul-miR172* gen ailesi üyelerine hedef gösterilerek miRNA-hedef gen ilişkisi belirlenmiştir. *Pvul-miR172* hedef genlerine özgü primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.3). qRT-PCR analizlerinde kullanılacak cDNA'lar 1/10 oranında seyreltilmiştir. Kurulan tüm qRT-PCR reaksiyonları 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarında Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (RK21204, ABclonal, Türkiye) kullanılmıştır. Gerçekleştirilen reaksiyonlarda kullanılan bileşenler üreticinin belirttiği oranlara göre ayarlanmıştır. qRT-PCR için gerekli bileşenler ve reaksiyon programı aşağıda verilmiştir:

cDNA (1/10)	2 µl
SYBR Green Master Mix	5 µl
Primer (F+R)	0,5 µl
dH ₂ O	2,5 µl
Toplam	10 µl

	Ön denatürasyon	65°C	5 dk	1 döngü
	Denatürasyon	95°C	20 sn	40 döngü
	Bağlanma	57,5-60°C	35 sn	
	Uzama	72°C	5 sn	
	Erime Eğrisi	60-95°C	her 3 dk 1°C	1 döngü

3.9. qRT PCR Analizi İçin Tasarlanmış Stem-Loop, miRNA ve Hedef Gen Primerleri

Fasulyedeki miR172 gen ailesi üyelerinin sekans bilgileri sRNAanno ve PmiREN 2.0 veri tabanından elde edilmiştir (Chen et al. 2021; Guo et al. 2022). miR172 gen ailesi üyelerinin fasulye kromozomlarındaki konumları Phytozome v13 (Goodstein et al. 2012) veri tabanında yer alan BLAST aracı yardımıyla *P. vulgaris* (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Pvulgaris5_593_v1_1) genomu üzerinde taranmıştır. Elde edilen kromozom bilgileri MG2C v2.1 web aracı kullanılarak görselleştirilmiştir (Chao et al. 2021). *Pvul-miR172* gen ailesi üyelerinin ikincil yapılarını tahmin etmek için RNAfoldWebServer (Lorenz et al. 2011) web aracı kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. qRT PCR analizinde kullanılan *Pvul-miR172* primerleri

miRNA	Stem-loop RT Primer	İleri Primer	Geri Primer
Pvul-miR172a-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGACCTGCAG	CGGCGGGGAATCTT GATGATGC	GTGCAGGGTCCGA GGT
Pvul-miR172c-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGACTGTGAA	TTAGGGCAGCAGCA TCAAGAT	
Pvul-miR172d-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGACTGTGAA	TAGCGGGGAGCATC ATCAAGAT	
Pvul-miR172f-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGACTGTGAA	TCGGCGGCAGCAA GATCAAGATT	
U6		GAGAAGATTAGCAT GG	CACGAATTTGCGT GTCATCCTT

3.10. Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışma tam şansa bağlı deneme planına göre tasarlanmıştır. Ağır metal stresi uygulanmış fasulyedeki miR172 gen ailesinin ifade ölçüleri ağırlıklı ortalama normalizasyon yöntemine göre normalize edilirken (Qureshi and Sacan, 2013), miRNA

3. MATERYAL ve YÖNTEM

hedef genlerinin ifade ölçüleri ise fasulye U6 geni ile karşılaştırılarak normalize edilmiştir. Gen ifadesindeki kat değişikliklerini analiz etmek için Livak and Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon formülü kullanılmıştır. Araştırmada, 3 tekerrürlü ve 3 biyolojik tekrar kullanılarak elde edilen verilere ait ortalamalar ve standart sapma değerleri Graphpad Prizm 8 ile görselleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. qRT PCR analizinde kullanılan *Pvul-miR172* hedef genlerin primerleri

Hedef Gen	İleri Primer	Geri Primer	Fonksiyon
Phvul.001G206700.1 ABC Transporter	GTACAAGTCCGT GCTGAAGAT	GGATGCTTTGAT GTCTCGTTTG	ABC TRANSPORTER C AİLE ÜYESİ 14-İLİŞKİLİ
Phvul.002G016900.1 AP2	GCCTAAGGCTCA TCTGGTAAAT	GGCTCAGTAGTC TCAAGGTTTC	ÇİÇEK HOMEOTİK PROTEİN APETALA 2
Phvul.002G291200.1 UBC	CGAGACATGGA CCTGATGAAA	CTTCCACACACC AACCTCATA	UBİKUITİN-KONJUGASYON ENZİMİ E2
Phvul.006G137900.1 UAA Transporter	CTTCTGGTACTC CTCCAACATC	TGGCACAGCGT AAGGAAA	ÇÖZÜNEN MADDE TAŞIYICI AİLESİ 35
Phvul.007G240200.1 AP2/ERF	AGCATGGTGGG CAGAATAAG	GATGAGACAGC CAGAAGAAGAG	AP2 BENZERİ ETİLENE DUYARLI TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ SMZ İLE İLİŞKİLİ
Phvul.008G266700.1 RING FINGER	GGAGAATTGGT GAGGGTACTTC	CATTGGGCATGA TCCTTGTTG	RING FINGER ALANI İÇEREN
Phvul.009G036900.2 MSL	TGCCGTGTCGTT GTTCAT	GACCTGCTAGA GTGAGCAATAC	YNAI İLE İLİŞKİLİ MEKANOSENSİTİF İYON KANALI
Phvul.011G207100.1 NRT	CCATCAGGGAG CCCATTTAC	TGCTCCTCCTCC TCATAACA	PROTEİN NRT1/ PTR AİLESİ 5.4

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

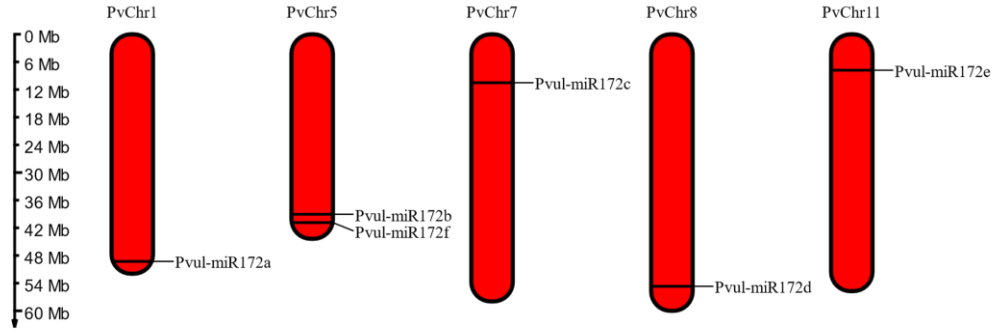
4.1. Fasulyedeki miR172 Gen Ailesi Üyelerin Genom Çaplı Analizi

P. vulgaris genomunda 6 adet *Pvul-miR172* geni tespit edilmiştir. Bu genler *Pvul-miR172a*, *Pvul-miR172c*, *Pvul-miR172d*, *Pvul-miR172e* ve *Pvul-miR172f* şeklinde adlandırılmıştır. miR172 gen ailesini üyelerinin olgun dizisi, kromozom bilgisi, genlerin başlangıç ve bitiş konumları Çizelge 4.1’de yer almaktadır. *A. thaliana*’da 5 adet (Chen 2004; Jung and Kang 2007; Lian et al. 2021a), *O. sativa*’da 4 adet (Li et al. 2005; Zhu et al. 2009), *H. vulgare*’de 3 adet (Tripathi et al. 2018) ve *G. max*’da 12 adet (Lee et al. 2023) miR172 gen ailesi üyesi tanımlanmıştır.

Çizelge 4.1. *P. vulgaris* miR172 gen ailesi üyelerinin bilgileri

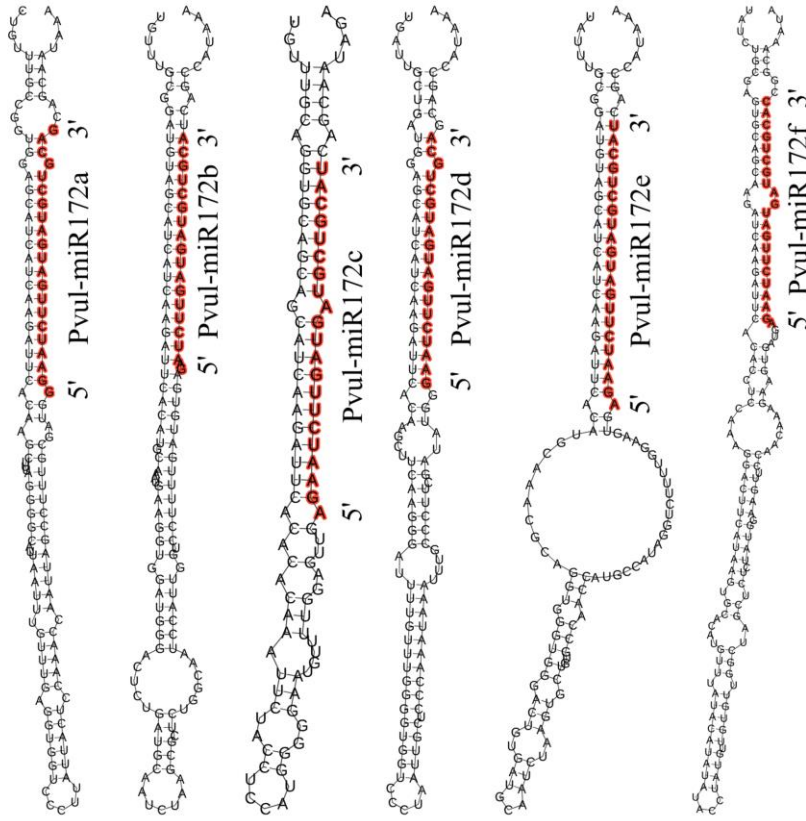
Pvul Gen Adı	Olgun Dizi (5'-3')	Dizi Uzunluğu (nt)	Kromozom No	Başlangıç Konumu	Bitiş Konumu
Pvul-miR172a	GGAAUCUUGAUG AUGCUGCAG	21	PvChr1	51848885	51849015
Pvul-miR172b	GGAAUCUUGAUG AUGCUGCAG	21	PvChr5	41243099	41243231
Pvul-miR172c	AGAAUCUUGAUG AUGCUGCAU	21	PvChr7	11039332	11039432
Pvul-miR172d	AGAAUCUUGAUG AUGCUGCAU	21	PvChr8	57673478	57673605
Pvul-miR172e	AGAAUCUUGAUG AUGCUGCAU	21	PvChr11	8168544	8168680
Pvul-miR172f	AGAAUCUUGAUG AUGCUGCAC	21	PvChr5	43033503	43033657

Pvul-miR172 gen ailesi üyeleri Şekil 4.1’de görüldüğü üzere 5 farklı *P. vulgaris* kromozomu üzerinde dağılım göstermiştir. *Pvul-miR172b* ve *Pvul-miR172f* genleri 5. kromozom üzerinde bulunurken *Pvul-miR172a* 1. kromozom, *Pvul-miR172c* 7. kromozom, *Pvul-miR172d* 8. kromozom ve *Pvul-miR172e* 11. kromozom üzerinde yer almaktadır. *A. thaliana* miR172 genlerinin 2., 3. ve 5. kromozomlarda lokalize olduğu tespit edilmiştir (Lian et al. 2021). *O. sativa* miR172 genlerinin ise 1., 2., 7. ve 9. kromozomlar üzerinde dağılım gösterdiği bulunmuştur (Li et al. 2005).



Şekil 4.1. *Pvu-miR172* gen ailesi üyelerinin kromozomal lokasyonları

Pvu-mir172 gen ailesi üyelerinin ikincil yapıları RNAfold web server ile analiz edilerek görselleştirilmiştir. Analiz sonucunda tüm genlerin miRNA oluşumu için gerekli olan saç tokası yapısında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). *Elaeis guineensis* miR172 gen ailesi üyelerinin de saç tokası yapısında olduğu ve benzer şekilde olgun dizilerin uç kısımlara yakın konumlandığı tespit edilmiştir (Mehrpooyan et al. 2012). *H. vulgare* mir172 öncü dizilerinde de benzer saç tokası yapıları tanımlanmıştır (Anwar et al. 2018).



Şekil 4.2. *Pval-miR172* gen ailesi üyelerinin ikincil yapıları.

4.2. *Pval-miR172* Gen Ailesi Üyelerin Evrimsel İlişkisi

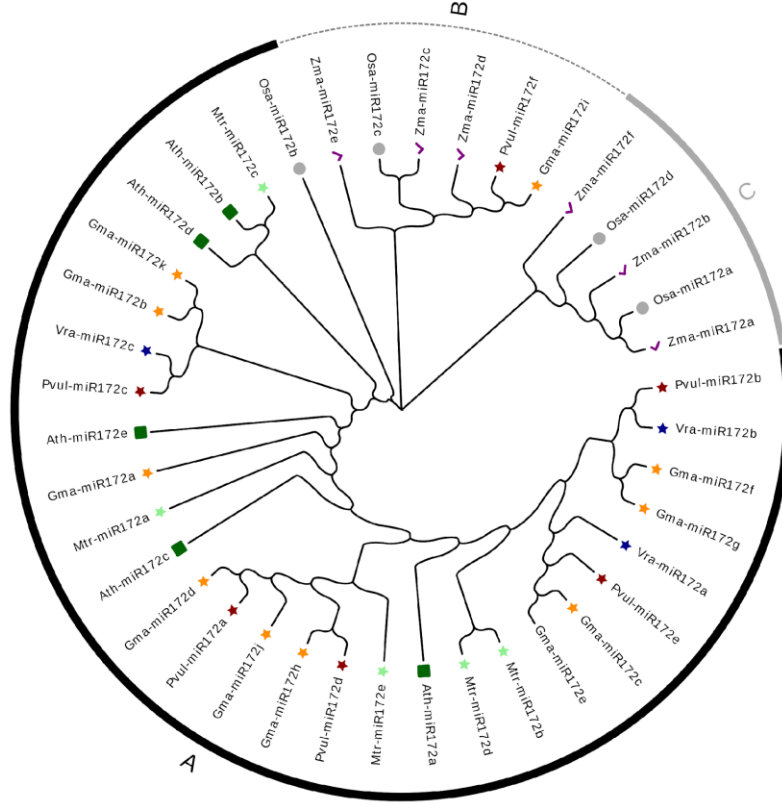
Pval-mir172 gen ailesi üyelerinin korunmuş bölge analizi sonucunda 21 nükleotitik olgun dizilerin 19 nükleotitik kısmının diziler arasında korunduğu tespit edilmiştir. Olgun diziler Şekil 4.3'te kırmızı renk ile gösterilmiştir. *H. vulgare*'deki miR172 gen ailesi üyelerinin 20-21 nükleotit arasında değişen olgun dizilerinin 19 nükleotitik kısmının korunduğu bulunmuştur (Anwar et al. 2018). Benzer şekilde *B. napus* miR172'lerinin 21 nükleotitik olgun dizilerinin 20 nükleotitik kısmı da korunmaktadır (Wang et al. 2019).



Şekil 4.3. *Pviol-miR172* gen ailesi üyelerinin korunmuşluk analizi.

miR172 genlerinin evrimsel ilişkisini anlamak adına *Pviol-miR172* gen ailesi üyelerine 6 farklı organizmadaki miR172 genleri ile çoklu dizi hizalaması yapılmıştır. Ardından bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Analiz sonucunda A, B ve C olmak üzere 3 farklı grup oluşmuştur (Şekil 4.4). *Pviol-miR172f* dışındaki *Pviol-miR172* genleri A grubunda yer almıştır. Oluşan filogenetik ağaç incelendiğinde, *Pviol-miR172a* ile *G. max miR172d* geni, *Pviol-miR172b* ile *V. radiata miR172b* geni, *Pviol-miR172c* ile *V. radiata miR172c* geni *Pviol-miR172d* ile *G. max miR172h* geni komşu genler olarak A grubunda yer almaktadır. *Pviol-miR172f* ile *G. max miR172i* geni B grubunda komşu genler olarak gözükmemektedir. Yine bu grupta *Osa-miR172c* ile *Zma-miR172c* genleri komşu genler olarak tespit edilmiştir. C grubunda da B grubunda olduğu gibi *Osa-miR172* gen ailesi üyeleri ile *Zma-miR172* gen ailesi üyeleri komşu genler olarak yer almıştır. *Ath-miR172* gen ailesi üyeleri yalnızca A grubunda yer almaktadır.

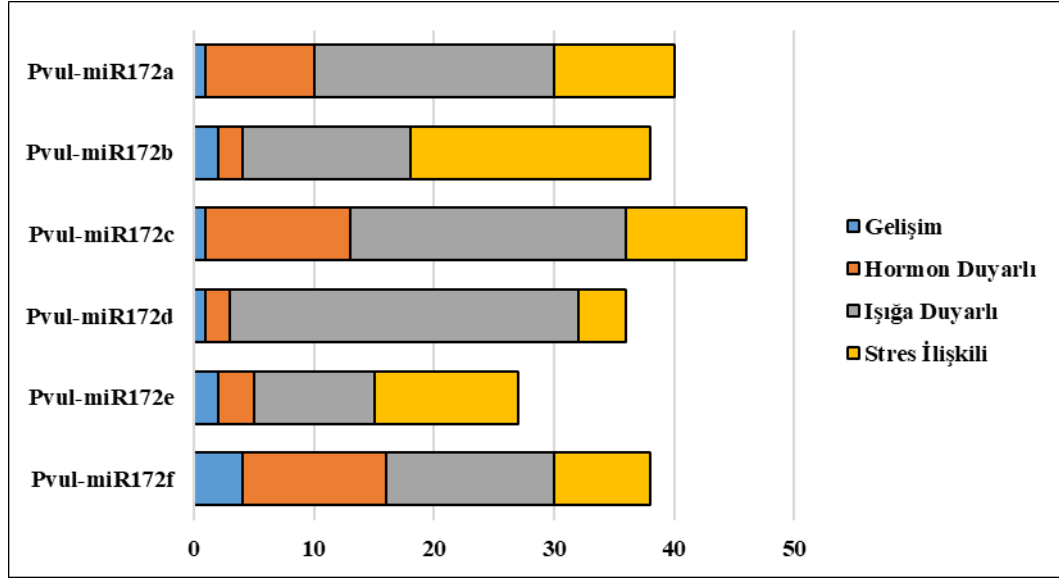
B. napus miR172 gen ailesi üyelerinin yedi farklı organizma ile yapılan filogenetik analiz sonucunda bu üyeler dört farklı gruba ayrılmıştır. Benzer şekilde *Osa-miR172a* ile *Zma-miR172a* komşu genler olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *Zma-miR172c* ile *Zma-miR172d*'den farklı gruplarda yer almaktadır. *Ath-miR172* gen ailesi üyeleri her bir grupta da yer almaktadır (Wang et al. 2019). Sekiz farklı organizmadaki miR172 gen ailesi üyelerinin öncül dizileriyle gerçekleştirilen filogenetik analiz sonucunda üyelerin üç farklı sınıfa ayrıldığı tespit edilmiştir. Farklı olarak *Ath-miR172c* ile *Zma-miR172a*'nın komşu genler olduğu bulunmuştur. *Ath-miR172* gen ailesi üyeleri ise sınıf 1 dışında diğer sınıflarda yer almaktadır (Dash et al. 2023).



Şekil 4.4. *Pvul-miR172* gen ailesi üyelerinin filogenetik analizi.

4.3. *Pvul-miR172* Gen Ailesi Üyelerinin Cis-Etkili Elementlerin Tahmini

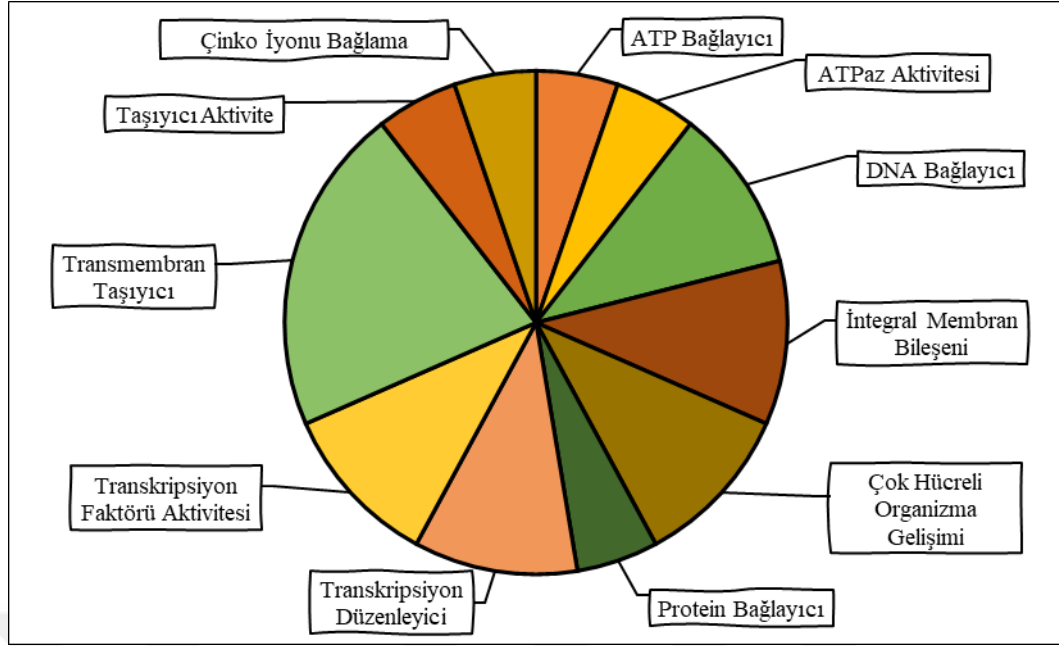
Pvul-mir172 gen ailesi üyelerinin yukarı akış bölgesinde yer alan cis etkili elementler analiz edilmiştir. Analiz sonucunda en fazla element *Pvul-miR172d* üzerinde yer almaktadır. Gelişim ile ilişkili en fazla bulunan element O2-site (5) elementi olmuştur. Gelişim ile ilişkili elementlerin en fazla bulunduğu *Pvul-miR172* gen ailesi üyesi ise *Pvul-miR172f* (4) olmuştur (Şekil 4.5). Hormon duyarlı elemenler arasında en fazla bulunan element ERE (11)'dir. Hormon duyarlı elementler en fazla *Pvul-miR172c* ve *Pvul-miR172f* (12) üzerinde bulunmuştur. Stres ilişkili elementler incelendiğinde en fazla bulunan element MYB (34) olarak tespit edilmiştir. Stresle ilişkili elementler en fazla *Pvul-miR172d* (29) üzerinde yer almaktadır. Benzer elementler *B. napus* miR172 gen ailesi üyelerinde de tespit edilmiştir. Cis-etkili elementler en fazla *Bna-miR172d* üzerinde tespit edilmiştir (Wang et al. 2019). *S. lycopersicum*'daki miR172 gen ailesi üyelerinde de ERE, MYB ve diğer benzer elementler bulunmuştur (Koc et al. 2015).



Şekil 4.5. *Pvu-miR172* gen ailesi üyelerinin farklı süreçlerde görev alan cis-etkili elementlerinin tahmini.

4.4. *Pvu-miR172* Hedef Genlerinin Fonksiyonel Analizi

Pvu-miR172 gen ailesi üyelerinin hedef genleriyle gerçekleştirilen GO analizi sonucunda birçok farklı süreçte görev aldıkları anlaşılmıştır. Hedef genler transmembran zar boyunca belli maddelerin taşınmasında görev aldıkları anlaşılmıştır. Ayrıca protein bağlayıcı ve çok hücreli organizma gelişimi süreçlerine de dahil olmaktadır. Hedef genlerden ABC Transporter en fazla biyolojik sürece sahip gen olmuştur. Ardından NRT ve AP2 ile UAA Transporter gelmektedir (Şekil 4.6). *G. max* ABC genlerinin GO analizi sonucunda da birçok farklı biyolojik süreçte görev aldıkları ve çoğunlukla taşıma görevi üstlendikleri tespit edilmiştir (Mishra et al. 2019). Benzer şekilde *Z. mays* NRT geninin de taşıyıcı görevlere sahip olduğu bulunmuştur (Jia et al. 2023).



Şekil 4.6. *Pvul-miR172* hedef genlerinin GO analizi.

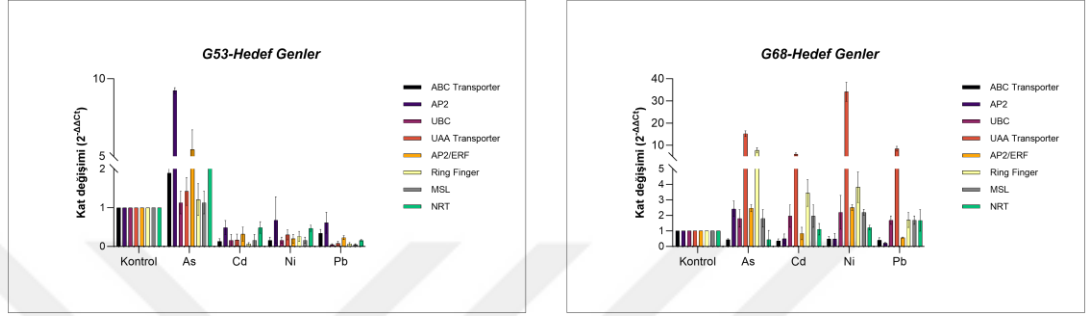
4.5. *Pvul-miR172* ve Hedef Genlerin Kantitatif Real Time Analizi

Pvul-miR172 gen ailesi üyelerinin hedef aldığı sekiz genin dört farklı ağır metal stresi altında, dayanıklı (G68) ve hassas (G53) olmak üzere iki farklı genotipte ifade durumları analiz edilmiştir. Analiz sonucunda bu hedef genler G53 genotipinde As stresi haricinde düşük ifade düzeyi sergilemiştir (Şekil 4.7). AP2 geni tüm stresler altında ifadesi en fazla olan gen olmuştur. As ve Pb stresinde UBC, Cd stresinde Ring Finger ve Ni stresinde ABC Transporter, UBC ve MSL genleri en az ifade gösteren genler olmuştur.

G68 genotipindeki bütün stres türlerinde yüksek ifade seviyesi gösteren hedef genlerin bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). UAA Transporter geni her stres türünde en yüksek ifade düzeyi gösteren gen olmuştur. As stresi altında ABC Transporter ile NRT, Cd stresinde ABC Transporter, Ni stresinde ABC Transporter ile AP2 ve Pb stresinde AP2 genleri en düşük ifade düzeyi gösteren genler olarak tespit edilmiştir.

G68 genotipinde As stresi altında yüksek ifade düzeyi gösteren Ring Finger geninin aşırı ifade ettirildiği transgenik *A. thaliana* hatlarında As stresinde karşı duyarlı hatlar elde edilmiştir (Lim et al. 2014). Cd stresinde G53 genotipinde düşük ifade düzeyine sahip olan UBC geni G68 genotipinde artış göstermiştir. Cd stresine maruz

kalmış *Poa pratensis*'de strese toleranslı genotipe UBC gen ifadesinin yukarı yönde düzenlendiği bulunmuştur (Xian et al. 2020). Pb stresi altındaki G53 genotipine kıyasla G68 genotipinde artış gösteren NRT geni ile benzer şekilde Pb stresine maruz kalmış *Raphanus sativus*'daki birkaç NRT gen ailesi üyesinin de ifadesinin arttığı bulunmuştur (Ding et al. 2023).



Şekil 4.7. G53 ve G68 genotiplerinde ağır metal stresleri altında *Pvul-miR172* hedef genlerinin qRT-PCR analizi

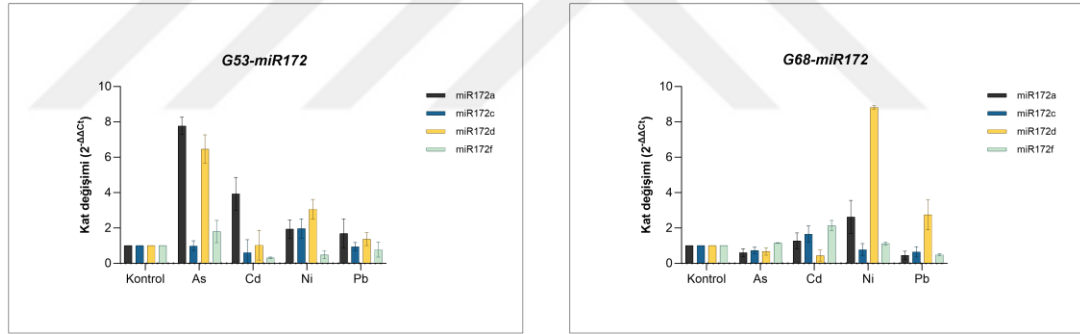
Pvul-miR172 gen ailesi üyelerinin dört farklı ağır metal stresi altında, G53 ve G68 olmak üzere iki farklı genotipte ifade durumları analiz edilmiştir. G53 genotipinde gerçekleştirilen analiz sonucunda Ni stresi hariç tüm stresler altında en yüksek ifade düzeyini *Pvul-miR172a* göstermiştir (Şekil 4.8). As stresi hariç tüm streslerde ise en düşük ifade seviyesine sahip olan *Pvul-miR172* gen ailesi üyesi *Pvul-miR172f* olmuştur. Ni stresinde en yüksek ifade düzeyini *Pvul-miR172d* gösterirken As stresinde en düşük ifade düzeyini *Pvul-miR172c* göstermiştir.

G68 genotipinde ise As ve Cd stresi altında *Pvul-miR172f*'nin ifade seviyesi en yüksek olurken Ni ve Pb stresinde *Pvul-miR172d*'nin ifadesi en yüksek düzeyde tespit edilmiştir. As ve Pb stresinde *Pvul-miR172a*, Cd stresinde *Pvul-miR172d* ve Ni stresinde *Pvul-miR172c* ifade seviyesi en düşük *Pvul-miR172* gen ailesi üyesi olmuştur (Şekil 4.8).

As stresi altındaki G53 genotipinde ifade düzeyi en yüksek olan *Pvul-miR172a* G68 genotipinde ifade seviyesi en düşük olan *Pvul-miR172* gen ailesi üyesi olurken Cd stresi altındaki G53 genotipinde en düşük ifade düzeyi gösteren *Pvul-miR172f*'nin G68 genotipinde en yüksek ifade düzeyi gösteren *Pvul-miR172* gen ailesi üyesi olduğu tespit edilmiştir. Ni ve Pb kurşun streslerinde de farklı ifade profilleri gözlemlenmiştir. Bu

nedenle *Pvul-miR172* gen ailesi üyelerinin aynı streslere karşı farklı genotiplerde değişen yanıtlar verdiği görülmektedir.

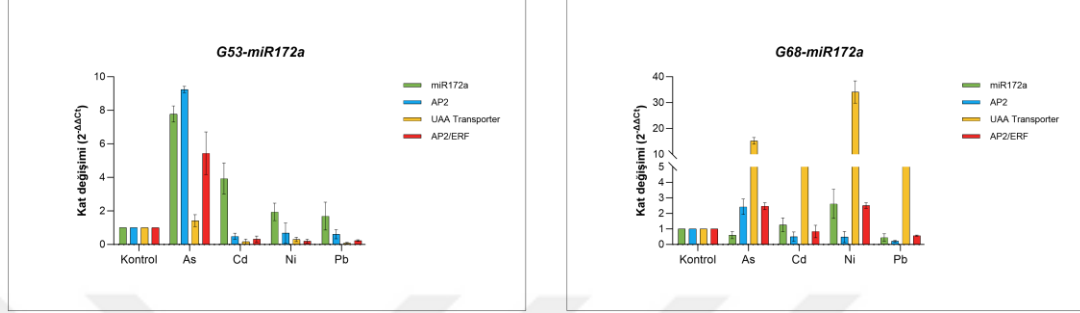
As stresine maruz kalmış *B. juncea*'daki kök dokusunda As uygulamasının 1. saatinde *ath-miR172a* ifadesi azalan bir ifade seviyesi gösterirken uygulamanın 4. saatinde artan ifade seviyesi sergilemiştir (Srivastava et al. 2012). Benzer şekilde As stresi altındaki *O. sativa*'da kök dokusunda uygulamanın 6. saatinde *miR172*'nin ifadesi artarken 24. saatin sonunda ifade düzeyi azalmıştır (Yu et al. 2012). *Helianthus annuus*'taki Cd uygulamasında *miR172* hem yaprak hem de kök dokularında artan ifade seviyeleri göstermiştir (Ebrahimi Khaksefidi et al. 2015). İki farklı genotipte Cd stresine maruz bırakılan *H. vulgare*'de ise *hvu-miR172b* ifadesi azalan bir ifade düzeyi göstermiştir (Yu et al. 2019). Pb stresi altındaki *G. hirsutum* yaprak dokusundaki *miR172* ifadesinin 50 μ M Pb dozunda aşağı yönde düzenlenirken 100 ve 200 μ M konsantrasyonunda artış gösterdiği bulunmuştur (He et al. 2014).



Şekil 4.8. G53 ve G68 genotiplerinde ağır metal stresleri altında *Pvul-miR172* gen aile üyelerinin qRT-PCR analizi

G53 genotipinde *Pvul-miR172* gen ailesi üyelerinden *Pvul-miR172a*, tüm streslerde artan ifade düzeyi göstermiştir (Şekil 4.9). As stresi hariç tüm stresler altında AP2, UAA Transporter ve AP2/ERF genlerinin ifadesi *Pvul-miR172a*'nın aksine düşük ifade profili sergilemiştir. G68 genotipinde ise *Pvul-miR172a*'nın ifadesi As ve Pb stresinde altında bir azalış sergilerken Cd ve Ni stresleri altında ifadesi artmıştır. As stresinde tüm hedef genler ve Pb stresinde UAA Transporter genlerinin ifadesi *Pvul-miR172a*'nın aksine artış göstermiştir. Cd stresinde AP2 ile AP2/ERF ve Ni stresinde AP2 genlerinin ifadesi *Pvul-miR172a*'nın aksine azalmıştır.

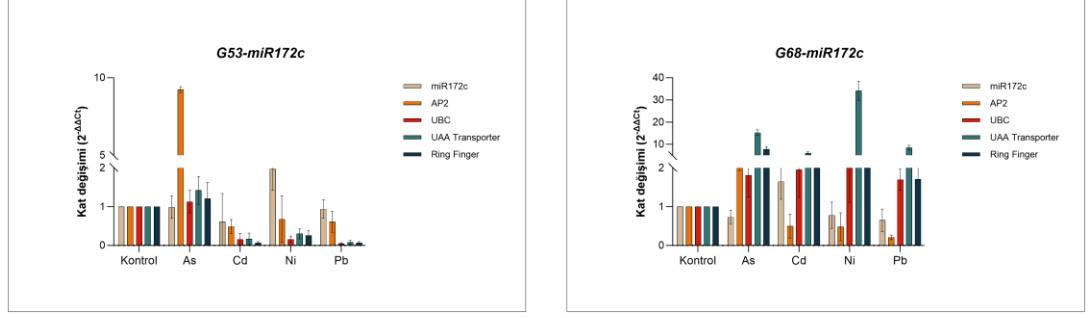
UAA Transporter geni G53 genotipinde genel olarak düşük ifade profiline sahipken G68 genotipinde yüksek seviyede ifade profiline sahip olduğu bulunmuştur. Cd stresine maruz kalmış *O. sativa*'da strese toleranslı çeşitte UAA Transporter gen ifadesi yukarı yönde düzenlendiği bulunmuştur (Fang et al. 2019).



Şekil 4.9. Ağır metal stresleri altında G53 ve G68 genotiplerinde *Pvl-miR172a* ve hedef genlerinin qRT-PCR analizleri

G53 genotipinde *Pvl-miR172* gen ailesi üyelerinden *Pvl-miR172c*, Ni stresi haricindeki tüm streslerde azalan bir ifade profili sergilemiştir (Şekil 4.10). As stresinde tüm hedef genler *Pvl-miR172c*'nin aksine artan ifade profili sergilerken Ni stresinde *Pvl-miR172c*'nin aksine azalan bir ifade profili göstermiştir. G68 genotipinde ise *Pvl-miR172c*'nin ifadesi Cd stresi hariç tüm streslerde düşük ifade düzeyi sergilemiştir. As stresinde tüm hedef genler ve Ni ile Pb stresinde UBC, UAA Transporter ve Ring Finger genlerinin ifadesi *Pvl-miR172a*'nın aksine artış göstermiştir. Cd stresinde ise AP2 gen ifadesi *Pvl-miR172a*'nın aksine azalmıştır.

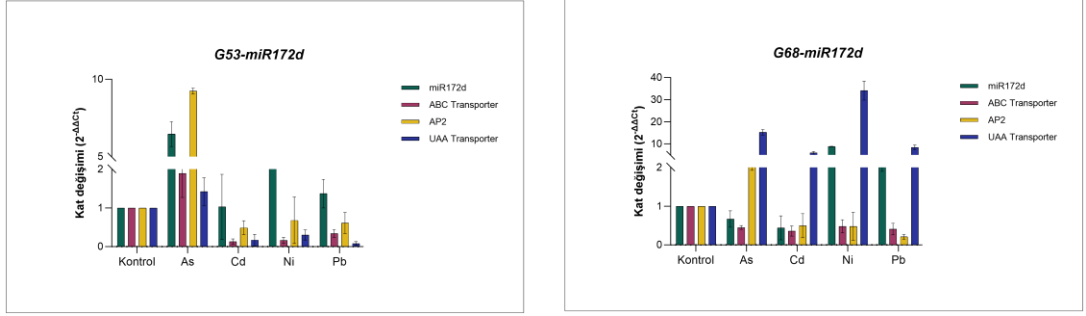
As stresi haricinde G53 genotipinde düşük ifade düzeyi gösteren UBC ve Ring Finger genleri G68 genotipinde yüksek ifade seviyesi sergilemiştir. *N. tabacum*'da Cd birikimini azaltmak ve bitkinin Cd'a toleransını sağlamak amacıyla UBC geninin aşırı ifade ettirildiği hatlar elde edilmiştir. Bunun sonucunda hem Cd birikimi azalmış hem de strese karşı tolerans sağlandığı gözlemlenmiştir (Bahmani et al. 2017). Cd stresine maruz kalmış *S. lycopersicum*'da Ring Finger geninin aşırı ifade ettirildiği transgenik hatlarda ise sürgün ve köklerdeki Cd birikiminin azalması yanı sıra CAT, DHAR ve MDHAR gibi antioksidan aktivite gösteren genlerin seviyesinin arttığı ve bu nedenle bitkinin ağır metal stresine karşı artan tolerans göstermesine katkı sağladığı bulunmuştur (Ahammed et al. 2021).



Şekil 4.10. Ağır metal stresleri altında G53 ve G68 genotiplerinde *Pvu-miR172c* ve hedef genlerinin qRT-PCR analizleri

G53 genotipinde *Pvu-miR172* gen ailesi üyelerinden *Pvu-miR172d*, Cd stresi haricindeki tüm streslerde artan ifade profili göstermiştir (Şekil 4.11). As stresi haricindeki diğer stresler altında tüm hedef genler *Pvu-miR172d*'nin aksine düşük ifade profili göstermiştir. G68 genotipinde ise *Pvu-miR172d*'nin ifadesi Ni ve Pb stresinde yüksek ifade düzeyi sergilerken As ve Cd stresi altında düşük ifade düzeyi göstermiştir. As stresinde AP2 ile UAA Transporter ve Cd stresinde UAA Transporter genlerinin ifadesi *Pvu-miR172d*'nin aksine artmıştır. Ni ile Pb stresinde ise ABC Transporter ve AP2 genlerinin ifadesi *Pvu-miR172d*'nin aksine azalmıştır.

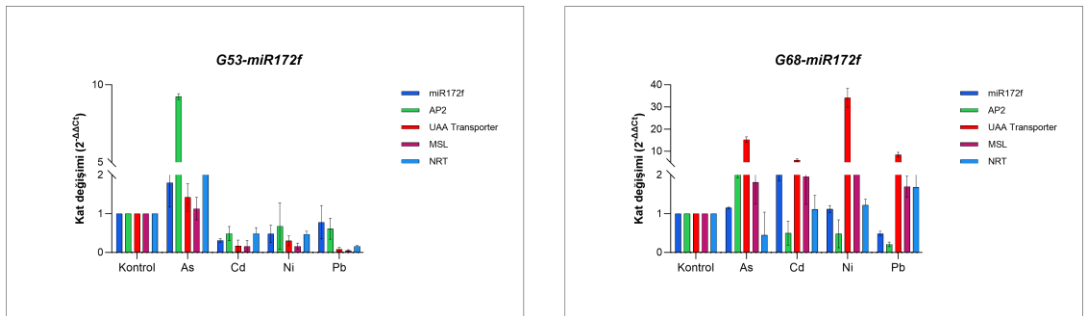
ABC Transporter gen ifadesi As stresi altındaki G53 genotipi dışında her iki genotipte de düşük ifade seviyesi göstermiştir. Ancak *Populus tomentosa* ABC Transporter geninin aşırı ifade ettirildiği *A. thaliana* transgenik hatlarında Cd birikiminin azaldığı ve hatların strese karşı daha toleranslı olduğu bildirilmiştir (Wang et al. 2019). Ayrıca Pb stresine altındaki *M. sativa*'da ABC transporter geni ifadesinin toleranslı çeşitte hassas çeşide göre yukarı yönde düzenlendiği bulunmuştur (Wang et al. 2021).



Şekil 4.11. Ağır metal stresleri altında G53 ve G68 genotiplerinde *Pvu-miR172d* ve hedef genlerinin qRT-PCR analizleri

G53 genotipinde *Pvu-miR172* gen ailesi üyelerinden *Pvu-miR172f*, As stresi haricindeki tüm streslerde azalan ifade profili sergilemiştir (Şekil 4.12). Streslerin hepsinde tüm hedef genler *Pvu-miR172f* ile benzer ifade profili göstermiştir. G68 genotipinde ise *Pvu-miR172f*'nin ifadesi Pb stresi haricinde artan ifade düzeyi sergilemiştir. As stresinde NRT ve Cd ile Ni stresinde AP2 genlerinin ifadesi *Pvu-miR172f*'nin aksine azalmıştır. Pb stresinde ise UAA Transporter, MSL ve NRT genlerinin ifadesi *Pvu-miR172f*'nin aksine artış göstermiştir.

NRT gen ifadesi Pb stresi altındaki G53 genotipinde düşük seviyeye sahipken G68 genotipinde yüksek düzeydedir. *A. thaliana*'da NRT geninin bulunmadığı transgenik hatlarda Pb birikiminin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle strese karşı toleransta önemli bir gen olarak görülmüştür (Zhu et al. 2019).



Şekil 4.12. Ağır metal stresleri altında G53 ve G68 genotiplerinde *Pvu-miR172f* ve hedef genlerinin qRT-PCR analizleri

Pvul-miR172 gen ailesi üyeleri hem ağır metal stresi türüne bağlı olarak hem de genotipe bağlı olarak farklı ifade yanıtları vermiştir. As stresi maruziyeti sonucunda G53 genotipindeki *Pvul-miR172a* ve *Pvul-miR172d* ifadeleri yüksek seviyede iken G68 genotipinde düşük seviyede kalmıştır. Ayrıca UAA Transporter ve Ring Finger genlerinin ifade seviyeleri G53 genotipine kıyasla G68 genotipinde daha yüksek seviye tespit edilmiştir.

Cd stresi sonucunda G53 genotipindeki *Pvul-miR172d*'nin ifadesi yüksek seviyede iken G68 genotipinde düşük seviyede kalmıştır. Ayrıca G53 genotipindeki *Pvul-miR172c* ve *Pvul-miR172f*'nin ifadesi düşük seviyede iken G68 genotipinde yüksek seviye göstermiştir. Ek olarak G53 genotipine kıyasla UAA Transporter, UBC, Ring Finger, MSL ve NRT genlerinin ifade seviyeleri G68 genotipinde daha yüksek seviye tespit edilmiştir.

Ni stresine maruz kalan G53 genotipindeki *Pvul-miR172c*'nin ifade düzeyi yüksek seviyede iken G68 genotipinde düşük seviyede kalmıştır. Ayrıca G53 genotipindeki *Pvul-miR172f*'nin ifadesi düşük seviyede iken G68 genotipinde yüksek seviyede tespit edilmiştir. Ek olarak G53 genotipine kıyasla UAA Transporter, UBC, Ring Finger, MSL ve NRT genlerinin ifade seviyeleri G68 genotipinde daha yüksek seviye tespit edilmiştir.

Pb stresi sonucunda *Pvul-miR172a* hariç tüm *Pvul-miR172* gen ailesi üyeleri her iki genotipte de benzer ifade profili göstermiştir. Ayrıca G53 genotipine kıyasla UAA Transporter, UBC, Ring Finger, MSL ve NRT genlerinin ifade seviyeleri G68 genotipinde daha yüksek seviye tespit edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

P. vulgaris genomunda 6 adet miR172 gen ailesi üyesi tanımlanmıştır. Bu üyeler fasulye genomunda 5 farklı kromozom üzerinde yer almaktadır. Altı farklı organizma ile gerçekleştirilen filogenetik analiz sonucunda 3 farklı gruba ayrılmışlardır. *Pvul-miR172* gen ailesi üyelerinin yukarı akış bölgelerinde stres ile ilişkili cis-etkili elementlere sahip oldukları anlaşılmıştır. *Pvul-miR172* hedef genlerinin özellikle membran bölgesinde bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri olduğu tespit edilmiştir.

Pvul-miR172 gen ailesi üyeleri As, Cd, Pb ve Ni streslerine karşı değişken yanıtlar vermişlerdir. Bu yanıtlar çalışmada kullanılan iki farklı genotipte de değişiklik göstermiştir. *Pvul-miR172*'nin hedefleri de benzer şekilde ağır metal çeşidine ve genotipine bağlı olarak farklı ifade profilleri sergilemiştir. Bazı örnek gruplarında *Pvul-miR172* gen ailesi üyeleri ile hedef genler arasında zıt ifade durumları tespit edilirken bazı örnek gruplarında ise benzer ifade profilleri bulunmuştur. Özellikle G68 genotipinde *Pvul-miR172* gen ailesi üyelerinin hedef genler ile G53 genotipinde tespit edilmeyen ilişkisi ağır metal toleransının anlaşılması adına bir fikir sunabilir. Örnek olarak ağır metal stresi toleransında önemli genlerden MSL, NRT, Ring Finger, UAA Transporter ve UBC genlerinin her iki genotipteki ifade profilleri bu ilişkinin anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

Bitkilerin büyüme, gelişim, savunma ve stres koşullarında görev alan genler ile etkileşim halindeki miRNA'ların kullanıldığı transgenik yaklaşımlar hem abiyotik stres toleransını hem de mahsul verimini güçlendirmektedir (Begum 2022). Bu transgenik bitkilerin geliştirilmesi sırasında yapay miRNA'lar (amiRNA) ve hedef taklitleri (STTM) yoluyla gen susturma ve hedef genlerin aşırı ekspresyonu gibi araçlar kullanılmaktadır (Tiwari et al. 2014; Teotia and Tang 2017). Ayrıca miRNA'ların aşırı seviyede ifade ettirilmesi hedef genlerin ifadesinin düzenlenmesi ile sonuçlanabilmektedir (Zhang et al. 2022). Bulunan yeni bir yaklaşımda ise miRNA kodlu peptid (miPEP)'ler yoluyla miRNA'ların ifadesinin arttırılabilindiği tespit edilmiştir (Ren et al. 2021). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile yukarı bahsedilen yaklaşımlar kullanılarak ağır metal stresine dirençli hat veya çeşitler geliştirmek mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T., and Harberd, N. P. 2007. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6484–6489.
- Ahammed, G. J., Li, C. X., Li, X., Liu, A., Chen, S., and Zhou, J. (2021). Overexpression of tomato RING E3 ubiquitin ligase gene SLRING1 confers cadmium tolerance by attenuating cadmium accumulation and oxidative stress. *Physiologia plantarum*, 173(1), 449-459.
- Akdogan, G., Tufekci, E. D., Uranbey, S., and Unver, T. 2016. miRNA-based drought regulation in wheat. *Functional and Integrative Genomics*, 16(3), 221–233.
- Ali, H., and Khan, E. 2018. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’—proposal of a comprehensive definition. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 100(1), 6–19.
- Almeida, M. I., Reis, R. M., and Calin, G. A. 2011. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1), 1–8.
- Amasino, R. 2010. Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, 61(6), 1001–1013.
- Amasino, R. M., and Michaels, S. D. (2010). The timing of flowering. *Plant Physiology*, 154(2), 516-520.
- An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piñeiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C., and Coupland, G. 2004. CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development*, 131(15), 3615–3626.
- Andrés, F., and Coupland, G. 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), Article 9.
- Anonim, 2024. Web Sitesi: <https://data.tuik.gov.tr>, Erişim Tarihi: 25.01.2024
- Anonymous, 2024a. Web Sitesi: <https://www.fao.org/faostat/en/#data>, Erişim Tarihi: 28.01.2024
- Anonymous, 2024b. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ptable/density>, Erişim Tarihi: 06.01.2024
- Anwar, N., Ohta, M., Yazawa, T., Sato, Y., Li, C., Tagiri, A., Sakuma, M., Nussbaumer, T., Bregitzer, P., Pourkheirandish, M., Wu, J., and Komatsuda, T. (2018). miR172 downregulates the translation of cleistogamy 1 in barley. *Annals of botany*, 122(2), 251-265.
- Asati, A., Pichhode, M., and Nikhil, K. 2016. Effect of heavy metals on plants: an overview. *International Journal of Application or Innovation in Engineering and Management*, 5(3), 56–66.
- Aukerman, M. J., and Sakai, H. 2003. Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *The Plant Cell*, 15(11), 2730–2741.

- Axtell, M. J. 2013. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 137–159.
- Babaei, S., Singh, M. B., and Bhalla, P. L. 2023. Circular RNAs modulate the floral fate acquisition in soybean shoot apical meristem. *BMC Plant Biology*, 23(1), 322.
- Bahmani, R., Kim, D., Lee, B. D., and Hwang, S. (2017). Over-expression of tobacco UBC1 encoding a ubiquitin-conjugating enzyme increases cadmium tolerance by activating the 20S/26S proteasome and by decreasing Cd accumulation and oxidative stress in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant molecular biology*, 94, 433–451.
- Barakat, M. A. 2011. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(4), 361–377.
- Begum, Y. 2022. Regulatory role of microRNAs (miRNAs) in the recent development of abiotic stress tolerance of plants. *Gene*, 821, 146283.
- Bhat, J. A., Shivaraj, S. M., Singh, P., Navadagi, D. B., Tripathi, D. K., Dash, P. K., Solanke, A. U., Sonah, H., and Deshmukh, R. 2019. Role of silicon in mitigation of heavy metal stresses in crop plants. *Plants*, 8(3), 71.
- Bhogireddy, S., Mangrauthia, S. K., Kumar, R., Pandey, A. K., Singh, S., Jain, A., Budak, H., Varshney, R. K., and Kudapa, H. 2021. Regulatory non-coding RNAs: a new frontier in regulation of plant biology. *Functional and Integrative Genomics*, 21(3), 313–330.
- Bibi, M., Samiullah, F. B., and Saba Afzal, S. 2023. Essential and non-essential heavy metals sources and impacts on human health and plants. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 12(2), 835–847.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D., and Chalot, M. 2003. Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *The Plant Cell*, 15(12), 2911–2928.
- Blázquez, M. A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M. R., and Weigel, D. 1998. Gibberellins Promote Flowering of Arabidopsis by Activating the LEAFY Promoter. *The Plant Cell*, 10(5), 791–800.
- Boss, P. K., Bastow, R. M., Mylne, J. S., and Dean, C. 2004. Multiple Pathways in the Decision to Flower: Enabling, Promoting, and Resetting. *The Plant Cell*, 16(suppl_1), S18–S31.
- Budak, H., Kantar, M., Bulut, R., and Akpinar, B. A. 2015. Stress responsive miRNAs and isomiRs in cereals. *Plant Science*, 235, 1–13.
- Bukhari, S. A. H., Shang, S., Zhang, M., Zheng, W., Zhang, G., Wang, T. Z., Shamsi, I. H., and Wu, F. (2015). Genome-wide identification of chromium stress-responsive micro RNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) roots. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(11), 2573–2582.
- Burklew, C. E., Xie, F., Ashlock, J., and Zhang, B. 2014. Expression of microRNAs and their targets regulates floral development in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Functional and Integrative Genomics*, 14(2), 299–306.
- Candar-Cakir, B., Arican, E., and Zhang, B. 2016. Small RNA and degradome deep sequencing reveals drought-and tissue-specific micrnas and their important

- roles in drought-sensitive and drought-tolerant tomato genotypes. *Plant Biotechnology Journal*, 14(8), 1727–1746.
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., and Huerta-Cepas, J. 2021. eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Molecular Biology and Evolution*, 38(12), 5825–5829.
- Chao, H., Hu, Y., Zhao, L., Xin, S., Ni, Q., Zhang, P., and Chen, M. 2022. Biogenesis, Functions, Interactions, and Resources of Non-Coding RNAs in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), Article 7.
- Chao, J., Li, Z., Sun, Y., Aluko, O. O., Wu, X., Wang, Q., and Liu, G. 2021. MG2C: a user-friendly online tool for drawing genetic maps. *Molecular Horticulture*, 1(1), 16.
- Chen, C., Li, J., Feng, J., Liu, B., Feng, L., Yu, X., Li, G., Zhai, J., Meyers, B. C., and Xia, R. 2021. sRNAanno—a database repository of uniformly annotated small RNAs in plants. *Horticulture Research*, 8, 45.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., and Guegler, K. J. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), e179.
- Chen, C., Wu, Y., Li, J., Wang, X., Zeng, Z., Xu, J., Liu, Y., Feng, J., Chen, H., He, Y., and Xia, R. 2023. TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining. *Molecular Plant*, 16(11), 1733–1742.
- Chen, J., Pan, A., He, S., Su, P., Yuan, X., Zhu, S., and Liu, Z. 2020. Different MicroRNA Families Involved in Regulating High Temperature Stress Response during Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Anther Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), Article 4.
- Chen, X. 2004. A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* Flower Development. *Science*, 303(5666), 2022–2025.
- Cheng, X., He, Q., Tang, S., Wang, H., Zhang, X., Lv, M., Liu, H., Gao, Q., Zhou, Y., Wang, Q., Man, X., Liu, J., Huang, R., Wang, H., Chen, T., and Liu, J. 2021. The miR172/IDS1 signaling module confers salt tolerance through maintaining ROS homeostasis in cereal crops. *New Phytologist*, 230(3), 1017–1033.
- Cho, H. J., Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, J.-H., Park, C.-M., and Ahn, J. H. 2012. SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) protein negatively regulates miR172 transcription via direct binding to the pri-miR172a promoter in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 586(16), 2332–2337.
- Chuck, G., Cigan, A. M., Saeteurn, K., and Hake, S. 2007. The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, 39(4), Article 4.
- Chung, M.-Y., Nath, U. K., Vrebalov, J., Gapper, N., Lee, J. M., Lee, D.-J., Kim, C. K., and Giovannoni, J. 2020. Ectopic expression of miRNA172 in tomato (*Solanum lycopersicum*) reveals novel function in fruit development through regulation of an AP2 transcription factor. *BMC Plant Biology*, 20(1), 283.

- Cobbett, C., and Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 159–182.
- Coen, E. S., and Meyerowitz, E. M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353(6339), Article 6339.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., and Coupland, G. 2007. FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316(5827), 1030–1033.
- Cui, L.-G., Shan, J.-X., Shi, M., Gao, J.-P., and Lin, H.-X. 2014. The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *The Plant Journal*, 80(6), 1108–1117.
- D'Ario, M., Griffiths-Jones, S., and Kim, M. 2017. Small RNAs: Big Impact on Plant Development. *Trends in Plant Science*, 22(12), 1056–1068.
- Dai, X., and Zhao, P. X. 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_2), W155–W159.
- DalCorso, G. 2012. Heavy Metal Toxicity in Plants. Springer Netherlands, 1–25. Dordrecht.
- DalCorso, G., Manara, A., and Furini, A. 2013. An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics*, 5(9), 1117–1132.
- Dash, P. K., Gupta, P., Sreevathsa, R., Pradhan, S. K., Sanjay, T. D., Mohanty, M. R., Roul, P. K., Singh, N. K., and Rai, R. (2023). Phylogenomic Analysis of micro-RNA Involved in Juvenile to Flowering-Stage Transition in Photophilic Rice and Its Sister Species. *Cells*, 12(10), 1370.
- de Almeida Costa, G. E., da Silva Queiroz-Monici, K., Reis, S. M. P. M., and de Oliveira, A. C. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, 94(3), 327–330.
- De Lucia, F., Crevillen, P., Jones, A. M., Greb, T., and Dean, C. (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(44), 16831–16836.
- Debernardi, J. M., Lin, H., Chuck, G., Faris, J. D., and Dubcovsky, J. 2017. microRNA172 plays a crucial role in wheat spike morphogenesis and grain threshability. *Development*, 144(11), 1966–1975.
- Ding, M., He, M., Zhang, W., Han, Y., Zhang, X., Zhang, X., Zhu, Y., Wang, Y., Liu, L., and Xu, L. (2023). Genome-wide identification and expression analysis of RsNRT gene family reveals their potential roles in response to low-nitrogen condition in radish (*Raphanus sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 321, 112273.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., and Yanofsky, M. F. 2004. The SEP4 Gene of *Arabidopsis thaliana* Functions in Floral Organ and Meristem Identity. *Current Biology*, 14(21), 1935–1940.
- Ebrahimi Khaksefidi, R., Mirlohi, S., Khalaji, F., Fakhari, Z., Shiran, B., Fallahi, H., Rafiei, F., Budak, H., and Ebrahimie, E. 2015. Differential expression of seven

- conserved microRNAs in response to abiotic stress and their regulatory network in *Helianthus annuus*. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., and Xie, Y. 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., and Aykin-Burns, N. 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal-induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 529–539.
- Fang, P., Hu, Y., Xia, W., Wu, X., Sun, T., Pandey, A. K., Ning, K., Zhu, C., and Xu, P. 2023. Transcriptome Dynamics of Common Bean Roots Exposed to Various Heavy Metals Reveal Valuable Target Genes and Promoters for Genetic Engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(1), 223–233.
- Fang, Y., Deng, X., Lu, X., Zheng, J., Jiang, H., Rao, Y., Zeng, D., Hu, J., Zhang, X., and Xue, D. (2019). Differential phosphoproteome study of the response to cadmium stress in rice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 780–788.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2023. The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. Urbanization, agrifood systems transformation and healthy diets across the rural–urban continuum. Rome, FAO.
- Feng, J., Wang, Y., Ge, W., Zhang, K., and Cui, J. 2023. Regulatory mechanism of the miR172e–LbrAP2 module during the vegetative growth phase transition in *Lilium*. *Planta*, 259(1), 26.
- Garg, V., Hackel, A., and Kühn, C. 2021. Expression Level of Mature miR172 in Wild Type and StSUT4-Silenced Plants of *Solanum tuberosum* Is Sucrose-Dependent. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), Article 3.
- Geraldo, N., Bäurle, I., Kidou, S., Hu, X., and Dean, C. 2009. FRIGIDA Delays Flowering in *Arabidopsis* via a Cotranscriptional Mechanism Involving Direct Interaction with the Nuclear Cap-Binding Complex. *Plant Physiology*, 150(3), 1611–1618.
- Ghorecha, V., Patel, K., Ingle, S., Sunkar, R., and Krishnayya, N. S. R. 2014. Analysis of biochemical variations and microRNA expression in wild (*Ipomoea campanulata*) and cultivated (*Jacquemontia pentantha*) species exposed to in vivo water stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(1), 57–67.
- Ghorecha, V., Zheng, Y., Liu, L., Sunkar, R., and Krishnayya, N. S. R. 2017. MicroRNA dynamics in a wild and cultivated species of Convolvulaceae exposed to drought stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(2), 291–300.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., and Rokhsar, D. S. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1178–D1186.
- Grobelak, A., and Kowalska, A. 2020. Heavy metal mobility in soil under futuristic climatic conditions. *Elsevier*, 437–451, .
- Gull, A., Lone, A. A., and Wani, N. U. I. 2019. Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants*, 1–19.
- Guo, Z., Kuang, Z., Zhao, Y., Deng, Y., He, H., Wan, M., Tao, Y., Wang, D., Wei, J., Li, L., and Yang, X. 2022. PmiREN2.0: from data annotation to functional

- exploration of plant microRNAs. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D1475–D1482.
- Gupta, O. P., Meena, N. L., Sharma, I., and Sharma, P. 2014. Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. *Molecular Biology Reports*, 41(7), 4623–4629.
- Hakeem, K., Sabir, M., Ozturk, M., and Mermut, A. 2014. Soil remediation and plants: prospects and challenges.
- Han, Y., Zhang, X., Wang, Y., and Ming, F. 2013. The Suppression of WRKY44 by GIGANTEA-miR172 Pathway Is Involved in Drought Response of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 8(11), e73541.
- He, Q., Zhu, S., and Zhang, B. (2014). MicroRNA–target gene responses to lead-induced stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Functional and integrative genomics*, 14, 507-515.
- He, Z., Zhang, H., Gao, S., Lercher, M. J., Chen, W.-H., and Hu, S. 2016. Evolvview v2: an online visualization and management tool for customized and annotated phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W236–W241.
- Helliwell, C. A., Wood, C. C., Robertson, M., James Peacock, W., and Dennis, E. S. 2006. The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal*, 46(2), 183–192.
- Hepworth, S. R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A., and Coupland, G. 2002. Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *The EMBO Journal*, 21(16), 4327–4337.
- Hisamatsu, T., and King, R. W. 2008. The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 3821–3829.
- Hoagland, D. R., and Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347(2nd edit).
- Hombach, S., and Kretz, M. 2016. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. Springer International Publishing, 3–17, . Cham.
- Hong, Y., and Jackson, S. 2015. Floral induction and flower formation—the role and potential applications of miRNAs. *Plant Biotechnology Journal*, 13(3), 282–292.
- Huang, C., Zhou, J., Jie, Y., Xing, H., Zhong, Y., She, W., Wei, G., Yu, W., and Ma, Y. 2016. A ramie (*Boehmeria nivea*) bZIP transcription factor BnbZIP3 positively regulates drought, salinity and heavy metal tolerance. *Molecular Breeding*, 36, 1–15.
- Huang, C.-F., Yamaji, N., Chen, Z., and Ma, J. F. 2012. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *The Plant Journal*, 69(5), 857–867.
- Huijser, P., and Schmid, M. 2011. The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 138(19), 4117–4129.
- Hwang, E.-W., Shin, S.-J., Park, S.-C., Jeong, M.-J., and Kwon, H.-B. 2011. Identification of miR172 family members and their putative targets responding to drought stress in *Solanum tuberosum*. *Genes and Genomics*, 33(2), 105–110.

- Jack, T. 2004. Molecular and Genetic Mechanisms of Floral Control. *The Plant Cell*, 16(suppl_1), S1–S17.
- Jamla, M., Patil, S., Joshi, S., Khare, T., and Kumar, V. 2021. MicroRNAs and their exploration for developing heavy metal-tolerant plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1–17.
- Jian, H., Wang, J., Wang, T., Wei, L., Li, J., and Liu, L. 2016. Identification of Rapeseed MicroRNAs Involved in Early Stage Seed Germination under Salt and Drought Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Jia, L., Hu, D., Wang, J., Liang, Y., Li, F., Wang, Y., and Han, Y. (2023). Genome-Wide Identification and Functional Analysis of Nitrate Transporter Genes (NPF, NRT2 and NRT3) in Maize. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12941.
- Jiu, S., Leng, X., Haider, M. S., Dong, T., Guan, L., Xie, Z., Li, X., Shangguan, L., and Fang, J. (2019). Identification of copper (Cu) stress-responsive grapevine microRNAs and their target genes by high-throughput sequencing. *Royal Society Open Science*, 6(1), 180735.
- José Ripoll, J., Bailey, L. J., Mai, Q.-A., Wu, S. L., Hon, C. T., Chapman, E. J., Ditta, G. S., Estelle, M., and Yanofsky, M. F. 2015. microRNA regulation of fruit growth. *Nature Plants*, 1(4), Article 4.
- Juneja, S., Saini, R., Mukit, A., and Kumar, S. 2023. Drought priming modulates ABF, GRFs, related microRNAs and induce metabolic adjustment during heat stress in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 203, 108007.
- Jung, H. J., and Kang, H. 2007. Expression and functional analyses of microRNA417 in *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(10), 805–811.
- Jung, J.-H., Ju, Y., Seo, P. J., Lee, J.-H., and Park, C.-M. 2012. The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69(4), 577–588.
- Jung, J.-H., Seo, P. J., Ahn, J. H., and Park, C.-M. 2012. *Arabidopsis* RNA-binding Protein FCA Regulates MicroRNA172 Processing in Thermosensory Flowering *. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 16007–16016.
- Jung, J.-H., Seo, P. J., Kang, S. K., and Park, C.-M. 2011. miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3/4/5 genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Molecular Biology*, 76(1), 35–45.
- Jung, J.-H., Seo, Y.-H., Seo, P. J., Reyes, J. L., Yun, J., Chua, N.-H., and Park, C.-M. 2007. The GIGANTEA-Regulated MicroRNA172 Mediates Photoperiodic Flowering Independent of CONSTANS in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(9), 2736–2748.
- Jyothi, M. N., Usha, S., Suchithra, B., Ulfath, T. K. S., Devaraj, V. R., and Babu, R. N. 2018. Boron toxicity induces altered expression of miRNAs in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6(6), 1–10.
- Kayıhan, D., Aksoy, E., and Kayıhan, C. 2021. Identification and expression profiling of toxic boron-responsive microRNAs and their targets in sensitive and tolerant wheat cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45(4), 411–433.

- Kayihan, D., Kayihan, C., and Çiftçi, Y. 2019. Moderate level of toxic boron causes differential regulation of microRNAs related to jasmonate and ethylene metabolisms in *Arabidopsis thaliana*. Turkish Journal of Botany, 43(2), 167–172.
- Khan, I., Asaf, S., Jan, R., Bilal, S., Khan, A. L., Kim, K.-M., and Al-Harrasi, A. 2023. Genome-wide annotation and expression analysis of WRKY and bHLH transcriptional factor families reveal their involvement under cadmium stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Frontiers in Plant Science, 14, 1100895.
- Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, H. S., Huijser, P., and Ahn, J. H. 2012. The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 Module Regulates Ambient Temperature-Responsive Flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 159(1), 461–478.
- Kim, W., and Ahn, J. H. 2014. MicroRNA-target Interactions: Important Signaling Modules Regulating Flowering Time in Diverse Plant Species. Critical Reviews in Plant Sciences, 33(6), 470–485.
- Klupšaitė, D., and Juodeikienė, G. 2015. Legume: Composition, protein extraction and functional properties. A review. Chemical Technology, 66(1), 5–12.
- Koc, I., Filiz, E., and Tombuloglu, H. 2015. Assessment of miRNA expression profile and differential expression pattern of target genes in cold-tolerant and cold-sensitive tomato cultivars. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 29(5), 851–860.
- Komiya, R., and Nonomura, K.-I. 2014. Isolation and Bioinformatic Analyses of Small RNAs Interacting with Germ Cell-Specific Argonaute in Rice. Humana Press, 235–245, . Totowa, NJ.
- Kouhi, F., Sorkheh, K., and Ercisli, S. 2020. MicroRNA expression patterns unveil differential expression of conserved miRNAs and target genes against abiotic stress in safflower. PLOS ONE, 15(2), e0228850.
- Krizek, B. A., and Fletcher, J. C. 2005. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. Nature Reviews Genetics, 6(9), Article 9.
- Lee, H., Yoo, S. J., Lee, J. H., Kim, W., Yoo, S. K., Fitzgerald, H., Carrington, J. C., and Ahn, J. H. 2010. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. Nucleic Acids Research, 38(9), 3081–3093.
- Lee, J. H., Yoo, S. J., Park, S. H., Hwang, I., Lee, J. S., and Ahn, J. H. 2007. Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. Genes and Development, 21(4), 397–402.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell, 75(5), 843–854.
- Lee, S., Singh, M. B., and Bhalla, P. L. 2023. Functional analysis of soybean miR156 and miR172 in tobacco highlights their role in plant morphology and floral transition. Plant Physiology and Biochemistry, 196, 393–401.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., and Rombauts, S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Research, 30(1), 325–327.

- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E., and Yu, H. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 15(1), 110–120.
- Li, H., Zhang, Z., Huang, F., Chang, L., Ma, Y., and Zhao, X. 2012. MicroRNA Expression Profiles in Strawberry Plants. *Acta Horticulturae*, 929, 33–37.
- Li, L., Ju, Y., Zhang, C., Tong, B., Lu, Y., Xie, X., and Li, W. 2023. Genome-wide analysis of the heat shock transcription factor family reveals saline-alkali stress responses in *Xanthoceras sorbifolium*. *PeerJ*, 11, e15929.
- Li, R., Chen, D., Wang, T., Wan, Y., Li, R., Fang, R., Wang, Y., Hu, F., Zhou, H., Li, L., and Zhao, W. 2017. High throughput deep degradome sequencing reveals microRNAs and their targets in response to drought stress in mulberry (*Morus alba*). *PLOS ONE*, 12(2), e0172883.
- Li, W., Wang, T., Zhang, Y., and Li, Y. 2016. Overexpression of soybean miR172c confers tolerance to water deficit and salt stress, but increases ABA sensitivity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 175–194.
- Li, X., Guo, F., Ma, S., Zhu, M., Pan, W., and Bian, H. 2019. Regulation of flowering time via miR172-mediated APETALA2-like expression in ornamental gloxinia (*Sinningia speciosa*). *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 20(4), 322.
- Li, Y., Li, W., and Jin, Y.-X. 2005. Computational Identification of Novel Family Members of MicroRNA Genes in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(2), 75–87.
- Lian, H., Wang, L., Ma, N., Zhou, C.-M., Han, L., Zhang, T.-Q., and Wang, J.-W. 2021a. Redundant and specific roles of individual MIR172 genes in plant development. *PLOS Biology*, 19(2), e3001044.
- Lian, H., Wang, L., Ma, N., Zhou, C.-M., Han, L., Zhang, T.-Q., and Wang, J.-W. 2021b. Redundant and specific roles of individual MIR172 genes in plant development. *PLOS Biology*, 19(2), e3001044.
- Liang, C., Liu, H., Hao, J., Li, J., and Luo, L. 2019. Expression profiling and regulatory network of cucumber microRNAs and their putative target genes in response to cucumber green mottle mosaic virus infection. *Archives of Virology*, 164(4), 1121–1134.
- Liang, C., Liu, X., Sun, Y., Yiu, S.-M., and Lim, B. L. 2014. Global small RNA analysis in fast-growing *Arabidopsis thaliana* with elevated concentrations of ATP and sugars. *BMC Genomics*, 15(1), 116.
- Liang, G., Ai, Q., and Yu, D. 2015. Uncovering miRNAs involved in crosstalk between nutrient deficiencies in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 5(1), Article 1.
- Lim, S. D., Hwang, J. G., Han, A. R., Park, Y. C., Lee, C., Ok, Y. S., and Jang, C. S. (2014). Positive regulation of rice RING E3 ligase OshIR1 in arsenic and cadmium uptakes. *Plant molecular biology*, 85, 365–379.
- Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A., and Zheng, C.-C. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14(5), 836–843.

- Liu, W., Cheng, C., Chen, F., Ni, S., Lin, Y., and Lai, Z. 2018. High-throughput sequencing of small RNAs revealed the diversified cold-responsive pathways during cold stress in the wild banana (*Musa itinerans*). *BMC Plant Biology*, 18(1), 308.
- Livak, K. J., and 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.
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., and Carrington, J. C. 2002a. Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants[W]. *The Plant Cell*, 14(7), 1605–1619.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. 2002b. Cleavage of Scarecrow-like mRNA Targets Directed by a Class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 297(5589), 2053–2056.
- Lohmann, J. U., and Weigel, D. 2002. Building Beauty: The Genetic Control of Floral Patterning. *Developmental Cell*, 2(2), 135–142.
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., and Hofacker, I. L. 2011. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 26.
- Luan, Y., Cui, J., Li, J., Jiang, N., Liu, P., and Meng, J. 2018. Effective enhancement of resistance to *Phytophthora infestans* by overexpression of miR172a and b in *Solanum lycopersicum*. *Planta*, 247(1), 127–138.
- Ma, C., Burd, S., and Lers, A. 2015. miR408 is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 84(1), 169–187.
- Ma, J., Wang, Y., and Li, J. 2020. Global identification and analysis of microRNAs involved in salt stress responses in two alfalfa (*Medicago sativa* ‘Millennium’) lines. *Canadian Journal of Plant Science*, 100(4), 445–455.
- Ma, J., Zhao, P., Liu, S., Yang, Q., and Guo, H. 2020. The Control of Developmental Phase Transitions by microRNAs and Their Targets in Seed Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), Article 6.
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Bartel, D., Vance, V. B., and Bowman, L. H. 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 15228–15233.
- Marker, C., Zemann, A., Terhörst, T., Kiefmann, M., Kastenmayer, J. P., Green, P., Bachellerie, J.-P., Brosius, J., and Hüttenhofer, A. 2002. Experimental RNomics: identification of 140 candidates for small non-messenger RNAs in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology: CB*, 12(23), 2002–2013.
- Martin, R. C., Asahina, M., Liu, P.-P., Kristof, J. R., Coppersmith, J. L., Pluskota, W. E., Bassel, G. W., Goloviznina, N. A., Nguyen, T. T., Martínez-Andújar, C., Kumar, M. B. A., Pupel, P., and Nonogaki, H. 2010. The microRNA156 and microRNA172 gene regulation cascades at post-germinative stages in *Arabidopsis*. *Seed Science Research*, 20(2), 79–87.
- Mathieu, J., Yant, L. J., Mürdter, F., Küttner, F., and Schmid, M. 2009. Repression of Flowering by the miR172 Target SMZ. *PLOS Biology*, 7(7), e1000148.

- Mehrpooyan, F., Othman, R. Y., and Harikrishna, J. A. (2012). Tissue and temporal expression of miR172 paralogs and the AP2-like target in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Tree genetics and genomes*, 8, 1331–1343.
- Mekassa, B., and Chandravanshi, B. S. 2015. Levels of selected essential and non-essential metals in seeds of korarima (*Aframomum corrorima*) cultivated in Ethiopia. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18, 102–111.
- Meng, Y., Ma, X., Chen, D., Wu, P., and Chen, M. 2010. MicroRNA-mediated signaling involved in plant root development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(3), 345–349.
- Meyerowitz, E. M., Bowman, J. L., Brockman, L. L., Drews, G. N., Jack, T., Sieburth, L. E., and Weigel, D. 1991. A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 113(Supplement_1), 157–167.
- Michaels, S. D., and Amasino, R. M. 1999. FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. *The Plant Cell*, 11(5), 949–956.
- Mishra, A. K., Choi, J., Rabbee, M. F., and Baek, K. H. (2019). In silico genome-wide analysis of the ATP-binding cassette transporter gene family in soybean (*Glycine max* L.) and their expression profiling. *BioMed Research International*, 2019.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410.
- Moon, J., Suh, S.-S., Lee, H., Choi, K.-R., Hong, C. B., Paek, N.-C., Kim, S.-G., and Lee, I. 2003. The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 35(5), 613–623.
- Moradi, K., and Khalili, F. 2018. Assessment of pattern expression of miR172 and miR169 in response to drought stress in *Echinacea purpurea* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 507–512.
- Morel, J. L., Mench, M., and Guckert, A. 1986. Measurement of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, 2(1), 29–34.
- Morgado, L., and Johannes, F. 2019. Computational tools for plant small RNA detection and categorization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1181–1192.
- Morris, K. V., and Mattick, J. S. 2014. The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews Genetics*, 15(6), Article 6.
- Multari, S., Stewart, D., and Russell, W. R. 2015. Potential of fava bean as future protein supply to partially replace meat intake in the human diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 511–522.
- Naqvi, A. R., Haq, Q. M., and Mukherjee, S. K. 2010. MicroRNA profiling of tomato leaf curl new delhi virus (tolcndv) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. *Virology Journal*, 7(1), 281.
- Nova-Franco, B., Íñiguez, L. P., Valdés-López, O., Alvarado-Affantranger, X., Leija, A., Fuentes, S. I., Ramírez, M., Paul, S., Reyes, J. L., Girard, L., and Hernández, G. 2015. The Micro-RNA172c-APETALA2-1 Node as a Key Regulator of the

- Common Bean-Rhizobium etli Nitrogen Fixation Symbiosis. *Plant Physiology*, 168(1), 273–291.
- Ohtsuki, N., Kizawa, K., Mori, A., Nishizawa-Yokoi, A., Komatsuda, T., Yoshida, H., Hayakawa, K., Toki, S., and Saika, H. 2021. Precise Genome Editing in miRNA Target Site via Gene Targeting and Subsequent Single-Strand-Annealing-Mediated Excision of the Marker Gene in Plants. *Frontiers in Genome Editing*, 2.
- Palakolanu, S. R., Gupta, S., Yeshvekar, R. K., Chakravartty, N., Kaliamoorthy, S., Shankhapal, A. R., Vempati, A. S., Kuriakose, B., Lekkala, S. P., Philip, M., Perumal, R. C., Lachagari, V. B. R., and Bhatnagar-Mathur, P. 2022. Genome-wide miRNAs profiles of pearl millet under contrasting high vapor pressure deficit reveal their functional roles in drought stress adaptations. *Physiologia Plantarum*, 174(1), e13521.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology : CB*, 12(17), 1484–1495.
- Praveen, A., Dubey, S., Singh, S., and Sharma, V. K. 2023. Abiotic stress tolerance in plants: a fascinating action of defense mechanisms. *3 Biotech*, 13(3), 102.
- Quig, D. 1998. Cysteine Metabolism and Metal Toxicity. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, 3, 262–270.
- Qureshi, R., and Sacan, A. (2013). A novel method for the normalization of microRNA RT-PCR data. *BMC medical genomics*, 6(1), 1-13.
- Rausser, W. E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31, 19–48.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), Article 6772.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., and Bartel, D. P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, 16(13), 1616–1626.
- Ren, Y., Song, Y., Zhang, L., Guo, D., He, J., Wang, L., Song, S., Xu, W., Zhang, C., Lers, A., Ma, C., and Wang, S. (2021). Coding of non-coding RNA: insights into the regulatory functions of Pri-MicroRNA-encoded peptides in plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 641351.
- Rivetta, A., Negrini, N., and Cocucci, M. 1997. Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant, Cell and Environment*, 20(5), 600–608.
- Rubio-Somoza, I., Cuperus, J. T., Weigel, D., and Carrington, J. C. 2009. Regulation and functional specialization of small RNA–target nodes during plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 622–627.
- Sahu, P. K., Jayalakshmi, K., Tilgam, J., Gupta, A., Nagaraju, Y., Kumar, A., Hamid, S., Singh, H. V., Minkina, T., Rajput, V. D., and Rajawat, M. V. S. 2022. ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Frontiers in Plant Science*, 13.

- Samad, A. F. A., Ali, N. M., Ismail, I., and Murad, A. M. A. 2016. Analysis of miRNAs targeting transcription factors in *Persicaria minor* induced by *Fusarium oxysporum*. AIP Conference Proceedings, 1784(1), 020009.
- Samarfard, S., Ghorbani, A., Karbanowicz, T. P., Lim, Z. X., Saedi, M., Fariborzi, N., McTaggart, A. R., and Izadpanah, K. 2022. Regulatory non-coding RNA: The core defense mechanism against plant pathogens. Journal of Biotechnology, 359, 82–94.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R. A., and Coupland, G. 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. Genes and Development, 20(7), 898–912.
- Shen, X., Song, Y., Ping, Y., He, J., Xie, Y., Ma, F., Li, X., and Guan, Q. 2023. The RNA-binding protein MdHYL1 modulates cold tolerance and disease resistance in apple. Plant Physiology, 192(3), 2143–2160.
- Srikanth, A., and Schmid, M. 2011. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. Cellular and Molecular Life Sciences, 68(12), 2013–2037.
- Srivastava, S., Srivastava, A. K., Suprasanna, P., and D’Souza, S. F. 2013. Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in Brassica juncea. Journal of Experimental Botany, 64(1), 303–315.
- Sun, L., Jiang, Z., Ju, Y., Zou, X., Wan, X., Chen, Y., and Yin, Z. 2021. A potential endogenous gibberellin-mediated signaling cascade regulated floral transition in *Magnolia × soulangeana* ‘Changchun.’ Molecular Genetics and Genomics, 296(1), 207–222.
- Sun, X., Tian, X., Tomsig, J. L., and Suszkiw, J. B. 1999. Analysis of Differential Effects of Pb²⁺ on Protein Kinase C Isozymes. Toxicology and Applied Pharmacology, 156(1), 40–45.
- Tahir, M. M., Li, S., Liu, Z., Fan, L., Tang, T., Zhang, X., Mao, J., Li, K., Khan, A., Shao, Y., Zhang, D., and Ma, J. 2022. Different miRNAs and hormones are involved in PEG-induced inhibition of adventitious root formation in apple. Scientia Horticulturae, 303, 111206.
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution, 38(7), 3022–3027.
- Tang, Y., Liu, H., Guo, S., Wang, B., Li, Z., Chong, K., and Xu, Y. 2018. OsmiR396d Affects Gibberellin and Brassinosteroid Signaling to Regulate Plant Architecture in Rice. Plant Physiology, 176(1), 946–959.
- Teotia, S., and Tang, G. 2015. To Bloom or Not to Bloom: Role of MicroRNAs in Plant Flowering. Molecular Plant, 8(3), 359–377.
- Teotia, S., and Tang, G. 2017. Silencing of Stress-Regulated miRNAs in Plants by Short Tandem Target Mimic (STTM) Approach. Springer, 337–348, . New York, NY.
- The UniProt Consortium. 2023. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. Nucleic Acids Research, 51(D1), D523–D531.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M., and Schroeder, J. I. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in

- Arabidopsis* with homology to Nramp genes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(9), 4991–4996.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882.
- Tian, W., Huang, Y., Li, D., Meng, L., He, T., and He, G. 2022. Identification of StAP2/ERF genes of potato (*Solanum tuberosum*) and their multiple functions in detoxification and accumulation of cadmium in yeast: Implication for Genetic-based phytoremediation. *Science of The Total Environment*, 810, 152322.
- Tiwari, M., Sharma, D., and Trivedi, P. K. 2014. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant Molecular Biology*, 86(1), 1–18.
- Tripathi, R. K., Bregitzer, P., and Singh, J. 2018. Genome-wide analysis of the SPL/miR156 module and its interaction with the AP2/miR172 unit in barley. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1.
- Valdés-López, O., Yang, S. S., Aparicio-Fabre, R., Graham, P. H., Reyes, J. L., Vance, C. P., and Hernández, G. (2010). MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytologist*, 187(3), 805-818.
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., and Hellens, R. P. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(1), 12.
- Verma, S., Nizam, S., and Verma, P. K. 2013. Biotic and abiotic stress signaling in plants. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, Volume 1, 25–49.
- Vetterlein, D., Szegedi, K., Ackermann, J., Mattusch, J., Neue, H.-U., Tanneberg, H., and Jahn, R. 2007. Competitive Mobilization of Phosphate and Arsenate Associated with Goethite by Root Activity. *Journal of Environmental Quality*, 36(6), 1811–1820.
- Waititu, J. K., Zhang, C., Liu, J., and Wang, H. 2020. Plant Non-Coding RNAs: Origin, Biogenesis, Mode of Action and Their Roles in Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), Article 21.
- Wang, H., Liu, Y., Peng, Z., Li, J., Huang, W., Liu, Y., Wang, X., Xie, S., Sun, L., Han, E., Wu, N., Luo, K., and Wang, B. (2019). Ectopic expression of poplar ABC transporter PtoABCG36 confers Cd tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3293.
- Wang, L., Sun, S., Jin, J., Fu, D., Yang, X., Weng, X., Xu, C., Li, X., Xiao, J., and Zhang, Q. 2015. Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(50), 15504–15509.
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., and Guo, S. 2013. The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7370–7390.
- Wang, Y., Meng, Y., Mu, S., Yan, D., Xu, X., Zhang, L., and Xu, B. (2021). Changes in phenotype and gene expression under lead stress revealed key genetic responses to lead tolerance in *Medicago sativa* L. *Gene*, 791, 145714.

- Wang, T., Sun, M.-Y., Wang, X.-S., Li, W.-B., and Li, Y.-G. 2016. Over-Expression of GmGla-Regulated Soybean miR172a Confers Early Flowering in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), Article 5.
- Wani, S. H., Sah, S. K., Hossain, M. A., Kumar, V., and Balachandran, S. M. 2016. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in crop plants. *Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits*, 345–396.
- Wen, Z., Hong, Y., Qiu, Z., Yang, K., Hou, Q., Qiao, G., and Wen, X. 2022. Identification of miRNAs mediating shoot growth of grafted sweet cherry through small RNA and degradome sequencing. *Scientia Horticulturae*, 291, 110557.
- Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M. N., Maier, A., and Schwechheimer, C. 2007. The DELLA Domain of GA INSENSITIVE Mediates the Interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A Gibberellin Receptor of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(4), 1209–1220.
- Witkowska, D., Słowik, J., and Chilicka, K. 2021. Heavy Metals and Human Health: Possible Exposure Pathways and the Competition for Protein Binding Sites. *Molecules*, 26(19), Article 19.
- Wood, C. C., Robertson, M., Tanner, G., Peacock, W. J., Dennis, E. S., and Helliwell, C. A. (2006). The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14631–14636.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J.-W., Weigel, D., and Poethig, R. S. 2009. The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138(4), 750–759.
- Xian, J., Wang, Y., Niu, K., Ma, H., and Ma, X. (2020). Transcriptional regulation and expression network responding to cadmium stress in a Cd-tolerant perennial grass *Poa Pratensis*. *Chemosphere*, 250, 126158.
- Xie, F., Wang, Q., Sun, R., and Zhang, B. 2015. Deep sequencing reveals important roles of microRNAs in response to drought and salinity stress in cotton. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 789–804.
- Xie, Y.-F., Zhang, R.-X., Qin, L.-J., Zhao, D.-G., and Xia, Z. 2022. Genome-wide identification and genetic characterization of the CaMYB family and its response to five types of heavy metal stress in hot pepper (*Capsicum annuum* cv. CM334). *Plant Physiology and Biochemistry*, 170, 98–109.
- Yadav, A., Kumar, S., Verma, R., Rai, S. P., Lata, C., and Sanyal, I. 2023. Target cleavage mapping and tissue-specific expression analysis of PGPR responsive miR166 under abiotic stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 154(2), 415–432.
- Yamaguchi, A., and Abe, M. 2012. Regulation of reproductive development by non-coding RNA in *Arabidopsis*: to flower or not to flower. *Journal of Plant Research*, 125(6), 693–704.
- Yang, J. X., Rastetter, R. H., and Wilhelm, D. 2016. Non-coding RNAs: An Introduction. Springer Netherlands, 13–32, . Dordrecht.
- Yang, J., Wei, H., Hou, M., Chen, L., Zou, T., Ding, H., Jing, Y., Zhang, X., Zhao, Y., Liu, Q., Heng, Y., Wu, H., Wang, B., Kong, D., and Wang, H. 2023. ZmSPL13

- and ZmSPL29 act together to promote vegetative and reproductive transition in maize. *New Phytologist*, 239(4), 1505–1520.
- Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J., and Poethig, R. S. 2013. Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife*, 2, e00260.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., and Schmid, M. 2010. Orchestration of the Floral Transition and Floral Development in *Arabidopsis* by the Bifunctional Transcription Factor APETALA2. *The Plant Cell*, 22(7), 2156–2170.
- Yin, Z., Li, Y., Yu, J., Liu, Y., Li, C., Han, X., and Shen, F. 2012. Difference in miRNA expression profiles between two cotton cultivars with distinct salt sensitivity. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 4961–4970.
- Yin, Z., Murawska, Z., Xie, F., Pawelkiewicz, M., Michalak, K., Zhang, B., and Lebecka, R. 2019. microRNA response in potato virus Y infected tobacco shows strain-specificity depending on host and symptom severity. *Virus Research*, 260, 20–32.
- Yu, J., Wu, L., Fu, L., Shen, Q., Kuang, L., Wu, D., and Zhang, G. (2019). Genotypic difference of cadmium tolerance and the associated microRNAs in wild and cultivated barley. *Plant Growth Regulation*, 87, 389–401.
- Yu, L. J., Luo, Y. F., Liao, B., Xie, L. J., Chen, L., Xiao, S., Li, J. T., Hu, S. N., and Shu, W. S. (2012). Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 195(1), 97–112.
- Yu, S., Cao, L., Zhou, C.-M., Zhang, T.-Q., Lian, H., Sun, Y., Wu, J., Huang, J., Wang, G., and Wang, J.-W. 2013. Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife*, 2, e00269.
- Yu, S., Galvão, V. C., Zhang, Y.-C., Horrer, D., Zhang, T.-Q., Hao, Y.-H., Feng, Y.-Q., Wang, S., Schmid, M., and Wang, J.-W. 2012. Gibberellin Regulates the *Arabidopsis* Floral Transition through miR156-Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE Transcription Factors. *The Plant Cell*, 24(8), 3320–3332.
- Zhang, B., and Chen, X. 2021. Secrets of the MIR172 family in plant development and flowering unveiled. *PLOS Biology*, 19(2), e3001099.
- Zhang, F., Yang, J., Zhang, N., Wu, J., and Si, H. 2022. Roles of microRNAs in abiotic stress response and characteristics regulation of plant. *Frontiers in Plant Science*, 13, 919243.
- Zhang, J., Xu, Y., Huan, Q., and Chong, K. 2009. Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 10(1), 449.
- Zhang, K., Wang, E., Liu, Q. A., and Wang, J. 2023. High CO₂ adaptation mechanisms revealed in the miR156-regulated flowering time pathway. *PLOS Computational Biology*, 19(12), e1011738.
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Chellappan, P., Chen, Z., Zhou, X., Zhang, X., Fromuth, N., Coutino, G., Coffey, M., and Jin, H. 2011. Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Molecular Biology*, 75(1), 93–105.

- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., Ruan, K., and Jin, Y. 2007. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), 585–590.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., and Luo, L. 2010. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4157–4168.
- Zhou, Y.-F., Wang, Y.-Y., Chen, W.-W., Chen, L.-S., and Yang, L.-T. 2020. Illumina sequencing revealed roles of microRNAs in different aluminum tolerance of two citrus species. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(11), 2173–2187.
- Zhou, Z. S., Zeng, H. Q., Liu, Z. P., and Yang, Z. M. (2012). Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal. *Plant, cell and environment*, 35(1), 86-99.
- Zhu, J., Fang, X. Z., Dai, Y. J., Zhu, Y. X., Chen, H. S., Lin, X. Y., and Jin, C. W. (2019). Nitrate transporter 1.1 alleviates lead toxicity in *Arabidopsis* by preventing rhizosphere acidification. *Journal of experimental botany*, 70(21), 6363-6374.
- Zhu, Q.-H., Upadhyaya, N. M., Gubler, F., and Helliwell, C. A. 2009. Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biology*, 9(1), 149.
- Zou, Y., Wang, S., and Lu, D. 2020. MiR172b-TOE1/2 module regulates plant innate immunity in an age-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 531(4), 503–507