

**AKUATİK BİTKİ *Lemna minör*'DE AĞIR METAL STRESİNE KARŞI miRNA
CEVAPLARININ ARAŞTIRILMASI**

MERVE SAĞLAM

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel SÖZEN

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

ÖZET

AKUATİK BİTKİ *Lemna minör*'DE AĞIR METAL STRESİNE KARŞI miRNA CEVAPLARININ ARAŞTIRILMASI

MERVE SAĞLAM

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Emel SÖZEN

Ağır metaller günümüzde en yaygın rastladığımız çevre kirleticilerindendir. Özellikle su ekosistemleri başta olmak üzere yeryüzündeki tüm ekosistemler ağır metallerin yapmış olduğu toksik etkilerden olumsuz olarak etkilenmektedirler. *Lemna minör*, Lemnaceae familyasına ait olan monokotil sucul bir bitkidir ve genelde mineral ve organik kontaminasyonu gidermek için atık su arıtımında kullanılır. MikroRNA'ların (miRNA), metalin detoksifikasyonu için ağır metal stresine karşı verilen tepkilerin önemli modülatörleri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada kadmiyum stresine maruz bırakılan *L. minor*'de ağır metal stresinde görevli olduğu bilinen 5 farklı miRNA (miR156, miR159, miR171, miR395 ve miR396) ve bunların hedef genlerinin (SPL, MYB, GRAS, SULTR ve GRF) ekspresyon seviyelerindeki değişikliğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hoagland solusyonu içinde kültüre alınan *L. minor* 0, 6, 12, 24saat süreyle 100 µM CdCl₂ içeren Hoagland solusyonu içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sıvı azotta öğütülen bitki örneklerinden miRNA ve mRNA izolasyonu yapılmış ardından RT-PCR ile cDNA elde edilerek qRT-PCR ile de ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Aynı *L. minor* örneklerindeki kadmiyum miktarını belirlemek için yaş yakma yöntemi kullanılmış ve numuneler ICP-OES cihazında ölçülmüştür. Sonuç olarak kadmiyuma maruz bırakılan *L. minor* örneklerinde ağır metal miktarının saate bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Çalışılan miRNA ekspresyon seviyeleri

kontrolle kıyaslandığında her bir miRNA için 6. ve 12. saatlerde ekspresyon artarken 24. saatte ekspresyonun azaldığı görülmüştür. SPL geninin ekspresyon seviyesi değişmezken, MYB ve SULTR2 genlerinin ekspresyon seviyesinin azaldığı, GRAS geninin ekspresyon seviyesinin arttığı ve GRF geninde ise ekspresyonun 6. ve 12. saatlerde arttığı fakat 24. saatte azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma kadmiyum stresine maruz bırakılan örneklerde çalışılan miRNA'lar ve onların hedef genlerinin ekspresyon profillerinin, literatürde çalışması yapılan diğer bitkilerdeki miRNA ekspresyon profillerine göre farklı düzenlendiğini göstermiştir. Bunun da *Lemna minor* bitkisinin hiperakümülatör bir bitki olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. *L. minor* bugüne kadar ağır metal stresinde oldukça fazla tercih edilmiş bir bitki olmasına rağmen gen ekspresyon profilleri ile ilgili yapılan herhangi bir çalışma örneğine literatürde rastlanılmamıştır. Çalışmadan elde edilen bilgiler bu bitki ile ilgili yapılacak sonraki çalışmalara rehberlik etmesi yönünden önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Ağır metal stresi, Kadmiyum, *Lemna minor*, qRT-PCR, miRNA.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF miRNA RESPONSES AGAINST HEAVY METAL STRESS IN AQUATIC PLANT *Lemna minor*

MERVE SAĞLAM

Department of High Technologies

Programme in Biotechnology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs

Supervisor: Prof. Dr. Emel SÖZEN

Heavy metals are among the most common environmental pollutants we encounter today. All ecosystems on earth, especially water ecosystems, are negatively affected by the toxic effects of heavy metals. *Lemna minor* is a monocotyl aquatic plant that belongs to the Lemnaceae family and is generally used in wastewater treatment to remove mineral and organic contamination. MicroRNAs (miRNAs) are known to be important modulators of responses to heavy metal stress for detoxification of metal. In this study, we aimed to determine expression levels of 5 different miRNA (miR156, miR159, miR171, miR395 and miR396) and their target genes (SPL, MYB, GRAS, SULTR and GRF) in *L. minor* exposed to cadmium stress. *L. minor* cultured in Hoagland solution was incubated in Hoagland solution containing 100 µM CdCl₂ for 0, 6, 12, 24hours. After incubation, miRNA and mRNA isolation were performed from plant samples powdered in liquid nitrogen. After that cDNAs were obtained by RT-PCR and expression levels were determined by qRT-PCR. The wet burning method was used to determine the amount of cadmium in the same *L. minor* samples. Measurements were accomplished by using the ICP-OES instrument. As a result, it was determined that the amount of heavy metal increased depending on time in *L. minor*

samples exposed to cadmium. Compared to control, the miRNA expression levels showed that expression increased at 6th and 12th hours for each studied miRNA, whereas expression decreased at 24th hour. While the expression level of the SPL gene did not change, the expression levels of the MYB and SULTR2 genes decreased, the expression level of the GRAS gene increased. On the other hand, the expression in the GRF gene increased at the 6th and 12th hours, but decreased at the 24th hour. This study showed that the expression profiles of miRNAs studied in *L. minor* samples exposed to cadmium stress and that of their target genes were arranged differently from the expression profiles compared to the plants studied in the literature. This is thought to be due to the hyperaccumulator characteristic of *Lemna minor*. Although *L. minor* is a highly preferred organism to study heavy metal stress, to date, no study examples related to gene expression profiles have been found in the literature. The information obtained from the study is important in terms of guiding further studies on this plant.

Keywords: Heavy metal stress, Cadmium, *Lemna minor*, *qRT-PCR*, miRNA.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen, engin tecrübesi, deneyimi ve hoşgörüsü ile beni yüreklendiren, sadece bir öğretmen değil aynı zamanda benim için bir anne de olan hayatımdaki güzel mucize sevgili danışman hocam Prof. Dr. Emel SÖZEN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Lisans hayatımdan beri yanımda olan her zaman beni destekleyen sevgili hocam Doç. Dr. İsmail POYRAZ'a ve sevgili eşi Dr. Öğretim Üyesi İlham Eröz POYRAZ'a çok teşekkür ederim.

Bu yola çıktığımdan beri beni her zaman destekleyen hayatımda aldığım her kararda yanımda olan biricik dostum Mehtap KARA'ya çok teşekkür ederim.

Ağır metal ölçümlerimiz sırasında bizden tecrübe ve yardımını esirgemeyen Dr. Rabia GÜNHAN hanıma çok teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında aldığım her kararda beni yüreklendiren sevgili kardeşim Yusuf SAĞLAM'a ve maddi manevi beni her zaman destekleyen sevgili anneme ve babama tüm kalbimle teşekkür ederim.

MERVE SAĞLAM

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

MERVE SAĞLAM

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	I
ÖZET	II
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	VI
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XV
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Lemna minör</i>	4
2.2. Ağır Metaller ve Kadmiyum	6
2.3 Kodlanmayan RNA'lar (non-coding RNA).....	8
2.4. miRNA Biyogenezi.....	11
2.5. miRNA İlişkili Gen İfadesi Düzenlenmesi	12

2.6. Bitki miRNA'larının Görevleri.....	13
2.7. miRNA ve Cd Toksisitesi	15
2.8. miR156 ve SPL İlişkisi.....	17
2.9. miR159 ve MYB İlişkisi.....	19
2.10. miR171 ve GRAS İlişkisi.....	22
2.11. miR395 ve SULTR2 İlişkisi.....	23
2.12. miR396 ve GRF İlişkisi.....	25
2.13.miRNA Araştırmalarında Kabul Edilen Moleküler Teknikler.....	26
2.13.1. miRNA İzolasyonu, Tanımlanması ve Karakterizasyonu için Yaklaşımlar	26
2.13.2. miRNA'lar ve Hedef Genleri.....	27
2.14. Konu ile İlgili Önceki Çalışmalar.....	28
3. MATERYAL VE METOD.....	33
3.1.Bitki Materyali, Büyüme Koşulları ve Stres Uygulaması	33
3.2. miRNA'ların ve mRNA'ların Dizilerinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı	34
3.3. RNA İzolasyonu Nicel Ölçümleri	38
3.4. cDNA Sentezi.....	39
3.4.1. miRNA-cDNA sentezi	39
3.4.2. mRNA-cDNA Sentezi.....	40
3.5. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR)	41
3.6. qRT-PCR Analiz Metodu ve İstatistik.....	43
3.7. <i>Lemna minör</i> Örneklerinde Ağır Metal Miktarının Belirlenmesi.....	44

4. BULGULAR	45
4.1. <i>Lemna minor</i> ve Kadmiyum Uygulaması.....	45
4.2. RNA İzolasyonu	45
4.3. Kantitatif Real Time PCR Analizi (qRT-PCR)	46
4.3.1 miRNA Gen İfadesi Analiz Sonuçları.....	47
4.3.2. miRNA Gen İfadesi Analiz Grafikleri	48
4.3.3. Hedef Genlerin Gen İfadesi Analiz Sonuçları	55
4.3.4. Hedef Genlerin Gen İfadesi Analiz Grafikleri	56
4.4. miRNA'lara ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi	63
4.4.1. miR156 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi	63
4.4.2. miR159 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi	64
4.4.3. miR171 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi	65
4.4.4. miR395 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi	66
4.4.5. miR396 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi	67
4.5. <i>Lemna minor</i> Örneklerinde Ağır Metal Miktarının Belirlenmesi.....	68
5. TARTIŞMA	69
KAYNAKÇA	77
EKLER	98

miRNA Anova İstatistik Değerleri	99
miR156 Anova İstatistik	99
miR159 Anova İstatistik	100
miR171 Anova İstatistik	101
miR395 Anova İstatistik	102
miR396 Anova İstatistik	103
mRNA Anova İstatistik Değerleri	104
SPL mRNA(miR156) Anova İstatistik	104
MYB mRNA(miR159) Anova İstatistik	105
GRAS mRNA(miR171) Anova İstatistik.....	106
SULTR2 mRNA(miR395) Anova İstatistik.....	107
GRF mRNA(miR396) Anova İstatistik	108
ÖZGEÇMİŞ.....	109

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. <i>Lemna minör</i> L. sistematigi	4
Tablo 2.2: Küçük RNA'ların Sınıflandırılması ve Karakteristikleri.....	8
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan miRNA'lar ve Hedef Genleri	34
Tablo 3.2. mRNA'ların Hedef Genleri ve Hedef Gene Ait İleri ve Geri Primer Dizi Bilgileri	35
Tablo 3.3. Qubit assay çalışma protokolü	38
Tablo 3.4. miRNA-cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri.....	39
Tablo 3.5. miRNA-cDNA Sentezi Reaksiyonu Koşulları	40
Tablo 3.6. mRNA-cDNA Sentezi İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	40
Tablo 3.7. mRNA-cDNA Sentezi Reaksiyonu Koşulları.....	41
Tablo 3.8. Real-Time qPCR İçin Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri	42
Tablo 3.9. Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları	42
Tablo 4.1. mRNA ölçüm sonuçları	46
Tablo 4.2. miRNA FC Değerleri.....	48
Tablo 4.3. mRNA FC Değerleri.....	55
Tablo 4.4. Ağır Metal Miktarı (ppb)	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>Lemna minör</i> (Kutschera ve Niklas, 2014)	4
Şekil 2.2. miRNA Hedef Tahmin Şeması.....	10
Şekil 2.3. Bitkilerde miRNA Biyogenezi	11
Şekil 2.4. Ağır Metallere Yanıt Olarak Ekspresyonu Değişen Bitki miRNA'ları	16
Şekil 2.5 miR156 ve SPL İlişkisi.....	18
Şekil 2.6 miR159 ve MYB İlişkisi	21
Şekil 2.7 miR395 ve SULTR2 İlişkisi.....	24
Şekil 2.8 miR396 ve GRF İlişkisi.....	25
Şekil 3.1. cDNA Yapım Aşamaları	41
Şekil 4.1. Cd uygulaması sonrası <i>Lemna minör</i> örnekleri.....	48
Şekil 4.2. miRNA FC Bar Grafiği	48
Şekil 4.3. miR156 Erime Piki (a) miR156 Amplifikasyon Eğrisi (b)	48
Şekil 4.4. miR159 Erime Piki (a) miR159 Amplifikasyon Eğrisi (b)	49
Şekil 4.5. miR171 Erime Piki (a) miR171 Amplifikasyon Eğrisi (b)	50
Şekil 4.6. miR395 Erime Piki (a) miR395 Amplifikasyon Eğrisi (b)	51
Şekil 4.7. miR396 Erime Piki (a) miR396 Amplifikasyon Eğrisi (b)	52
Şekil 4.8. miR161 Erime Piki (a) miR161 Amplifikasyon Eğrisi (b)	53
Şekil 4.9. mRNA FC Bar Grafiği	53
Şekil 4.10. Squamosa promotör bağlanma benzeri protein Erime Piki (a) Squamosa promotör bağlanma benzeri protein Amplifikasyon Eğrisi (b).....	55
Şekil 4.11. MYB transkripsiyon faktörleri Erime Piki(a) MYB transkripsiyon faktörleri Amplifikasyon Eğrisi(b)	56
Şekil 4.12. Scarecrow Benzeri Protein Erime Piki (a) Scarecrow Benzeri Protein Amplifikasyon Eğrisi(b)	57
Şekil 4.13. ATP Sülfirilaz Erime Piki (a) ATP Sülfirilaz Amplifikasyon Eğrisi (b)	58
Şekil 4.14. Büyümeyi Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü (GRF) Erime Piki(a) Büyümeyi Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü Amplifikasyon Eğrisi(b).....	59
Şekil 4.15. RLI Erime Piki (a) RLI Amplifikasyon Eğrisi (b)	61

Şekil 4.16. miR156 Bar Grafiği (a) Squamosa Promotör Bağlanma Benzeri Protein Bar Grafiği (b).....	62
Şekil 4.17. miR159 Bar Grafiği (a) MYB Transkripsiyon Faktörü Bar Grafiği (b).....	63
Şekil 4.18. miR171 Bar Grafiği (a) Scarecrow Benzeri Protein Bar Grafiği (b)	64
Şekil 4.19. miR395 Bar Grafiği (a) ATP Sülfirilaz Bar Grafiği (b).....	65
Şekil 4.20. miR396 Bar Grafiği (a) Büyümeyi Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü (GRF) Bar Grafiği.....	66
Şekil 4.21. <i>Lemna minör</i> Örneklerinde Zamana Bağlı Olarak Cd Miktarındaki Değişim	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ	: Mikro
μ l	: Mikrolitre
AGO	: Argounot protein
Cd	: Kadmiyum
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
ceRNA	: Endojen RNA
DCL1	: Dicer like 1
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozidtrifosfatlar
g	: Gram
GRN	: Gen düzenleyici Ağ
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HEN1	: Hua arttırıcı
lncRNA	: Uzun kodlanmayan RNA
miRNA	: Mikro RNA
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pri-miRNA	: Primer Mikro Ribonükleik Asit
qRT-PCR	: Kantitatif Real time PCR
RISC	: Ribonükleik Asit ile Uyarılmış Susturma Kompleksi
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal RNA
RT-PCR	: Reverse-transkriptaz PCR
SCLp	: Scarecrow-Benzeri Proteinler
siRNA	: Küçük sessizleştirici RNA
snoRNA	: Küçük nükleolar RNA
snRNA	: Küçük nükleer RNA
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TF	: Transkripsiyon Faktörü
tRNA	: Taşıyıcı RNA
U	: Ünite
μ l	: Mikrolitre

1.GİRİŞ

Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilemekle birlikte ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına sebep olan, bitkinin veya organlarının ölümüne yol açan önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere “stres” adı verilir. Ağır metallerin belirli bir konsantrasyondan sonra bitkilerdeki fizyolojik ve biyokimyasal olayları direkt veya dolaylı olarak etkilediği bilinmektedir. Olumsuz etki, metalden metale veya organizmadan organizmaya değişebilmektedir. Olumlu veya olumsuz toksik etkiler yalnızca metalin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olmayıp değişik türlerin genetik esaslı fizyolojik davranışları ile de ilgilidir (He vd., 2018).

Kadmiyum (Cd), hem bitkiler hem de hayvanlar için toksik olan ağır bir metaldir. Cd, tarım arazilerini; kanalizasyon sulama, düşük dereceli fosfat gübre kullanımı, böcek ilacı kullanımı, gübre uygulaması ve atmosferik yağış gibi jeojenik ve antropojenik aktivitelerle kirletir (Clemens vd., 2013). Toprakdan bitkiye verimli transfer ile Cd, dokularda kolayca birikir ve bitkiler için toksik olabilir; beslenme eksikliği, klorofil sentezi inhibisyonu, fotosentezin azaltılması, oksidatif stres vb. gibi bozuklukları teşvik eder. Bu metabolik bozukluklar bitki büyümesini baskılar ve hatta bitki ölümüne yol açabilir (Liu vd., 2018). Daha ciddi, besin zincirindeki bitki türlerinin yenilebilir kısımlarındaki Cd birikimi potansiyel olarak insan sağlığını tehdit eder. Bu gibi sebeplerden ötürü kadmiyum (Cd), bitkiler ve aquatik organizmalar üzerinde ciddi toksisiteye neden olan en tehlikeli ağır metallerden biri olarak kabul edilir (Dong vd., 2009; Shriram vd., 2016). Ayrıca Cd'nin ROS üretimi yoluyla oksidatif stresi indüklediği kabul edilmektedir. Birçok çalışmada yüksek Cd seviyeleri nedeniyle bitkide H_2O_2 üretimi ve birikimi fark edilmiştir (Arshad vd., 2015). Cd hasarının görünür semptomları arasında kloroz, bodur büyüme ve hatta bitki ölümü de bulunur (Schützendübel vd., 2001).

Su mercimeği hızlı bir büyüme, kirli suya karşı yüksek tolerans, küresel dağılım ve yüksek nişasta içeriği ile karakterize edilen küçük yüzen bir su bitkisidir (Landolt, 1986). Uzun yıllardır, su mercimeği; hayvan yemi, organik gübre ve kimyasal toksisite testleri için

kullanılabilen endüstriyel olarak çok yönlü bir bitki olarak kabul edilmektedir (Cheng ve Stomp, 2009). Ayrıca son yıllarda su mercimeği, biyoyakıt üretimi için ideal bir hammadde olarak kabul edilmiştir, bunun sebebi yumuşak ve nişasta bakımından zengin biyokütleyle sahip olması, daha fazla biyoyakıt etanol, butanol ve biyogaz verimi sağlamaktadır. Diğer taraftan, su mercimeği azot, fosfor ve ağır metalleri büyüme sırasında sudan verimli bir şekilde biriktirdiğinden, düşük maliyetli ve düşük enerjili atık su arıtma sistemlerinde de kullanılmaktadır

Su mercimeği türleri ağır metalleri izlemek için su kalitesi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Radic vd., 2010). Su sümbülüne kıyasla; soğuğa karşı dayanıklı olmaları, alglerden daha kolay hasat edilmeleri ve hızlı büyüme yeteneklerinden dolayı daha iyi bir alternatif olarak kabul edilir ve su arıtımı çalışmalarında kullanılması için tavsiye edilirler (Sharma ve Gaur, 1995).

MikroRNA'lar hedef genlerini bölünme yoluyla veya neredeyse tamamlayıcı dizilere baz eşleştirme yoluyla transkripsiyonu baskılayarak negatif olarak düzenler (Carrington, ve Ambros, 2003). Transkripsiyon sırasında mRNA'ların bozunmasını yönlendirerek kök, yaprak veya çiçek gelişimini düzenleyen birkaç miRNA tanımlanmıştır. Bununla birlikte, en son biyokimyasal kanıtlar, miRNA'ların gen susturulmasına sadece transkripsiyonel bölünme ile değil aynı zamanda translasyonel baskı ile aracılık ettiğini ve bu iki sürecin bağımsız olduğunu ortaya koymuştur (Loudet vd., 2004).

MikroRNA'lar (miRNA) DNA'dan kopyalanan ancak proteinlere dönüştürülmeyen yaklaşık 20-24 nükleotit uzunluğunda kısa tek iplikli RNA'lardır. miRNA'lar, hedef mRNA'ların çevrilmemiş 3' bölgesine bağlanarak posttranskripsiyonel düzeyde hedef genlerin ekspresyonunu negatif olarak düzenler (Singh vd.,2008). Her olgun miRNA, çoklu hedef mRNA'ları kısmen tamamlayıcıdır ve inaktivasyon için hedef mRNA'ları tanımlamak üzere RNA ile indüklenen susturma kompleksini (RISC) transkripsiyon sonrası baskılanan mRNA'lara yönlendirir (Matkovich vd., 2010). Gen ekspresyonunda yer alan diğer mekanizmalarla karşılaştırıldığında, miRNA'lar protein sentezinden hemen önce etki eder ve gen ekspresyonunda daha doğrudan rol oynayabilir (Ying vd., 2008; Bartel ve Chen, 2004). Ayrıca, miRNA'lar kromatin yapısının değiştirilmesinde ve genom stabilitesinin

korunmasında kilit rol oynamaktadır (Guil ve Esteller, 2009). Ek olarak miRNA'lar; hücre büyümesi, farklılaşma, proliferasyon, apoptoz ve metabolizma gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçleri düzenleyebilir (Singh vd.,2008; Backes vd.,2010). Bitkilerde ağır metal stresi ile ilişkili çok sayıda miRNA tespit edilmiştir. Bunların fonksiyonları genel olarak yaprak gelişimi, çiçek organların tanımlanması, oksin sinyalizasyonu, yaprak polaritesi ve stres cevabı şeklinde sınıflandırılabilir.

L. minör bugüne kadar ağır metal stresi çalışmalarında oldukça fazla tercih edilmiş bir bitki olması ancak bu bitkide kadmiyum ve miRNA ilişkisi ile ilgili yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla, bu çalışmada ağır metal çalışmalarında oldukça sık kullanılan hiperakümülatör *Lemna minör* bitkisinde kadmiyum varlığında ağır metalle ilişkilendirilen 5 farklı miRNA ve bunların hedef genlerinin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

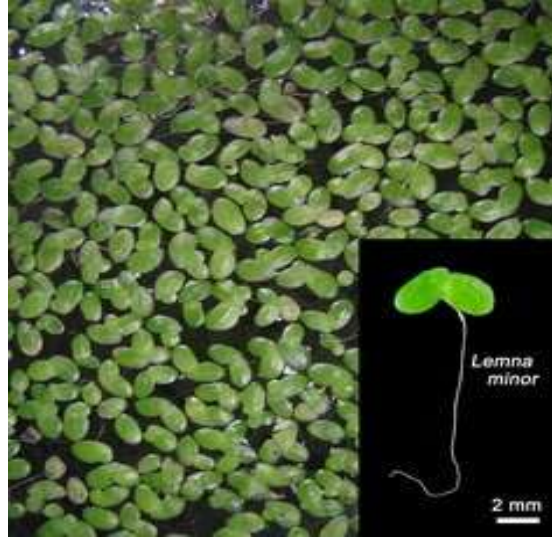
2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Lemna minör*

Tablo 2.1. *Lemna minör* L. sistematığı

<i>Lemna minör</i>	Sistematik
Alem	Plantae
Bölüm	Spermatophyta.
Sınıf	Liliopsida
Takım	Arales
Familya	Lemnaceae
Tür	<i>Lemna minör</i> L.

Lemna minör, Lemnaceae familyasına ait olan monokotil aquatik bir bitkidir. Vejetatif olarak bölünen ve çoğalan bu bitkiler dairesel yapraklıdır ve her bir yaprağın kökü bulunur. Gövde yapıları küçük ve yapraksı yapıdan oluşan bu bitki suya yarı batık olarak veya su yüzeyinde serbest olarak bulunabilmektedir (Saygıdeğer, 1997).



Şekil 2.1: *Lemna minör* (Kutschera ve Niklas, 2014)

Çoğalma hızı oldukça yüksek olan bu bitkiler kloroplasta sahiptir ve fotosentez yapabilmektedirler. Yapraktaki küçük bir hücre bölünerek yeni bir yaprak oluşturabilmektedir.

Bu bitki, yapraklarının tabanında bir meristematik bölgede oluşan yavru bitkilerin tomurcuklanmasıyla eşeysiz olarak büyür ve çoğalır. Her yaprakçık fazla sayıda dişi tomurcuk üretebilmektedir (Saygıdeğer, 1997)

Kış mevsiminde tomurcukları suyun altında gelişen *Lemna minör*'ler, uygun sıcaklıklarda tekrar çoğalmaya başlarlar. Büyümesi ve gelişmesi durgun sularda olmaktadır. Bulundukları bölgede hızlı üreyen ve baskın duruma geçen bir bitkidir (Akel, 2006).

Bu tür, tatlı su ekosistemlerinin ağır metal içeriğini değerlendirmek için başarıyla kullanılmıştır. *Lemna minör* L. ve *Lemna gibba* L., sabit veya yavaş hareket eden tatlı su kütlelerinin yüzeyinde yüzen su bitkileri olup genellikle ötrofik su yolu ve havuzlarda yoğun yüzen bir katman oluştururlar (Driever vd., 2005). Bu bitkiler farklı çevresel koşullara kolayca uyum sağlar. Yüksek protein içeriğine sahiptirler ve su kuşları, balıklar ve küçük omurgasızlar için bir besin kaynağıdır ve bir dizi küçük organizma için yaşam alanı sağlarlar (Van Hoeck vd., 2015). Bu nedenle Lemna havuzundaki kirliliğin ne kadarının dokularında biriktiğini analiz etmek çok önemlidir.

Küçük boyutu, basit yapısı ve hızlı büyümesi *L. minör*'ü toksisite testleri için çok uygun hale getirmektedir (OECD, 2002). Bu yüzden Su mercimeği, mineral ve organik kontaminasyonu gidermek için atık su arıtımında da kullanılır (Davis vd., 2002; Susarla vd., 2002). *Lemna minör* yüksek bir metal biriktirme potansiyeline sahiptir. Su kütlelerinin hem pasif hem de aktif biyo-izlenmesi için güvenilir bir biyoindikatör tür olarak kabul edilir (Jayasri ve Suthindhiran, 2016).

2.2. Ağır Metaller ve Kadmiyum

Büyük bir kısmı bitkilerin beslenebilmesi için gerekli olan, ancak belirli konsantrasyonu aşınca toksik etki gösteren, fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha yüksek olan metallere “ağır metaller” adı verilir. Doğal olarak oluşan doksan elementin 53'ü ağır metallerdir (West vd. , 1984). Bu metaller arasında Fe, Mo ve Mn mikrobeyinler olarak önemlidir, Zn, Ni, Cu, Co, Va ve Cr ise eser elementler olarak yüksek veya düşük önem taşıyan toksik elementlerdir. Ag, As, Hg, Cd, Pb ve Sb'nin besin olarak bilinen bir işlevi yoktur ve bitkiler ve mikroorganizmalar için az ya da çok toksik görünmektedir (Niess, 1999). Ağır metallerden kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa, çinko vs. gibi metaller doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde bağlı olarak bulunurlar. Atmosferde, toprakta ve suda aşırı miktarda hem esansiyel hem de esansiyel olmayan ağır metallerin varlığı, tüm organizmalar için ciddi sorunlara neden olabilir.

Kadmiyum, bitki büyümesini ve gelişmesini olumsuz etkileyen esansiyel olmayan (nonessential) bir elementtir. Enerji santralleri, ısıtma sistemleri, metal çalışan sanayiler veya kentsel trafik ile çevreye salınır. Elektrokaplama, pigmentler, plastik stabilizatörler ve nikel-kadmiyum pillerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Sanita ve Gabbrielli, 1999). Sudaki yüksek toksisitesi ve yüksek çözünürlüğü nedeniyle son derece önemli bir kirletici olarak kabul edilmektedir (Pinto vd., 2004). Kadmiyumun toprak-bitki döngüsünde hızlı hareket edebilme yeteneğine sahip olması besin zincirine dâhil olabilmesini sağlar ki bu da bitki, hayvan ve insan sağlığı açısından tehlike arz eder (Yalçın, 2014).

Kadmiyumun biyolojik sistemler üzerindeki toksik etkileri birkaç yazar tarafından bildirilmiş olsa da, Cd toksisitesinin mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Sanita ve Gabbrielli, 1999). Kadmiyum, minerallerin topraktan elde edilebilirliği üzerindeki etkileri veya toprak mikroorganizmalarının popülasyonunda bir azalma yoluyla bitkilerin mineral alımını değiştirebilir (Moreno vd., 1999). Stomadaki açılma, terleme ve fotosentezin besin çözeltilerindeki kadmiyumdan etkilendiği bildirilmiştir, ancak metal bitkilere topraktan ziyade besin çözeltilerinden daha kolay alınır (Sanita ve Gabbrielli, 1999). Kloroz, yaprak

katlanması ve bodurluk, bitkilerdeki kadmiyum toksisitesinin ana ve kolayca görülebilen belirtileridir. Kloroz Fe eksikliği, P eksikliği veya Mn taşınmasını azaltmış gibi görünebilir (Goldbol ve Hutterman, 1985). Cd'nin neden olduğu kök Fe (III) redüktazın inhibisyonu, Fe (II) eksikliğine yol açar ve fotosentezi ciddi şekilde etkiler (Alcantara vd., 1994). Genel olarak, Cd'nin çeşitli elementlerin (Ca, Mg, P ve K) ve suyun bitkiler tarafından alınmasına, taşınmasına ve kullanılmasına müdahale ettiği gösterilmiştir (Das vd., 1997). Kadmiyum stresine maruz kalan bir bitkinin azot metabolizmasının enzimleri olan nitrat redüktaz ve nitrit redüktazın aktiviteleri azalış göstermektedir. Bu durum bitkilerin nitrat asimilasyonunu azaltmaktadır. Kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerin su ve iyon alımının azalmasının en önemli sebebi kök büyüme ve gelişmesini engellemesidir. Aynı zamanda kadmiyum stresi altındaki bitkilerde stomaların kapanması nedeniyle transpirasyonla su kaybı azalmakta ve kadmiyum taşınması engellenmektedir (Fodor vd., 1995).

Kadmiyum, lipid peroksidasyonunu uyaran membranların fonksiyonunda değişikliklere ve klorofil biyosentezini inhibe ederek ve CO₂ fiksasyonunda yer alan enzimlerin aktivitesini azaltarak kloroplast metabolizmasındaki rahatsızlıklara neden olur (Stobart vd., 1985). Bazı çalışmalar oksijensiz stresin oksijensiz radikal üretimini indükleyerek veya enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları azaltarak Cd toksisitesinde rol oynayabileceğini öne sürmüştür (Cho ve Seo, 2004).

Metal iyonlarının bitkilerdeki farklı hareketliliğine rağmen, metal içeriği köklerde genellikle yer üstü dokulardan daha fazladır (Ramos vd., 2002). Çoğu çevresel koşulda, Cd önce köklere girer ve sonuç olarak Cd hasarı önce köklerde yaşanır (Sanitá ve Gabrielli, 1999). Cd, kortikal dokudan köke kolayca nüfuz eder ve yer üstü dokulara taşınır (Yang vd., 1998). Cd köklere girer girmez, organik asitler veya fitoşelatinler gibi çeşitli ligandlarla kompleks haline gelen apoplastik veya simplastik bir yoldan (Salt vd., 1995) ksileme ulaşabilir. Normalde, Cd iyonları esas olarak köklerde tutulur ve sürgünlere sadece küçük miktarlar taşınır (Cataldo vd., 1983). Genelde, bitkilerdeki Cd içeriği şu sırayla azalır: kök> sap> yaprak> meyve> tohum (Blum, 1997).

2.3 Kodlanmayan RNA'lar (non-coding RNA)

Kodlayıcı olmayan RNA'lar (ncRNA'lar), protein çevirisi için herhangi bir bilgi taşımayan, en azından uzun peptitler için olmayan bir ribonükleik asit sekansları sınıfıdır, ancak gen ve protein regülasyonu, RNA birleştirme (Kishore ve Stamm, 2006), kromozom yapısı gibi birçok biyolojik süreçte yer alır. ncRNA'lar uzunlukları esas alınarak sınıflandırılır. MikroRNA'lar (miRNA'lar) ~21 nükleotid uzunluğunda küçük, kodlayıcı olmayan RNA'lardır. Uzun, kodlayıcı olmayan RNA'ların (lncRNA'lar) uzunlukları ise 200 nükleotidin üzerindedir. Kodlanmayan RNA'ların sınıflandırılması Tablo 2.2'de gösterilmiştir. Gen ekspresyon profillerinin, klinik bilgilerin ve miRNA-hedef etkileşimlerinin birleşimi, lncRNA düzenleyici mekanizmalarının araştırılması için iyi potansiyeller göstermiştir (Zhang vd., 2018). LncRNA'lar transkripsiyonda korunmamasına rağmen, ekspresyon paterni ve fonksiyonunda korunmuş gibi görünmektedir (Tang vd., 2017). LncRNA'lar miRNA molekülleri için haberci RNA'lar (mRNA'lar) ile rekabet edebilir ve böylece miRNA aracılı hedef baskıyı düzenleyebilir. Bu tip rakip endojen RNA (ceRNA) karışımı, farklı biyolojik süreçlerde ve hastalıklarda yaygın olarak gözlenmiştir (Zhang vd., 2018).

Tablo 2.2: Küçük RNA'ların Sınıflandırılması ve Karakteristikleri

Sınıf	Büyüklik(nt)	Prekürsörlerin Yapısı	Hareket Mekanizması	3' Uç Modifikasyonları	Organizma
miRNA	20-23	Hatalı Hairpin	Translayonel Baskılama mRNA Bölünme	Değişmemiş	Memeli
				Değişmemiş	Böcek
				2' O Metillenmesi	<i>D. rerio</i>
				Değişmemiş	Bitki
				Değişmiş ama Karakterize Edilmemiş	Nematod
					<i>C.reinhardtii</i> Virüs
siRNA	20-23	dsRNA	mRNA Bölünme 2' O Metillenmesi 2' O Metillenmesi	Değişmemiş	Memeli
				Böcek	
				Karakterize Edilmemiş	<i>D. rerio</i>
				Bitki	
				Değişmemiş	Nematod
				Karakterize Edilmemiş	<i>S.pombe</i>
				Karakterize Edilmemiş	<i>N.crassa</i>
				Karakterize Edilmemiş	<i>T. brucei</i>

				Değişmiş ama Karakterize Edilmemiş	<i>C.reinhardtii</i> Bitki
<i>tasiRNA</i>	21-22	dsRNA	mRNA Bölünme	2' O Metillenmesi	Bitki
<i>natsiRNA</i>	21-22	dsRNA	mRNA Bölünme	2' O Metillenmesi	Bitki
<i>Sekonder siRNA</i>	20-25	dsRNA	mRNA Bölünme	Değişmemiş Karakterize Edilmemiş	Nematod
<i>incRNA</i>	22	Karakterize Edilmemiş	Karakterize Edilmemiş	Karakterize Edilmemiş	Nematod
<i>hcRNA</i>	24	dsRNA	Kromatin Yapılarının Regülasyonu	2' O Metillenmesi Karakterize Edilmemiş	Bitki <i>S.pombe</i> <i>T. brucei</i>
<i>rasiRNA</i>	23-28	Putatif ssRNA	Kromatin Yapılarının Regülasyonu	2' O Metillenmesi 2' O Metillenmesi	Böcek <i>D. rerio</i>
<i>piRNA</i>	28-33	Putatif ssRNA	mRNA Bölünme (İn Vitro Kanıt)	2' O Metillenmesi 2' O Metillenmesi 2' O Metillenmesi	Memeli Böcek <i>D. rerio</i>
<i>scnRNA</i>	26-30	dsRNA	Kromatin Yapılarının Regülasyonu	Karakterize Edilmemiş	Protozoa
<i>21U RNA</i>	21	Karakterize Edilmemiş	Karakterize Edilmemiş	Değişmiş ama Karakterize Edilmemiş	Nematod

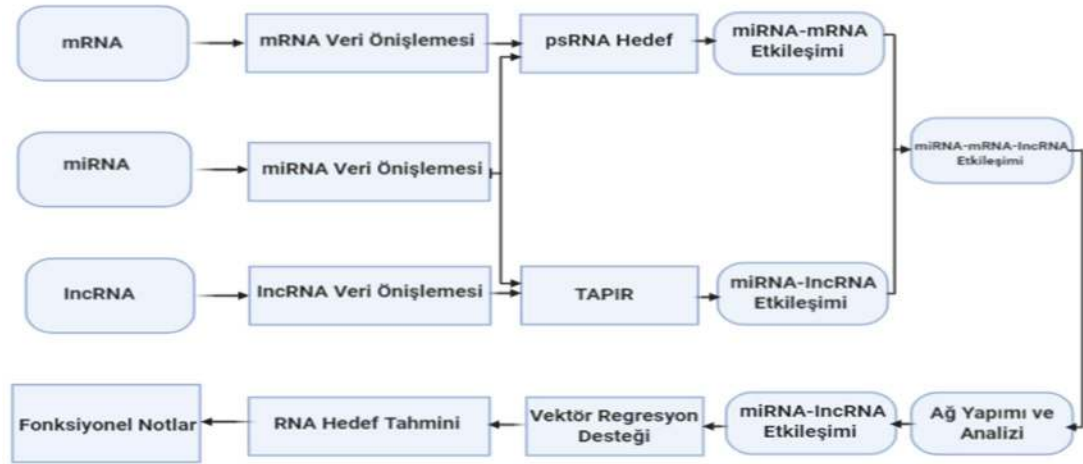
miRNA'lar ve lncRNA'lar birbirleri ile etkileşerek transkripsiyon sonrası gen ifadesinin düzenlenmesini sağlarlar (He vd., 2018). Günümüzde miRNA-lncRNA-mRNA ağ yapısının araştırılmasına ve ağın aralarındaki ilişkiyi anlamak için analize tabi tutulması konusuna artan bir ilgi vardır (Xiao vd., 2018; Wu vd., 2015). Birçok miRNA-mRNA ve miRNA-lncRNA çifti, spesifik genomik bölgedeki aynı iplik veya farklı iplikçikler üzerinde bulunur (Guo vd., 2013).

miRNA'ların, mRNA'ların ve lncRNA'ların kapsamlı analizi organizmanın patogenezi hakkında bilgi verir. Bu kapsamlı analiz Gen Ontolojisi (GO) ve Gen ve Genomların Kyoto Ansiklopedisi (KEGG) yolu, Sanallaştırma ve Entegre Keşif için Veritabanı (DAVID) kullanılarak gerçekleştirilir (Song vd., 2018). RNA'lar, gen ekspresyon düzenlemelerini belirlemede kritik bir mekanizma olan ceRNA'lar olarak işlev görebilir (Lu vd., 2018).

Çevrimiçi sunucular kullanılarak miRNA-mRNA ve miRNA-lncRNA etkileşimlerinin bir genomik ölçekte araştırılması üzerine çalışmalar yapılmıştır (Li vd., 2015).

Transkripsiyonel regülasyonu öngörmek için biyoinformatik hesaplama yaklaşımları kullanılır (Ye vd., 2014). Düzenleyici rollerine dayanarak farklı RNA molekülleri arasındaki olası fonksiyonel ilişkileri tanımlamak için bütünleştirici yöntem geliştirilmektedir. Son çalışmalarda, diferansiyel olarak ekspres edilmiş lncRNA'lar, circRNA, miRNA ve potansiyel hedefleme genlerinin fonksiyonları GO ve KEGG analizi ile tahmin edilmektedir (Yang vd., 2017). miRNA'nın biyolojik özelliklerine dayanan miRNA-mRNA'nın birlikte değerlendirilmesi, bu çalışmaları daha da zenginleştirmiştir (Meng vd., 2016). miRNA-mRNA ve miRNA-lncRNA etkileşimleri için genellikle starBase v2.0, TarBase, mirTarBase, mir2Disease, miRecords (V4.0) veritabanları tercih edilmektedir (Tang vd., 2018).

miRNA'ların bilinen bir işlevi, hedef miRNA'ların, hedef mRNA ile baz eşleşmesi yoluyla protein ifadesini düzenlemektir. Birçok araştırma grubu Arabidopsis, Drosophila ve insanda miRNA hedeflerini tahmin etmek için hesaplama yöntemleri geliştirmiştir. Bu yöntemler Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Meng vd., 2014).



Şekil 2.2. miRNA Hedef Tahmin Şeması

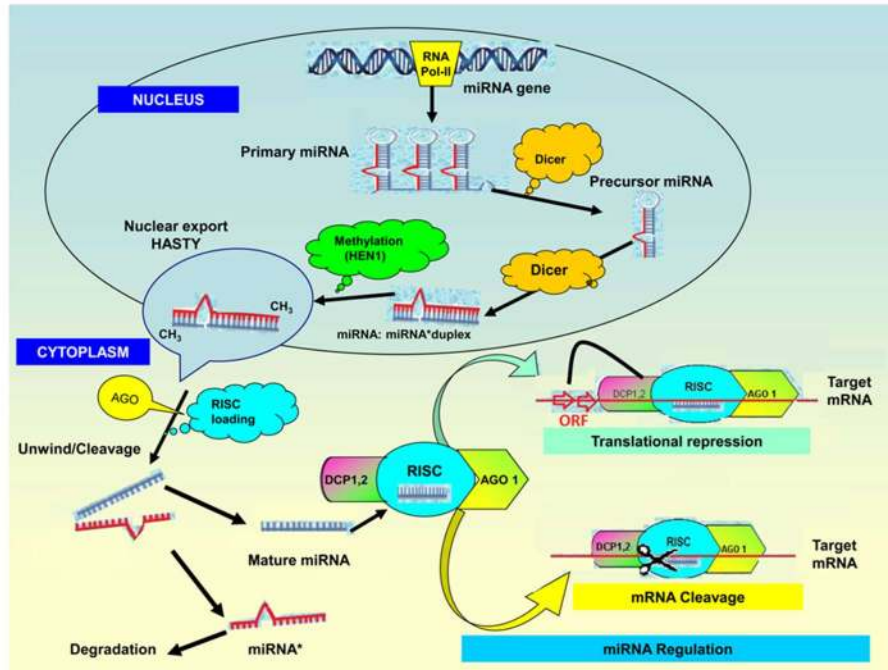
Stres koşulları sırasında, bitkiler, mikroRNA'lar (miRNA) tarafından transkripsiyon sonrası gen ekspresyonu dahil olmak üzere gen ekspresyonunu düzenlemek için karmaşık mekanizmalar kullanır. Hayvan miRNA'larının aksine, bitki miRNA'larının çoğu hem tohum

çimlenmesi hem de bitki büyümesi sırasında yer alan transkripsiyon faktörlerini düzenler (Lu vd., 2018).

Bitkilerde, miRNA'lar genellikle kodlama yerlerinde mRNA ile eşleşir ve RNA bozunması yoluyla hedeflerini sustururlar. Ayrıca besin eksikliği ve fazlalığı durumunda bitki tepkilerinde rol oynadıkları bilinmektedir (Lu vd., 2018). Arabidopsis'e ek olarak, son çalışmalarla miRNA'lar ve büyüme-gelişme sırasında ve farklı stres koşulları altındaki fonksiyonları hakkında transkripsiyon sonrası süreç bilgisi, çeşitli bitkilerde gösterilmiştir (Bartel, 2004).

2.4. miRNA Biyogenezi

miRNA'lar, uzunluğu 20 ila 24 nükleotid arasında değişen kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir (Jones-Rhoades vd., 2006). miRNA genleri (veya miR genleri) tipik olarak intergenik bölgelerde bulunur. Bazı miRNA'lar genomda kümelenir ve büyük olasılıkla uzun polisistronik RNA'lar olarak transkripsiyonlanır.



Şekil 2.3. Bitkilerde miRNA Biyogenezi (Djami-Tchatchou vd., 2017)

Böylece miRNA'ların biyogenezi (Şekil 2.3.) spesifik miR genlerinin RNA polimeraz II tarafından uzun birincil transkriptlere (pri-miRNA'lar) kopyalandığı çekirdekte meydana gelir (Bartel, 2004). Bunlar, özel olarak modifiye edilmiş bir nükleotid ile 5' ucunda baskılanmış ve 3' ucunda birkaç adenozin ile poliadenilatlanmış tipik transkriptlerdir (Pantaleo vd., 2010). Pri-miRNA'lar daha sonra hiponastik yapraklar-1 (HYL1) ve serrat (SE) gibi diğer proteinlerle birlikte DICER-LIKE (DCL1) adı verilen RNaseIII benzeri enzimler tarafından miRNA öncülerine ayrılır. Bu saç tokası ilmekli yapılar ayrıca sitoplazmada değil çekirdekte miRNA-miRNA dupleksleri oluşturmak için DCL1 tarafından işlenir (Papp vd., 2003). Dubleksler korunmuş S-adenosil-L-metiyonine bağımlı RNA metiltransferaz, HUA arttırıcı 1 (HEN1) tarafından 3' ucunda metillenir (Sun vd., 2012) ve EXPORTIN5, HASTY bitki homologu ile sitoplazmaya gönderilir (Peláez vd., 2012). Burada, dubleksler, ARGONAUTE (AGO) proteinlerini içeren RNA'nın neden olduğu susturma kompleksine (RISC) yüklenir. RISC yüklemesinden sonra, miRNA-miRNA dupleksleri öncelikle AGO1 proteini tarafından açılır (Arribas-Hernández vd., 2016). Son olarak, olgun miRNA RISC'yi tamamlayıcı hedef mRNA'lara yönlendirir. Hedef mRNA'ya yüksek homolojisi olan miRNA'lar, mRNA'nın bölgeye özgü bölünmesine yol açarken, hedef mRNA ile kusurlu baz eşleşmesine sahip miRNA'lar, translasyonel baskıya veya mRNA degradasyonuna yol açar (Sun vd., 2012).

2.5. miRNA İlişkili Gen İfadesi Düzenlenmesi

miRNA'ların çeşitliliği onların bir genomda kodlanan hemen hemen herhangi bir RNA'ya spesifik olarak bağlanması için yeterlidir, böylece bitki biyolojisinin hemen hemen her yönünü düzenler ve genellikle transkripsiyon faktörleri (TF) tarafından kontrolü etkiler. Artık bir miRNA'nın karşılık gelen hedef mRNA'ya bağlanmasının, hedef mRNA'nın bozulmasına ve hedef mRNA ile kusurlu eşleştirmenin translasyonel baskıya yol açtığı gösterilmiştir (Sun, 2012). Bozulma ile birlikte hedef mRNA'ların ve mRNA bozunmasının dengesizleşmesine yol açan poli (A) kuyruğunun çıkarılmasını başlatır (Guleria vd., 2011).

Transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu baskılayıcı rollerine ek olarak, miRNA'lar transkripsiyonu güçlendirmek ve transkript kopya sayısında rastgele oluşan yapıları

engellemek için transkripsiyonel susturma yoluyla biyolojik süreçlere sağlamlık kazandırmaya yardımcı olabilir (Ebert, 2012). Farklı uzunluklardaki miRNA'lar, aynı miRNA geninden uzunluk olarak heterojen olan miRNA'ların yanı sıra farklı genlerden de üretilebilir (Starega-Roslin vd., 2011). Çoğu bitki pre-miRNA'sı, 21 nt uzunluğunda olgun miRNA üretmek için DCL1 tarafından işlenir, ancak DCL'ler 2-4 nt farklı uzunluklar üretmek için de dahil edilebilir (Jeong, 2016). Bu tür miRNA heterojenliği, miRNA havuzlarını çeşitlendirir ve potansiyel olarak düzenleyici potansiyellerini artırabilir.

2.6. Bitki miRNA'larının Görevleri

Bitki miRNA'ları post-transkripsiyonel olarak genlerin baskılanmasında görev aldığı gibi; aynı zamanda da bitki büyümesi, bitki çiçeklenmesi, oksin sinyalizasyonu, yaprak ve kök gelişimi, biyotik ve abiyotik strese görev almaktadırlar. Daha önce yapılan çalışmalarda bulunan miRNA'lar ve bu miRNA'ların görevleri Tablo 2.3'de gösterilmiştir (Kaplan, 2017).

Tablo 2.3. *miRNA'ların görevleri (Kaplan, 2017)*

Rolü	miRNA Aileleri	Etki Ettiği Gen Aileleri
Oksin sinyalizasyonu	miRNA160	ARF10 (oksin cevap faktörü 10)
	miRNA164	NAC1 (NAC domain transkripsiyon faktör 1)
	miRNA167	ARF8 (oksin cevap faktörü 8)
	miRNA390	ARF (oksin cevap faktörü) TIR1
	miRNA393	TIR1 (taçgıma inhibitör cevap TF 1)
Yaprak gelişimi	miRNA159	MYB (mapkinaz transkripsiyon faktör)
	miRNA164	NAC1 (NAC domain transkripsiyon faktör 1)
	miRNA166	HD-ZIPIII (homedomain lusu zinciri TF)
	miRNA172	AP2 (apetela 2 DNA bağlanma proteini)

	miRNA319	TCP (TF)
Yaprak polaritesi	miRNA166	HD-ZIPIII (homedomain lusin zinciri TF)
	miRNA168	AGO1 (argonaute 1)
	miRNA390	ARF (GAP domain 1)
Çiçek organları tanımlanması	miRNA160	ARF10 (oksin cevap faktörü 10)
	miRNA164	NAC1 (NAC domain transkripsiyon faktör 1)
	miRNA172	AP2 (apatela 2 DNA bağlanma proteini)
	miRNA319	TCP (TF)
	miRNA156	SBP (sulfat taşıyıcı)
	miRNA159	MYB (mapkinaz transkripsiyon faktör)
Stres cevabı	miRNA156	SBP (sulfat taşıyıcı)
	miRNA159	MYB (mapkinaz transkripsiyon faktör)
	miRNA160	ARF10 (oksin cevap faktörü 10)
	miRNA167	ARF8 (oksin cevap faktörü 8)
	miRNA168	AGO1 (argonaute 1)
	miRNA169	NFY (çekirdek TF)
	miRNA171	SLC (nitrat redüktaz)
	miRNA319	TPC (TF)
	miRNA393	TIR1 (taşıma inhibitör cevap TF 1)
	miRNA395	APS (adenozin fostat kinaz)
	miRNA396	GRF (nükleer resöptör)
	miRNA397	Laktaz
	miRNA398	CSD (büyüme faktörü)
	miRNA399	UBC24 (ubiquitin konjugasyon enzimi)
	miRNA408	Plastosiyanın
miRNA'ların kontrolü	miRNA162	DLC1 (Dicer enzimi)
	miRNA168	AGO1 (argonaute 1)
	miRNA403	AGO2 (argonaute 2)
Diğer	miRNA158	Atlg64100 (Arabidopsis thaliana TF)

	miRNA161	PPR (DNA motifi)
	miRNA163	At1g66700 (Arabidopsis thaliana TF)
	miRNA173	At3g28460 (Arabidopsis thaliana TF)

2.7. miRNA ve Cd Toksisitesi

Cd stresi için miRNA'lar ve ilişkili gen karakterizasyonu, ağır metal toleransı için bitki moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olmaktadır (Fang vd., 2013). *Brassica napus*'ta yapılan bir çalışmada miR156, miR171 ve miR396a transkriptlerinin aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Zhou vd., 2012). Farklı Cd seviyelerine maruz bırakılan *Medicago* bitkilerinde miRNA'lar modifiye edilmiş ekspresyon profilleri sergilerken, bunlar arasında miR393, miR171, miR319 ve miR529'un yukarı regüle olduğu, miR166'nın aşağı regüle edildiği bildirilmiştir (Zhou vd., 2008). miRNA ekspresyonunun bu düşük regülasyonu, Cd'ye bağlı hasarları azaltmak için CSD1 / CSD2 transkriptlerini indüklemiştir. Bu sonuçlar, bitki metal stres yanıtı düzenlemesinde bazı miRNA'ların önemini göstermiştir.

Metalle düzenlenen miRNA'larla ilgili çalışmalar, bitkilerdeki çeşitli metabolik süreçlerin düzenlenmesi ile ilişkili çeşitli hedefleri ortaya koymaktadır. Örneğin, Ding vd., (2011), mikroarray deneyi kullanılarak 1 gün boyunca 60 µM CdCl₂ e maruz kalan pirinç fidelerinde 19 miRNA tanımlamıştır. Tanımlanan miRNA'lar arasında bazıları, örneğin miR162a, miR166m, miR171b, miR390, miR168b ve miR1561 başka deneyler yapılarak da tanımlanmıştır. Cd stresine cevap veren miRNA'lar arasında bulunan miR171 ve miR393'ün *Medicago truncatula*, *B. napus* ve *O. sativa*'da Cd stresini tolere etme işlevi Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

	miRNA 156	miRNA 157	miRNA 158	miRNA 159	miRNA 160	miRNA 161	miRNA 162	miRNA 164	miRNA 165	miRNA 166	miRNA 167	miRNA 168	miRNA 169	miRNA 171	miRNA 172	miRNA 319	miRNA 390	miRNA 393	miRNA 394	miRNA 395	miRNA 396	miRNA 397	miRNA 398	miRNA 399
Manganese	↑	↑		↓				↑		↑	↑					↑	↑			↑	↑	↓	↑	
Arsenic	↑			↓			↓	↓	↑	↓	↓		↓	↓	↓	↑	↓	↑			↓	↑		
Mercury	↓			↓	↓		↓	↑		↓				↓		↓	↓	↑		↓	↓		↓	↓
Cadmium	↓		↑	↓	↓	↑	↓	↓		↓	↓	↓		↓		↓	↓	↑	↓	↑	↓		↑	↓
Aluminum	↑	↑		↓	↓		↓			↓	↑		↑	↑	↑	↓	↓	↑		↑	↓	↑	↓	↑

Şekil 2.4. Ağır Metallere Yanıt Olarak Ekspresyonu Değişen Bitki miRNA'ları (Noman ve Aqeel, 2017)

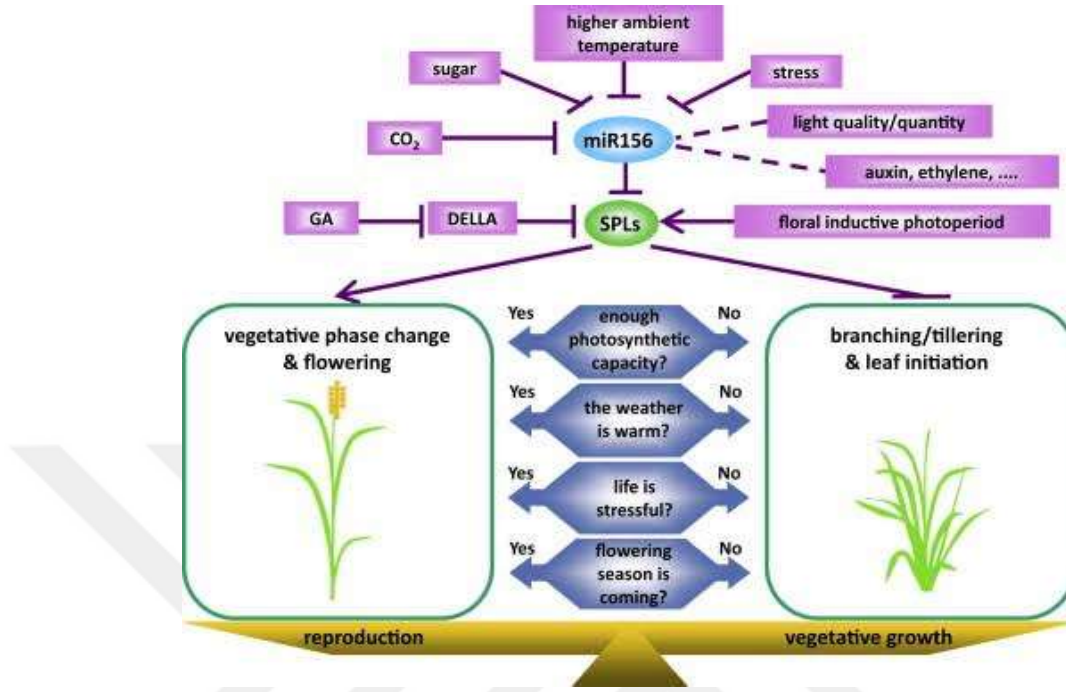
miR393'ün Cd stresi sırasında uyarılması TIR1 / mRNA seviyesini arttırmıştır. Bu durum, oksin sinyalinin aşağı regülasyonunda ve muhtemelen protein proteolizini hedefleyen E3 ubiquitin ligazının azalmasıyla sonuçlanır. Ek olarak, Cd'ye maruz kalma ile karşı karşıya olan transgenik bitkiler yabani tip bitkilerle karşılaştırıldığında, büyüme özellikleri, klorofil, glutatyon ve protein olmayan tiol içeriklerinin arttığı bildirilmiştir. Eşzamanlı olarak, bu miRNA, sülfat taşıyıcı 1-1 (Sultr1-1) gibi metal tolerans genlerinin yukarı regülasyonu ve daha belirgin ekspresyonuna neden olmuştur (Zhang vd., 2013).

Normal kükürt varlığında miR395 ekspresyonunun Cd'ye maruz kalan bitkilerin aksine tüm dokularda sıfır olması beklenir. Cd stresi toprakta kükürt eksikliği ile aynı tepkiyi gösterdiği düşünüldüğünden miR395 ekspresyonunun bu stres altında artması beklenir. miR395 bazlı Cd toleransında büyük olasılıkla topraklardan daha fazla kükürt elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu bulgu ile, Cd stresinin sülfat eksikliği gibi hemen hemen aynı etkiye sahip olduğunu kanıtlanmaktadır. Artan miRNA ekspresyonu Sultr1-1 hedef genini baskıladığından hedef genin ekspresyon seviyesi düşecektir. Ayrıca miR159 ve miR167 için iki doğal dirence bağlı makrofaj proteini; (NRAMP) tipi metal taşıyıcı ile bir ABC taşıyıcısı tanınmıştır. Bunlar metal alımı ve translokasyona katılır. Verilen taşıyıcı faaliyetlerindeki değişiklik, bitkilerin metal stresine tolerans göstermesine neden olabilir (Krämer vd., 2007; Xu vd. (2013), Cd-stresli bitkilerde farklı ekspresyonu olan yeni miRNA ailelerini gözlemlemişlerdir. Cd'ye duyarlı miRNA hedef genleri, fit selatin sentaz-1, demir ve ABC taşıyıcı proteinleri olarak belirlenmiştir (Xu vd., 2013). Farklı Cd seviyelerine yanıt olarak farklı tahıl bitkilerindeki özetlenmiş bulgular, Cd toksisitesi sırasında miRNA'ların

tomurcuklanma fonksiyonunu gösterir. Sonuç olarak, spesifik TF'leri, enzimleri veya diğer proteinleri içeren ileri deneyler, Cd'nin neden olduğu toksisiteyi nötralize etmek için daha iyi ürün yönetimi stratejileri tasarlamamızı kolaylaştıracaktır.

2.8. miR156 ve SPL İlişkisi

Bitkilerdeki filiz gelişimi, her fazda üretilen lateral organların karakterine bağlı olarak farklı fazlara ayrılabilir (Rs, 2013). Bu fazlar, genç vejetatif, yetişkin vejetatif ve bir üreme evresinden ve filizin ürettiği geçiş dönemlerinden oluşur. miR156 ve onunla yakından ilişkili miRNA, miR157, filizden itibaren vejetatif gelişimin (vejetatif faz değişimi) erişkin fazına geçişin ana düzenleyicileridir (Wu ve Poethig, 2006). miR156 / miR157, filiz gelişiminde erken üretilen organlarda yüksek seviyelerde ifade edildiği ve hedefleri olan Squamosa Promotor Bağlayıcı Protein (SBP) transkripsiyon faktörlerinin ifadesini, bastırdıkları görülmüştür (Rhoades vd., 2002; Wang vd., 2011). Vejetatif faz değişikliği, miR156 / 157 ekspresyonundaki bir düşüş ve bunun sonucunda yeni oluşan organlarda SBP genlerinin ekspresyonundaki artışla başlatılır (Wu vd., 2009). Bu SBP genleri erişkin vejetatif özelliklerin gelişimini ve ayrıca bazı türlerde çiçek oluşumunun uyarılmasını destekler (Wang, 2014). Mekanizma Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5 miR156 ve SPL İlişkisi (Chen vd., 2010)

Arabidopsis, 10'u miR156 tarafından hedeflenen 16 SBP-LIKE (SPL) genine sahiptir (Cardon vd., 1999). Bu genler, korunmuş DNA bağlanma domainlerinin SPL3 / SPL4 / SPL5, SPL9 / SPL15, SPL2 / SPL10 / SPL11, SPL6 ve SPL13A / B'nin amino asit dizisine dayanarak beş şekilde gruplandırılabilir (Xie vd., 2006). Transgenik bitkilerin korunmuş olarak miR156'yı aşırı ekspres eden fenotipi, bu SPL genlerinin; vejetatif faz değişimi, çiçeklenmenin uyarılma zamanı, yaprak başlatma oranı, sürgün dallanması, antosiyanin ve çiçeklenme sapı üzerinde trikoma üretimi, stres tepkileri, karotenoid biyosentezi ve doku kültüründe sürgün rejenerasyonu ve lateral kök gelişiminde görevli olduklarını göstermiştir (Yamaguchi vd., 2009). Bununla birlikte, bu işlemlerde ayrı SPL genlerinin rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Bireysel SPL genlerinin işlevi, öncelikle bu genlerin miR156-dirençli versiyonlarını kendi promotörleri veya yapısal olarak ifade edilen Karnabahar Mozaik Virüsü 35S promotörünün düzenlemesi altında eksprese eden bitkilerin fenotiplerini karakterize ederek araştırılmıştır. SPL2, SPL9, SPL10, SPL11, SPL13 ve SPL15'in kök ve sürgün gelişiminde çeşitli süreçleri kontrol ettiği görülürken, SPL3, SPL4 ve SPL5'in öncelikle çiçeklenmeyi desteklediği belirlenmiştir (Wang vd., 2009). Bununla birlikte, çoğu durumda, bu aşırı

ekspresyon fenotipinin bu genlerin normal fonksiyonunu yansıtır yansıtmadığı bilinmemektedir, çünkü fonksiyon kaybı fenotipleri karakterize edilmemiştir. Bu ailenin en iyi karakterize edilmiş üyeleri SPL9 ve SPL15'tir: Bu genlerin aşırı ekspresyonu vejetatif faz değişimini hızlandırır (Usami vd., 2009).

miR156'nın çiçek geçişi sırasında ve sonrasında SPL aktivitesinin düzenlenmesinde küçük bir rol oynadığını ve SPL15'in çiçeklenme için önemli olduğunu, ancak çiçeklenme gelişiminin sonraki aşamaları için önemli olmadığını göstermektedir. Yapraklarda miR156 seviyesi düştükçe, bazı SPL genlerinin ekspresyonu önemli ölçüde artarken, diğerleri güçlü bir şekilde bastırılmış olarak kalmıştır. SPL aktivitesindeki geçici artışların çiçeklenmeyi erken teşvik etmesini önlemek için önemli olabilir (Kasschau vd., 2003).

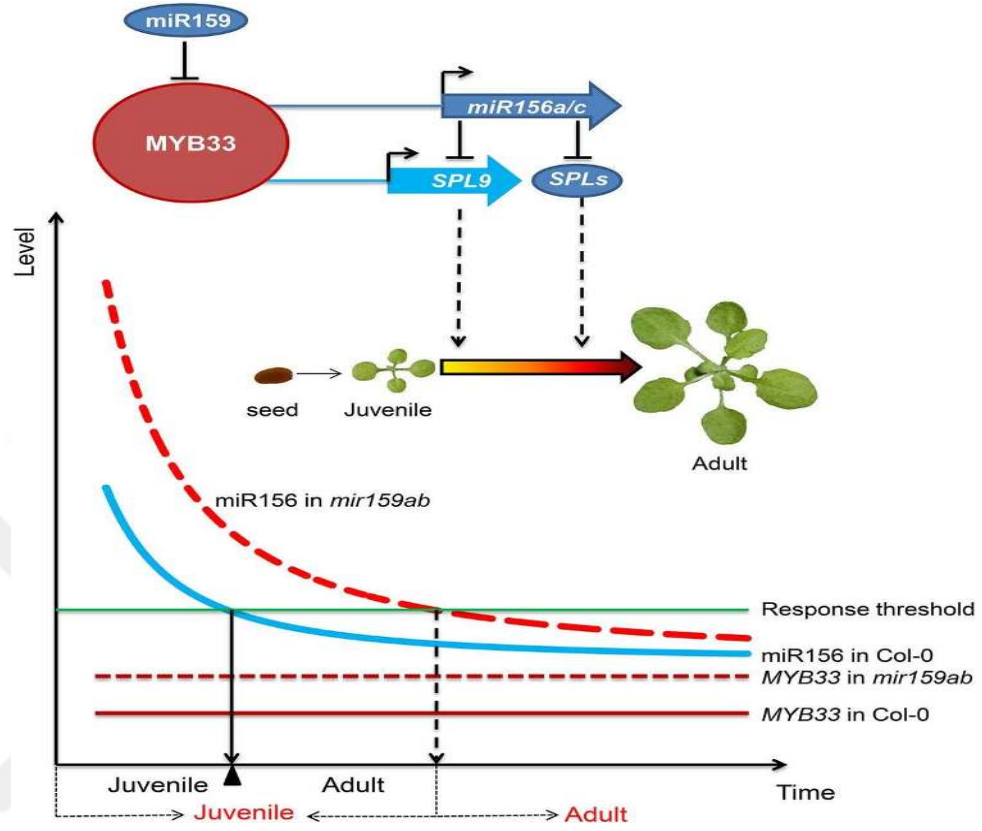
miR156, çiçeklenmenin sadece uygun çevresel koşullar altında gerçekleşmesini sağlayarak dolaylı olarak bu süreci düzenleyebilir. miR156, SPL transkriptlerini bölerek (Ronemus vd., 2006) ve translasyonel baskılarını artırarak (Brodersen vd., 2008) SPL gen ekspresyonunu bastırır, ancak bu aktivitelerin göreceli önemi hala bilinmemektedir.

2.9. miR159 ve MYB ilişkisi

miR159 ailesi, çoğu kara bitkisinde bulunan en eski (> 400 milyon yıl) miRNA ailelerinden birini temsil eder (Axtell ve Bartel, 2005). Biyoinformatik tahmin ve deneysel doğrulama yoluyla, miR159'un arpa ve pirinç gibi monokotiledonlar, (Tsuji vd., 2006) ve Arabidopsis gibi dikotiledon olan çeşitli bitki türlerinde bir GAMYB veya GAMYB benzeri gen ailesinin ekspresyonunu düzenlediği bulunmuştur. Bu türleri ayıran önemli evrimsel mesafeye rağmen, bu MYB genlerindeki miR159 bağlanma bölgesi hem pozisyonda hem de sırayla korunur. Bu güçlü koruma, miR159-MYB ilişkisinin güçlü bir seçici baskı altında olduğunu ve muhtemelen kritik bir işlevi yerine getirdiğini göstermektedir. Bu GAMYB genleri, gibberellin (GA) sinyal transdüksiyonunda yer alan R2R3 MYB transkripsiyon faktörlerini kodlar. Roller, programlanmış hücre ölümünü (PCD) teşvik etmek olan anterler (tapetum) ve tohumlarda (aleurone) karakterize edilmiştir. Örneğin, pirinçte, tapetum PCD'ye giremediği ve dejenere olmadığı için gamyb mutanlığı erkek sterildir (Aya vd., 2009). Aynı şekilde bu işlev kaybı, miR159'un iki ana hedef geni olan MYB33 ve MYB65'in

mutasyonu olan Arabidopsis'te, dejenere olmayan bir tapetum nedeniyle erkek kısırlılığı ile sonuçlanır (Millar ve Gubler, 2005). Hem tahılda hem de Arabidopsis'te miR159'un aşırı ekspresyonu erkek sterilitesiyle sonuçlanmaktadır ve bu da GAMYB anter fonksiyonunun güçlü bir şekilde korunduğu anlamına gelir. Tohumda, arpa veya Arabidopsis'teki GAMYB ekspresyonu aleurone vakulasyonunu, ayrıca GA aracılı PCD sürecini destekler (Alonso-Peral vd., 2010). Bu nedenle, miR159 aktivitesinin zayıf olduğu tohumlarda, bu GAMYB benzeri genlerin eksprese edildiği ve korunmuş bir PCD fonksiyonunu desteklediği görülmektedir. Aksine, miR159-MYB yolunun vejetatif dokulardaki fonksiyonel rolü o kadar net değildir (Alonso-Peral vd., 2012).

miR159'un gelişimdeki rolü Arabidopsis'deki genetik analizden ileri sürülmüştür. Daha önce, 3 Arabidopsis miR159 ailesi üyesi miR159a-c için işlev kaybı mutasyonları gösterilmiştir. Üç tek mutantın hiçbirinde bir fenotip gösterilmemiştir, ancak miR159ab çift mutantı, bodur büyümeyi ve yuvarlak, yukarı doğru kıvrılmış yaprakları içeren pleiotropik gelişimsel kusurları sergilemiştir (Allen vd., 2010). miR159 ve MYB mekanizmasına ait görsel Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6 miR159 ve MYB İlişkisi (Guo vd., 2017)

miR159'un Arabidopsis'te yaklaşık 20 farklı hedef geni düzenlediği tahmin edilmekle birlikte, bu deneyler Arabidopsis bitkisel dokularında bulunan oldukça aktif bir miR159-MYB33 / MYB65 yolunu tanımlamıştır. Her ne kadar MYB33 için çiçeklenmenin desteklenmesinde bir rol önerilmiş olsa da, Landsberg erecta ekotipinde aşırı miR159 ekspresyonu MYB33 transkript düzeylerini düşürdüğü ve çiçeklenmeyi geciktirdiği görülmüş (Achard vd., 2004) olsa da, Columbia ekotipinde böyle bir etki görülmemiştir (Schwab vd., 2005). İlginç bir şekilde, diğer yüksek oranda korunmuş miRNA'lara benzer şekilde, miRNA seviyelerinde değişikliklerin nicelleştirildiği sayısız çalışma, miR159'un bir dizi farklı türdeki çeşitli streslere bir tepki vermesine neden olmuştur. Buna kuraklık, tuzluluk, soğuk, ısı, UV ışığı, su basması, ağır metal, virüsler veya bakteri gibi biyotik streslere yanıt dahildir. MYB aktivitesinin vejetatif büyümeyi etkileyebileceği düşünüldüğünde, ifadesi stres sırasında büyümeyi ayarlayabilir (Kitazumi vd., 2015). Bu

değişikliklerin bu streslere önemli fizyolojik tepkiler verip vermediği ve herhangi bir potansiyel rolün yaygın olarak korunup korunmadığı belirsizdir. Bu nedenle, miR159-MYB birçok türde güçlü bir şekilde korunmasına rağmen, bu yolun bitkisel dokularda hangi fonksiyonel rolü oynadığı bilinmemektedir.

2.10. miR171 ve GRAS İlişkisi

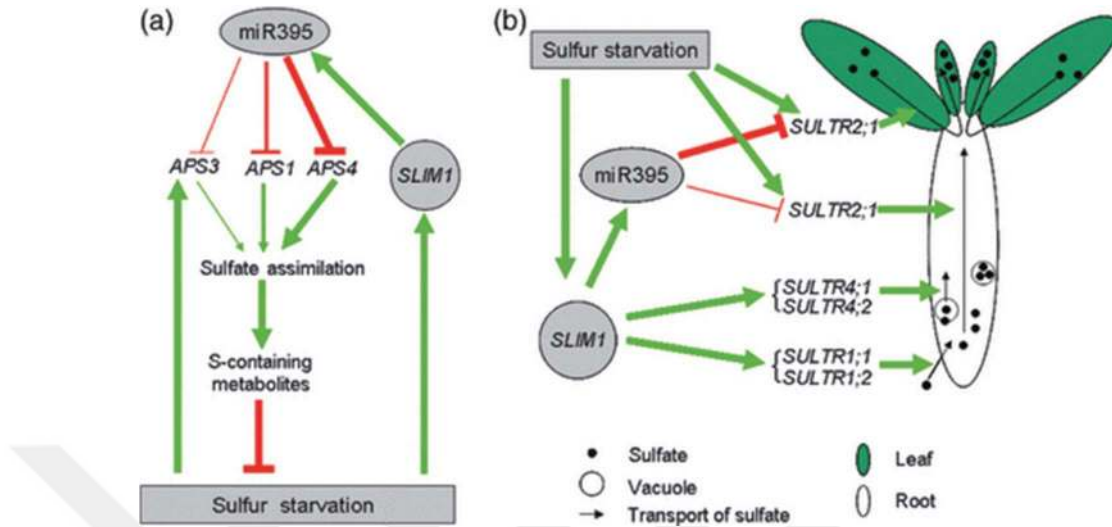
21 nükleotid uzunluğundaki miR171 familyası, angiosperm bitkiler arasında oldukça korunmuştur (Zhu vd., 2015). miR171 genlerinin sayısı çeşitli bitki türleri arasında değişir. Örneğin Arabidopsis'te üç kopyası vardır (miR171a, b ve c gibi). Arpa, Brachypodium, pirinç ve mısır sırasıyla iki, dört, dokuz ve 14 miR171 izoformuna sahiptir (Curaba vd., 2013). miRBase'de listelenen nodül de dahil olmak üzere çeşitli dokulardan türetilmiş küçük RNA kütüphanelerinin sıralanmasıyla tanımlanan 21 soya fasulyesi miR171 geni vardır (Yan vd., 2015). miR171'in GRAS transkripsiyon faktörü ailesinin üyelerini hedefleyerek çeşitli bitki büyüme ve gelişme süreçlerini düzenlediği bilinmektedir. Bu ailenin adı GAI (Gibberellic Asit Sensitifi), RGA (GAI Temsilcisi) ve SCR (Scarecrow) transkripsiyon faktörlerinden türetilmiştir (Fiorilli vd., 2015). miR171'in en iyi incelenen iki hedefi, Scarecrow-Like (SCL) ve Nodulasyon Sinyal Yolu 2 (NSP2) transkripsiyon faktörleridir (Hirsch vd., 2009).

Arabidopsis'te miR171, apikal meristem ve aksiller meristem için kritik olan SCL6-II, SCL6-III ve SCL6-IV de dahil olmak üzere üç SCL6 genini hedef alır. miR171 öncüllerinin aşırı ekspresyonu, aksiller tomurcuk oluşumunu inhibe ederek ve çiçek sayısını baskılayarak Arabidopsis'te sürgün yapısını değiştirmiştir (Schulze vd., 2010). Ek olarak miR171, SCL6, SCL22 ve SCL27 mRNA'larını hedefleyerek klorofil biyosentezini de düzenler. SCL27, fotosentez için önemli bir ışıkla indüklenebilir enzim olan Protoklorofil Oksidoredüktaz C (PORC) ekspresyonunu kontrol eder (Pattanayak ve Tripathy, 2011). Arpa (*Hordeum vulgare* L.) gibi monokotiledonlarda, Hvu pri-miR171a'nın ektopik aşırı ekspresyonu, kısa boy uzunluğu, gecikmiş çiçeklenme süresi ve kısmen steril sivri uçlar gibi pleiotropik etkilerle sonuçlanmıştır (Curaba vd., 2013).

2.11. miR395 ve SULTR2 İlişkisi

Arabidopsis thaliana'da, topraktan sülfat alımı SULTR1-1 ve SULTR1-2 genleri tarafından kodlanan iki sülfat taşıyıcısı ile ilişkilendirilir. Uyarılan SULTR1-1 düşük sülfat koşulları altında sülfat alımından sorumluyken, SULTR1-2 köklerle topraktan sülfatın alımını gerçekleştiren proteini kodlar (Yoshimoto vd., 2002). Alınan sülfat, çeşitli birincil ve ikincil metabolitlerin sentezi için çeşitli yerlere taşınır. SULTR1-3 tarafından kodlanan floem lokalize sülfat taşıyıcı, sülfürün kaynaktan organlara yeniden dağılımına aracılık eder (Yoshimoto vd., 2003). SULTR3-5 tarafından kodlanan protein, SULTR2-1'in kök vaskülatüründeki sülfat taşıma kabiliyetini artırır (Kataoka vd., 2004a). Alımdan sonra, sülfat ya hücre vakuolünde depolanır ya da plastidlerde asimile edilir. Sülfat asimilasyon yolu, sistein, metiyonin ve glutatyon sentezi için azaltılmış kükürt sağlar. ATP sülfürlaz, sülfat asimilasyon yolundaki ilk enzimdir. *Arabidopsis thaliana*'da ATP sülfürlaz izoformlarını kodlayan dört APS geni (APS1, APS2, APS3 ve APS4) vardır. APS1, APS3 ve APS4 proteinlerinin plastidlere lokalize olduğu tahmin edilirken, APS2'nin sitozolde işlev gösterebileceği tahmin edilmektedir (Hatzfeld vd., 2000). Sülfat, daha sonra kükürt içeren metabolitler oluşturmak üzere azaltılan adenosin 5 fosfosülfat oluşturmak için ATP sülfürlaz tarafından aktive edilir (Saito, 2004).

Son araştırmalar, miR395'in kükürt eksikliği ile uyarıldığını ve aynı metabolik yolda koordineli olarak işlev gören iki gen grubunu hedeflediğini göstermiştir (Jones-Rhoades ve Bartel, 2004). miR395'in sülfat açlığı sırasında uyarılması ve hedeflerinin cevapları, miRNA395'in kükürt açlığına yanıt verdiğini göstermektedir (Şekil 2.7).

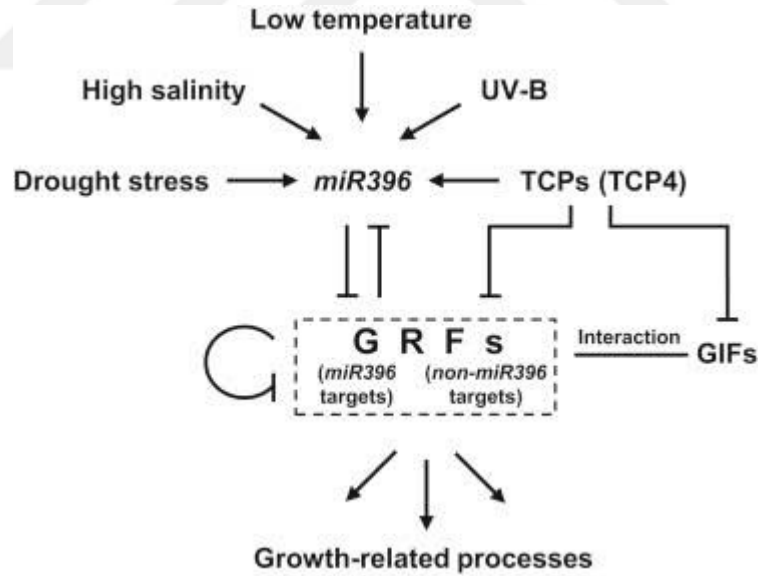


Şekil 2.7 miR395 ve SULTR2 İlişkisi (Liang vd., 2010)

miR395, monokotiledonlar ve dikotiledonlar da dahil olmak üzere çeşitli türlerde tanımlanmış korunmuş bir mikroRNA'dır. Arabidopsis'te (miRBase, sürüm 11.0) 6 birincil transkriptten kaynaklanan 6 miR395 türü (a – f) tanımlanmıştır (Griffiths-Jones, 2004). Sülfat sınırlaması sırasında miR395'in ekspresyonu yüksek oranda uyarılır (Jones-Rhoades ve Bartel, 2004). Çeşitli besin yoksunluğu koşulları altında (C, N, P, K, Fe, Cu, S gibi), sadece sülfat eksikliği miR395'in ekspresyonunu indüklemiştir (Hsieh, vd., 2009). Bu kanıt, miR395'in özellikle sülfat eksikliğinde tepki verdiğini göstermektedir. Önceki çalışmalar miR395'in Arabidopsis'te APS genlerini (APS1, APS3 ve APS4) ve SULTR2-1'i hedeflediğini göstermiştir (Kawashima vd., 2009). SULTR2-1 mRNA filizde azalır, ancak köklerde artar. Bu dört hedef genin, *Arabidopsis thaliana*'da miR395 tarafından parçalandığı tespit edilmiştir (Jones-Rhoades ve Bartel, 2004). Kawashima ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı bir çalışmada sülfat açlığı sırasında APS1 ve APS4 transkriptlerinin ve sürgün SULTR2-1'in aşağı regüle edildiğini, ancak APS3 ve kök SULTR2-1 transkriptlerinin genellikle hedef genlerini negatif olarak düzenlemelerine rağmen yukarı regüle edildiği gözlemlendi. Son çalışmalar, sülfat açlığı sırasında kök SULTR2-1 mRNA ve miR395 arasındaki pozitif korelasyonun örtüşmeyen dokuya özgü ekspresyondan kaynaklandığını ortaya koymuştur (Kawashima vd., 2009).

2.12. miR396 ve GRF İlişkisi

miR396 son zamanlarda Arabidopsis ve pirinçte tanımlanan bir miRNA ailesidir. Arabidopsis'te miR396'nın iki lokusu (miR396a ve miR396b) vardır ve bunların ekspresyonu hem northern blot analizi hem de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar doğrultusunda, miR396'nın sırasıyla 7 Büyüme Düzenleyici Faktör (GRF) genini ve ayrıca sırasıyla Rodenaz benzeri bir proteini ve kinesin benzeri bir proteini kodlayan iki ek geni (At2g40760 ve At4g27180) hedeflediği tahmin edilmektedir (Jones-Rhoades ve Bartel, 2004). Bitki GRF genleri, bitki yaprağı büyümesindeki rolleri olan varsayılan bir transkripsiyon faktörleri ailesini kodlar (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 miR396 ve GRF İlişkisi (Liu vd., 2009)

Arabidopsis'te, GRF gen ailesinin 9 üyesi vardır ve bunların çoğu aktif olarak büyüyen ve gelişen dokularda güçlü bir şekilde ifade edilir. AtGRF1 ve AtGRF2'yi aşırı eksprese eden transgenik bitkiler daha büyük yapraklara ve kotiledonlara sahipken, AtGRF1-AtGRF3 için elde edilen mutantlar yabani tip bitkilerden daha küçük yapraklara ve kotiledonlara sahiptir (Kim, Choi ve Kende, 2003). Benzer şekilde, atgrf5 mutant bitkileri,

hücre sayısının azalması ve AtGRF5'in aşırı ekspresyonu nedeniyle dar yapraklı fenotipler sergiler ve yaprak primordial ve artan yaprak büyümesinde hücre proliferasyonunu artırır (Horiguchi vd., 2005). GRF'ler ve GIF1, yaprakların büyümesini ve şeklini düzenlemede yer alan transkripsiyon faktörlerinin kompleksleri olarak işlev görür (Kim ve Kende, 2004).

miR396'nın 6 GRF genini hedeflediği tahmin edilip doğrulanmış olmasına rağmen, miR396'nın GRF gen ekspresyonu ve bitki yaprak büyümesinin düzenlenmesindeki rolünü doğrudan ele alan hiçbir moleküler genetik analiz yapılmamıştır. Transgenik bitkilerin dar yaprak fenotipi, sadece öngörülen 6 GRF hedef geninin değil, aynı zamanda GRF ile etkileşen bir proteini kodlayan GIF1'in bastırılmış ifadesi ile de ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, transgenik miR396-aşırı eksprese eden bitkiler stomada daha düşük yoğunluklara sahiptir ve yabancı tip bitkilere göre kuraklığa daha toleranslıdır. Bu sonuçlar miR396'nın GRF gen ekspresyonunu baskılayarak bitki yaprağı büyümesi ve gelişmesinin düzenlenmesindeki rolünü kuvvetle desteklemektedir (Liu vd., 2009).

2.13.miRNA Araştırmalarında Kabul Edilen Moleküler Teknikler

2.13.1. miRNA İzolasyonu, Tanımlanması ve Karakterizasyonu için Yaklaşımlar

miRNA'ların izolasyonu, tanımlanması ve işlevlerini açıklamak için ilk adımı temsil eder. miRNA'lar öncelikle doğrudan klonlama, sekanslama, genetik tarama ve biyoinformatik tahminlerle keşfedilmiştir (Schommer vd., 2012). miR156, miR159, miR164, miR171, vb. gibi ilk bitki miRNA'ları, küçük RNA popülasyonlarının izole edilmesi, klonlanması ve sekanslanması yoluyla *Arabidopsis thaliana*'da gösterilmiştir (Reinhart vd., 2002).

Son 10 yılda, bitkilerdeki binlerce miRNA'yı tanımlamak için hem hesaplama stratejileri hem de deneysel yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki miRNA'ları, hedef mRNA'larına yüksek derecede dizi benzerliği gösterir ve korunan miRNA'lar, NCBI-BLAST (Temel Yerel Hizalama Arama Aracı, www.ncbi.nlm.nih.gov) veritabanı tarafından gösterilmiştir. İlk

deneysel yöntemler, bitkilerdeki miRNA'ları tanımlamak ve fonksiyonel olarak analiz etmek için doğrudan klonlamayı ve genetik taramaya dayanan yaklaşımları içeriyordu (Reinhart vd., 2002). Son yıllarda, diğer bir yöntem olan yeni nesil sekanslama (NGS) teknolojisi bitkilerdeki miRNA keşfi ve hedef tanımlamasını göstermek için kullanılmaktadır (Djami-Tchatchou ve Dubery, 2015). Tanımlanan miRNA'ların ekspresyonunun çoğunlukla Northern Blotlama veya yüksek hassasiyetli kantitatif veya yarı kantitatif gerçek zamanlı PCR bazlı analizler ile doğrulanması gerekmektedir.

2.13.2. miRNA'lar ve Hedef Genleri

Bitki miRNA'larının hedef genlerinin birçoğu, biyoinformatik araçlar ve ardından deneysel yaklaşımlar kullanılarak tahmin edilebilir (Pantaleo vd., 2010). miRNA hedef tahmini için kullanılan biyoinformatik araçlarından bazıları şunlardır:

psRNATarget ([http:// plantgrn. Noble.org/psRNATarget/](http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/));

TAPİR (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/tapir/>),

miRTour (<https://mirnablog.com/mirtour-plantmirna-and-target-prediction-tool/mirnest/>), (<http://rhesus.amu.edu.pl/mirnest/>)

ve deneysel olarak doğrulanmış microRNA-hedef etkileşimleri veritabanı (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) (miRTarBase) (Shriram vd., 2016).

Hedef mRNA'ların ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı PCR ile izlenebilse de, hedef kesme bölgesi cDNA Uçlarının 5 ACE-Hızlı Amplifikasyonu (RACE) ile eşlenebilir. Son zamanlarda, degradom dizileme tekniği geliştirilmiştir. Bu, yüksek verimli, derin bir sekanslama yöntemi kullanılarak 5 '-RACE'in modifiye edilmiş bir versiyonudur (Song vd., 2018).

2.14. Konu ile İlgili Önceki Çalışmalar

Yeni nesil dizileme teknolojisinin hızlı gelişimi ile, küçük RNA'ların ve mRNA bozunmasının genom çapında analizi, ağır metallere bitki tepkilerini potansiyel olarak içeren çok sayıda küçük RNA'yı tanımlamak için güçlü bir araç haline gelmiştir.

Bugüne kadar bitkilerin ağır metal stresine cevabında önemli roller oynayan çok sayıda miRNA tespit edilmiştir. Chen vd., 2011'de yaptıkları bir çalışmada Al^{+3} stresinde cevap veren miRNA'ları tanımlamak için, Al^{+3} uygulanan ve uygulanmayan model baklagil bitkisi *Medicago truncatula*'nın kök apekslerinden oluşturulan kütüphaneleri sıralamak için yeni nesil dizileme teknolojisi kullanmıştır. Çalışmada daha önceden tanımlanmış 326 miRNA tespit edilirken, 21 yeni miRNA tanımlanmış ve miRNA'lar arasında, 23 miRNA'nın ekspresyonu Al^{+3} e cevap vermiştir. Al^{+3} e cevap veren mRNA'ların çoğunluğu aşağı regüle edilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler ayrıca kantitatif gerçek zamanlı PCR ile doğrulanmıştır (Chen vd., 2011).

Srivastava vd., 2012'de yaptıkları bir çalışmada arsenik (As) stresindeki miRNA'ların rolünü incelemek için, *Brassica juncea*'da miRNA'ların mikroarray profilini dizilemişlerdir. Sonuçlar, 1 saat ve 4 saat boyunca As'a maruz kalan köklerde miRNA ekspresyonunun önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir. Yanıt veren miRNA'lar ayrıca ekspresyonlarında zamana ve dokuya bağlı bir değişiklik göstermiştir. Ayrıca miRNA'lar için varsayılan hedeflerin; çeşitli gelişim süreçlerini (örneğin miR156, miR169 ve miR172), kükürt alımını, taşınmasını ve asimilasyonunu (miR395, miR838 ve miR854) ve hormonal biyosentez veya fonksiyonu (örn. miR319, miR167, miR164 ve miR159) etkilediği tahmin edilmiştir (Srivastava vd., 2012).

Jin vd. (2015), *Paeonia ostii*'deki korunmuş ve korunmamış miRNA'ları kontrol ve bakır uygulanmış koşullarda tanımlamak için yeni nesil dizileme teknolojisi kullanmıştır. Daha önce bilinen 102 bitki miRNA'sı tanımlanmış ve gen dizisi benzerliklerine göre 89 familyada sınıflandırılmıştır. Çalışmada 34 yeni miRNA tanımlanarak bu miRNA'ların hedef genleri daha önce tanımlanan miRNA'ların dizi benzerliklerinden yararlanılarak tahmin edilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler neticesinde bakır stresine yanıt olarak 12 korunmuş miRNA ve 18 yeni miRNA bulunmuştur (Jin vd., 2015).

Li vd., 2007’de pirinç tohumlarında kadmiyum (Cd) birikimini azaltmak için, fitoşelatin sentaz (PCS) geninin OsPCS1’in ekspresyonunun RNA etkileşimi (RNAi) ile bastırıldığını göstermişlerdir. PCR ürününün saç tokası yapısı, *Agrobacterium tumefaciens* yoluyla pirince (japonica) aktarılmıştır. RNAi içeren pirinç bitkileri seçilmiş ve 10 mg / kg Cd’ye maruz bırakılan saksılarda yetiştirilmiştir. OsPCS1’in transkripsiyonel seviyesi, bazı RNAi pirincinin tohumlarında yabancı tipe kıyasla azalmıştır. Sonuç olarak RNAi pirinci içeren tohumlarda Cd birikimi yaklaşık yarı yarıya azalmıştır. Sonuçlar, bu yeni yaklaşımın ürünlerde ağır metal birikimini kontrol etmek için kullanılabileceğini göstermiştir (Li vd., 2007).

Valdés-López vd. (2010), agronomik açıdan önemli bir baklagil olan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) içindeki miRNA’ları araştırmayı amaçladıkları çalışmada daha önce bildirilmiş ağır metal stresine duyarlı miRNA’ların saptanmasına ek olarak, manganez toksisitesi için yeni strese duyarlı miRNA’lar keşfetmiştir (Valdés-López vd., 2010).

Çelik ve Akdaş (2019) yaptıkları bir çalışmada üç farklı nikel stres konsantrasyonuna maruz bırakılan *Ricinus communis* L.’nin hem yaprak hem de kök dokularındaki yedi farklı miRNA transkript seviyelerini ve hedef genlerin ekspresyon seviyelerini qRT-PCR yöntemi ile çalışmıştır. Sonuçlar, miRNA’ların ve bunların her iki dokudaki varsayılan hedeflerinin farklı düzenlendiğini göstermiştir. Elde edilen verilerde, miR838’in Ni²⁺ stresine en duyarlı olduğu, miR398 hedef geninin hem kök hem de yaprak dokularında yukarı regüle olduğu bulunmuştur. Yaprak dokusunda miR395 seviyesi ve varsayılan hedef genleri, sülfat taşıyıcısı ve sülfat adenil transferaz genindeki değişiklikler ilişkiliyken, sadece sülfat taşıyıcısının ekspresyon seviyesi kök dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çelik ve Akdaş, 2019).

Remans vd. 2012’de yaptıkları çalışmada Zn’ya duyarlı miRNA’ları tanımlamak için çalışmışlardır. Bunun için *Arabidopsis thaliana* bitkilerini 0, 100, 250 veya 500 M ZnSO₄’e 24 saat maruz bırakmış ve oksidatif strese bağlı gen ekspresyonu, enzim aktiviteleri ve metabolitlerindeki değişiklikleri belirlemiştir. Hem köklerde hem de yapraklarda biriken Zn, artan H₂O₂ seviyelerinden ve değişen glutatyon durumundan artan fitoşelatin üretimi nedeniyle magnezyum alımı etkilenmiş ve glutatyon seviyeleri azalmıştır. Ayrıca, miR398’in farklı lokuslarında Zn, miR398a hedef geninin (CSD1 ve CSD2) ekspresyonu azaltmış,

ancak miR398b ve miR398c transkripsiyonunu arttırmıştır. Çalışma sonucunda miR398'in hedef geni CSD1 ve CSD2 mRNA'yı aşağı regüle ettiği bildirilmiştir (Remans vd., 2012).

Solanum nigrum, yüksek Zn / Cd toleransı olan tipik bir Zn / Cd biriktirici bitkidir. Bu özelliğinden dolayı (Xie vd., 2017), *S. nigrum*'da daha önce hiç çalışılmadığı için Zn duyarlı miRNA'ları tanımlamayı amaçlamıştır. Bunun için, *S. nigrum* köklerine Zn uygulanmış ve Zn'ye duyarlı miRNA'ları tanımlamak için RNA sekanslaması teknolojisi kullanılmıştır. Zn toksisitesine yanıt olarak *S. nigrum* köklerinde 176 farklı eksprese miRNA tanımlanmıştır. Bu sonuçlar, bu miRNA'ların *S. nigrum*'un Zn toksisite toleransında anahtar rol oynayabileceğini göstermiştir (Xie vd., 2017).

Artan sayıda mikroRNA'nın, çeşitli metal streslerine karşı bitki tepkilerinde önemli düzenleyici rol oynadığı gösterilse de özellikle kadmiyum (Cd) stresine cevap veren miRNA'lar hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Qiu vd., 2016'da miRNA'ların Cd stresine yanıtlardaki rolünü araştırmak için, buğday fidelerini 6, 12ve 24 saat boyunca 250 mM Cd çözeltisine tabi tutmuşlar ve morfolojik ve fizyolojik değişikliklerin yanı sıra 5 miRNA'nın ekspresyonu ve karşılık gelen hedeflerinin analizini yapmışlardır. Sonuçlar, miRNA'ların ve hedeflerinin, Cd stresine maruz kalan buğday fidelerinin yapraklarında ve köklerinde farklı şekilde ifade edildiğini göstermiştir. Ayrıca miR398, hedef genini Cd stresine katılacak şekilde düzenleyerek oksidatif stres toleransına dahil olabileceği düşünülmüştür. İncelenen 10 miRNA-hedef çifti arasında, 9 çift Cd stresine maruz kalan buğday fidelerinin yapraklarında ve köklerinde karmaşık düzenleme ilişkisi göstermiştir. Bu bulgular, miRNA'ların buğdaydaki Cd stres sinyali cevabında yer aldığını düşündürmektedir. Bu çalışma miRNA'ların ve ilişkili hedeflerin Cd maruziyetine verilen yanıtların karakterizasyonu ve bitkilerdeki ağır metal toleransının moleküler mekanizmasını anlamak için bir şablon sağlamaktadır (Qiu vd., 2016).

Huang vd. (2009) ağır metal stresine duyarlı miRNA'ları tanımlamak için, toksik kadmiyum seviyelerine maruz kalan pirinç fidelerinden küçük RNA kütüphanesi oluşturmuştur. Kütüphanenin sıralanması ve ardından yapılan analizler, 6 aileyi temsil eden 19 yeni miRNA'yı ortaya çıkarmıştır. Bu yeni miRNA'lar ne Arabidopsis'te ne de başka herhangi bir türde dizi benzerliği göstermemiştir. Yeni pirinç miRNA'larının çoğu, metal maruziyetine tepki olarak yukarı veya aşağı yönde düzenlenmiştir. Çalışma sonucunda 34

miRNA hedefi tahmin edilmiş ve miRNA'ların tahmin edilen bazı hedefleri, ağır metal kaynaklı streslere verilen yanıtın düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. (Huang vd., 2009).

He ve ark.2016'da Cd duyarlı ve toleranslı iki zıt tütün genotipi (Guiyan 1 ve Yunyan 2) kullanarak miRNA'ları tanımlamak için yeni nesil dizileme teknolojisi kullanmışlardır. Kontrol ve Cd ile muamele edilmiş bitkilerdeki miRNA ekspresyon profillerinin kapsamlı analizi ile iki genotipte bilinen 72 (27 aile) ve 14 yeni miRNA tanımlamışlardır. Bunlar arasında, bilinen 28 miRNA (14 aile) ve 5 yeni miRNA, esas olarak hücre büyümesi, iyon homeostazı, stres savunma, antioksidan ve hormon sinyalizasyonunda rol oynayan Cd toleransı ile ilişkili miRNA'lar olarak kabul edilmiştir. Bulgulardan yola çıkarak çalışmada tespit edilen bazı miRNA'ların, hedef genlerinin ve yolaklarının Cd toleransında kritik roller oynayabileceğini ifade etmişlerdir (He vd., 2016).

Solanum torvum yüksek Cd toleransı olan akümülatör bir bitkidir. Kang vd. (2017), *Solanum torvum* bitkisi köklerine Cd uyguladıktan sonra bitkide yeni nesil dizileme ile 45 miRNA familyası ve bu aileler içinde 165 miRNA tespit etmiştir. Bu miRNA'lar arasında, 21 miRNA familyasından eksprese edilen miRNA aileleri arasında, köklerde 6 miRNA ailesi yukarı regüle edilmiş ve 15 miRNA ailesi aşağı regüle edilmiştir. Bu sonuçlar, spesifik miRNA'ların *S. torvum* köklerinde Cd toksisitesi ile düzenlendiğini, bu da *S. torvum*'un Cd toleransında anahtar rol oynayabileceğini göstermiştir (Kang, vd., 2017).

Ding vd. (2018), pirinçte Cd birikimi ve toleransında miR166'nın rolünü analiz etmişlerdir. miR166'nın ekspresyon seviyelerinin hem kök hem de yaprak dokularında, fide halinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Pirinç fidelerinin köklerindeki miR166'nın ekspresyonu, Cd işleminden sonra azalmıştır. Ancak pirinçte miR166 aşırı ekspres edildiğinde ise bitkide Cd toleransı geliştiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca, miR166'nın aşırı ekspresyonu hem köklerden fidelere Cd taşınmasını hem de tahıllarda Cd birikimini azaltmıştır. miR166, bitkilerde HD-Zip ailesi proteinlerini kodlayan genleri hedefler. Pirinçte, HD-Zip proteinini kodlayan HOMEODOMAIN CONTAINING PROTEIN4 (OsHB4) geni (Os03g43930), Cd uygulaması ile yukarı regüle edilmiş, ancak transgenik pirinç bitkilerinde miR166'nın aşırı ekspresyonu ile aşağı regüle edildiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar pirinçte miR166'nın hedef geni OsHB4'ün düzenlenmesi

yoluyla Cd birikiminde ve toleransında kritik bir rol oynadığını göstermiştir (Ding vd., 2018).

Gao vd., (2019) Cd stresine yanıt olarak miRNA'ların rolünü araştırmak için, mısır soyları B73 ve Mo17'nin fidelerinin köklerini toplamış ve farklı sürelerde 200 mg / L CdCl₂2.5 H₂O uygulamışlardır. Süperoksit dismutaz ve peroksidazın enzim aktiviteleri ölçülmüş ve 6 aday miRNA'nın ekspresyonu ve hedefleri, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) teknolojisi kullanılarak doğrulanmıştır. Ek olarak, Zma-miR171b'nin ekspresyonu, in situ hibridizasyon kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, miRNA'ların ve bunların ilgili hedef genlerinin, Cd stresine maruz kalan mısır fide köklerinde farklı şekilde ifade edildiği gösterilmiştir. Bu araştırma, bitkilerde Cd stresine yanıt veren miRNA'ların moleküler mekanizmasına yeni bakış açıları getirmiş ve ağır metal streslerine maruz kalan bitkilerdeki miRNA çalışmalarına ışık tutmuştur (Gao vd., 2019).

L. minör ağır metal stres çalışmalarında oldukça tercih edilen bir bitki türü olmasına rağmen, yapılan literatür araştırmalarında bu bitkide kadmiyum ve miRNA ilişkisi ile ilgili yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın amacı kadmiyum stresi altındaki *Lemna minör*'de ağır metalle ilişkilendirilen 5 farklı miRNA ve bunların hedef genlerinin ekspresyon seviyelerinin incelenmesidir.

3. MATERYAL VE METOD

Tez kapsamında Eskişehir Teknik Üniversitesi Bitki Fizyolojisi Laboratuvarı'nda kültür şartlarında büyütülmüş olan *Lemna minör* aquatik bitkisi kadmiyuma maruz bırakılarak ağır metal ilişkili olduğu düşünülen (miR156, miR159, miR171, miR395 ve miR396) ve bunların hedef genlerinin (SPL, MYB, GRAS, SULTR ve GRF) gen ifade seviyeleri farklı saat aralıklarında karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

3.1.Bitki Materyali, Büyüme Koşulları ve Stres Uygulaması

Piyasadan temin edilen 2000 adet *Lemna minör* 5 lt. lik plastik kaplarda %50 Hoagland solüsyonu içerisinde, iklim kabininde (Sanyo) 26°C'de 18 saat aydınlık 6 saat karanlık periyotta kültüre alınarak çoğaltılmıştır. Kullanılan kabın yüzeyi, bölünerek çoğalan *L. minör* tarafından kaplandığında yeni kaplara alt kültür yapılarak bitki yoğunluğu arttırılmıştır. Bitkilerin 10 günde bir besin çözeltisi yenilenmiştir. İlk olarak test kimyasalımız olan CdCl₂'ün toksik dozunu belirlemek amacıyla yaklaşık 0.2 g tartılan *L. minör* örnekleri 5, 10, 15, 25, 35, 50, 60, 75 ve 100 µM CdCl₂/ %50 Hoagland solüsyonu içeren beherlere alınıp 3 gün boyunca yukarıda belirtilen şartlarda inkübe edilmiştir. Her gün iki kez düzenli olarak kontrolü yapılan bitkilerde klorozisin en belirgin olarak 100 µM konsantrasyonda görülmesi ama bunun yanında hala yaşayan bitkilerin bulunmasından dolayı deneye bu doz kullanılarak devam edilmiştir.

Kültüre alınan *L. minör* örnekleri 1'er g tartılarak 100 µM CdCl₂ / %50 Hoagland solüsyonu içeren 1 lt'lik beherlere aktarılmış ve 6, 12 ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak %50 Hoagland solüsyonu içinde büyütülen bitkiler kullanılmıştır. Çalışma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. miRNA'ların ve mRNA'ların Dizilerinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı

Bu çalışmada daha önce buğday, Arabidopsis gibi bitkilerde ağır metalle ilişkili olduğu bildirilmiş miRNA'lar arasından bitkilerde korunmuş ve stres cevabında çalışılan; miR156, miR159, miR171, miR395 ve miR396 miRNAları kullanılmıştır (Tablo 3.1). miRNA dizi bilgileri “www.mirbase.org” internet sitesinden elde edilmiştir. Buradan elde edilen miRNA dizileri için tasarlanan stem-loop cDNA primerleri ve qRT-PCR sırasında kullanılan geri ve ileri primerler de aynı web sitesinden mature dizileri alınarak dizayn edilmiştir.

Çalışmada kullanılan miRNAlara ait hedef genlerin tahmini için bazı biyoinformatik web sitelerinden yararlanılmıştır. Bu siteler sırasıyla,

PsRNA Target ([http:// plantgrn. Noble.org/psRNAtarget/](http://plantgrn.noble.org/psRNAtarget/),

TAPİR (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/tapir/>),

miRTour (<https://mirnablog.com/mirtour-plantmirna-and-target-prediction-tool/>; Zhang ve Wang, 2015),

Aynı zamanda elde edilen hedef gen primerlerinin de doğru bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığı NCBI Primer Blast üzerinden kontrol edilmiştir. Kullandığımız miRNAlara ait hedef genler ve bu genlere ait primer bilgileri Tablo 3.1 ve 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan miRNA 'lar ve Hedef Genleri

miRNA Adı	Primer	Hedef gen
miR159	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTG	MYB transkripsiyon faktörleri
miR156	TGACAGAAGAGAGTGAGCACA	Squamosa promotör bağlanma benzeri protein
miR171	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	Scarecrow benzeri proteinler
miR396	TTCCACAGCTTTCTTGAAGT	Büyümeyi Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü (GRF)
miR395	TGAAGTGTGGGGGAAGT	ATP sülfirilaz

Tablo 3.2. mRNA'ların Hedef Genleri ve Hedef Gene Ait İleri ve Geri Primer Dizi Bilgileri

mRNA Adı	Primer	Hedef gen
MYB-F	CACCATTGTTGGGGGTACACTT	MYB transkripsiyon faktörleri
MYB-R	TCACTGACGGAGTTGCTGTC	MYB transkripsiyon faktörleri
SPL-F	CCTAAAGTCGTTGTGAGTGGCGT	Squamosa promotör bağlanma benzeri protein
SPL-R	ACTCAGAGAGACAGTGGAACCTGC	Squamosa promotör bağlanma benzeri protein
GRAS-F	TTTCACTGCAAACGCCAACACGAT	Scarecrow benzeri proteinler
GRAS-R	TGCTGAGCGAGAGGCGATGAATCA	Scarecrow benzeri proteinler
GRF-F	CTCTCTCTTCTTTGTGATCACTCT	Büyümeyi Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü (GRF)
GRF-R	GGTAACACCCCCATCCAAGG	Büyümeyi Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü (GRF)
SULTR-F	GCTTTGCCAATGCCAGTTCA	ATP sülfirilaz
SULTR-R	TCGAGTTACAAACACACCCA	ATP sülfirilaz

Çalışmada miRNA ekspresyon analizleri iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada cDNA sentezi (RT-PCR) yapılmıştır. Bu aşamada stem-loop cDNA sentez primerleri kullanılmış, miRNA uzunlukları ters transkripsiyon ile uzatılmıştır. İkinci aşamada ise uzunluğu arttırılmış olan cDNA'lar geri ve ileri primerler kullanılarak qRT-PCR'da kantitatif olarak analiz edilmişlerdir.

Hedef gen ekspresyon analizleri de iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada cDNA sentezi için miRNA'dan farklı olarak random hexamer primeri ile mRNA uzunlukları ters transkripsiyon ile uzatılmıştır. İkinci aşamada ise uzunluğu arttırılmış cDNA'lar geri ve ileri primerler kullanılarak qRT-PCR'da kantitatif olarak analiz edilmişlerdir.

3.3. miRNA ve mRNA İzolasyonu

100µM CdCl₂'e 0, 6, 12, 24 saat süreyle maruz bırakılan *Lemna minör* örnekleri porselen havanlara alınarak sıvı azotta öğütülmüştür. Öğütülen örneklerden hızlıca 50 mg tartılarak buz üzerinde etiketlenmiş olan ependorflara aktarılmıştır. Kalan bitki örnekleri daha sonra kullanılması ihtimaline karşılık -80 °C derin dondurucuya kaldırılmıştır. miRNA ve total RNA izolasyonu Hybrid-R miRNA izolasyon kiti (Geneall, 325-150) ile izolasyon kitinin çalışma protokolüne bağlı kalınarak yapılmıştır. miRNA izolasyon kitinin çalışma protokolü aşağıda verilmiştir. Kit prosedürüne göre 7. adımına kadar mRNA ve miRNA izolasyon işlem basamakları ortaktır.

1. 50 mg bitki dokusu üzerine 500 µL RiboEx eklenerek pipetaj yapılmış ve karışması sağlanmıştır.
2. Elde edilen karışım 5 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir.
3. Ardından karışım üzerine 100 µl kloroform eklenerek karıştırılmış ve 2 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir.
4. Tüpler 12.000g'de, 15 dk., 4°C'de santrifüj yapılmış ve santrifüj sonunda süpernatant başka bir tüpe aktarılmıştır. (DNA ve protein ara fazda ve alt kısımdaki organik fazda kalırken, total RNA üst sulu fazda bulunur).
5. Alınan sulu faz kadar üzerine %50 etanol eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
6. Elde edilen karışım Tip B kolona aktarılmıştır. (Burada total mRNA membrana bağlanırken, küçük RNAlar kolondan aşağı doğru iner.)
7. Örnekler 11.000rpm, 1 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir. Bu aşamada total mRNA kolona bağlanmış ve küçük RNA'lar süpernatant şeklinde toplama tüpünde birikmiştir. Bu aşamadan sonra mRNA izolasyonu ve miRNA izolasyonu için farklı işlemler uygulanmıştır.

mRNA izolasyonu için;

- a. Tip B kolon yeni toplama tüpüne konularak kolon üzerine 500 µL SW1 Buffer eklenmiştir.

- b. Örnekler 11.000rpm, 1 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.
- c. Toplama tüp yenisi ile değiştirilerek kolonun üzerine 500µL RNW Buffer eklenmiştir.
- d. Örnekler 11.000rpm, 1 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.
- e. Toplama tüpü yenisi ile değiştirilerek Tip B kolonu üzerine tekrar 500µL RNW Buffer eklenmiştir.
- f. Örnekler 11.000rpm, 1 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.
- g. Toplama tüpü yenisi ile değiştirilerek üzerine bir şey eklenmeden 11.000rpm, 2 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.
- h. Daha sonra kolondaki membranın tam merkezine gelecek şekilde 50 µL RNase-free su eklenip 2dk. oda sıcaklığında bekletilmiş ve 11.000 rpm hızda 2 dak. santrifüj edildikten sonra mRNA örnekleri -80°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

miRNA izolasyonu için;

- 8. İzolasyonun 7. aşamasında santrifüj sonrası toplama tüpünde kalan sıvının üzerine 1:1 oranda %100 etanol eklenerek pipetaj yapılmıştır.
- 9. Daha sonra karışım en fazla 650 µL hacimde Tip W kolona aktarılmıştır. Bu kolon küçük RNA ların bağlanmasını sağlamıştır.
- 10. Örnekler 11.000rpm, 1 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.
- 11. Geriye kalan örnek olması durumunda 9-10. işlemler tekrarlanmıştır.
- 12. Toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiş ve üzerine 500 µL RBW Buffer eklenerek. 11.000rpm, 1 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.
- 13. Toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiş ve kolonun üzerine bu kez 500µL RNW Buffer eklenmiştir. Örnekler 11.000rpm, 1 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.

14. Toplama tüpü yenisi ile değiştirilerek üzerine tekrar 500µL RNW Buffer eklenmiş ve örnekler 11.000rpm, 1 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.

15. Toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiş ve üzerine bir şey eklenmeden 11.000rpm, 2 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.

19. Daha sonra kolondaki membranın tam merkezine gelecek şekilde 50 µL RNase-free su eklenmiş ve 2dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.

20. Örnekler 11.000rpm, 2 dk., oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.

21. Elde edilen miRNA örnekleri -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.3. RNA İzolasyonu Nicel Ölçümleri

RNA örneklerinin nicel ölçümleri için Qubit fluorometre (invitrogen qubit 3.0) cihazı kullanılmıştır. RNA Hs kit (Q32852-invitrogen) kullanılarak RNA miktarları belirlenmiştir.

1. Standartlar (RNA assay için 2 tane) ve her ölçülecek örnek için 1 adet 0.5 ml’lik tüp etiketlenmiştir.
2. Qubit materyal 1-200 Qubit bufferda seyreltilerek Qubit çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Her standart ve örnek için 200 µL çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
3. Analiz tüpleri Tablo 3.3’ de verildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. *Qubit assay çalışma protokolü*

	Standart	Kullanıcı Örneği
	Analiz Tüpleri	Analiz Tüpleri
Eklenecek Çalışma solüsyonu hacmi (2. adımdan)	190 µL	180–199 µL
Eklenecek Standart hacmi (kitten)	10 µL	—
Eklenecek Kullanıcı Örneği	—	1–20 µL
Her Analiz Tüpündeki Toplam Hacim	200 µL	200

4. Tüpler oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
5. Tüpler Qubit 3.0 Fluorometer'e yerleştirilip okumaları alınmıştır.

3.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi miRNA'lar ve mRNA'lar için iki ayrı protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. miRNA-cDNA sentezi

Toplam 15 miRNA örneğimizden cDNA sentezi için A.B.T.TM miR cDNA Synthesis Kit. C04-01-05 kullanılmıştır ve sentez kitin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Stem-loop primerler miRNA'dan cDNA sentezi yaparken miRNA dizisi ile spesifik bağlandığı için oldukça güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir. cDNA sentezi için gereken reaksiyon bileşenleri Tablo 3.4' de verilmiştir.

Tablo 3.4. *miRNA-cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri*

miRNA-cDNA Sentezi İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	
MasterMix Bileşenleri	Hacim
10X Reaksiyon tamponu	2 µl
Stem-loop primer (miRNA spesifik)	2 µl
20X dNTP mix	1 µl
Reverse transkriptaz	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase free su	3.5 µl
miRNA örneği	10 µl
TOPLAM	20 µl

Çalışılan her bir örnek ve her bir miRNA için yukarıdaki miktarlar kullanılarak bir mastermix hazırlandıktan sonra ters transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. miRNA-cDNA sentezi için kullanılan ters transkripsiyon reaksiyonunun koşulları Tablo 3.5’ de belirtilmiştir.

Tablo 3.5. miRNA-cDNA Sentezi Reaksiyonu Koşulları

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk.	20 dk.	5 dk.	-

Elde edilen miRNA-cDNA örnekleri Real-Time PCR aşamasına kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4.2. mRNA-cDNA Sentezi

Toplamda 15 mRNA örneğimizden cDNA sentezi için WizScript cDNA Synthesis Kit High capacity (W2211 Wizbio) kullanılmıştır ve sentez kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için gereken reaksiyon bileşenleri Tablo 3.6’de verilmiştir.

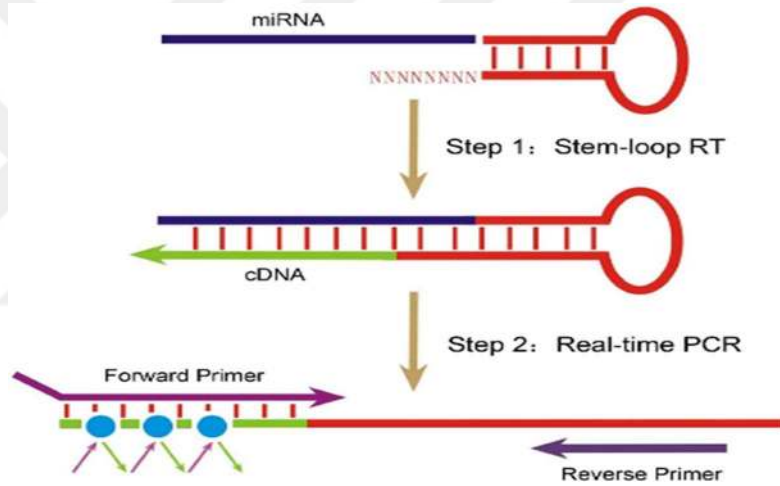
Tablo 3.6. mRNA-cDNA Sentezi İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri

MasterMix Bileşenleri	Hacim
10X Reaksiyon tamponu	2 µl
Hexamer	2 µl
20X dNTP mix	1 µl
Reverse transkriptaz	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase free su	3.5 µl
mRNA örneği	10 µl
TOPLAM	20 µl

mRNA-cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra ters transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. mRNA-cDNA sentezi için kullanılan ters transkripsiyon reaksiyonunun koşulları Tablo 3.7’ de belirtilmiştir.

Tablo 3.7. *mRNA-cDNA Sentezi Reaksiyonu Koşulları*

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk.	120 dk.	5 dk.	-



Şekil 3.1. *cDNA yapım aşamaları (Kramer, 2011)*

3.5. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR)

Tez kapsamında ağır metal stresi ile ilişkili miRNA’ların ve bu miRNA’ların hedef genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR analizi ile çalışılmıştır. qRT-PCR analizleri Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazı ile yapılmıştır. qRT-PCR için gereken reaksiyon bileşenleri Tablo 3.8’ de verilmiştir. Real-Time qPCR için A.B.T.™ 2X miRqGreen MasterMix (with ROX) (Q04-02-01) kullanılmıştır.

Tablo 3.8. *Real-Time qPCR İçin Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri*

Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	
MasterMix Bileşenleri	Hacim
A.B.T.TM 2X miRqGreen MasterMix (with ROX)	10 µl
ROX Dye (20X)	1 µl
miRNA Spesifik İleri Primer (5 µM)*	1 µl
miRNA Universal Geri Primer (5 µM)*	1 µl
miRNA-cDNA Kalıbı	2 µl
RNase-Free Distile Su	5 µl
TOPLAM	20 µl

* ile verilen primerler miRNA spesifik primerlerdir. Hedef genler için yapılan qRT analiz koşulları da tablo 3.8 deki gibi olup kullanılan primerlerin farklıdır. Hedef gen içinde elde edilen mRNA-cDNA kalıbına hedef genlere özgü ileri ve geri primerler kullanılarak yapılır. Hem miRNA hem de mRNA örnekleri için Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. Real-Time qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 3.9’da belirtilmiştir.

Tablo 3.9. *Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları*

PCR Step	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç Denaturasyonu	95	300 sn.	1
Denaturasyon	95	10 - 30 sn.	25 – 40
Bağlanma	55 – 68	10-60 sn.	
Erime Eğrisi	65 – 95	2-5sn./step	1

Erime eğrisi analizi PCR amplifikasyonunun özgünlüğünü ispatlamak amacıyla yapılmıştır. Primerin nonspesifik olarak bağlanma yapıp yapmadığı bu yöntemle kontrol edilmiş olur.

3.6. qRT-PCR Analiz Metodu ve İstatistik

Daha önceki çalışmalarda miR161 kontrol grubu olarak gösterilmiştir. Bu gen atasal olarak korunmuş bir bölgeyi temsil ettiği için referans gen olarak tercih edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda miRNA ekspresyonları kantitasyonu miR161 referans gen olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. mRNA ekspresyonları kantitasyonu RLI referans olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplamasında “ $\Delta\Delta C_t$ Yöntemi” kullanılmıştır. $\Delta\Delta C_t$ hesaplaması aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hem hedef grupta hem de referans grupta her bir örneğin hem hedef miRNA hem de referans RNA için Real-Time PCR sonucunda C_t değerleri elde edilmiştir.

2. Hedef grupta hedef miRNA C_t değerinden referans RNA C_t değeri çıkarılarak hedef grup ΔC_t değerleri elde edilmiştir.

3. Referans grupta hedef miRNA C_t değerinden referans RNA C_t değeri çıkarılarak referans grup ΔC_t değerleri elde edilmiştir.

4. Hedef grup ΔC_t değerlerinden referans grup ΔC_t değerleri çıkarılarak da $\Delta\Delta C_t$ değerleri elde edilmiştir.

5. $\Delta\Delta C_t$ değerleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ şeklinde işleme alınarak kat değişimi (Fold Change) hesaplanması yapılmıştır.

6. Fold Change değeri 1’in üzerinde çıkması durumunda hedef grubu miRNA ekspresyonunun referans grubun miRNA ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Fold Change değeri 1’in altında çıkması durumunda ise hedef

grubu miRNA ekspresyonunun referans grubun miRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlanır.

Hesaplama sonrası elde edilen kat artışı (fold change) değerleriyle istatistik analizi yapılmıştır. Bunun için Medcalc (19.2.1) analiz programı kullanılmış ve verilerin istatistiği Anova metoduna göre yapılmıştır. İstatistik sonucunda elde edilen p değerlerinden verilerin birbirleriyle ve kendi aralarında anlamlı olduğu korelasyon tablolarıyla gösterilmiştir.

İstatistik verilerini hesaplarken kullanılan programa çalıştığımız 15 örneğe ait hesaplanan fold change değerleri ve saat aralıkları girilmiştir. 3 biyolojik tekrar için elde edilen fc değerleri girilir ve istatistik-anova-one way analysis-tukey-kramer kısmı seçilip analiz yaptırılmıştır. Gelen analiz sonucundan aynı zamanda bar grafikleri de alınarak rapora eklenmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olduğundan standart sapma değerleri bar grafikleri üzerinde gösterilmiştir.

3.7. *Lemna minör* Örneklerinde Ağır Metal Miktarının Belirlenmesi

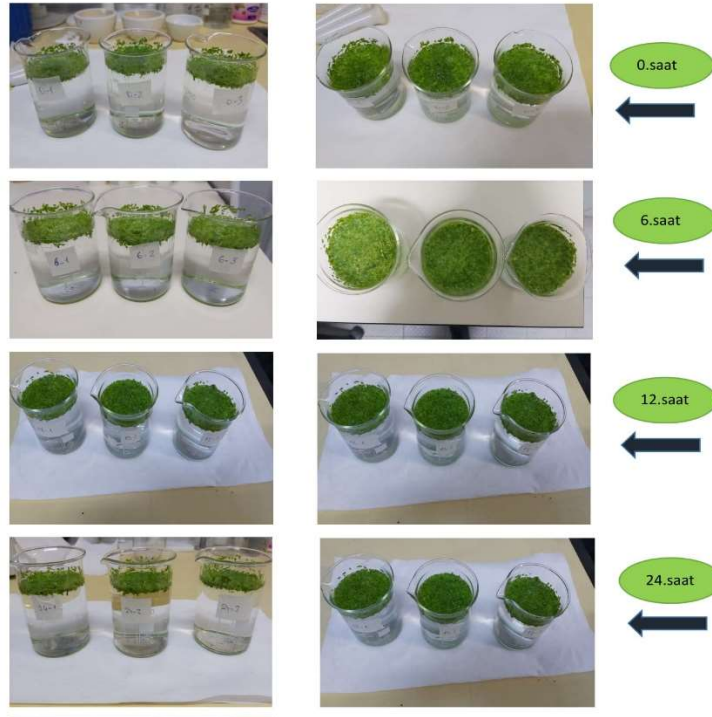
Kontrol ve kadmiyum stresine maruz bırakılan *L. minör* örnekleri önce 10mM EDTA solüsyonu içinde 3 kez 5'er dak. bekletilerek kök ve yaprak yüzeyine dışarıdan tutunan metal iyonlarından arındırılmıştır. EDTA muamelesinin ardından örnekler 3 kez distile su yıkanıp kurutma kağıtları üzerine alınmıştır. Örnekler oda ısısında yaklaşık 48 saat bekletilerek hava kurusu yapılmıştır. Sonrasında spatülle kazınarak toplanmış ve tartımı yapılarak ependorf tüplere aktarılmıştır.

Ağır metal tayini için yaş yakma yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, yaklaşık 0.15g kurutulmuş *L. minor* örnekleri 10 ml %68 nitrik asit ile karıştırılarak 200°C'de 10 dakika mikrowave yaş yakma ünitesinde (CEM MARS 6 240/50, Matthews, NC, USA) yakmaya tabi tutulmuştur. Bu örneklerdeki Cd miktarları Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Toprak ve Ekoloji Laboratuvarından hizmet alımı yoluyla ICP OES spektrofotometresinde, Cd standartı (1, 5, 10, 25, 50 ppm) ile karşılaştırılarak (Inductively Couple Plasma spectrophotometer) (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP/OES, Shelton, CT 06484-4794, USA) belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Lemna minor* ve Kadmiyum Uygulaması

%50 Hoagland solüsyonu içinde büyütülen *L. minor* örnekleri 100 μ M kadmiyum içeren %50 Hoagland solüsyonu içerisinde 6, 12 ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Deney grupları inkübasyon süresi sonunda fotoğraflanmıştır (Şekil 4.1). *L. minor* örneklerinin 24 saat Cd uygulaması sonrası renk kaybı yaşadığı hafif sararma gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Cd uygulaması sonrası *Lemna minor* örnekleri

4.2. RNA İzolasyonu

Kontrol grubu ve Cd uygulanan test grubuna ait örneklerden yaklaşık 50mg kullanılarak Geneall-Hybrid miRNA kiti ile mRNA ve miRNA izolasyonu yapılmıştır. mRNA

örneklerinin miktar tayini fluorometrik yolla belirlenmiştir. Qubit 3.0 cihazı ile elde edilen ölçüm sonuçları aşağıdaki gibidir. miRNA'lar yapısal olarak çok küçük olduklarından miktar ölçümleri Qubit ve ya Nanodropla yapılamamıştır, ölçüm yapılabilmesi için özel kitlere ihtiyaç vardır. Ancak qRT-PCR aşamasında elde edilen miRNA cDNA'ları erime eğrisi pikleriyle doğrulanmıştır.

Tablo 4.1. mRNA ölçüm sonuçları

0.saat-1	150 ng/ ul
0.saat-2	178 ng/ ul
0.saat-3	164 ng/ ul
6.saat-1	120 ng/ ul
6.saat-2	136 ng/ ul
6.saat-3	198 ng/ ul
12.saat-1	63,6 ng/ ul
12.saat-2	70,8 ng/ ul
12.saat-3	108 ng/ ul
24.saat-1	160 ng/ ul
24.saat-2	196 ng/ ul
24.saat-3	154 ng/ ul

4.3. Kantitatif Real Time PCR Analizi (qRT-PCR)

Real-time PCR, reaksiyon esnasında her bir PCR siklüsünde yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonu aşama aşama sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir. Çift iplikli DNA'ya bağlandıklarında floresans ışımaya veren boyalar (SYBR) kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan 5 farklı miRNA (miR156, miR159, miR171, miR395 ve miR396) ve 5 farklı mRNA (SPL, MYB, GRAS, SULTR ve GRF) ile miRNA ve mRNA analizinde kontrol olarak kullanılan miR161 ve RLI'ya ait cDNA ürünleri revers transkriptaz

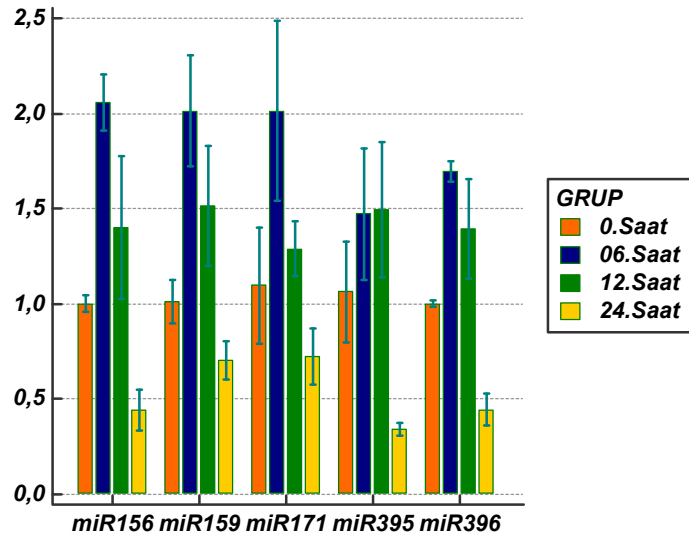
enzimi ile spesifik primerler kullanılarak uzatılmıştır. Bu aşamada mRNA tek iplikli kararsız bir molekül olduğundan daha kararlı bir yapı olan komplementer DNA'ya dönüştürülür. Bu aşamada elde edilen çift iplikli moleküle real time PCR aşaması sırasında SYBR green boyasının bağlanmasıyla eş zamanlı ışıma gösterilir. Aynı zamanda RNA kalitesi ile ilgili de bilgi sahibi olmamızı sağlar.

4.3.1 miRNA Gen İfadesi Analiz Sonuçları

Çalışmada elde edilen cT değerleri 3 biyolojik tekrar ve 2 teknik tekrar sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları hesaplanarak elde edilmiştir. Çalışma sonucunda tüm hesaplamalar yapılarak elde edilen Fc değerleri Tablo 4.2'de ve ilgili bar grafiği Şekil 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2: *miRNA FC Değerleri*

	miR156	miR159	miR171	miR395	miR396
0.saat	1,00 ± 0,07	1,01 ± 0,2	1,1 ± 0,53	1,06 ± 0,46	1,00 ± 0,03
06.saat	2,06 ± 0,25	2,01 ± 0,51	2,01 ± 0,82	1,47 ± 0,59	1,70 ± 0,1
12.saat	1,40 ± 0,65	1,52 ± 0,54	1,29 ± 0,25	1,49 ± 0,61	1,39 ± 0,45
24.saat	0,44 ± 0,19	0,70 ± 0,18	0,73 ± 0,25	0,34 ± 0,06	0,44 ± 0,15



Şekil 4.2. *miRNA FC Bar Grafiği*

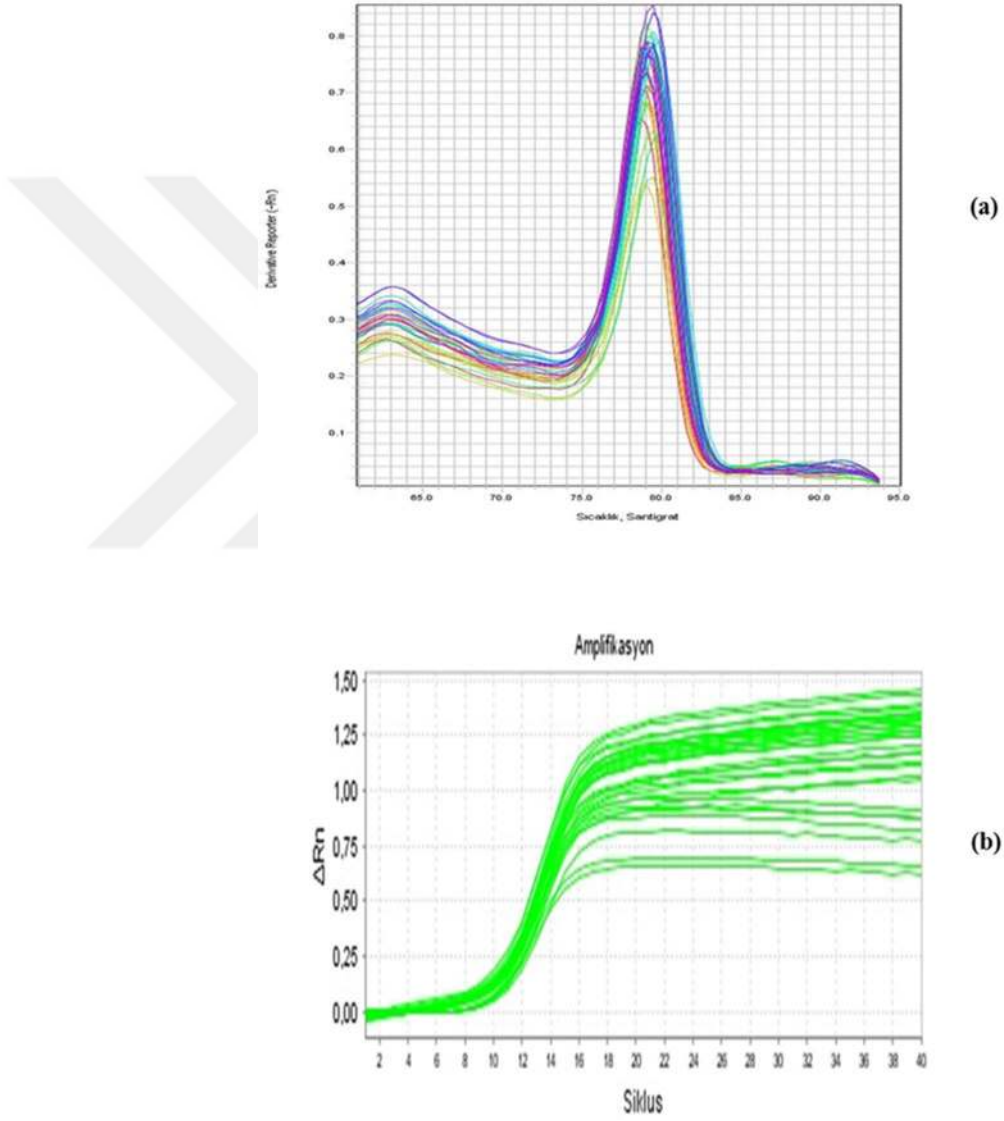
4.3.2. miRNA Gen İfadesi Analiz Grafikleri

Amplifikasyon sonrası erime eğrisi analizi, primer-dimerleri için gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarını kontrol etmenin ve reaksiyon özgüllüğünü sağlamanın basit bir yoludur. Nükleik asitlerin erime sıcaklığı, uzunluk, GC içeriği ve baz uyumsuzluklarının varlığından etkilendiğinden, diğer faktörlerin yanı sıra, farklı PCR ürünleri genellikle erime özelliklerinden ayırt edilebilir. Erime eğrisi analizi ile reaksiyon ürünlerinin (örneğin primer dimerler ve amplikonlar) karakterizasyonu, zaman alan jel elektroforez ihtiyacını azaltır.

5 miRNA'ya (miR156, miR159, miR171, miR395 ve miR396) ait gen ifadelerinin erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri aşağıda sıra ile verilmiştir. Her bir miRNA'da tek bir erime piki gözlenmiştir, miRNA'lara ait amplifikasyon eğrileri de beklendiği gibi bir artış sergilemiştir. PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış (cT - threshold cycle) reaksiyona konan kalıp (template) başlangıç miktarı ile orantılıdır. Bu sonuçlar bize qRT-PCR sonucunda ilgili primerlerin cDNA üzerinde doğru bölgelere bağlandıklarını ve istenilen ürünün oluştuğunu göstermektedir.

4.3.2.1. miR156 Analiz Sonucu

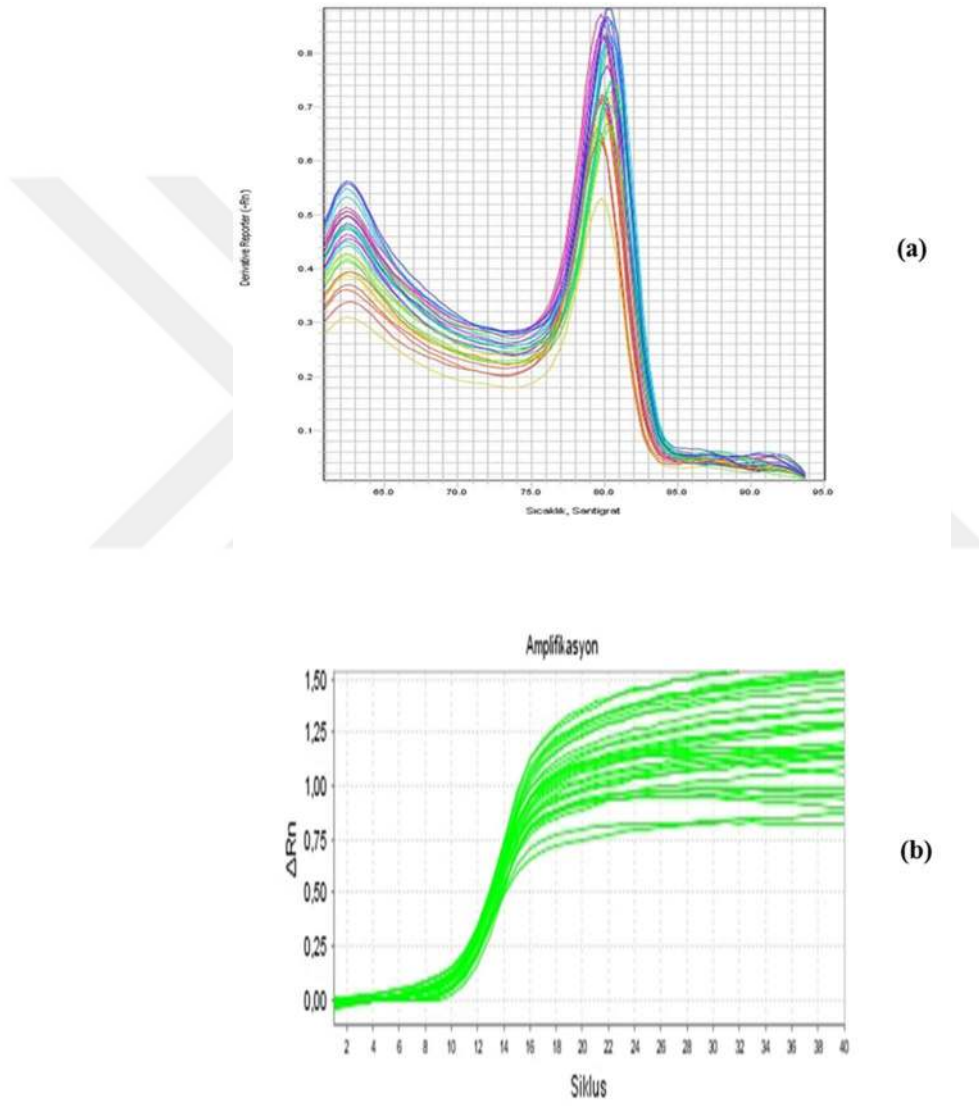
miR156'ya ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: miR156 Erime Piki (a) miR156 Amplifikasyon Eğrisi (b)

4.3.2.2. miR159 Analiz Sonucu

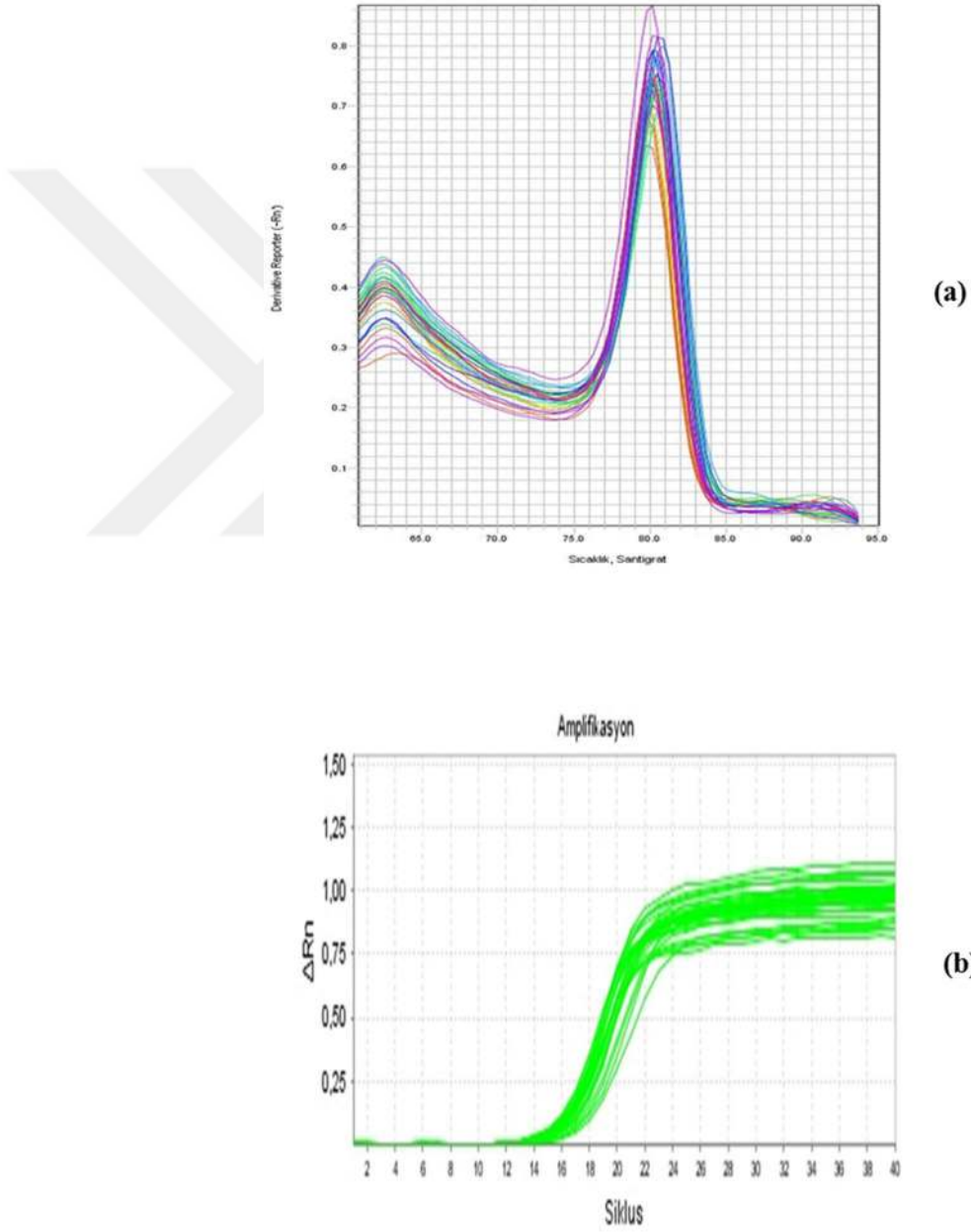
miR159'a ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4: miR159 Erime Piki (a) miR159 Amplifikasyon Eğrisi (b)

4.3.2.3. miR171 Analiz Sonucu

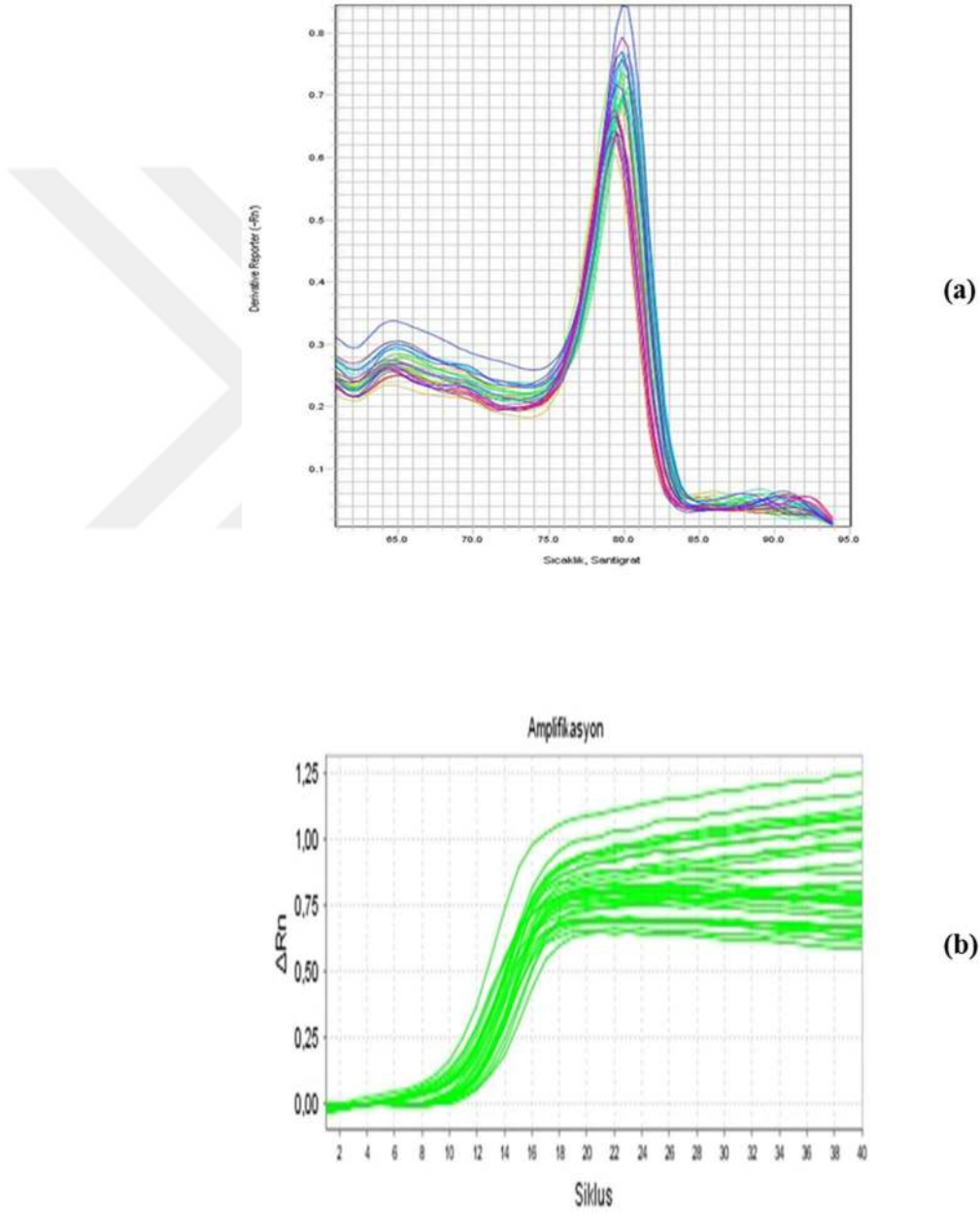
miR171'e ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5: miR171 Erime Piki (a) miR171 Amplifikasyon Eğrisi (b)

4.3.2.4. miR395 Analiz Sonucu

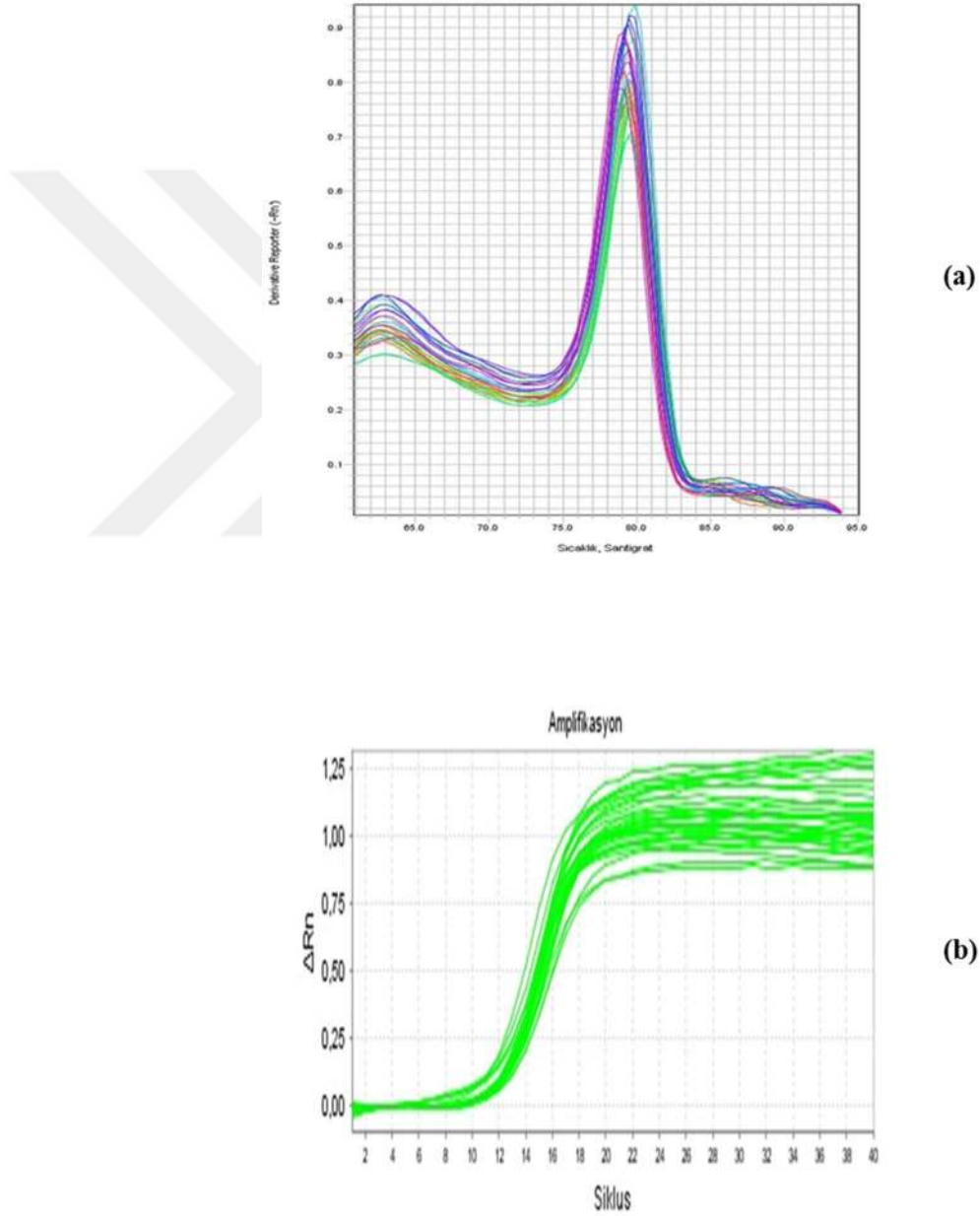
miR395'e ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6: miR395 Erime Piki (a) miR395 Amplifikasyon Eğrisi (b)

4.3.2.5. miR396 Analiz Sonucu

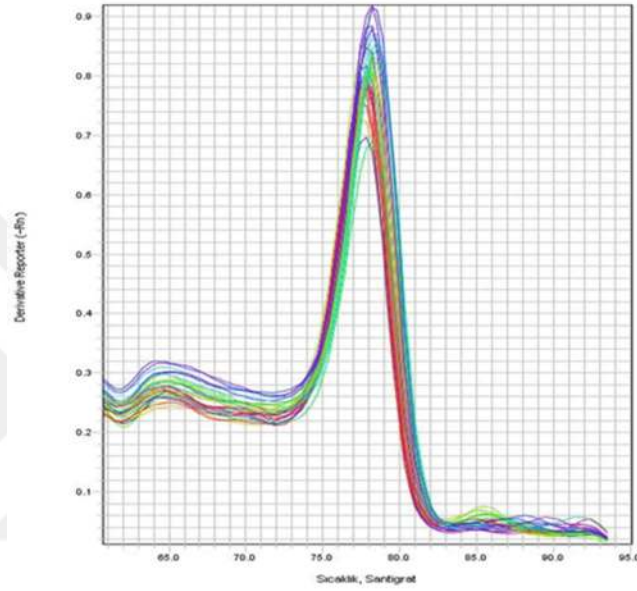
miR396'ya ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



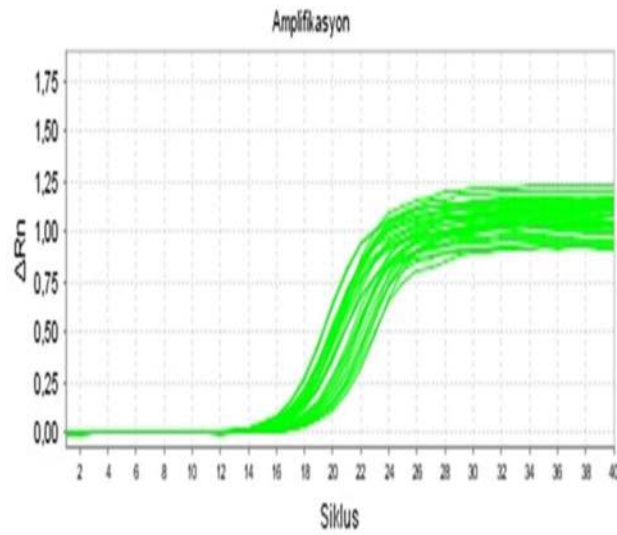
Şekil 4.7: miR396 Erime Piki (a) miR396 Amplifikasyon Eğrisi (b)

4.3.2.6. miR161 Analiz Sonucu

miR161'e ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



(a)



(b)

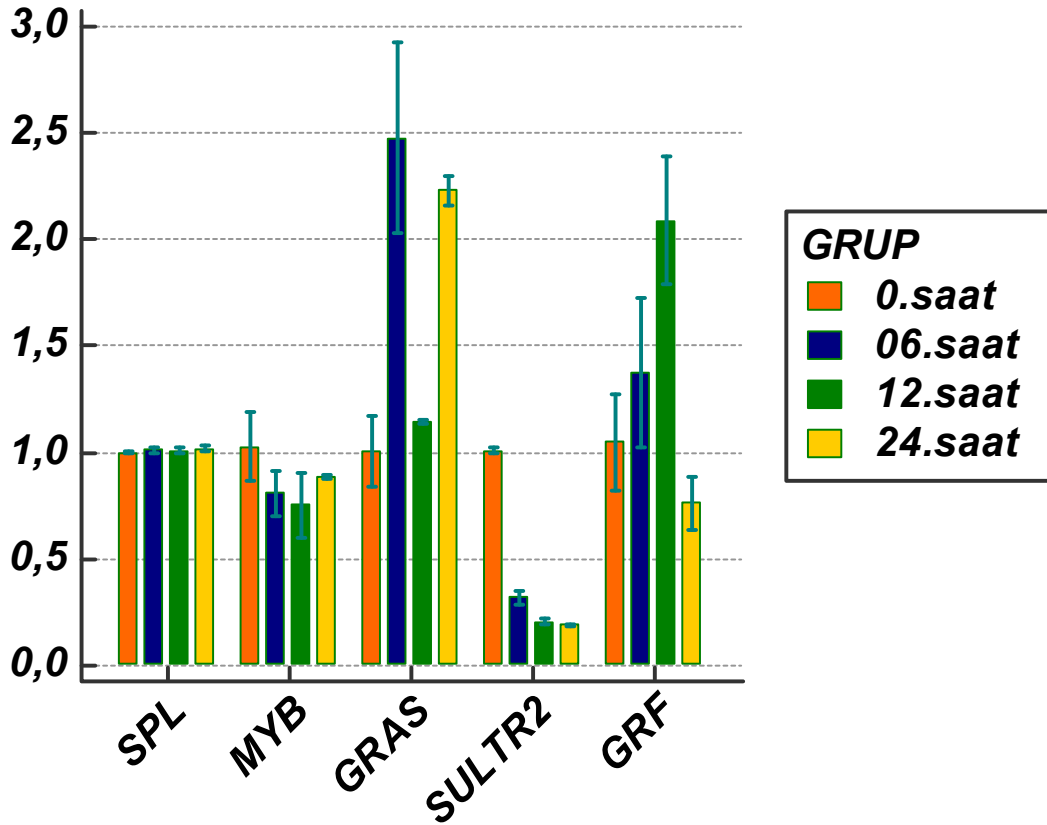
Şekil 4.8: miR161 Erime Piki (a) miR161 Amplifikasyon Eğrisi (b)

4.3.3. Hedef Genlerin Gen İfadesi Analiz Sonuçları

Çalışmada elde edilen cT değerleri 3 biyolojik tekrar ve 2 teknik tekrar sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları hesaplanarak elde edilmiştir. Çalışma sonucunda tüm hesaplamalar yapılarak elde edilen Fc değerleri Tablo 4.3’de ve ilgili bar grafiği Şekil 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.3.: mRNA FC Değerleri

	SPL	MYB	GRAS	SULTR	GRF
0.saat	1,00 ± 0,00	1,03 ± 0,28	1,09 ± 0,77	1,04 ± 0,37	1,05 ± 0,39
06.saat	1,01 ± 0,02	0,81 ± 0,19	4,73 ± 0,02	0,14 ± 0,06	2,31 ± 1,73
12.saat	1,01 ± 0,02	0,75 ± 0,26	1,35 ± 0,06	0,02 ± 0,02	1,52 ± 1,11
24.saat	1,02 ± 0,02	1,45 ± 0,99	3,41 ± 0,33	0,01 ± 0,01	0,76 ± 0,21



Şekil 4.9. mRNA FC Bar Grafiği

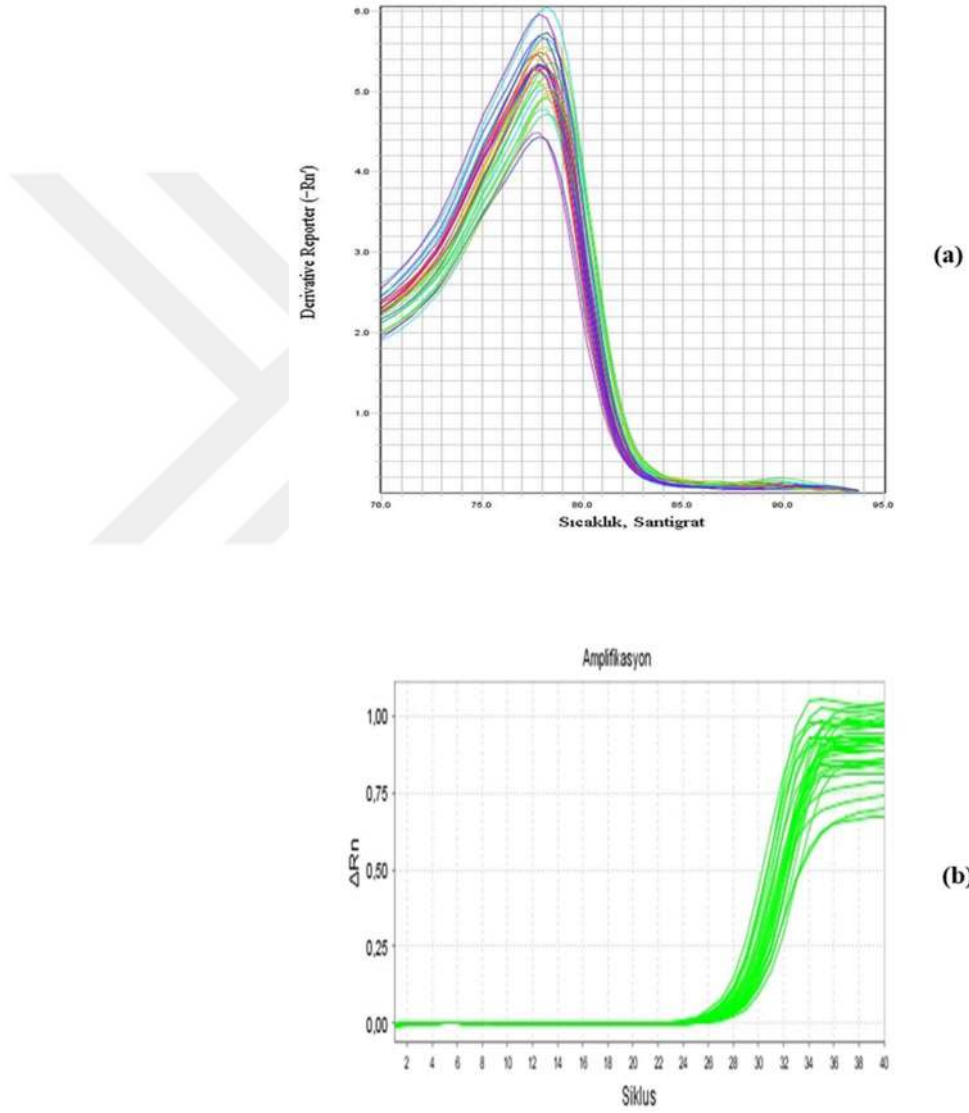
4.3.4. Hedef Genlerin Gen İfadesi Analiz Grafikleri

Kantitatif Real-Time PCR analizinde amplifikasyon sonrası erime eğrisi analizi, çalışmamızda kullanılan 5 miRNA'ya ait hedef genlerin mRNA'ları (SPL, MYB, GRAS, SULTR ve GRF) ile de yapılmıştır. Bu mRNA'lara ait gen ifadelerinin erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri aşağıda sıra ile verilmiştir.



4.3.4.1. *Squamosa* Promotör Bağlanma Benzeri Protein (SPL) Analiz Sonucu

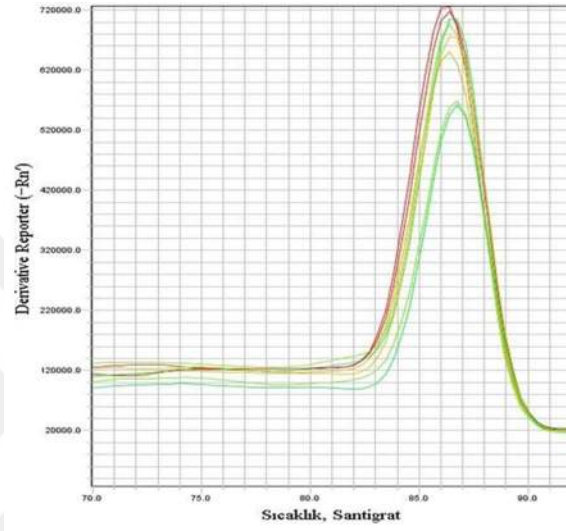
miR156'nın hedefi olan *squamosa* promotör bağlanma benzeri proteinine ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.10'da verilmiştir.



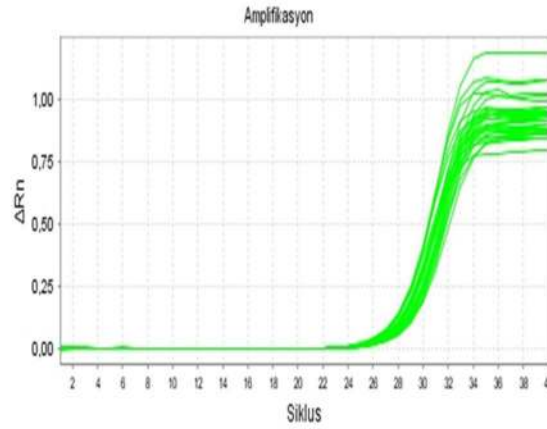
Şekil 4.10: *Squamosa* promotör bağlanma benzeri protein Erime Piki (a) *Squamosa* promotör bağlanma benzeri protein Amplifikasyon Eğrisi (b)

4.3.4.2. MYB transkripsiyon faktörleri Analiz Sonucu

miR159'un hedefi olan MYB transkripsiyon faktörlerine ait qRT-PCR analizinden elde edilen ait erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.11'de verilmiştir.



(a)

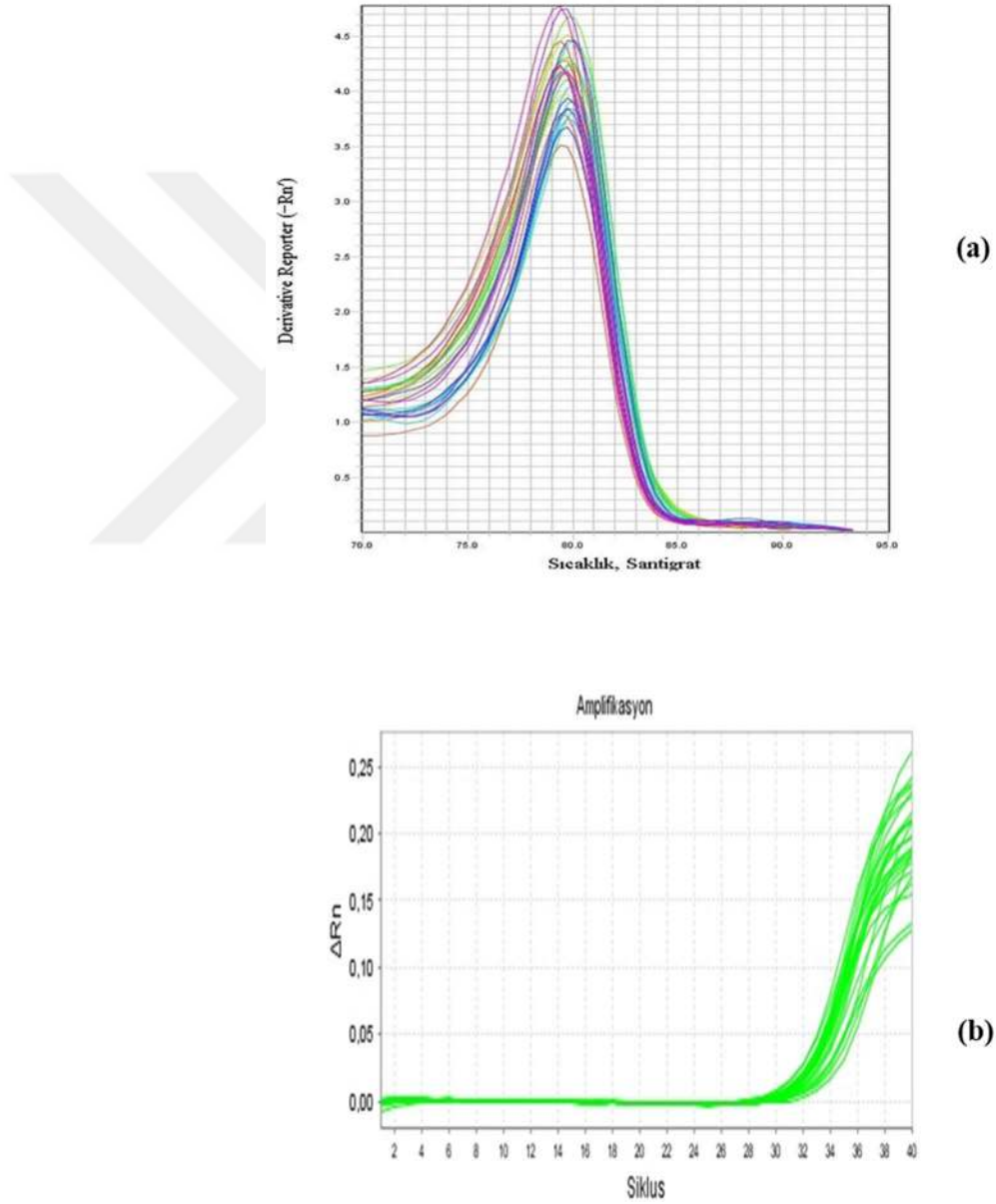


(b)

Şekil 4.11: MYB transkripsiyon faktörleri Erime Piki(a) MYB transkripsiyon faktörleri Amplifikasyon Eğrisi(b)

4.3.4.3. Scarecrow Benzeri Protein Analiz Sonucu

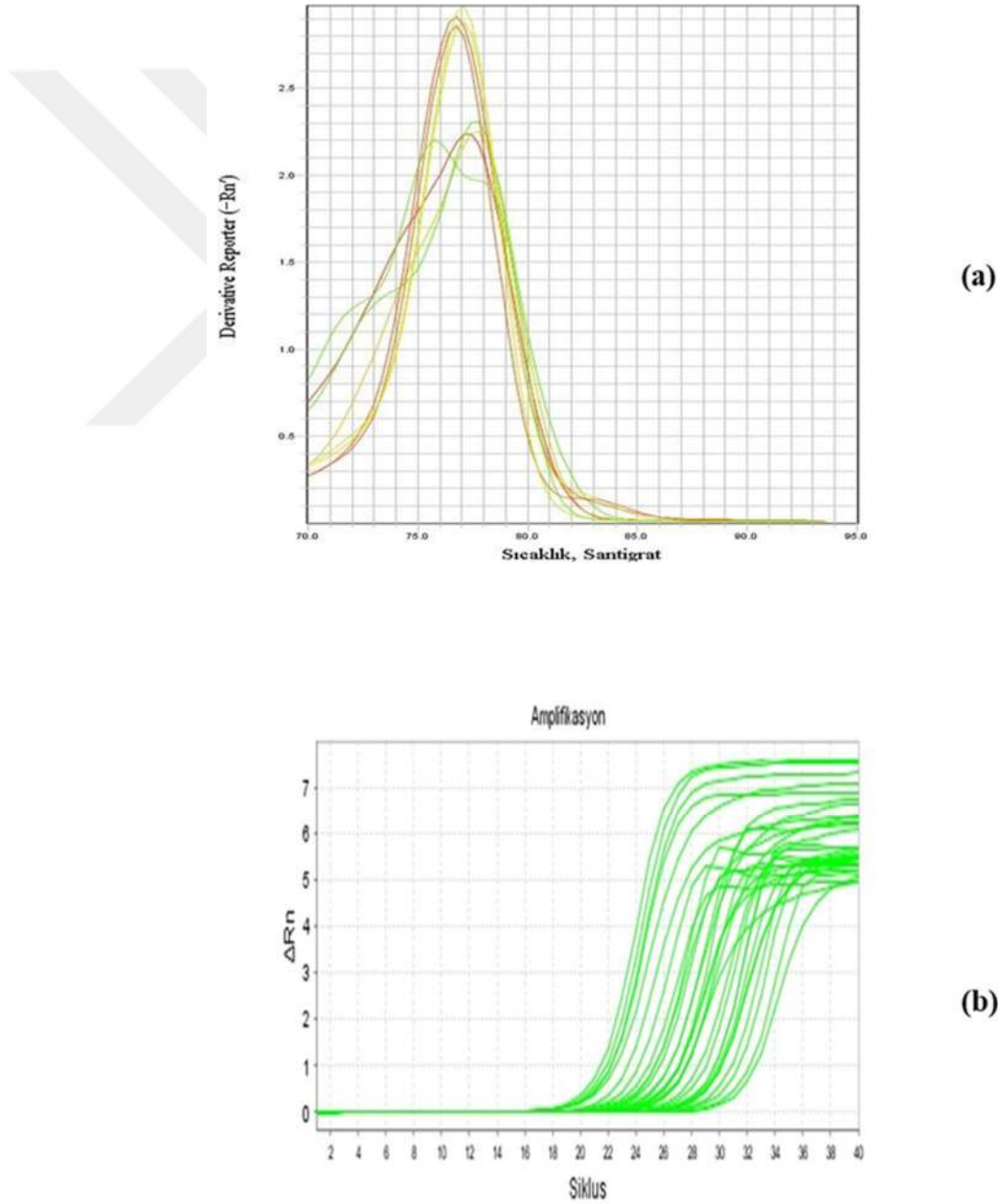
miR171 ailesinin hedefi olan scarecrow benzeri proteine ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12: Scarecrow Benzeri Protein Erime Piki (a) Scarecrow Benzeri Protein Amplifikasyon Eğrisi(b)

4.3.4.4. ATP Sülfirilaz Analiz Sonucu

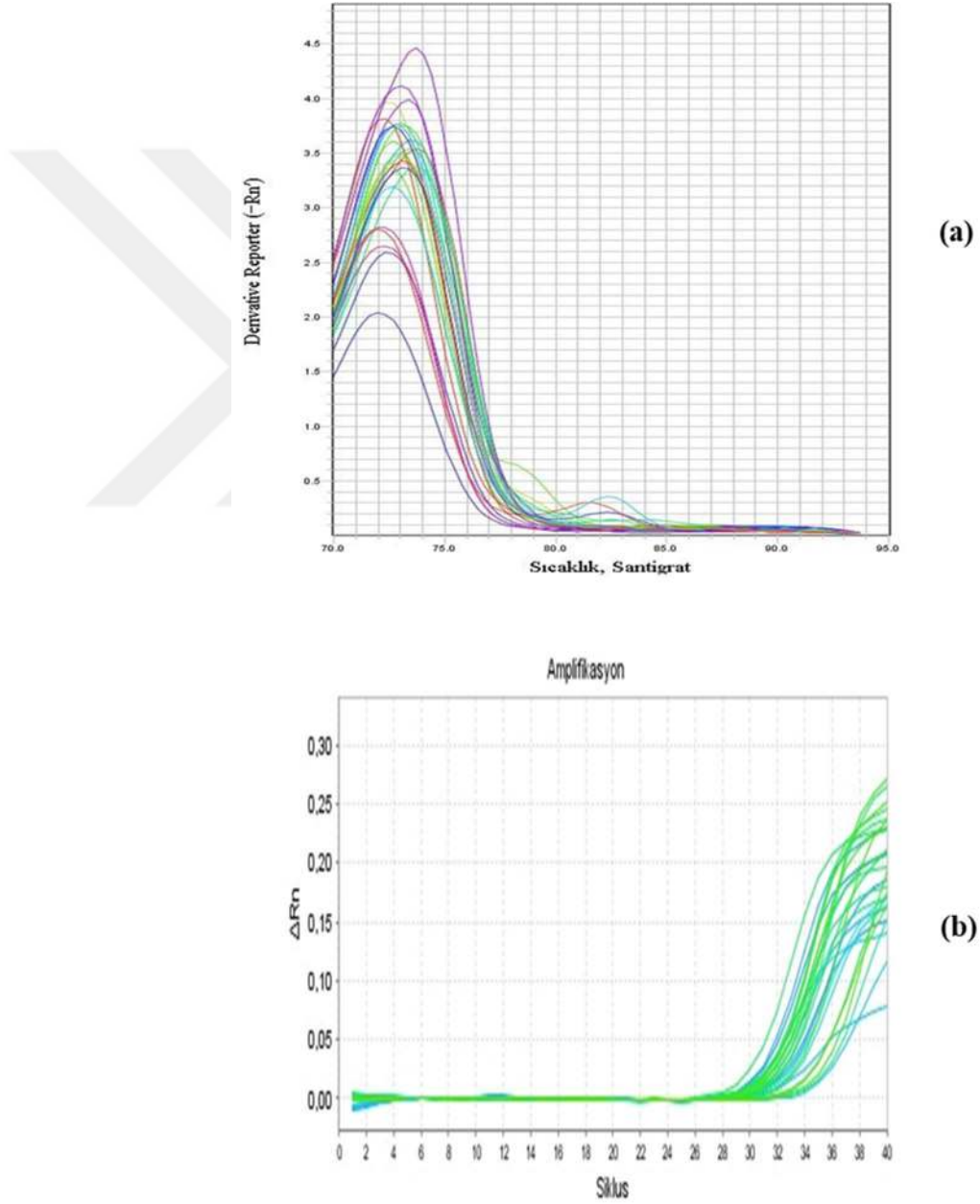
miR395 ailesinin hedefi olan ATP Sülfirilaza ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.13’de verilmiştir. Burada görülen birden fazla erime piki primerlerin non spesifik bağlanmalar yaptığını göstermektedir. Buna bağlı olarak da amplifikasyon eğrisinde bir dağılma görülmektedir.



Şekil 4.13: ATP Sülfirilaz Erime Piki (a) ATP Sülfirilaz Amplifikasyon Eğrisi (b)

4.3.4.5. Büyüme Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü (GRF) Analiz Sonucu

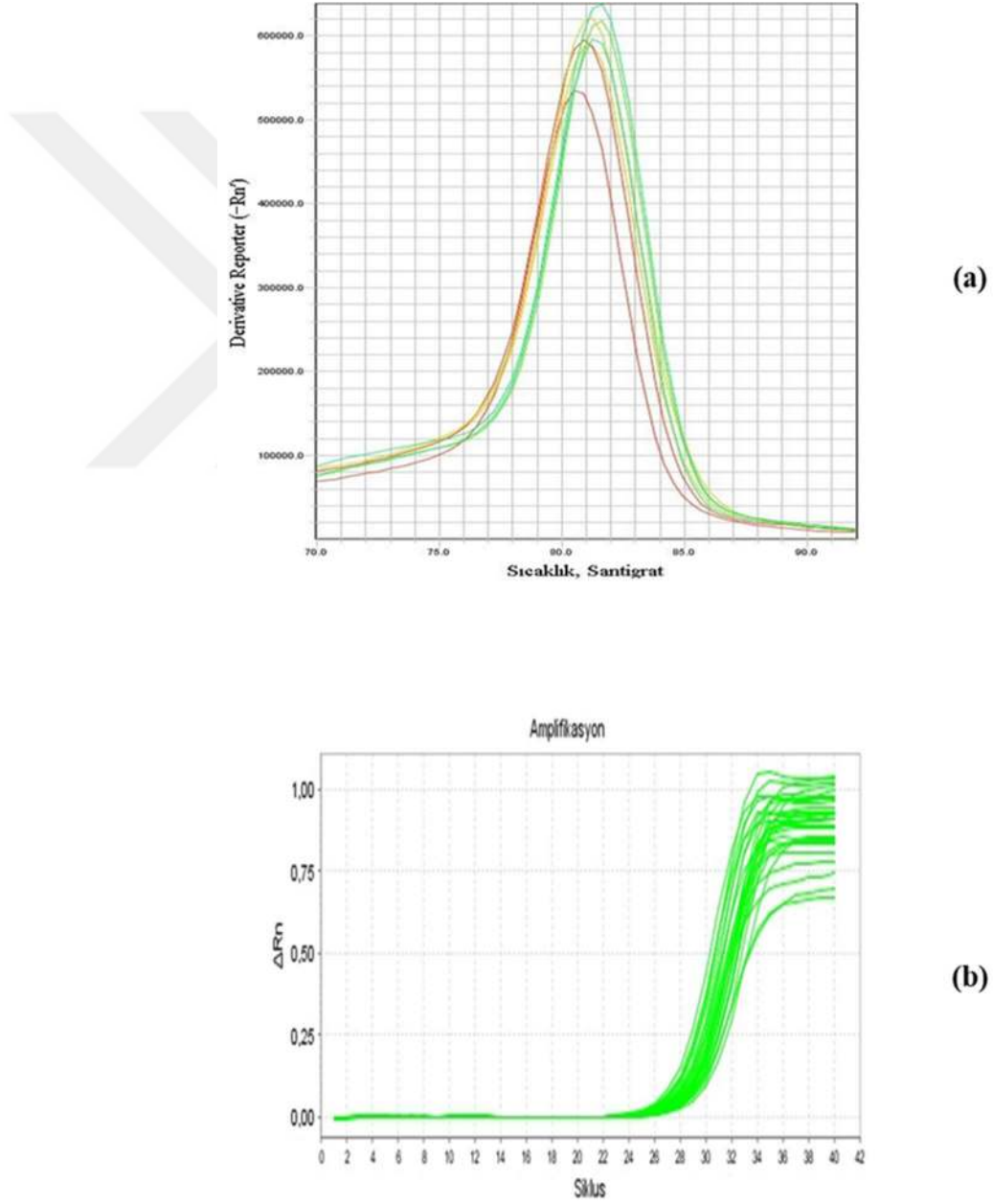
miR396 ailesinin hedefi olan büyüme düzenleyen transkripsiyon faktörüne (GRF) ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.14: Büyüme Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü (GRF) Erime Piki(a) Büyüme Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü Amplifikasyon Eğrisi(b)

4.3.4.6. RLI Analiz Sonucu

RLI referans genine ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



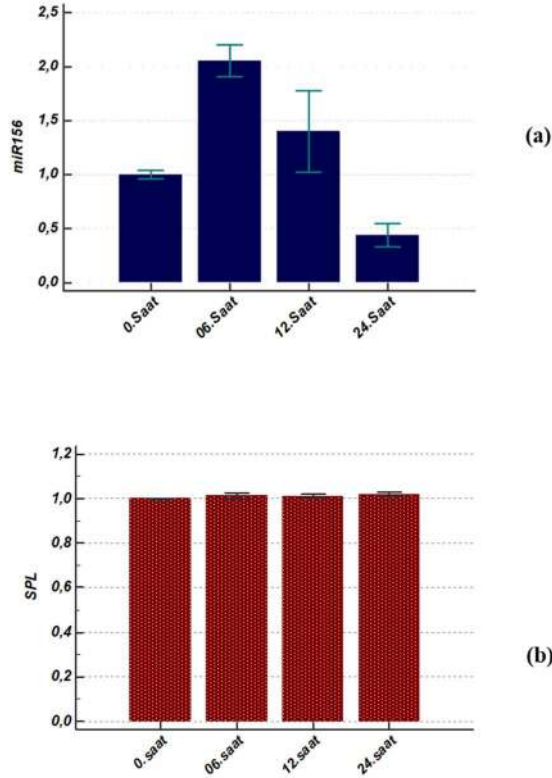
Şekil 4.15: RLI Erime Piki (a) RLI Amplifikasyon Eğrisi (b)

4.4. miRNA'lara ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi

Tez kapsamında çalışılan ağır metal stresi ile ilgili miRNA'ların kontrol olarak kullanılan miR161'e, hedef genlerin de kontrol RLI'ya göre rölatif gen ifade farkları ANOVA programı ile analiz edilmiştir.

4.4.1. miR156 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi

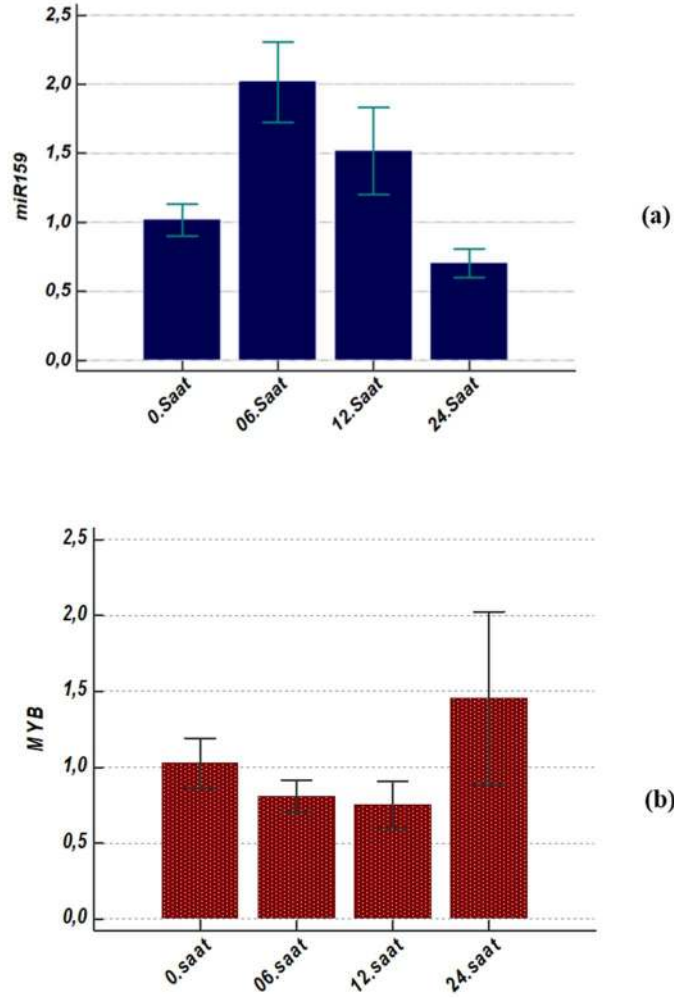
Lemna minör'de uygulanan Cd sonrası miR156 ve hedef geni SPL'de gözlenen gen ekspresyon seviyelerindeki değişim Şekil 4.16'da gösterilmiştir. miR156 ekspresyon seviyesi ilk 6 saatte artarken zamanla azalmaya başlamıştır. miRNA'nın hedef genin (SPL) ekspresyonunda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.16: miR156 Bar Grafiği (a) Squamosa Promotör Bağlanma Benzeri Protein Bar Grafiği (b)

4.4.2. miR159 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi

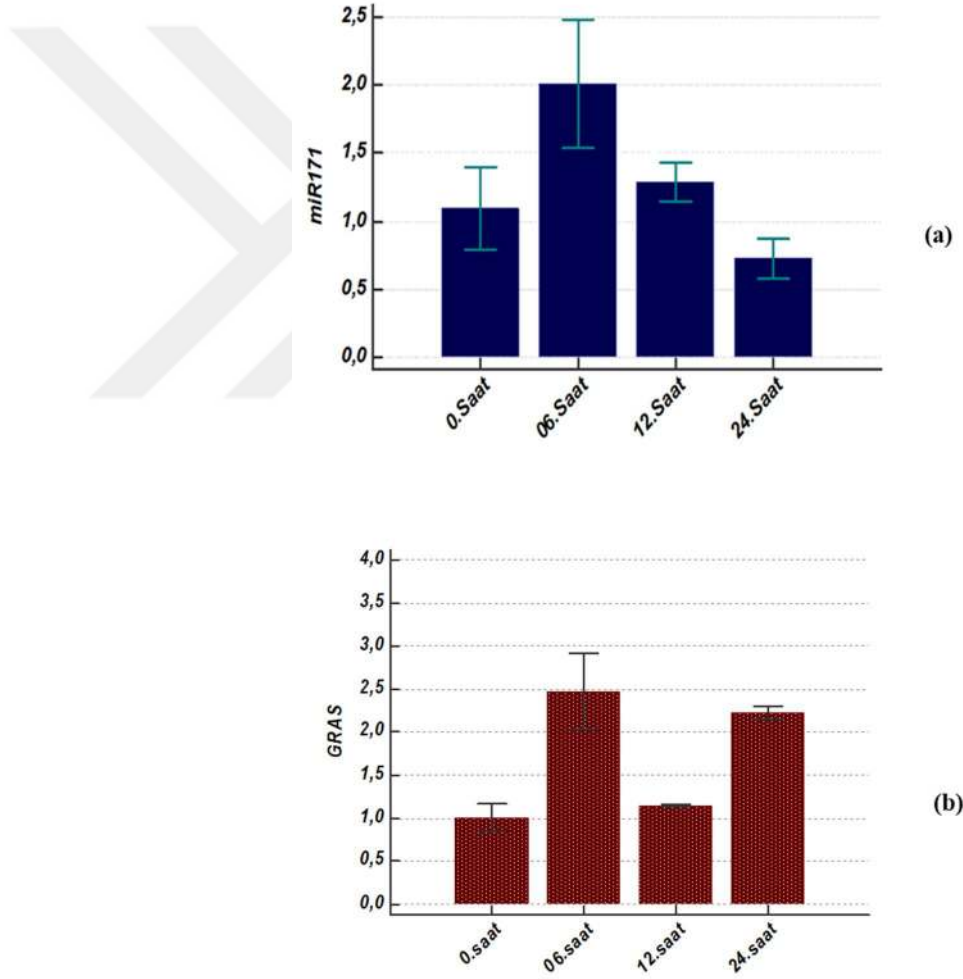
Lemna minör'de uygulanan Cd sonrası miR159 ve hedef geni MYB'de gen ekspresyon seviyelerindeki değişim Şekil 4.17'de gösterilmiştir. miR159 ekspresyon seviyesi ilk 6 saatte artarken zamanla azalmıştır. miRNA'nın hedef genin (MYB) ekspresyonunda artan zamana bağlı olarak ekspresyonda azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 4.17: miR159 Bar Grafiği (a) MYB Transkripsiyon Faktörü Bar Grafiği (b)

4.4.3. miR171 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi

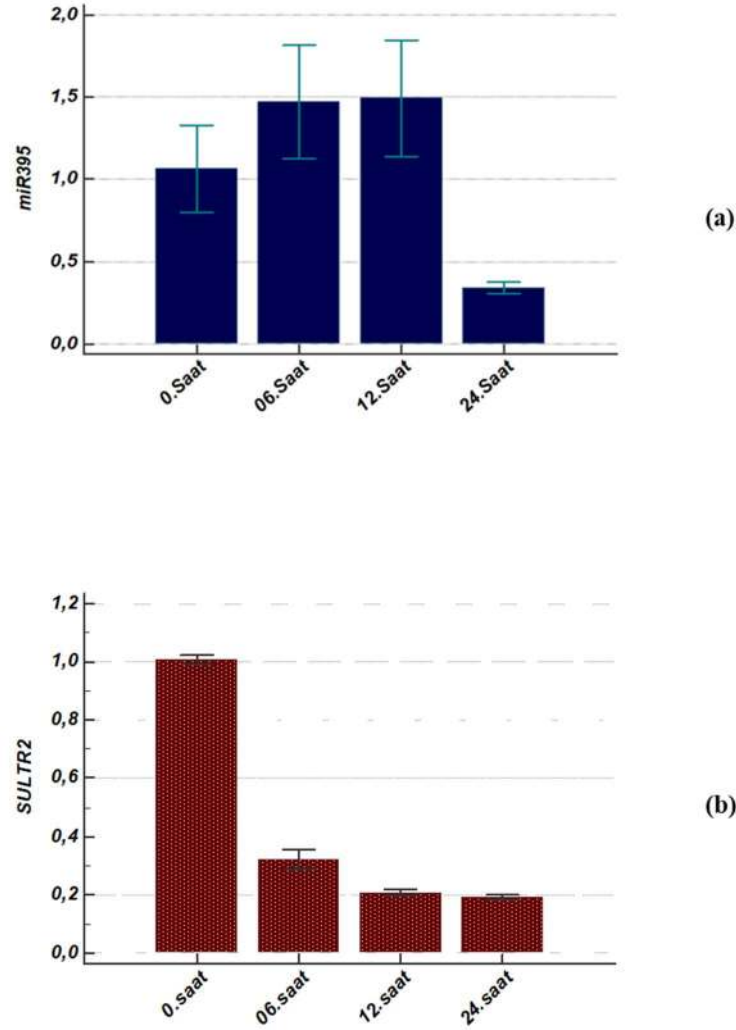
Lemna minör'de uygulanan Cd sonrası miR171 ve hedef geni GRAS'da gen ekspresyon seviyelerindeki değişim Şekil 4.18'de gösterilmiştir. miR171 ekspresyon seviyesi ilk 6. ve 12. saatte artarken, 24. saatte azalmıştır. miRNA'nın hedef genin (GRAS) ekspresyonunda artan zamana bağlı olarak ekspresyonda artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.18: miR171 Bar Grafiği (a) Scarecrow Benzeri Protein Bar Grafiği (b)

4.4.4. miR395 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi

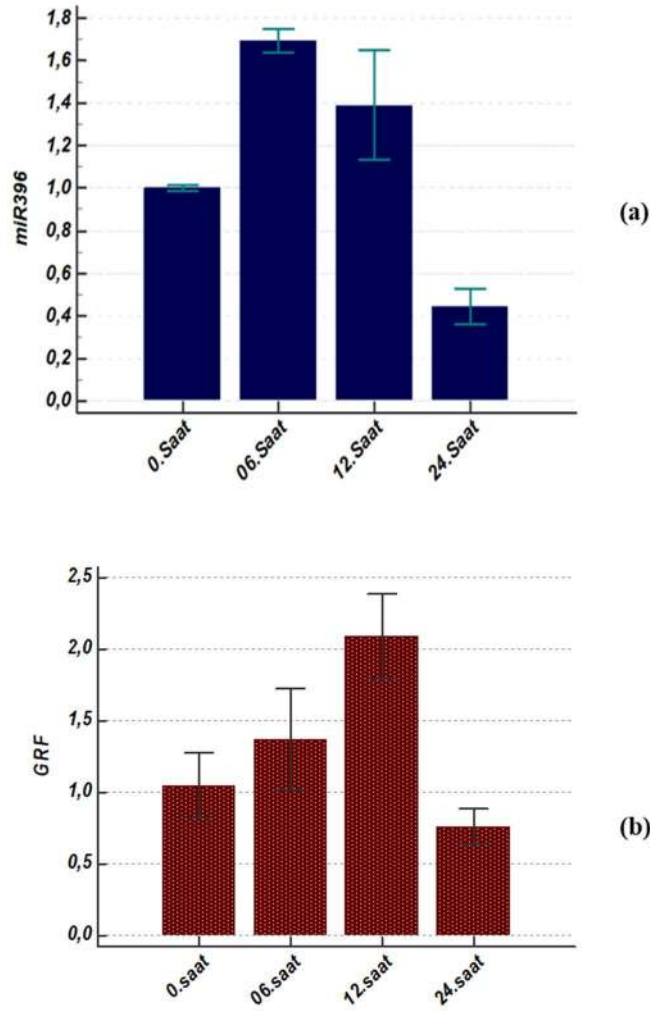
Lemna minör'de uygulanan Cd sonrası miR395 ve hedef geni SULTR'de gen ekspresyon seviyelerindeki değişim Şekil 4.19'da gösterilmiştir. miR395 ekspresyon seviyesi ilk 6 saatte artarken 12. saatten sonra azalmıştır. miRNA'nın hedef genin (SULTR) ekspresyonunda artan zamana bağlı olarak ekspresyonda azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 4.19: miR395 Bar Grafiği (a) ATP Sülfirilaz Bar Grafiği (b)

4.4.5. miR396 ve Hedef Geninin Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi

Lemna minor'de uygulanan Cd sonrası miR396 ve hedef geni GRF'de gen ekspresyon seviyelerindeki değişim Şekil 4.20'da gösterilmiştir. miR396 ekspresyon seviyesi ilk 6 saatte artarken zamanla azalmıştır. miRNA'nın hedef genin (GRF) ekspresyonunda 12. saate kadar artış sonrasında ise azalma gözlemlenmiştir.



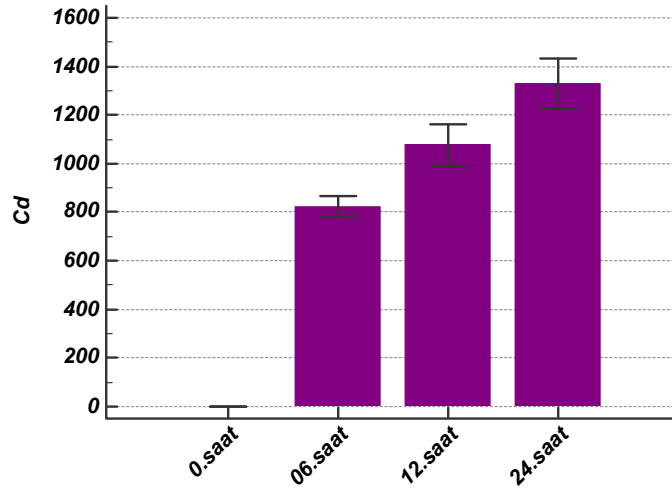
Şekil 4.20: miR396 Bar Grafiği (a) Büyümei Düzenleyen Transkripsiyon Faktörü (GRF) Bar Grafiği (b)

4.5. *Lemna minör* Örneklerinde Ağır Metal Miktarının Belirlenmesi

Yaş yakma metodu ile *Lemna minör* örneklerinde ölçülen Cd miktarları Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre bar grafiği çizilmiş ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Örneklerde zamana bağlı olarak Cd miktarının arttığı gözlenmiştir. 0. saatte ortalama Cd miktarı 0,0006 gr Cd kg⁻¹, 6. saatte 0,1564 gr Cd kg⁻¹, 12. saatte 0,1831 gr Cd kg⁻¹ ve 24. saatte 0,2124 gr Cd kg⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.4: *Lemna minör* Örneklerinde Ağır Metal Miktarı (ppm)

	Cd
0.saat	0,00
0.saat	0,395
0.saat	0,657
06.saat	805,10
06.saat	759,70
06.saat	906,02
12.saat	969,30
12.saat	1015,00
12.saat	1248,00
24.saat	1176,00
24.saat	1284,00
24.saat	1524,20



Şekil 4.21: *Lemna minör* Örneklerinde Zamana Bağlı Olarak Cd Miktarındaki Değişim

5. TARTIŞMA

Su, birçok organik ve inorganik madde için iyi bir çözücü olması, organik maddelerin yapı taşı olarak kullanılması, metabolik faaliyetlerin gerçekleşmesini sağlaması, vücut ısısını düzenlemesi ve birçok organizma için yaşam alanı olması bakımından, ekosistemin son derece önemli bir bölümünü temsil etmektedir. Ancak, kentsel atıklar, sanayi ve tarımsal faaliyetler, nakliyat, termik ve nükleer santraller ve daha birçok insan faaliyeti su kirliliğine neden olmaktadır. Böyle faktörler sonucu ortama bilerek veya bilmeyerek sızan organik ve inorganik bileşikler, mikroorganizmalar, deterjanlar, pestisitler, ağır metaller, radyoaktif partiküller, yağlar ve petrol ürünleri vb. maddeler suyu kirleten başlıca kirleticilerdendir (Tchounwou vd., 2012). Ağır metal ve diğer birçok kirleticinin giderimi için biyolojik yöntemlerin kullanıldığı biyoremediasyon, bakteriler gibi mikroorganizmalar ve makrofitler, alglar veya diğer organizmalar kullanılarak kirleticiler ve zararlı maddelerin ortamdaki giderimi anlamına gelen bir süreçtir (Kulshreshtha vd., 2014).

Lemna minor gibi metal biriktiren bitkiler, moleküler metal tolerans mekanizmalarını tanımlamak için mükemmel türlerdir. Ağır metallerin kimyasal ve biyolojik süreçlerle parçalanamayan doğası, araştırmacıları biyolojik yaklaşım olarak hiper akümülatör bitkileri tercih etmeye yönlendirir. Su mercimeği (*L. minor*) de üzerinde bugüne kadar pek çok ağır metal uzaklaştırılma çalışması yürütülerek önemli metaller için farklı şartlarda uzaklaştırma kapasitesi saptanmış biyoindikatör akuatik bitki türlerinden biridir (Leblebici ve Aksoy, 2011).

100 µM CdCl₂ içeren %50 Hoagland solüsyonu içinde 6, 12 ve 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra kurutulan bitki örneklerinde yapılan ağır metal analiz sonuçları bitkinin zamana bağlı olarak daha fazla Cd'yi bünyesinde biriktirdiğini göstermiştir. *L. minor*'un saate bağlı biriktirdiği Cd miktarları 0.1564 (6 saat), 0.1831 (12 saat), 0.2124 (24 saat) ve 0.3627 gr Cd kg⁻¹ olarak hesaplanmıştır. *L. minor*'ün dokularında yüksek ağır metal birikim potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Zayed ve arkadaşlarının (1998) yaptığı çalışmada bitkiye konsantrasyonları 0.1 – 10 mg L⁻¹ arasında değişen Cd, Cr, Cu, Ni, Pb ve Se gibi eser elementleri içeren besin solüsyonları verildiğinde su mercimeği dokularında biriken eser

elementlerin en yüksek konsantrasyonları Cd için 13.3 gr Cd kg⁻¹ olarak saptanmıştır (Zayed vd., 1998). Çalışmada 3 litre ebatında plastik kaplar kullanılmış ve su mercimekleri 8 gün inkübe edilmiştir, ağır metal muamelesi sonunda ise örnekler distile su ile yıkanıp kurutulmuştur. Ancak bizim çalışmamızda ağır metal uygulaması sonrasında örnekler 10 mM EDTA ile yıkanıp kök ve yaprak yüzeyine dışarıdan tutunan metal iyonlarından arındırıldıktan sonra kurutulmuştur. Zayed ve arkadaşlarının çalışmasına oranla bizim çalışmamızda hesaplanan ağır metal miktarı daha düşük olmasının bir nedeni EDTA ile muamele olabilir, EDTA dış kaynaklı Cd'ü bağlayacağından ağır metal ölçümlerinde sonuçlara sadece bitki tarafından alınan Cd miktarı yansiyacaktır. *L. minor*'de Cd miktarının daha düşük olmasının bir diğer sebebi inkübasyon süresi olabilir. İnkübasyon süresi Zayed ve arkadaşlarının çalışmasında 8 gün iken bizim çalışmamızda en uzun inkübasyon süresi sadece 24 saattir. İnkübasyon süresindeki artış bitkinin bünyesinde daha çok ağır metal birikme olasılığını artırmaktadır denilebilir. Yang ve arkadaşlarının (2012) yaptığı bir çalışmada ise soya fasülyesi tohumları (*Glisin max* L.) 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 50 mg / L (Cd50), 100 mg / L (Cd100) ve 200 mg / L (Cd200) kadmiyum çözeltisine maruz kalmış ve tohumlar, Cd birikimi, oksidatif stres ve antioksidatif yanıtları açısından incelenmiştir . Soya fasulyesi tohumları, maruz kalma süresi ve doza bağlı bir şekilde Cd biriktirmiştir (Yang vd., 2012). Biriken kadmiyum miktarının her üç çalışmada da maruz kalma süresi ile doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir.

miRNA'ların fizyolojik süreçlerde ve bitki gelişiminde yer aldığı (Bartel ve Bartel, 2003) ve bazı miRNA'ların ekspresyonunun abiyotik streslerle düzenlendiği bilinmektedir (Jones-Rhoades ve Bartel, 2004). Bu tez kapsamında akuatik bitki *Lemna minor*'ün kadmiyum stresine verdiği cevabın epigenetik regülasyonda karmaşık rollere sahip miRNA'ları kullanarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda Cd ağır metal stresinde görevli olduğu belirtilen (Noman ve Aqeel, 2017) 5 farklı miRNA (miR156, miR159, miR171, miR395 ve miR396) kullanılmıştır. Cd'ye duyarlı hücrelerdeki miRNA'ların düzenleyici rolünü doğrulamak için, Cd ile düzenlenen miRNA'ların karşılık gelen hedef mRNA'ları, miRTarBase veritabanı kullanılarak tahmin edilmiştir (Anonim). miRNA'lar hedef mRNA'larını genelde negatif olarak düzenledikleri için, bu hedeflerin tanımlanması, bu miRNA'ların dahil olduğu yollar hakkında bilgi sağlar (Li vd., 2017). mikroRNA ekspresyonundaki zamansal farklılıklar, strese duyarlı mikroRNA'ların tanımlanmasında ve

stres yanıtı / toleransındaki rollerinin analizinde farklı zaman aralıkları uygulanmasının önemini vurgulamaktadır. Farklı zaman aralıkları, mikroRNA'nın değişen ortamlar altında genlerin ifade seviyelerinin yeniden düzenlenmesi ile ilgili bilgiler verebilir (Li vd., 2017). Bu nedenle, çalışılan miRNAlar ve hedef genlerinin zamana bağlı ekspresyon profillerini belirlemek amacıyla Srivastava ve arkadaşlarının (2012) çalışmalarında yaptığı gibi çalışmamızda 6. ve 24. saat aralıklarını ve buna ilaveten 12. saat de kullanılmıştır.

Çalışılan miRNAların gen ekspresyon analiz sonuçları ekspresyonun 6 ve 12. saatte artarken 24. saatte azaldığını göstermiştir. Bu nedenle Cd stresine yanıt olarak miRNA'ların Srivastava vd (2012) belirttiği gibi dinamik bir ekspresyon profili sergilediği düşünülebilir. Ayrıca miRNAların ağır metal stresinde farklı bitki türlerinde ve farklı ağır metal uygulamalarında farklı ekspresyon profili sergiledikleri görülmektedir. Örneğin, miR156'nın Cd stresine maruz bırakılan *Oryza sativa* ve *Triticum aestivum*'da aşağı regüle edildiği bildirilirken *Brassica napus*'ta ise yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Jalmi vd., 2018). Ding vd. (2011), Cd'ye duyarlı miRNA'ların çoğunun miR156, miR162 ve miR390 ile birlikte aşağı regüle edildiğini göstermişlerdir. Yine, Xie vd. (2007) Cd'ye maruz kaldığında miR156 ekspresyonunun bastırıldığını göstermiştir. Bununla birlikte, Srivastava vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada *Brassica juncea*'da arsenik stresi altında miR156 gen ekspresyonunu kökte ve filizde incelemiş, miR156'nın, mikroarray ile 1. saatte aşağı regüle edilirken, gerçek zamanlı PCR analizi sırasında tüm zaman noktalarında (6. 24. ve 72. saat) yukarı regüle olduğunu bulmuşlardır. Bitkilerde ağır metal uygulaması sonucunda miR156 ile yapılan çalışmalarda kadmiyum ve civa streslerine yanıt olarak aşağı regüle edildiği, alüminyum, mangan ve arsenik stresi altında yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Noman ve Aqeel, 2017). *Triticum aestivum*'da ise kadmiyum stresinde miR156'nın kökte ve yaprakta aşağı regüle edildiği bildirilmiştir. Çalışmamızda miR156'nın 6. ve 12. saatte gen ekspresyonu yukarı regüle edilmiş 24. saatte ise aşağı regüle edildiği görülmüştür. Arabidopsis'te 17 SPL geninden 11'inin miR156 ve miR157'nin hedefleri olduğu bilinmektedir (Rhoades vd., 2002). Çalışmamızda hedef gen ekspresyonunda (SPL) ise herhangi bir değişim gözlenmemiştir. *L. minor*'de miR156'nın hedef geninin ifadesinin değişmediğinin gözlenmesi, bize bitkinin maruz kaldığı ağır metali tolere etmekte zorlanmadığını ve strese bağlı olarak bu hedef genin rol aldığı glikoz, inorganik tuzlar, ATP ve giberellin sentezindeki metabolik süreçlerinin alternatif metabolik yollar sayesinde etkilenmediğini düşündürmektedir.

miR159 yaygın bitki türleri arasında en bol bulunan mikroRNA çeşitlerinden birisidir. Yaprak gelişimi, çiçek organları tanımlanması ve stres cevabı gibi birden fazla görevi mevcuttur (Kaplan, 2017). miR159 ailesi, çoğu kara bitkisinde (> 400 milyon yıl) bulunan en eski miRNA ailelerinden birini temsil eder. miR159, hedefleri MYB / TCP transkripsiyon faktörleri yoluyla gibberellin sinyali ve etilen biyosentezini düzenler (Achard vd., 2004). Bitkilerde ağır metal uygulaması sonucunda miR159 ile yapılan çalışmalarda kadmiyum, cıva, alüminyum, mangan ve arsenik streslerine yanıt olarak aşağı regüle edildiği bildirilmiştir (Noman ve Aqeel, 2017). Yapılan bir diğer çalışmada *Triticum aestivum*'da kadmiyum stresinde miR159'un benzer şekilde kökte ve yaprakta aşağı regüle edildiği bulunmuştur (Qiu vd., 2016). Hiperakümülatör bir bitki *R. communis*'te ise miR159'un nikel stresinde kökte ve yaprakta yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Çelik ve Akdaş, 2019). *Brassica juncea*'da yapılan bir çalışmada arsenik stresi altında miR159 gen ekspresyonunun kökte ve filizde 6. ve 24. saatlerde yukarı regüle edildiği 72 saatte ise kökte aşağı regüle edildiği, filizde ise yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Srivastava vd., 2012). Çalışmamızda miR159'un 6. ve 12.saatte gen ekspresyonu yukarı regüle edilmiş 24. saatte ise aşağı regüle edildiği görülmüştür. miR159'un hedef geni olan MYB'nin ekspresyonunun ise 6. ve 12.saatte gen ekspresyonu aşağı regüle edilmiş 24. saatte ise yukarı regüle edildiği görülmüştür. Normal koşullarda azalan miR159 ekspresyonunun hedef geni olan MYB ekspresyonunu artırması beklenmektedir. Bizim çalışmamızda bunu desteklemektedir.

Ağır metal koşullarında hayatta kalmak için sararma (kloroz) ve yaşlanmadan (senescence) kaçınmak önemlidir. Klorozda; Fotosistem II biyosentezinin rol oynadığı bilinmektedir. Bu noktada, miR171'in düzenleyici rolü önem kazanmaktadır. miR171'in *Oryza sativa*, *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Medicago truncatula* ve *Phaseolus vulgaris*'te kadmiyum, cıva ve arsenik streslerine yanıt olarak aşağı regüle edildiği, alüminyum stresi altında yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Yang, 2013). Hiperakümülatör bir bitki *R. communis*'te nikel stresinde miR171'in kökte ve yaprakta aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Çelik ve Akdaş, 2019). miR171 ailesi Scarecrow-benzeri (SCLp) proteinler ailesinin gen ifadesini regüle etmektedirler. Çalışmamızda miR171'in 6. ve 12.saatte gen ekspresyonu yukarı regüle edilmiş 24. saatte ise aşağı regüle edildiği görülmüştür. miR171'in hedef geni olan GRAS'ın ekspresyonunda ise genel olarak yukarı regülasyon gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak; Cd stresi koşullarında *L. minor*'un hayatta kalabilmek ve senesense

kurtulabilmek için bitkinin klorofil II biyosentezini indükledikleri ve klorozdan kaçınma yönünde mekanizmalarını devreye soktukları söylenebilir. Elde edilen bu verinin literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Çelik ve Akdaş, 2019).

miR395, sülfat eksikliğinde kuvvetle indüklenir ve sülfat homeostazının düzenlenmesi için çok önemlidir (Takahashi vd., 2011). miR395'in S alımını ve taşınmasını, sırasıyla SULTR2; 1 ve Sülfat alımına ve sülfatın aktivasyonuna dahil olan APS'yi düzenlediği bilinmektedir (Liang ve ark., 2010). miR395'in hedef genleri üzerindeki etkilerini farklı mekanizmalar izler. Kawashima vd. (2009), *Arabidopsis thaliana* bitkisinde sülfür ağır metali ile yaptıkları çalışma sonucunda; SULTR2;1 mRNA seviyesinin arttığı, ATPS4 seviyesinin düştüğü ve ATPS1 ekspresyon seviyesinin ise etkilenmediğini göstermiştir. Dolayısıyla, miR395 aracılı mRNA bölünmesinin hedeflerinin işlevlerini üç farklı mekanizma ile düzenlediği görülmektedir. SULTR2'nin mRNA seviyeleri, sülfat açlığı sırasında köklerde artar ve ekspresyonu, mekânsal olarak ksilem parankim hücreleriyle sınırlandırılabilir (Kawashima vd., 2009). ATPS4, miR395 tarafından kanonik bir düzenlemeye tabi tutulur, çünkü miR395'in indüklenmesinden sonra mRNA seviyeleri düşer. ATPS1 düzeyleri ise ATPS1 mRNA'sında bir düşüş gözlemleyen Jones-Rhoades ve Bartell'in (2004) aksine, sülfat eksikliğinden etkilenmemiştir. Kawashima vd.'nin (2011) yaptığı bir çalışmada miR395 ve SULTR2; 1 arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Bununla birlikte, sadece belirli zaman noktalarında bir artış gösteren APS aktivitesinin analizi miR395 ile negatif korelasyon göstermemiştir. Bu, APS gibi bir enzimin seviyesinin, miRNA'nın sadece bir bileşen olacağı çeşitli seviyelerde düzenlenebileceğini düşündürmüştür. Bitkilerde yapılan çalışmalarda miR395'in kadmiyum, alüminyum ve mangan streslerine yanıt olarak yukarı regüle edildiği civa stresine yanıt olarak aşağı regüle edildiği bildirilmiştir (Noman ve Aqeel, 2017). Hiperakümülatör bitki *R. communis*'te ise nikel stresinde miR395'in kökte ve yaprakta aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Çelik ve Akdaş, 2019). Bir diğer çalışmada, *Brassica juncea*'da arsenik stresi altında miR395 gen ekspresyonunun kökte ve filizde 6. ve 24. saatlerde yukarı regüle edildiği 72 saatte ise aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Srivastava vd., 2012). Ancak kökteki azalma filizden daha fazladır. Aynı çalışmada miR395'in hedef geninde ise kökte ve filizde 6. ve 24. saatlerde aşağı regüle edildiği 72 saatte ise yukarı regüle edildiği gösterilmiştir. Ancak bu azalma kökte daha fazladır (Srivastava vd.,

2012). Çalışmamızda miR395'in 6. ve 12.saatte gen ekspresyonu yukarı regüle edilmiş 24. saatte ise aşağı regüle edildiği görülmüştür. Çalışmamızda miR395'in hedef geni olan SULTR'nin ekspresyonunun 6. 12. ve 24. saatlerde aşağı regüle edildiği görülmüştür. Çalışma sonucunda elde edilen verilerde miRNA ekspresyon seviyesindeki değişikliğin literatürle uyumlu olduğu ancak hedef gen ve miRNA arasında beklenen negatif korelasyonun bulunmadığı görülmüştür. Erime eğrisi analizinde görülen non spesifik bağlanma piklerini gözönüne aldığımızda bu istenmeyen sonucun, primer dizaynında genomdaki tekrar bölgelerin detaylı incelenememesi ve self dimer, hairpin oranlarının yüksek olması sebebiyle primerin non spesifik bağlanmalar yapmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Absisik asit (ABA), bitki büyümesi ve gelişimi sırasında GA ve diğer fitohormonların etkilerini çeşitli süreçlerde antagonize eder (Bailey-Serres ve Voesenek, 2010). Bitkilere özgü transkripsiyon faktörlerinin korunmuş bir sınıfı olan büyümeyi düzenleyen faktörler (GRF'ler), ABA sinyal yoluna ABA ve ozmotik strese duyarlı genlerin transkripsiyonel bir baskısı olarak katılır (Kim vd., 2012). Birkaç GRF'nin ekspresyonu, hormon homeostazının düzenleyicisi olarak işlev gören ve su stresi altında sinyal veren miR396 tarafından kontrol edilir (Zhang vd., 2008; Omidbakhshfard vd., 2015). miR396, hücre proliferasyonunun ve meristem büyüklüğünün düzenlenmesinde özel bir role sahiptir. miR396 transkripsiyonel olarak kontrol edilen GRF'ler üzerinden kök ve yaprak dokularının gelişimine aracılık eder (Debernardi vd., 2012; Liu vd., 2009). Bu miRNA'nın en önemli görevi stres cevabında rol almasıdır (Kaplan, 2017). Bitkilerde ağır metal uygulaması sonucunda miR396 ile yapılan çalışmalarda mangan stresine yanıt olarak yukarı regüle edildiği kadmiyum, alüminyum, civa ve arsenik streslerine yanıt olarak aşağı regüle edildiği bildirilmiştir (Noman ve Aqeel, 2017). Hiperakümülatör bitki *R. communis*'te nikel stresinde miR396'nın kökte ve yaprakta aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Çelik ve Akdaş, 2019). Çalışmamızda miR396'nın 6. ve 12.saatte gen ekspresyonu yukarı regüle edilmiş 24. saatte ise aşağı regüle edildiği görülmüştür. miR396'nın hedef geni GRF'de ise 6. ve 12.saatte gen ekspresyonu yukarı regüle edilmiş 24. saatte aşağı regüle edildiği görülmüştür. Bunun sonucu olarak elde edilen miRNA verilerinin literatürle uyumlu olduğu gözlemlenirken hedef gen GRF'nin ekspresyonu ise azalmış ve miR396 ile benzer bir profil sergilemiştir.

Lemna minör bugüne kadar ağır metal stresi çalışmalarında oldukça fazla tercih edilmiş bir bitki olmasına rağmen gen ekspresyon profilleri üzerinde yapılan herhangi bir çalışma örneğine literatürde rastlanılmamıştır. Bu çalışmada *Lemna minör* bitkisinde ağır metal stresi ile ilişkili olduğu düşünülen miRNA'lar ve ilgili hedef genleriyle yapılan qRT-PCR analizlerinin verileri incelenmiş ve seçilen miRNA'ların kadmiyum stresi ile ilişkisi ortaya konmuştur. Kadmiyuma maruz bırakılan *Lemna minör*'de çalışılan tüm miRNA'larda (miR156, miR159, miR171, miR395 ve miR396) gen ekspresyonunun 6 ve 12. saatte arttığı 24. saatte ise azaldığı görülmektedir. Çalışmada kullanılan miRNA'ların ekspresyonlarının bazı bitki türlerinden elde edilen sonuçlarla benzer, bazıları ile de farklılıklar göstermiş olması metal stresi ile ilişkili miRNAların ifadelerinin düzenlenmesinde türden türe farklılıklar olabileceğini göstermektedir. Ayrıca zamana bağlı ekspresyon profilleri ile yapılan çalışmalarda (Srivastava vd., 2012) bahsedildiği gibi ekspresyonda artışlar ve azalışlar gözlemlenmektedir.

Ancak çalışmamızda elde ettiğimiz hedef genlerin ifadeleri ve miRNA'ların ifade profilleri literatürle uyumlu değildir. miRNA ve hedef gen arasında Gielen vd (2016) belirttiği gibi her zaman negatif bir korelasyon gözlemlenmemiştir. Hedef genler miRNA'lar dışında başka transkripsiyon faktörleri tarafından da kontrol edilebilir (Gielen vd., 2016). mikroRNA ekspresyonundaki farklı zaman aralıkları, strese duyarlı mikroRNA'ların tanımlanmasında ve stres yanıtı / toleransındaki rollerinin analiz edilmesindeki önemini göstermektedir. Bunun yanında çalışılan miRNA'lar ağır metal stresi dışında tuz, kuraklık, ısı, soğuk, ABA, UVB ve biyotik streslerde de görev yapmaktadır (Wang vd., 2017). Çalışılan miRNA'ların hedef genlerinde (SPL, MYB, GRAS, SULTR ve GRF) ise SPL gen ekspresyonu aynı kalırken, MYB gen ekspresyonunun 6.ve 12. saatte aşağı regüle olurken 24.saatte yukarı regüle edildiği, GRAS gen ekspresyonunun 6.12. ve 24. saatlerde yukarı regüle edildiği, SULTR gen ekspresyonunun aşağı regüle edildiği ve GRF gen ekspresyonunun ise 6.ve 12. saatte yukarı regüle olurken 24.saatte aşağı regüle edildiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, hiperakümülatör bitkilerin ağır metale diğer bitkilere göre daha dayanıklı olmasından dolayı uygulanan ağır metal bitkide ağır metal stresinde görev yapan miRNAlar ve onların hedef genlerinin ekspresyonlarının daha geç yanıt vermesine sebep olabilir. Yani uygulanan ağır metalin olumsuz etkileri bitkide belli bir miktar ağır metal

birikiminden sonra ortaya çıkıyor olabilir. Hiperakümülatör bitkilerde ağır metal stresine verilen cevaplar uygulanan doz ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişiklik gösteriyor olabilir. *Lemna minor* üzerinde farklı kadmiyum dozları test edilerek aynı miRNAlar ve hedef genlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi bu duruma açıklık getirebilir. Çalışmadan elde edilen bilgiler bu bitki ile ilgili yapılacak sonraki çalışmalara rehberlik etmesi yönünden önemlidir.



KAYNAKÇA

- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C., Harberd, N.P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*. (131), 3357–3365.
- Akel, E. (2006). Kırmızı yanaklı Singapur tatlı su kaplumbağalarının (Pseudemys scripta elegans) akvaryum ortamında su mercimeği (Lemna minor L.) ile beslenme imkanları üzerine mukayeseli araştırmalar. *Kütahya Dumlupınar Üniversitesi*.
- Allen, R.S., Li, J., Alonso-Peral, M.M., White, R.G., Gubler, F., Millar, A.A. (2010). MicroR159 regulation of most conserved targets in Arabidopsis has negligible phenotypic effects. *Silence*, 1:18.
- Alonso-Peral, M.M., Li, J., Li, Y., Allen, R.S., Schnippenkoetter, W., Ohms, S., White, R.G., Millar, A.A. (2010). The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. *Plant Physiol* (154), 757–771.
- Alonso-Peral, M.M., Sun, C. and Millar, A.A. (2012). MicroRNA159 can act as a switch or tuning microRNA independently of its abundance in Arabidopsis. *PLoS One*.
- Anonim. (n.d.). <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>.
- Appenroth, K.J., Borisjuk, N. and Lam, E. (2013). Telling Duckweed Apart: Genotyping Technologies for the Lemnaceae. *Chin J Appl Environ Biol*, 1-10.
- Arribas-Hernández, L., Kielpinski, L. J., and Brodersen, P. (2016). mRNA decay of most Arabidopsis miRNA targets requires slicer activity of AGO1. *Plant Physiol*. 171, 2620–2632.
- Arshad, M., Ali, S., Noman, A., Ali, Q., Rizwan, M., Farid, M., Irshad, M.K. (2015). Phosphorus amendment decreased cadmium (Cd) uptake and ameliorates chlorophyll contents, gas exchange attributes, antioxidants, and mineral nutrients in wheat (*Triticum aestivum* L.) under Cd stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 37-41.

- Axtell, M.J. and Bartel, D.P. (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell* (17), 1658–73.
- Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., Kondo, M., Hamada, K., Yano, K., Nishimura, M., Matsuoka, M. (2009). Gibberellin Modulates Anther Development in Rice via the Transcriptional Regulation of GAMYB. *The Plant Cell Online* 21(5), 1453-1472.
- Backes, C., Meese, E., Lenhof, H.P. and Keller, A. (2010). A dictionary on microRNAs and their putative target pathways. *Nucleic Acids Res.* (38), 4476-4486.
- Bailey-Serres, J. and Voesenek, L.A. (2010). Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. *Curr. Opin. Plant Biol.* (13), 489-494.
- Bartel, B. and Bartel, D.P. (2003). MicroRNAs, at the root of plant development. *Plant Physiol* (132), 709-717.
- Bartel, D. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* (116), 281-297.
- Bartel, D.P. and Chen, C.Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* (5), 396–400.
- Blum, W. (1997). Cadmium uptake by higher plants. *In proceedings of extended abstracts from the fourth international conference on the Biogeochemistry of trace elements,,* (pp. 109-110). Berkeley, USA.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* (320), 1185–1190.
- Cardon, G., Hohmann, S., Klein, J., Nettlesheim, K., Saedler, H. (1999). Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene* (237), 91–104.
- Carrington, J. C., and Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* (301), 336–338.

- Chen, J., Zhang, S., Tong, J., Teng, X., Zhang, Z., Li, S., Teng, X. (2020). Whole transcriptome-based miRNA-mRNA network analysis revealed the mechanism of inflammation-immunosuppressive damage caused by cadmium in common carp spleens. *Science of The Total Environment* .
- Chen, L., Wang, T., Zhao, M., Tian, Q., & Zhang, W.-H. (2011). Identification of aluminum-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *Planta*, 235(2), 375–386.
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* (303), 2022–2025.
- Chen, X., Zhang, Z., Liu, D., Zhang, K., Li, A., Mao, L. (2010). Squamosa Promoter-Binding Protein-Like Transcription Factors: Star Players for Plant Growth and Development. *Journal of Integrative Plant Biology* 52(11), 946–951.
- Cheng, J.J. and Stomp, A.M. (2009). Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. *Clean* 2009 (37), 17–26.
- Cho, U. and Seo, N. (2004). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci.* (168), 113-120.
- Clemens, S., Aarts, M.G.M., Thomine, S., Verbruggen, N. (2013). Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci.* 18, 92–99.
- Curaba, J., Talbot, M., Li, Z., and Helliwell, C. (2013). Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinacy in barley. *BMC Plant Biol*, 13(1).
- Çelik, O. and Akdaş, E.Y. (2019). Tissue-specific transcriptional regulation of seven heavy metal stress responsive miRNAs and their putative targets in nickel indicator castor bean (*R. communis* L.) plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 682-690.
- Das, P., Samantary, S. and Rout, G.R. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Pollution* (98), 29-36.

- Davis, S.M., Drake, K.D. and Maier, K.J. (2002). Toxicity of boron to the duckweed *Spirodella polyrrhiza*. *Chemosphere* (48), 615-620.
- Ding, D., Zhang, L., Wang, H., Liu, Z., Zhang, Z., Zheng, Y. (2009). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany*, 29-38.
- Ding, Y., Chen, Z. and Zhu, C. (2011). Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Experimental Botany* (62), 3563–3573.
- Ding, Y., Gong, S., Wang, Y., Wang, F., Bao, H., Sun, J., Zhu, C. (2018). MicroRNA166 Modulates Cadmium Tolerance and Accumulation in Rice. *Plant Physiology*.
- Djami-Tchatchou, A. T., and Dubery, I. A. (2015). Lipopolysaccharide perception leads to dynamic alterations in the microtranscriptomes of *Arabidopsis thaliana* cells and leaf tissues. *BMC Plant Biol.*, 15:79.
- Djami-Tchatchou, A.T., Sanan-Mishra, N., Ntushelo, K., Dubery, I.A. (2017). Functional Roles of microRNAs in Agronomically Important Plants—Potential as Targets for Crop Improvement and Protection. *Frontiers in Plant Science* (8).
- Driever, S., Egbert, H. and Rudi, M. (2005). Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density. *Aquatic Botany* (81), 245-251.
- Ebert, M. a. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* (149), 515-524.
- Fang, X., Zhao, Y., Ma, Q., Huang, Y., Wang, P., Zhang, J., Nian, H., Yang, C. (2013). Identification and comparative analysis of cadmium tolerance associated miRNAs and their targets in two soybean genotypes. *PLoS One*, 8:81471.
- Fiorilli, V., Volpe, V., Zanini, S., Vallino, M., Abbà, S., Bonfante, P. (2015). A rice gras gene has an impact on the success of arbuscular mycorrhizal colonization. *Am. J. Plant Sci.* (6), 1905-1915.
- Fodor, A., Szabo-Nagy, A. and Erdei, L. (1995). The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *J. Plant Physiol* (14), 787-792.

- Gao, J., Luo, M., Peng, H., Chen, F., Li, W. (2019). Characterization of cadmium-responsive MicroRNAs and their target genes in maize (*Zea mays*) roots. *BMC Molecular Biology* (20), 14.
- Gielen, H., Remans, T., Vangronsveld, J. and Cuypers, A. (2016). Toxicity responses of Cu and Cd: the involvement of miRNAs and the transcription factor SPL7. *BMC Plant Biology* 16(1).
- Goldbol, D.L. and Hutterman, A. (1985). Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation on *Picea abies* seedlings and the significance of these metals to forest die back. *Environ. Pollution* (38), 375-381.
- Gouia, H., Gorbil, M.H. and Meyer, C. (2000). Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant*, 629-638.
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA registry. *Nucleic Acids Res* (32), 109-111.
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y. and Zhu, J. (2013). Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 74(5), 840-851.
- Guil, S. and Esteller, M. (2009). DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int. J. Biochem. Cell Biol* (41), 87-95.
- Guleria, P., Mahajan, M., Bhardwaj, J., and Yadav, S. (2011). Plant Small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. *Genom. Proteom. Bioinform*, 183–199.
- Guo, C., Xu, Y., Shi, M., Lai, Y., Wu, X., Wang, H., Wu, G. (2017). Repression of miR156 by miR159 Regulates the Timing of the Juvenile-to-Adult Transition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*.
- Guo, L., Yang, S., Zhao, Y., Zhang, H., Wu, Q., Chen, F. (2013). An integrated analysis method for miRNA, lncRNA and mRNA profiles based on their functional and positional relationships. *Engineering* (5), 38-41.

- Hatzfeld, Y., Lee, S., Lee, M., Leustek, T. and Saito, K. (2000). Functional characterization of a gene encoding a fourth ATP sulfurylase isoform from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* (248), 51-58.
- He, J.H., Han, Z.P., Zou, M.X., Wang, L., Y, Y.B., Zhou, J.B., Cao, M.R., Li, Y.G. (2018). Analyzing the lncRNA, miRNA, and mRNA regulatory network in prostate cancer with bioinformatics software, *J.Comput. Biol. Journal of Computational Biology*, 146–157.
- He, X., Zheng, W., Cao, F. and Wu, F. (2016). Identification and comparative analysis of the microRNA transcriptome in roots of two contrasting tobacco genotypes in response to cadmium stress. *Scientific Reports* 6(1).
- Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., Oldroyd, G. E. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* (21), 545–557.
- Horiguchi, G., Kim, G.T. and Tsukaya, H. (2005). The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* (43), 68-78.
- Hossain, M.d.S, Hoang, N.T., Yan, Z., Tóth, K., Meyers, B.C., Stacey, G. (2019). Characterization of the Spatial and Temporal Expression of Two Soybean miRNAs Identifies SCL6 as a Novel Regulator of Soybean Nodulation. *Front. Plant Sci.*, 10:475.
- Hsieh, L.C., Lin, S.I., Shih, A.C.C., Chen, J.W., Lin, W.Y., Tseng, C.Y., Li, W.H., Chiou, T.J. (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol* (151), 2120-2132.
- Huang, S.Q., Peng, J., Qiu, C.X., Yang, Z.M. (2009). Heavy metal-regulated new microRNAs from rice. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(2), 282-287.

- Islam, M.S., Kabir, M.S., Khan, S.I., Ekramullah, M., Nair, G.B., Sack, R.B., Sack, D.A. (2004). Wastewater-grown duckweed may be safely used as fish feed. *Can J Microbiol* (50), 51–56.
- Jalmi, S.K., Bhagat, P.K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K., Sinha, A.K. (2018). Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling. *Frontiers in Plant Science* (9).
- Jayasri, M.A. and Suthindhiran, K. (2016). Effect of zinc and lead on the physiological and biochemical properties of aquatic plant *Lemna minor*: its potential role in phytoremediation. *Applied Water Science* 7(3), 1247–1253.
- Jeong, D. (2016). Functional diversity of microRNA variants in plants. *J. Plant Biol* (59), 303-310.
- Jin, Q., Xue, Z., Dong, C., Wang, Y., Chu, L., Xu, Y. (2015). Identification and Characterization of MicroRNAs from Tree Peony (*Paeonia ostii*) and Their Response to Copper Stress. *PLOS ONE*, 10(2).
- Jones-Rhoades, M.W. and Bartel, D.P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress induced miRNA. *Mol. Cell* (14), 787-799.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D. P. and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Ann. Rev. Plant Biol* (57), 19-53.
- Kang, X.P., Gao, J.P., Zhao, J.J., Yin, H.X., Wang, W.Y., Zhang, P., Xu, J. (2017). Identification of cadmium-responsive microRNAs in *Solanum torvum* by high-throughput sequencing. *Russian Journal of Plant Physiology* 64(2), 283-300.
- Kaplan, E. (2017). Patateste Kuraklık ve Yüksek Sıcaklık Streslerine Tepkide Rol Oynayan miRNA'ların Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile Belirlenmesi. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell* (4), 205–217.
- Kataoka, T., Hayashi, N., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2004a). Root-to-shoot transport of sulfate in Arabidopsis. Evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiol.* (136), 4198-4204.
- Kawashima, C.G., Matthewman, C.A., Huang, S., Lee, B.R., Yoshimoto, N., Koprivova, A., Rubio-Somoza, I., Todesco, M., Rathjen, T., Saito, K., Takahashi, H., Dalmay, T. and Kopriva, S. (2011). Interplay of SLIM1 and miR395 in regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis. *Plant J.*, 863-876.
- Kawashima, C.G., Yoshimoto, N., Maruyama-Nakashita, A., Tsuchiya, Y.N., Saito, K., Takahashi, H. and Dalmay, T. (2009). Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant J* (57), 313-321.
- Khellaf, N. and Zerdaoui, M. (2009). Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L. *Bioresource Technology* (23), 6137–6140.
- Kim, J. S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K. (2012). Arabidopsis growth-regulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A. *Plant Cell*, 3393-3405.
- Kim, J.H. and Kende, H. (2004). A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* (101), 13374–13379.
- Kim, J.H., Choi, D.S. and Kende, H. (2003). The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *Plant J* (36), 94-104.

- Kitazumi, A., Kawahara, Y., Onda, T.S., De Koeyer, D., de Los Reyes, B.G. (2015). Implications of miR166 and miR159 induction to the basal response mechanisms of an andigena potato (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) to salinity stress, predicted from network models in *Arabidopsis*. *Genome* (58), 13–24.
- Kramer, M. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology* (15), 10-15.
- Krämer, U., Talke, I.N. and Hanikenne, M. (2007). Transition metal transport. *FEBS Lett*, 2263–2272.
- Kulshreshtha, A., Ranu, A., Manika, B. and Shilpi, S. (2014). A Review on bioremediation of heavy metals in contaminated water. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* (8), 44-50.
- Kutschera, U. and Niklas, K.J. (2014). Darwin-Wallace Demons: survival of the fastest in populations of duckweeds and the evolutionary history of an enigmatic group of angiosperms. *Plant Biology* (17), 24-32.
- Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (Lemnaceae), vol. 2. *Stiftung Rubel, Zürich: Geobotanischen Inst ETH*.
- Leblebici, Z. and Aksoy, A. (2011). Growth and Lead Accumulation Capacity of *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae): Interactions with Nutrient Enrichment. *Water, Air and Soil Pollution* 214(1-4), 175-184.
- 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), 843-854.
- Li, A., Zhang, J., Zhou, Z., Wang, L., Sun, X., Liu, Y. (2015). Genome-scale identification of mi RNA–mRNA and mi RNA–lnc RNA interactions in domestic animals. *Anim. Genet.* (46), 716-719.
- Li, G., Deng, Y., Geng, Y., Zhou, C., Wang, Y., Zhang, W., Song, Z., Gao, L. and Yang, J. (2017). Differentially Expressed microRNAs and Target Genes Associated with

- Plastic Internode Elongation in *Alternanthera philoxeroides* in Contrasting Hydrological Habitats. *Front. Plant Sci.* 8:2078.
- Li, J.C., Guo, J.B., Xu, W.Z., Ma, M. (2007). RNA Interference-mediated Silencing of Phytochelatin Synthase Gene Reduce Cadmium Accumulation in Rice Seeds. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(7), 1032–1037.
- Li, W.X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.J., Wu, J.M., Iida, K., Lu, X.Y., Cui, X., Jin, H. and Zhu, J.K. (2008). The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* 20, 2238-2251.
- Li, Y., Alonso-Peral, M., Wong, G., Wang M.B. and Millar, A.A. . (2016). Ubiquitous miR159 repression of MYB33/65 in Arabidopsis rosettes is robust and is not perturbed by a wide range of stresses. *BMC Plant Biology*, 179.
- Liang, G., Yang, F. and Yu, D. (2010). MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 1046-1057.
- Liebsch, D. and Palatnik, J.F. (2020). MicroRNA miR396, GRF transcription factors and GIF co-regulators: a conserved plant growth regulatory module with potential for breeding and biotechnology. *Current Opinion in Plant Biology*, 31-42.
- Liu, D., Song, Y., Chen, Z. and Yu, D. (2009). Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum*, 136(2), 223-236.
- Liu, S., Yang, R., Tripathi, D.K., Li, X., He, W., Wu, M., Ali, S., Ma, Q., Cheng, Q., Pan, Y. (2018.). The interplay between reactive oxygen and nitrogen species contributes in the regulatory mechanism of the nitro-oxidative stress induced by cadmium in arabidopsis. *J. Hazard. Mater* 344(C), 1007–1024.
- Loudet, O., Saliba-Colombani, V., Camilleri, C., Calenge, F., Gaudon, V.,Kurihara, Y. and Watanabe, Y. (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 12753–12758.

- Lu, M., Xu, X., Xi, B., Dai, Q., Li, C., Zhou, L. Su. X., Tang, M., Yao, Y., Yang, J. . (2018). Molecular network-based identification of competing endogenous RNAs in thyroid carcinoma. *Genes* 9 (1), 44.
- Ma, Z., Hu, X., Cai, W., Huang, W., Zhou, X., Luo, Q. (2014). Arabidopsis miR171-Targeted Scarecrow-Like Proteins Bind to GT cis-Elements and Mediate Gibberellin-Regulated Chlorophyll Biosynthesis under Light Conditions. *Plos One*, 1-12.
- Matkovich, S.J., Van Booven, D.J., Eschenbacher, W.H., Dorn G.W. (2010). RISC RNA sequencing for context-specific identification of in vivo microRNA targets. *Circ. Res.*
- McGrath, S.P., Dunham, S.J. and Correll, R.L. (1999). Phytoremediation of contaminated soil and water. 109-129.
- Meng, J., Liu, D., Sun, C. and Luan, Y. (2014). Prediction of plant pre-microRNAs and their microRNAs in genome-scale sequences using structure-sequence features and support vector machine. *BMC Bioinformatics* (15), 423.
- Meng, J., Shi, G.L., Luan, Y.S. (2016). Plant miRNA function prediction based on functional similarity network and transductive multi-label classification algorithm. *Neurocomputing* (179), 283-289.
- Mertens, D. (2005). Metal in Plants and Pet Foods. Official Methods of Analysis. In *AOAC Official Method* (p. 481). North Frederick Avenue, Gaithersburg, Maryland: 18th edn. Horwitz, W., and G.W. Latimer, (Eds). Chapter 3, pp 3-4.
- Millar, A.A. and Gubler, F. (2005). The Arabidopsis GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* (17), 705-721.
- Moreno, J.L., Hernandez, T. and Garcia, C. (1999). Effects of a cadmium-containing sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soils. *Biol. Fert. Soils* (28), 230-237.

- Ni, Y., Aghamirzaie, D., Elmarakeb, H., Collakova, E., Li, S., Grene, R., Heath, L.S. (2016). A machine learning approach to predict gene regulatory networks in seed development in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* (7), 1936.
- Niess, D. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiol. Biotech.* 51, 730-750.
- Noman, A. and Aqeel, M. (2017). miRNA-based heavy metal homeostasis and plant growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 10068–10082.
- OECD. (2002). Guidelines for the testing of chemicals Lemna sp. Growth Inhibition Test. *Draft guideline 221*.
- Omidbakhshfard, M.A., Proost, S., Fujikura, U., and Mueller-Roeber, B. (2015). Growth-regulating factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. *Mol. Plant* (8), 998-1010.
- Pantaleo, V., Szittyá, G., Moxon, S., Miozzi, L., Moulton, V., Dalmay, T., et al. (2010). Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Plant J.* 62, 960-976.
- Papp, I., Mette, M. F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S.E., Ray, A. (2003). Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol.* (132), 1382-1390.
- Pattanayak, G.K. and Tripathy, B.C. (2011). Overexpression of Protochlorophyllide Oxidoreductase C Regulates Oxidative Stress in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 6(10).
- Peláez, P., Trejo, M. S., Iñiguez, L. P., Estrada-Navarrete, G., Covarrubias, A. A., Reyes, J. L. (2012). Identification and characterization of microRNAs in Phaseolus vulgaris by high-throughput sequencing. *BMC Genomics* (13).
- Pinto, A.P., Mota, A.M., de Varennes, A., Pinto, F.C. (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Sci. Tot. Environ* (326), 239-247.

- Poethig, R. (2013). Vegetative phase change and shoot maturation in plants. *Current Top Dev Biol* (105), 125-152.
- Qiu, J., Zhou, Y.J., Mao, L.F., Ye, C.Y., Wang, W.D., Zhang, J.P., Yu, Y.Y., Fu, F., Wang, Y., Qian, F.J., Qi, T., Wu, S.L., Sultana, M.H., Cao, Y.N., Wang, Y., Timko, M.P., Ge, S., Fan, L.J., Lu, Y.L. (2017). Genomic variation associated with local adaptation of weedy rice during de-domestication. *Nat. Commun.* (8), 15323.
- Qiu, Z., Hai, B.Z., Guo, J.L., Li, Y.F., Zhang, L. (2016). Characterization of wheat miRNAs and their target genes responsive to cadmium stress. *Plant Physiology and Biochemistry* (101), 60-67.
- Ra, B. (1962). Phase change in higher plants and somatic cell heredity. *Quart Rev Biol* (37), 1-22.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., Bartel, D.P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* (20), 3407-3425.
- Reinhart, B.J. and Basson, M. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* (403), 901-906.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* (16), 1616-1626.
- Remans, T., Opdenakker, K., Guisez, Y., Carleer, R., Schat, H., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2012). Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature. *Environmental and Experimental Botany* (84), 61-71.
- Reyes, J.L. and Chua, N.H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal* (49), 592-606.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., Bartel, D.P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 513-520.
- Ronemus, M., Vaughn, M.W. and Martienssen, R.A. (2006). MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by ARGONAUTE,

- DICER, and RNA-dependent RNA polymerase in Arabidopsis. *Plant Cell* (18), 1559–1574.
- Saito, K. (2004). Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiol* (136), 2443–2450.
- Sanita, di Toppi L. and Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environ.Exp. Bot* (41), 105-130.
- Saygıdeğer, S. (1997). *Lemna gibba* L. ve *Lemna minor* L. (Lemnaceae)’nin Morfolojik Anatomik Ekolojik ve Fizyolojik Özellikleri. *Ekoloji Dergisi*, 8-11.
- Schommer, C., Bresso, E.G., Spinelli, S.V., and Palatnik, J.F. (2012). Role of microRNA miR319 in plant development. “MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses. in *Signaling and Communication in Plants*, Vol. (15), 29–47.
- Schulze, S., Schafer, B. N., Parizotto, E. A., Voinnet, O., and Theres, K. . (2010). Lost Meristems genes regulate cell differentiation of central zone descendants in arabidopsis shoot meristems. . *Plant J.* (64) , 668–678.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann,T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L. and Polle, A. (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology*, 887-898.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* (8), 517-527.
- Shriram, V., Kumar, V.,Devarumath, R.M., Khare, T.S. and Wani, S.H. (2016). MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science* (7), 817.
- Simon, S.A., Meyers, B.C., and Sherrier, D.J. (2009). MicroRNAs in the rhizobia legume symbiosis. *Plant Physiol* (151), 1002-1008.
- Singh, S.K., Pal Bhadra, M., Girschick, H.J., Bhadra, U. . (2008). MicroRNAs—micro in size but macro in function. *FASEB J.*275, 4929-4944.

- Song, J., Ye, A., Jiang, E., Yin, X., Chen, Z., Bai, G., Zhou, Y., Liu, J. (2018). Reconstruction and analysis of the aberrant lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA in CESC. *J. Cell. Bioc.* 119(8), 6665–6673.
- Sree, K.S., Bog, M. and Appenroth, K.J. (2016). Taxonomy of duckweeds (Lemnaceae), potential new crop plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 291-302.
- Sree, K.S., Sudakaran, S., Appenroth, K.J. (2015). How fast can angiosperms grow? Species and clonal diversity of growth rates in the genus *Wolffia* (Lemnaceae). *Acta Physiologiae Plantarum*, 37:204.
- Srivastava, S., Srivastava, A.K., Suprasanna, P. and D'Souza, S.F. (2012). Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in *Brassica juncea*. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 303-315.
- Starega-Roslin, J., Krol, J., Koscińska, E., Kozłowski, P., Szlachcic, W.J., Sobczak, K. (2011). Structural basis on microRNA length variety. *Nucl. Acids Res* (39), 257-268.
- Stobart, A.K., Griffiths, W., Bukhari, I.A., Sherwood, R.P. (1985). The effect of CD+2 on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant* (63), 293-298.
- Sun, G. (2012). MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant Mol. Biol.* (80), 17-36.
- Sun, G., Stewart, C. N. Jr., Xiao, P. and Zhang, B. (2012). MicroRNA expression analysis in the cellulosic biofuel crop Switchgrass (*Panicum virgatum*) under abiotic stress. *PLoS ONE*.
- Susarla, S., Medina, V. F., McCutcheon, S.C. (2002). Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* (18), 647-658.
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K. and Hell, R. (2011). Sulfur Assimilation in Photosynthetic Organisms: Molecular Functions and Regulations of Transporters and Assimilatory Enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 157-184.
- Tang, G. (2010). Plant microRNAs: an insight into their gene structures and evolution. *Cell Dev. Biol* (21), 782–789.

- Tang, G., Zhang, T., Wang, X., Song, Z., Liu, F., Zhang, Q., Huo, R. (2018). Sub-pathway analysis for severe burns injury patients: identification of potential key lncRNAs by analyzing lncRNA-mRNA profile. *Exp. Ther. Med.* 15 (6), 5281–5287.
- Tang, Z., Wu, Y., Yang, Y., Yang, Y.T., Wang, Z., Yuan, J., Yang, Y., Hua, C., Fan, X., Niu, G., Zhang, Y., Lu, Z.J., Li, K. (2017). Comprehensive analysis of long non-coding RNAs highlights their spatio-temporal expression patterns and evolutionary conservation in *Sus scrofa*. *Sci. Rep.*, 43166.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J. (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (101), 133-164.
- Telfer, A., Bollman, K.M. and Poethig, R.S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* (124), 645-654.
- Thompson, L. (6-9 Şubat 2009). Exciting Environmental Technologies. *Available Ni potentials of Batı Anadolu* (pp. 146-153). ANKARA: Ünver İ, Madenoğlu S, Özbek K, 2008.
- Todesco, M., Rubio-Somoza, I., Paz-Ares, J. and Weigel, D. (2010). A Collection of Target Mimics for Comprehensive Analysis of MicroRNA Function in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics*, 1-10.
- Tsuji, H., Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., Shimada, Y., Nakazono, M., Watanabe, R., Nishizawa, N.K., Gomi, K., Shimada, A., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. (2006). GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *Plant J.* (47), 427-444.
- Usami, T., Horiguchi, G., Yano, S., Tsukaya, H. (2009). The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development* (136), 955-964.

- Ustaoglu, D. Terzioğlu, K., Türe, H., Yılmaz, E., Tunca, E. (2015). Sucul Otolamlardaki Bakırın (CU), Su mercimeği (*Lemna minor* Linneaus 1753) ile Fitoremediasyonu. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 10-22.
- Valdés-López, O., Yang, S.S., Aparicio-Fabre, R., Graham, P.H., Reyes, J.L., Vance, C.P., Hernández, G. (2010). MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytologist* 187(3), 805-818.
- Van der Knaap, E., Kim, J.H. and Kende, H. (2000). A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiol* (122), 695–704.
- Van Hoeck, A., Horemans, N., Monsieurs, P., Cao, H., Vandenhove, H., Blust, R. (2015). The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research andbiotechnological applications. *Biotechnology for Biofuels* (8), 188.
- Velichkova, K., Sirakov, I., Valkova, E., Stoyanova, S., Kostadinova, G. (2017). Bioaccumulation and protein content of *Lemna minuta* Kunth and *Lemna valdiviana* Phil. in Bulgarian water reservoirs. *Scientific Papers. Series E. Land Reclamation, Earth Observation & Surveying, Environmental Engineering* 4, 104-107.
- Wang, J., Meng, X., Dobrovolskaya, O. B., Orlov, Y. L., Chen, M. (2017). Non-coding RNAs and Their Roles in Stress Response in Plants. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 15(5), 301–312.
- Wang, J.W. (2014). Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. *J Exp Bot* (65), 4723-4730.
- Wang, J.W., Czech, B. and Weigel, D. (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* (138), 738-749.
- Wang, J.W., Park, M.Y., Wang, L.J., Koo, Y., Chen, X.Y. (2011). miRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genet*.

- Wang, M., Wang, Q. and Zhang, B. (2013). Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 530(1), 26-32.
- Wang, Y., Li, K., Chen, L., Zou, Y., Liu, H., Tian, Y. (2015). MicroRNA167- directed regulation of the auxin response factors gmarf8a and gmarf8b is required for soybean nodulation and lateral root development. *Plant Physiol.* (168), 984-999.
- West,R.C. , Astle, M.J. and Beyer W.H. (1984). CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, 64th EDITION. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 2386.
- Wu, G. and Poethig, R.S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* (133), 3539–3547.
- Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.W., Weigel, D. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* (138), 750-759.
- Wu, Q., Guo, L., Jiang, F., Li, L., Li, Z., Chen, F. (2015). Analysis of the mi RNA-mRNA-lncRNA networks in ER+ and ER– breast cancer cell lines. *J. Cell. Mol. Med.* 19 (12), 2874–2887.
- Xiao, B.,Zhang, W.,Chen, L.,Hang, J., Wang, L.,Zhang, R., Liao, Y., Chen, J., Ma, Q., Sun, Z., Li, L. (2018). Analysis of the miRNA-mRNA-lncRNA network in human estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer based on TCGA data. *Gene* 658, 28-35.
- Xie, K., Wu, C. and Xiong, L. (2006). Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol* (142), 280-293.
- Xie, Z., Zhang, P., Zhao, J., Wang, R., Gao, J., Xu, J. (2017). Identification of microRNAs from Zn-treated *Solanum nigrum* roots by small RNA sequencing. *Acta Physiologiae Plantarum* 39(1).

- Xiong, J., Yang, Y.J., Fu, G., Tao, L.X. (2015). Novel roles of hydrogen peroxide (H₂O₂) in regulating pectin synthesis and dimethyl esterification in the cell wall of rice (*Oryza sativa*) root 35 tips. *New Phytol* (206), 118-126.
- Xu F, Liu Q, Chen L, Kuang J, Walk T, Wang J, Liao H. ((2013)). Genomewide identification of soybean microRNAs and their targets reveals their organ specificity and responses to phosphate starvation. *BMC genom* (14), 66.
- Yalçın, V. (2014). *Bazı Ağır Metallerin (Pb, Cd, Ni) Sucul Bitkiler (Salvinia natans (L.) All., Lemna minor L.) Üzerinde Yaptığı Stres ve Biyolojik Yanıtlar*. Nevşehir: Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yamaguchi, A., Wu, M.F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R.S. (2009). The microRNA-regulated SBPBox transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Dev Cell* (17), 268–278.
- Yan, Z., Hossain, M. S., Wang, J., Valdes-Lopez, O., Liang, Y., Libault, M. (2013). miR172 regulates soybean nodulation. *Mol. Plant Microbe Interact* (26), 1371-1377.
- Yan, Z., Hossain, M.S., Arikat, S., Valdes-Lopez, O., Zhai, J., Wang, J. (2015). Identification of microRNAs and their mRNA targets during soybean nodule development: functional analysis of the role of miR393j-3p in soybean nodulation. *New Phytol* (207), 748-759.
- Yang, J., Zhang, N., Mi, X., Wu, L., Ma, R., Zhu, X., Yao, L., Jin, X., Si, H., Wang, D. (2014). Identification of miR159s and their target genes and expression analysis under drought stress in potato. *Comput Biol Chem* (53), 204-213.
- Yang, Q., Pan, W. and Qian, L. (2017). Identification of the miRNA–mRNA regulatory network in multiple sclerosis. *Neurol. Res.* 39 (2), 142-151.
- Yang, S., Xie, J. and Li, Q. (2012). Oxidative Response and Antioxidative Mechanism in Germinating Soybean Seeds Exposed to Cadmium. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 9(8), 2827–2838.

- Ye, S., Yang, L., Zhao, X., Song, W., Wang, W., Zheng, S. . (2014). Bioinformatics method to predict two regulation mechanism: TF–miRNA–mRNA and lncRNA–miRNA–mRNA in pancreatic cancer. *Cell. Biochem. Biophys.* 70 (3), 1849-1858.
- Ying, S.Y., Chang, D.C. and Lin, S.L. (2008). The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. *Mol. Biotechnol* (38), 257-268.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2003). Phloem-localizing sulfate transporter, SULTR1;3 mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in Arabidopsis. *Plant Physiol.* (131), 1511-1517.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F.W., Yamaya, T. and Saito, K. (2002). Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in Arabidopsis roots. *Plant J* (29), 465-473.
- Zayed, A., Gowthaman, S. and Terry, N. (1998). *Journal of Environmental Quality*, 27, p., 715-721.
- Zayed, A., Gowthaman, S. ve Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of Trace Elements by Wetland Plants: I. Duckweed. *Journal of Environment Quality*, 27(3), 715.
- Zhang, B., Pan, X., and Stellwag, E. J. (2008). Identification of soybean microRNAs and their targets. *Planta* (229), 161-182.
- Zhang, B., Wang, Q. and Pan, X. (2007). MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J. Cell. Physiol* (210), 279-289.
- Zhang, G., Sun, H., Zhang, Y., Zhao, H., Fan, W., Li, J., Lv, Y., Song, Q., Li, J., Zhang, M., Shi, H. (2018). Characterization of dysregulated lncRNA-mRNA network based on ceRNA hypothesis to reveal the occurrence and recurrence of myocardial infarction. *Cell. Death. Discov.*, 35.
- Zhang, J., Liu, L., Li, J., Le, T.D. . (2018). LncmiRSRN: identification and analysis of long noncoding RNA related miRNA sponge regulatory network in human cancer. *Bioinformatics*, 4232–4240.

- Zhang, L.W., Song, J.B., Shu, X.X., Zhang, Y., Yang, Z.M. (2013). miR395 is involved in detoxification of cadmium in *Brassica napus*. *J Hazard Mat* (250), 204–211.
- Zhang, X., Zou, Z., Gong, P., Zhang, J., Ziaf, K., Li, H., Xiao, F. and Ye, Z. (2011). Overexpression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnology Letters* (33), 403-409.
- Zhang, Z., Wei, L., Zou, X., Tao, Y., Liu, Z., and Zheng, Y. (2008). Submergence-responsive microRNAs are potentially involved in the regulation of morphological and metabolic adaptations in maize root cells. *Ann. Bot.* 102, 509–519.
- Zhou, H., Liu, Q., Li, J., Jiang, D., Zhou, L., Wu, P., Lu, S., Li, F., Zhu, L., Liu, Z. (2012). Photoperiod and thermosensitive genic male sterility in rice are caused by a point mutation in a novel noncoding RNA that produces a small RNA. *Cell Res* (22), 649–660.
- Zhou, J., Jiao, F., Wu, Z., Li, Y., Wang, X., He, X., Zhong, W., Wu, P. (2008). OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiol* (146), 1673–1686.
- Zhou, M., Li, D., Li, Z., Hu, Q., Yang, C., Zhu, L. and Luo, H. (2013). Constitutive expression of a miR319 gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant Physiology* (161), 1375-1391.
- Zhu, X., Leng, X., Sun, X., Mu, Q., Wang, B., Li, X. (2015). Discovery of conservation and diversification of genes by phylogenetic analysis based on global genomes. *Plant Genome* (8).
- Ziegler, P., Adelmann, K., Zimmer, S., Schmidt, C., Appenroth, K.J. (2015). Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) – the most rapidly growing higher plants. *Plant Biology*, 33-41.

EKLER

Cd Ölçüm İstatistiği Anova

Factor codes	GRUP
--------------	------

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	4,177
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,047

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	2986809,1688	3	995603,0563
Within groups (other fluctuations)	119436,8884	8	14929,6110
Total	3106246,0572	11	

F-ratio	66,686
Significance level	P < 0,001

Tukey-Kramer test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	SD	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 0.SAAT	3	0,3507	0,3307	(2)(3)(4)
(2) 06.SAAT	3	823,6067	74,8950	(1)(4)
(3) 12.SAAT	3	1077,4333	149,4719	(1)
(4) 24.SAAT	3	1328,0667	178,2336	(1)(2)

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	accept Normality (P=0,4710)
--	-----------------------------



[Save residuals](#)

[Multiple comparison graph](#)

miRNA Anova İstatistik Değerleri

miR156 Anova İstatistik

Data	miR156
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	5,299
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,026

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	4,1549	3	1,3850
Within groups (other fluctuations)	1,0526	8	0,1316
Total	5,2075	11	

F-ratio	10,526
Significance level	P = 0,004

Tukey-Kramer test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	SD	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 0.SAAT	3	1,0017	0,07026	(2)
(2) 06.SAAT	3	2,0553	0,2545	(1)(4)
(3) 12.SAAT	3	1,4010	0,6496	(4)
(4) 24.SAAT	3	0,4410	0,1859	(2)(3)

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	accept Normality (P=0,0725)
--	-----------------------------

miR159 Anova İstatistik

One-way analysis of variance

Data	miR159
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	3,687
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,062

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	2,9814	3	0,9938
Within groups (other fluctuations)	1,2401	8	0,1550
Total	4,2215	11	

F-ratio	6,411
Significance level	P = 0,016

Tukey-Kramer test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	SD	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 0.SAAT	3	1,0133	0,1975	
(2) 06.SAAT	3	2,0140	0,5051	(4)
(3) 12.SAAT	3	1,5165	0,5433	
(4) 24.SAAT	3	0,7038	0,1753	(2)

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	accept Normality (P=0,9884)
--	-----------------------------



[Save residuals](#)

[Multiple comparison graph](#)

miR171 Anova İstatistik

One-way analysis of variance

Data	miR171
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	2,626
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,122

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	2,6346	3	0,8782
Within groups (other fluctuations)	2,1446	8	0,2681
Total	4,7792	11	

F-ratio	3,276
Significance level	P = 0,080

Factor	n	Mean	SD
(1) 0.SAAT	3	1,0961	0,5259
(2) 06.SAAT	3	2,0124	0,8191
(3) 12.SAAT	3	1,2891	0,2468
(4) 24.SAAT	3	0,7251	0,2528

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	accept Normality (P=0,4265)
--	-----------------------------



[Save residuals](#)

[Multiple comparison graph](#)

miR395 Anova İstatistik

One-way analysis of variance

Data	miR395
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	2,227
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,162

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	2,6127	3	0,8709
Within groups (other fluctuations)	1,8865	8	0,2358
Total	4,4991	11	

F-ratio	3,693
Significance level	P = 0,062

Factor	n	Mean	SD
(1) 0.SAAT	3	1,0639	0,4599
(2) 06.SAAT	3	1,4716	0,5950
(3) 12.SAAT	3	1,4944	0,6115
(4) 24.SAAT	3	0,3410	0,06157

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	accept Normality (P=0,7495)
--	-----------------------------

[Save residuals](#)[Multiple comparison graph](#)

miR396 Anova İstatistik

One-way analysis of variance

Data	miR396
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	7,968
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,009

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	2,6277	3	0,8759
Within groups (other fluctuations)	0,4687	8	0,05858
Total	3,0963	11	

F-ratio	14,951
Significance level	P = 0,001

Tukey-Kramer test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	SD	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 0.SAAT	3	1,0003	0,02773	(2)
(2) 06.SAAT	3	1,6957	0,09840	(1)(4)
(3) 12.SAAT	3	1,3925	0,4501	(4)
(4) 24.SAAT	3	0,4443	0,1461	(2)(3)

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	reject Normality (P=0,0203)
--	-----------------------------



[Save residuals](#)

[Multiple comparison graph](#)

mRNA Anova İstatistik Değerleri
SPL mRNA(miR156) Anova İstatistik
One-way analysis of variance

Data	SPL
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	2,727
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,114

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	0,0006080	3	0,0002027
Within groups (other fluctuations)	0,002776	8	0,0003470
Total	0,003384	11	

F-ratio	0,584
Significance level	P = 0,642

Factor	n	Mean	SD
(1) 0.SAAT	3	1,0000	0,002851
(2) 06.SAAT	3	1,0139	0,02494
(3) 12.SAAT	3	1,0100	0,01801
(4) 24.SAAT	3	1,0195	0,02081

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	accept Normality (P=0,4648)
--	-----------------------------



[Save residuals](#)
[Multiple comparison graph](#)

MYB mRNA(miR159) Anova İstatistik

One-way analysis of variance

Data	MYB
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	3,541
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,068

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	0,1283	3	0,04276
Within groups (other fluctuations)	0,3651	8	0,04563
Total	0,4934	11	

F-ratio	0,937
Significance level	P = 0,467

Factor	n	Mean	SD
(1) 0.SAAT	3	1,0288	0,2798
(2) 06.SAAT	3	0,8084	0,1879
(3) 12.SAAT	3	0,7536	0,2621
(4) 24.SAAT	3	0,8840	0,01560

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	accept Normality (P=0,4623)
--	-----------------------------



[Save residuals](#)

[Multiple comparison graph](#)

GRAS mRNA(miR171) Anova İstatistik

One-way analysis of variance

Data	GRAS
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	8,213
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,008

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	5,0002	3	1,6667
Within groups (other fluctuations)	1,3943	8	0,1743
Total	6,3945	11	

F-ratio	9,563
Significance level	P = 0,005

Tukey-Kramer test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	SD	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 0.SAAT	3	1,0086	0,2863	(2)(4)
(2) 06.SAAT	3	2,4749	0,7743	(1)(3)
(3) 12.SAAT	3	1,1443	0,02051	(2)
(4) 24.SAAT	3	2,2294	0,1238	(1)

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	reject Normality (P=0,0183)
---	-----------------------------



[Save residuals](#)

[Multiple comparison graph](#)

SULTR2 mRNA(miR395) Anova İstatistik

One-way analysis of variance

Data	SULTR2
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	4,863
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,033

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	1,3568	3	0,4523
Within groups (other fluctuations)	0,008581	8	0,001073
Total	1,3654	11	

F-ratio	421,637
Significance level	P < 0,001

Tukey-Kramer test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	SD	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 0.SAAT	3	1,0076	0,02353	(2)(3)(4)
(2) 06.SAAT	3	0,3209	0,05702	(1)(3)(4)
(3) 12.SAAT	3	0,2063	0,01921	(1)(2)
(4) 24.SAAT	3	0,1919	0,01080	(1)(2)

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	accept Normality (P=0,1110)
--	-----------------------------



[Save residuals](#)

[Multiple comparison graph](#)

GRF mRNA(miR396) Anova İstatistik

One-way analysis of variance

Data	GRF
Factor codes	GRUP

Sample size	12
-------------	----

Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	0,497
DF 1	3
DF 2	8
Significance level	P = 0,694

ANOVA

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	2,9289	3	0,9763
Within groups (other fluctuations)	1,6745	8	0,2093
Total	4,6034	11	

F-ratio	4,664
Significance level	P = 0,036

Tukey-Kramer test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	SD	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 0.SAAT	3	1,0498	0,3948	
(2) 06.SAAT	3	1,3721	0,6072	
(3) 12.SAAT	3	2,0886	0,5171	(4)
(4) 24.SAAT	3	0,7634	0,2131	(3)

Residuals

D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	accept Normality (P=0,7964)
--	-----------------------------



[Save residuals](#)

[Multiple comparison graph](#)

ÖZGEÇMİŞ

PERSONAL INFORMATION

Sex : Female
Date of Birth : 17/06/1994
Marital Status : Single
Nationality : Turkish
Driving License : B

CONTACT INFORMATION

Address : Tandoğan Mah.Zeki Uğur Cad. 40/3 Sincan/ANKARA
GSM : (534) 952 34 42
E-mail : mervesaglammbg@gmail.com

EDUCATION

Postgraduate	Anadolu University – Eskişehir – Biotechnology – 02/2017 – 02/2020 (3.66)
University	Bilecik Seyh Edebali University – Bilecik – Molecular Biology and Genetics – 09/2012 – 09/2016 (3.06)
High school	Sincan High School – Ankara – 09/2008 – 06/2012 (84.84)

WORK EXPERIENCE

02/2018 – 02/20	Atlas Biyoteknoloji / Ankara Molecular BIOLOG Gene-Expression Analyses, RT-PCR, Sanger Sequencing, Western Blot, SDS Page, PCR, Cell Culture Operations, Tunnel Assay, Comet Assay, Cell Viability Tests, Flow Cytometry, Bioinformatic Analyses, Gene Cloning, Apoptosis Analyses Methods, ELISA
-----------------	---

ADDITIONAL EDUCATION & CERTIFICATES

2013	Molecular Biology and Genetics Winter School / Istanbul University
2014	I. International Forensic Biology and Genetics Symposium/Ankara University
2016	International Molecular Biology and Biotechnology Congress/ State University of Tetova
04/2018	ICRESS(DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF HEXYTHIAZOX ON WHEAT ROOTS, DIETARY MIRNAS AND THEIR POTENTIAL AS DISEASE BIOMARKERS PRESENTATION)
06/2018	12. Applied Cell Culture and Molecular Biology Studies Course/Nisantasi University-Instructor Certificate
12/2018	13. Applied Cell Culture and Molecular Biology Studies Course/Nisantasi University-Instructor
06/2019	14. Applied Cell Culture and Molecular Biology Studies Course /Atlas Biotechnology-Instructor
12/2019	15. Applied Cell Culture and Molecular Biology Studies Course / Atlas Biotechnology-Instructor

COMPUTER SKILLS

Word, Excel, Powerpoint, BioEdit, Mega7, CodonCodeAligner, PerlPrimer, ImageJ, miR

English	Intermediate
---------	--------------

SOCIAL ACTIVITIES

Chess, Riding Horse

REFERENCES

Emel Sözen	Eskisehir Technical University – Professor - esozen@eskisehir.edu.tr
İsmail Poyraz	Bilecik Seyh Edebali University – Associate Professor – ismail.poyraz@bilecik.edu.tr
İlham Eroç Poyraz	Anadolu University – Assistant Professor – ieroz@anadolu.edu.tr