



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Arabidopsis thaliana*'da AZOT AÇLIĞI ve KURAKLIK
STRESLERİNİN MİKRO RNA ANLATIMLARI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seda YAŞAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özgür ÇAKIR**

Temmuz, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 9.07.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Özgür ÇAKIR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Özge KARAKAŞ METİN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 37185 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Tezden üretilmiş bir yayın yoktur.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca benden hiçbir desteğini esirgemeyen ve çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum değerli danışmanım Doç. Dr. Özgür ÇAKIR'a tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda ve eğitimim sırasında bilgi ve deneyimleriyle her daim destek olan Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA hocama,

Bitki yetiştirme çalışmalarımda sağladığı imkân için İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşe ŞEN hocama,

İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki hocalarıma, arkadaşlarıma ve Araş. Gör. Burcu ARIKAN'a,

Dostluklarıyla her zaman yanımda olan ve tezim boyunca benden desteklerini esirgemeyen Burcu KADIOĞLU, Elif PULAT, Handan YILMAZ, İdil KÖKTÜRK, Rümeysa EVLİ arkadaşlarıma,

Benimle her zaman gurur duyduğunu bildiğim biricik anneanneme,

Eğitim hayatım boyunca her zaman beni destekleyen ve varlıklarıyla daima beni mutlu eden annem Mevlüdiye YAŞAR, babam İsmail YAŞAR ve kardeşim Sefa YAŞAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz 2021

Seda YAŞAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
2.2. BİTKİLERDE STRES	7
2.2.1. Kuraklık Stresi.....	8
2.2.2. Azot Açlığı Stresi	9
2.3. MİKRORNA'LAR.....	10
2.3.1. Bitki miRNA Biyogenezi	10
2.3.2. GEN ANLATIMININ miRNA ARACILI DÜZENLENMESİ.....	13
2.4. miRNA ANLATIMININ GZPZR İLE ANALİZLERİ.....	14
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	17
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	17
3.2. BİTKİ BESİYERİ VE DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARI	17
3.2.1. MS Besiyerinin Hazırlanması.....	17
3.2.2. Azot Açlığı Besiyerinin Hazırlanması.....	19
3.2.3. Kuraklık Besiyerinin Hazırlanması	19
3.2.4. Azot Açlığı ve Kuraklık Kombine Besiyerinin Hazırlanması.....	20
3.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> TOHUMLARININ YÜZEY STERİLİZASYONU	21
3.4. BİTKİLERİN ÇİMLENDİRİLMESİ.....	21
3.5. KALLUS KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI	21
3.6. STRES UYGULAMASI.....	22
3.7. FİZYOLOJİK VE MORFOLOJİK ANALİZLER.....	22
3.7.1. Büyüme İndeksinin Belirlenmesi	22

3.7.2. Hücre Zarı Hasarı Analizi	22
3.8. RNA İZOLASYONU.....	23
3.9. RNA’LARIN KONSANTRASYON VE SAFLIĞININ BELİRLENMESİ.....	23
3.9.1. Spektrofotometre ile Ölçüm	23
3.9.2. Agaroz Jel Elektroforezi	24
3.10. cDNA SENTEZİ	25
3.11. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	27
3.11.1. Gen Anlatımı Analizinde Kullanılan miRNA’lar, Genler ve Özellikleri.....	28
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. TOHUM ÇİMLENMESİ VE KALLUS KÜLTÜRLERİNİN ELDE EDİLMESİ	33
4.2. STRES UYGULAMASININ MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ETKİLERİ	36
4.2.1. Kuraklık ve Azot Açlığının Büyüme İndeksine Etkisi.....	39
4.2.2. Zar Hasarının Belirlenmesi.....	42
4.3. KURAKLIK VE AZOT AÇLIĞI STRESLERİNİN miRNA ANLATIMLARINA ETKİSİ	43
4.3.1. RNA İzolasyonu	43
4.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	65
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2. 1:** *Arabidopsis thaliana* bitkisinin yaşam döngüsü (Woodward ve Bartel, 2018).5
- Şekil 2. 2:** *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* (Kavak) ağaçları ve tahıl bitkileri *Sorghum bicolor* ile *Oryza sativa* (Pirinç) karşılaştırmalı genomiklerinin Venn şemasıyla gösterimi (Woodward ve Bartel, 2018). Verilen türlerin birbirleriyle ortak ve benzersiz olan gen ailelerinin sayısını gösterir. *Arabidopsis* ve *Populus* dikotil, *Sorghum* ve *Oryza* monokotil bitkidir.6
- Şekil 2. 3:** Bitki miRNA öncülünün şematik gösterimi. Mavi renk miRNA/miRNA* dubleks yapısını, yeşil renk DCL1 kırılma bölgelerini ifade etmektedir (Rojas ve diğ., 2020).11
- Şekil 2. 4:** miRNA biyogenezinin basitleştirilmiş taslağı ve bitkilerdeki etki mekanizması (Krishnatreya ve diğ., 2021). Siyah oklar, miRNA biyogenezi sürecine dahil olan sıralı adımları göstermektedir. RdRP (RNA'ya bağımlı RNA Polimeraz), pri-miRNA (birincil miRNA) transkriptlerini kopyalar. RNAz III aktivitesine sahip DCL (DICER-LIKE) proteini önce pri-miRNA'yı keserek pre-miRNA (öncül miRNA) yapısının oluşumunu sağlar, daha sonra miRNA/miRNA* dubleksini serbest bırakmak için pre-miRNA'ları parçalar. Dubleksin her iki zincirinin de 3' ucu bu uçlardaki son nükleotitin ribozunda HEN1 (HUA artırıcı 1) tarafından metillenir. Dubleks (mavi okla gösterildiği gibi) HASTY yardımıyla nukleustan sitoplazmaya doğru hareket eder. Sitoplazmaya geçen dubleks yapı, AGO (ARGONAT) proteinine sahip olan RISC'ye (RNA-indüklenmiş Susturma Kompleksi) yüklenir. Yolcu iplik (miRNA*) kompleksin dışına çıkar ve kılavuz iplik hedef mRNA'nın bölünmesini ya da tamamlayıcı olma derecesine bağlı olarak translasyonunun inhibisyonunu sağlar.12
- Şekil 2. 5:** “Stem-loop” RT-PZR miRNA analizinin şematik gösterimi (Varkonyi-Gasic ve diğ., 2007).15
- Şekil 2. 6:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda amplifikasyon eğrisi (Bio-Rad Laboratories, 2006).16
- Şekil 4. 1:** 3 haftalık *A. thaliana* bitkileri.33
- Şekil 4. 2:** Boy ve kök uzaması için MS besiyeri içeren magentalara aktarılan üç haftalık *A. thaliana* bitkileri.34
- Şekil 4. 3:** MS besiyeri içeren magentalarda 14 gün büyütülen 5 haftalık *A. thaliana* bitkileri.34
- Şekil 4. 4:** Bitki kök eksplantlarından kallus kültürlerinin kurulması.35

Şekil 4. 5: 1 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerinde 30 günün sonunda gözlenen kallus oluşumu.....	35
Şekil 4. 6: Alt kültürlen kallusların 2,4-D içeren MS besiyerinde 30 günlük büyümesi. A: Kallus indüklemesi başlangıcı. B: 30 gün sonunda kalluslardaki değişim.	36
Şekil 4. 7: Stres besiyerlerine aktarılan kalluslar. A: 2,4-D MS kontrol besiyeri, B: 2,4-D Azot açlığı MS besiyeri, C: 2,4-D Kuraklık MS besiyeri, D: 2,4-D Kombine (Azot açlığı ve kuraklık) MS besiyeri.	37
Şekil 4. 8: 7 gün stres uygulaması yapılmış kalluslar. A: 7 gün 2,4-D MS kontrol besiyeri, B: 7 gün 2,4-D azot açlığı MS besiyeri, C: 7 gün 2,4-D kuraklık MS besiyeri, D: 7 gün 2,4-D kombine (azot açlığı ve kuraklık) MS besiyeri.	38
Şekil 4. 9: 14 gün stres uygulaması yapılmış kalluslar, A: 14 gün 2,4-D MS kontrol besiyeri, B: 14 gün 2,4-D azot açlığı MS besiyeri, C: 14 gün 2,4-D kuraklık MS besiyeri, D: 14 gün 2,4-D kombine (azot açlığı ve kuraklık) MS besiyeri.	39
Şekil 4. 10: 7 ve 14 gün stres uygulanmış olan kallus örneklerinin kontrol grubuyla birlikte ağırlıklarındaki değişimin grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	41
Şekil 4. 11: 7 ve 14 gün azot açlığı, kuraklık ve kombine stres uygulanmış kallus örneklerinin kontrol gruplarıyla birlikte % Zar Hasarı grafiği.....	43
Şekil 4. 12: Stres uygulaması yapılmış kallus örneklerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel görüntüsü.	45
Şekil 4. 13: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR165a-3p, miR165b anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	46
Şekil 4. 14: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR167a-5p, miR167b anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	47
Şekil 4. 15: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR167c-5p anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	48
Şekil 4. 16: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR167d anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	49
Şekil 4. 17: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR169b-5p, miR169c anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	50
Şekil 4. 18: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR169h, miR169i, miR169j, miR169k, miR169l, miR169m,	

miR169n anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	51
Şekil 4. 19: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR169d, miR169e, miR169f-5p, miR169g-5p anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	52
Şekil 4. 20: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR319a, miR319b anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	53
Şekil 4. 21: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR319c anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	54
Şekil 4. 22: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR396-5p anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	55
Şekil 4. 23: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR396b anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	56
Şekil 4. 24: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399a anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	57
Şekil 4. 25: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399b anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	58
Şekil 4. 26: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399d anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	59
Şekil 4. 27: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399e anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	60
Şekil 4. 28: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399f anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	61
Şekil 4. 29: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR827 anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).	62
Şekil 4. 30: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında kontrol grubuna göre 7. ve 14. gün miRNA anlatımlarını ifade eden şematik gösterim.	64

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3. 1: MS temel tuz karışımı bileşenleri (Murashige ve Skoog, 1962).....	18
Tablo 3. 2: MS besiyeri bileşenleri ve konsantrasyonları.	19
Tablo 3. 3: 50X TAE hazırlanışı (Koontz, 2013).	24
Tablo 3. 4: cDNA sentezi için “stem-loop” primerleri ile hazırlanan primer havuzları.....	25
Tablo 3. 5: cDNA sentez reaksiyon bileşenleri.	26
Tablo 3. 6: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.....	26
Tablo 3. 7: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu bileşenleri.	27
Tablo 3. 8: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.	27
Tablo 3. 9: GZPZR için anlatım analizi yapılmış olan miRNA’lar, erişim numaraları ve dizileri.	28
Tablo 3. 10: cDNA sentezinde ve GZPZR’de kullanılacak olan miRNA stem-loop, ileri ve evrensel geri primerleri.	29
Tablo 3. 11: Tez kapsamında, stres koşulları altında değişimleri incelenmiş olan miRNA aileleri, etkilendikleri stres faktörleri ve bitkideki potansiyel görevleri.....	31
Tablo 3. 12: GZPZR için kullanılan <i>Aktin</i> referans geninin forward ve reverse primerleri (Sáenz-Mata ve diğ., 2014).	32
Tablo 4. 1: 7 ve 14 gün boyunca azot açlığı, kuraklık ve kombine stres uygulanmış olan kallus örneklerinin kontrol gruplarıyla birlikte ağırlıklarındaki değişim.....	40
Tablo 4. 2: 7 ve 14 gün stres uygulanmış kallus örneklerinin kontrol grubuyla birlikte % Zar Hasarı değerleri.	42
Tablo 4. 3: Stres uygulaması yapılmış kallus örneklerinden izole edilen RNA'ların spektrofotometre değerleri.	44
Tablo 4. 4: miRNA anlatımlarının 7 ve 14 gün azot açlığı, kuraklık ve kombine stresleri uygulaması sonrası değişim katsayıları. ($\pm$ SH): Standart hatayı göstermektedir.	63

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak
°C	: Derece Santigrat
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
atm	: Atmosfer
cm	: Santimetre
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
U	: Ünite
V	: Volt
KNO ₃	: Potasyum Nitrat
NH ₄ NO ₃	: Amonyum Nitrat
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum Sülfat Heptahidrat
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum Klorid Dihidrat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
MnSO ₄ .4H ₂ O	: Manganez Sülfat Tetrahidrat
KI	: Potasyum İyodür
H ₃ BO ₃	: Borik Asit
ZnSO ₄ .7H ₂ O	: Çinko Sülfat Heptahidrat
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır Sülfat Pentahidrat
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	: Sodyum Molibdat Dihidrat
CoCl ₂ .6H ₂ O	: Kobalt Klorid Hekzahidrat
FeSO ₄ .7H ₂ O	: Demir Sülfat Heptahidrat
Mb	: Megabaz
Mbç	: Megabaz çifti

Bç	: Baz çifti
HCl	: Hidrojen Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
N	: Azot
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksiasetik asit
NO₃⁻	: Azot nitrat
NH₄⁺	:Amonyum

Kısaltmalar

Açıklama

ABA	: Absisik asit
AGO	: ARGONAT proteini
ARF	: AUXIN RESPONSE FACTOR
cDNA	: Komplementer DNA
Ct	: Eşik döngüsü
Col-0	: Columbia ecotype
DCL	: DICER-LIKE protein
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleil Asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid Trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
FW	: Son ağırlık
g	: Rölatif Santrifüj Kuvveti, “RCF”
GRL	: GROWTH REGULATION FACTOR
GZPZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
IW	: Başlangıç ağırlığı
lncRNA	: Uzun kodlanmayan RNA
MS	: Murashige ve Skoog
MES	: 2-(N-morfolino) etansülfonik asit
miRNA	: MikroRNA
Mpa	: Ozmatik Potansiyel
ncRNA	: Küçük kodlanmayan RNA (“noncoding RNA”)

NSI	: Azot açlığı uyarılmış (“N-starvation- induced”)
NLA	: Azot Sınırlama Adaptasyonu (“Nitrogen Limitation Adaptation”)
NR	: Nitrat Redüktaz
NSS	: Azot açlığı bastırılmış (“N-starvation-supressed”)
pre-miRNA	: Öncül miRNA (“precursor miRNA”)
pri-miRNA	: Birincil miRNA (“primary miRNA”)
PEG	: Polietilen glikol
PHO2	: FOSFAT2 (“PHOSPHATE2”) proteini
RdRP	: RNA’ya bağımlı RNA Polimeraz
RISC	: RNA-İndüklenmiş Susturma Kompleksi (“RNA-Induced Silencing Complex”)
RNA	: Ribonükleik Asit
RTPZR	: Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RWC	: Bağlı su içeriği (“Relative Water Content”)
siRNA	: Küçük interferans RNA (“small-interference RNA”)
TAE	: Tris-asetat EDTA
UV	: Ultra Viyole
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (“Reactive Oxygen Species”)
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (“Rotation per minute”)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Arabidopsis thaliana*'da AZOT AÇLIĞI ve KURAKLIK STRESLERİNİN MİKRORNA ANLATIMLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seda YAŞAR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Özgür ÇAKIR

Kodlama yapmayan RNA'ların bir grubunu oluşturan mikroRNA'lar (miRNA), genellikle 20-22 nükleotit uzunluğundadırlar ve gen anlatımının düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir. MikroRNA'ların, hayvanların ve bitkilerin gelişiminde ve pek çok biyolojik süreçte önemli görevleri vardır. miRNA aracılı gen anlatımı düzenlenmesi genel olarak iki şekilde olur: Hedef mRNA'nın translasyonunu inhibe ederek veya yıkımına yol açarak. İlk olarak bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiş olan miRNA'lar, bitkilerin büyüme ve gelişim süreçlerinde görev alan genleri ve transkripsiyon faktörlerini hedef alarak onların çeşitli koşullar altında anlatımlarını düzenler.

Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi etkileyen kuraklık, tuzluluk, besin açlığı gibi çeşitli stres faktörlerinin miRNA'ların anlatımlarını değiştirdiği ve bu sayede, hedef genlerin anlatımının düzenlendiği bilinmektedir. Bu tez kapsamında bitki gelişimi ve büyümesini önemli derecede etkileyen iki farklı stres koşulu olan kuraklık ve azot açlığının miRNA anlatımlarında yol açtığı değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Doku kültürü çalışmalarıyla *Arabidopsis thaliana* bitkilerinden kallus dokuları elde edildikten sonra RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve çeşitli miRNA'lara özgü primerlerle cDNA sentezi yapılmıştır. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZPZR) yöntemi ile hedeflenen miRNA'ların anlatımlarındaki değişimler analiz edilmiştir. Ek olarak zar hasarı ve büyüme oranları belirlenmiştir. Zar hasarı sonuçları, kontrol grupları ile stres uygulamaları

arasında anlamlı bir değişiklik olmadığını ortaya koymuştur. Büyüme indeksi oranlarında, 7. gün kontrol örneği ile kuraklık (**** $p<0.0001$) ve kombine (** $p<0.0006$) stres uygulamasında anlamlı bir farklılık olduğu, azot açlığı stres uygulaması sonucunda ağırlık değişiminin ise anlamlı olmadığı görüldü. Bununla birlikte, 14. gün kontrol örneği ile azot açlığı (* $p<0.0124$) ve kombine (** $p<0.0024$) stres uygulamaları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü.

miRNA anlatımlarının Tek Yönlü ANOVA Tukey Testi ile analizi sonucunda miR165a-3p, miR165b örneklerinde 7 ve 14 gün uygulamalarının tamamında anlamlı azalma, miR167a-5p, miR167b kallus örneklerinde 7 gün stres uygulamalarının tamamında azalma görülürken 14 gün uygulamalarında değişimlerin anlamlı olmadığı görülmüştür. miR167c-5p'nin 7 gün stres uygulaması yapılan örneklerde kuraklık ve kombine uygulamalarında azaldığı, 14 gün stres uygulaması yapılan örneklerde azot açlığında anlamlı olarak arttığı, kuraklık ve kombine uygulamalarında ise azaldığı görülmüştür. miR167d anlatımının 7 ve 14 gün azot açlığı uygulamasında anlamlı olarak arttığı, 7 gün kombine ve 14 gün kuraklık ile kombine stres uygulamalarında ise anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. miR169b-5p, miR169c anlatım analizleri sonucunda 7 gün kombine ve 14 gün kuraklık ile kombine stres uygulamalarında anlamlı bir azalma olduğu, miR169h-n, miR169d,e,f-5p,g-5p üyelerindeki stres uygulamalarının tamamında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. miR319a,b anlatımının 7 gün stres uygulamalarının tamamında azaldığı, 14 gün stres uygulaması sonucunda ise yalnızca kuraklık koşulu altında anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. miR319c anlatımının, kallus örneklerine 7 gün uygulanan kuraklık ve kombine streslerde anlamlı azaldığı, 14 gün stres uygulaması sonucunda azot açlığında anlamlı olarak arttığı, geri kalan kuraklık ve kombine de stres koşullarında ise anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. miR396a-5p anlatımının 7 gün stres koşulları altındaki değişiminin anlamlı olmadığı, 14 gün stres uygulamalarının tamamında anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. miR396b'nin 7 gün stres uygulamaları sonucunda tüm stres koşulları altında azaldığı, 14 gün kombine stres uygulaması sonucunda ise anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir. miR399a anlatımının 7 gün kuraklık ve kombine uygulamasında anlamlı azaldığı, 14 gün kuraklık stresi uygulamasının ardından anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir. miR399b'nin 7 gün stres koşulları altındaki değişiminin anlamlı olmadığı, 14 gün stres koşullarının tamamında anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. miR399d'nin 7 ve 14 gün uygulanan stres koşullarının tümünde azaldığı belirlenmiştir. miR399e'nin 14 gün azot açlığı stresi uygulaması sonucunda anlamlı arttığı belirlenirken, 7 ve 14 gün uygulanan kuraklık ve kombine streslerde anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. miR399f anlatımının 7 gün azot açlığı ve kombine stres koşulu altında anlamlı azaldığı, geri kalan stres koşulları altında anlamlı olarak değişim olmadığı görülmüştür. miR827 anlatımının 7 gün uygulanan stres koşullarının tamamında anlamlı olarak azaldığı, 14 gün azot açlığında anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada anlatım analizleri yapılan miRNA'ların azot açlığı ve kuraklık streslerindeki değişimin yanı sıra kombine stres koşulunda da anlatımlarının farklı olduğu görülmüş, buna ek olarak 7 ve 14 günlük uygulamalar ile stres yanıtında oluşan değişimlerin miRNA'lar ile ilişkili moleküler mekanizmaların aydınlatılması için önemli olabileceği düşünölmüştür.

Temmuz 2021, 100. sayfa.

Anahtar kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, miRNA, kuraklık, azot açlığı.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NITROGEN STARVATION AND DROUGHT STRESSES ON MICRORNA EXPRESSIONS IN *Arabidopsis thaliana*

Seda YAŞAR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Özgür ÇAKIR

MicroRNAs (miRNAs) which involve in non-coding RNAs has generally 20-22 nucleotides long and they have responsibility for regulation of gene expression. miRNAs have important roles in the development of animals and plants and in many biological processes. miRNA mediated gene regulation occur in two different ways: Inhibition of translation of target mRNA or degradation of target mRNA. Gene expression is regulated by miRNAs which are discovered in *Caenorhabditis elegans*. miRNAs target genes and transcription factors include growth and development processes of plants in various stress conditions.

It is known that several stres factors such as drought, salt and starvation, which effect development and growth in plants, change miRNAs expression and regulate target genes expression.

In this thesis, it is aimed to investigate the changes in miRNA expression levels by drought treatment and nitrogen starvation, which are two different stress conditions affecting significantly development and growth in plants. It was targeted to establish *Arabidopsis thaliana* with plant tissue culture techniques, to achieve RNA isolation from these plants and to synthesize cDNA with specific primers to various miRNAs. Differences and changes in expression of targeted miRNAs were analyzed by Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) method. In addition, growth index and ion leakages were analyzed by

Tukey Test and ion leakages had no significant data for all callus tissue under different stress conditions. miRNA expressions were analyzed by One Way ANOVA Tukey Test and nearly all miRNAs that selected had significant results. From growth index rates, it is inferred that there is a significant change under 7-day applications of drought (**** $p < 0.0001$) and combination (*** $p < 0.0006$) stress compared to control samples, while under nitrogen deficiency conditions no significant changes in weight were observed. In addition, there was a significant difference between nitrogen starvation (* $p < 0.0124$) and combination stress (** $p < 0.0024$) compared to control conditions of 14-day application.

As a result of One way ANOVA Tukey Test analysis of miRNA expressions, all of the 7 and 14-day applications of miR165a-3p, miR165b samples showed significant downregulation, while miR167a-5p, miR167b showed decrease in all 7-day stress applications and no significant change in 14-day applications. miR167c-5p expression decreased for 7-day applications of drought and combination stress while significantly increasing for 14-day nitrogen starvation and decreasing for drought and combination samples. Significant upregulation of miR167d during 7 and 14-day nitrogen starvation applications, and downregulation during 7-day combination, 14-day drought and combination conditions were observed. Expressions of miR169b-5p, miR169c, significantly decreased as a result of 7-day combination and 14-day drought and combination stress, while miR169h-n, miR169d,e,f-5p,g-5p showed no significant change under any of the stress applications. During all of the 7-day stress conditions, miR319a,b expressions were downregulated, when for 14-day samples only drought conditions resulted in downregulation. Strong downregulation of miR319c was observed in callus tissues that were treated with 7-day drought and combination stress, along with upregulation for 14-day nitrogen starvation and downregulation for the remaining drought and combination conditions. miR396a-5p expression under 7-day stress application were found to be non-significant, all 14-day samples displayed significant decrease. For all 7-day samples under every stress application, miR396b was downregulated, when 14-day combination samples showed upregulation. Under 7-day drought and combination applications significant decrease of miR399a expression and under 14-day drought stress a significant increase was determined. For miR399b expression under 7-day stress conditions, no significant change was observed while expressions of all 14-day samples strongly decreased. miR399d exhibited downregulation for all stress conditions applied for 7 or 14 days. While miR399e expression increased in 14 day nitrogen starvation samples, it was downregulated under 7 and 14-day drought and combination stresses. Expression level of miR399f significantly dropped under 7-day nitrogen starvation and combination stress conditions, where the remaining samples displayed no significant change. miR827 expression was downregulated for 7-day applications of all stress conditions, while significantly increasing under 14 day nitrogen starvation.

Aside from the changes of expression under nitrogen starvation and drought stresses, miRNAs for which the expression analyses were performed in this study, are also shown to be variable under the combination of two stress conditions, additionally, the changes occurring in stress responses between 7 and 14-day applications are believed to be valuable to elucidate the associated molecular mechanisms of miRNAs.

July 2021, 100. pages.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, miRNA, drought, nitrogen starvation.

1. GİRİŞ

Bitkilerin bulundukları çevrede karşılaştıkları çevresel faktörler stres olarak tanımlanır ve bitkinin gelişimini, büyümesini, hayatta kalabilmesini etkileyebilirler. Biyotik ve abiyotik stres olarak gruplandırılan stres faktörleri bakteri, mantar, yüksek ya da düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, ağır metaller, besin eksikliği, radyasyon, sel gibi etkenler olabilir (Mahajan ve Tuteja, 2005; Fedoroff ve diğ., 2010; Hacquard ve diğ., 2017; Hussain ve diğ., 2018).

Kuraklık ve azot açlığı stresleri bitkiler için en önemli faktörlerindendir (Clarkson, 1996). Bu iki stres faktörü bitkinin gelişimini, verimini ve büyümesini önemli ölçüde etkilemekle beraber morfolojik ve fizyolojik olarak da değişikliklere sebep olmaktadır (Challinor ve diğ., 2004; Wang ve diğ., 2004; Anithakumari ve diğ., 2012). Kuraklık stresine maruz kalan bitki, anti-oksidatif savunma sistemlerini aktif hale getirerek yanıt oluşturur (Duan ve diğ., 2007; Praba ve diğ., 2009; Anjum ve diğ., 2011). Anti-oksidatif savunma sistemleri, Reaktif Oksijen Türleri (ROS; “Reactive Oxygen Species”) ile ilişkilidir ve ROS üretimi kuraklık stresine karşı verilen ilk erken yanıttır (Miller ve diğ., 2010). Azot açlığı stresine karşı oluşturulan yanıtta ise nitrat redüktaz (NR) enziminin aktivitesinde düşüş olduğu ve azotun farklı formlarının bu stres faktörüyle ilişkili olduğu görülmüştür (Scheible ve diğ., 1997; Wang ve diğ., 2004; Kant ve diğ., 2011).

Bitkiler sahip oldukları karmaşık metabolizma sayesinde biyokimyasal araştırmalar için diğer organizmaların çoğuna kıyasla daha fazla önem taşırlar. *Arabidopsis thaliana* bitkisinin tohumlarının küçük olması, kolay kültürlenebilmesi ve hızlı büyümesi gibi avantajları sayesinde araştırmalarda fazlasıyla tercih edilir (Leutwiler ve diğ., 1984; Meyerowitz ve Pruitt, 1985; Provart ve diğ., 2016; Woodward ve Bartel, 2018). Bu özelliklere ek olarak, genomunun küçük olması, beş kromozomunun olması *A. thaliana*’nın model organizma olarak seçilmesini teşvik etmiştir (Cheng ve diğ., 2017). Model organizma olarak *Arabidopsis thaliana*’nın kullanılması, bitki yapısı ve işlevlerinin keşfini hızlandırmıştır (Koorneef ve Meinke, 2010; Woodward ve Bartel, 2018).

MikroRNA’lar (miRNA’lar), düzenleyici, kodlama yapmayan, tek iplikli, 20-24 nükleotit uzunluğundaki küçük RNA’lardır (Llave ve diğ., 2002; Dinger ve diğ., 2008; Bustin, 2015; Cheng ve diğ., 2017). Hayvanlarda ve bitkilerde transkripsiyon sonrası gen anlatımının

düzenlenmesinde görevli olan miRNA'lar ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiştir. Bu keşfin ardından bitkilerde miRNA'lar ilk olarak *Arabidopsis*'te gösterilmiştir (Lee, Feinbaum ve Ambros, 1993; Llave ve diğ., 2002; Reinhart ve diğ., 2002). miRNA'lar evrimsel olarak korunmuşluğa sahiptir ve miRNA biyogenezi sırasında meydana gelebilecek bir mutasyon, bitki için hayati önem taşıyabilir (Yu ve diğ., 2017).

Bitki miRNA'ları transkripsiyon faktörlerini ve stres ile düzenlenen genleri hedefler (Llave ve diğ., 2002; Sunkar ve Zhu, 2004; Sunkar ve diğ., 2006). Bu hedeflemeyi gen anlatımını baskılayarak yaparlar (Tang ve diğ., 2003; Mallory ve diğ., 2004).

miRNA anlatım analizlerini yapabilmek için geleneksel yöntemler yetersiz kalmıştır ve bu sebeple miRNA'ların tespitinde kullanılmak üzere Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZPZR) tekniği geliştirilerek optimize edilmiştir (Chen ve diğ., 2005; Tang ve diğ., 2006).

Bu tez kapsamında, *Arabidopsis thaliana* Col-0 bitkisinden kallus kültürleri kurulmuş, kallus örneklerine azot açlığı, kuraklık ve bu iki stresin 7 ve 14 gün boyunca birlikte uygulamasının büyüme indeksine etkisi, oluşturduğu zar hasarı ve stresle ilişkili miRNA'ların anlatımları değerlendirilmiştir. *A. thaliana* Col-0 tohumları MS besiyerinde çimlendirildikten 2 hafta sonra MS besiyerlerinde 14 gün boy uzaması sağlanmış ve ardından 1 mg/l 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren MS besiyerlerinde kök dokularından kallus kültürleri kurulmuştur. İlk alt kültürlemenin ardından kallus örnekleri azot açlığı, kuraklık ve kombine stres uygulaması için stres besiyerlerine aktarılmıştır.

Büyüme indeksi ve zar hasarı incelenen stres uygulanmış örneklerde zar hasarında anlamlı değişim görülmezken, kuraklık ve kombine stres uygulamalarının kallus büyümesini anlamlı olarak azalttığı görülmüştür.

Uygulama yapılan *A. thaliana* kallus örneklerinden RNA izolasyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve uygulanan stres koşullarıyla ilişkili olan miRNA'ların GZPZR yöntemi ile anlatım analizleri incelenmiştir. miRNA'ların anlatımlarının stres koşulları altında farklı gün uygulamalarına bağlı olarak da değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan bu tez çalışması, miRNA'lar ve hedefledikleri genlerin görevli olduğu moleküler mekanizmaların aydınlatılması için farklı stres koşullarının bir arada değerlendirilmesi ve strese maruz kalınan süreyle ilişkilendirilmesi bakımından önem taşıdığı düşünülmektedir.



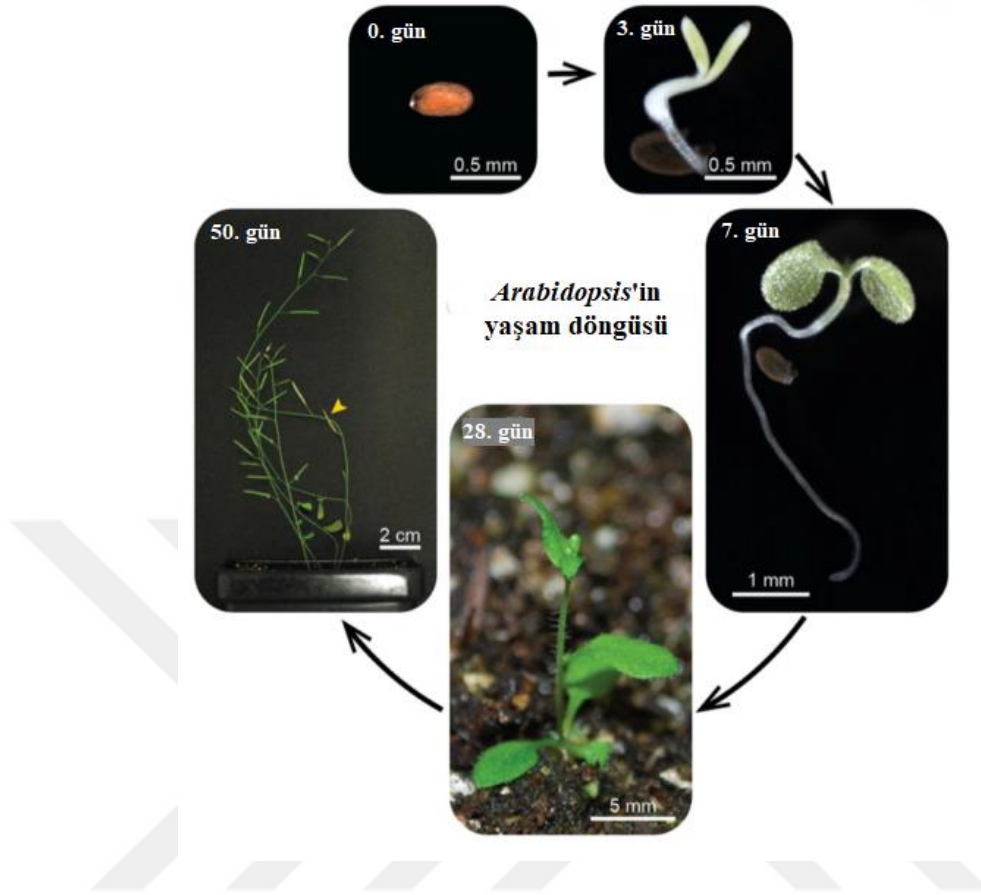
2. GENEL KISIMLAR

2.1. *Arabidopsis thaliana*

Dr. Johannes Thal tarafından Almanya'nın Harz Dağları'nda keşfedilmiş olan *Arabidopsis thaliana* bitkisi, ilk keşfedildiğinde *Pilosella siliquata* olarak isimlendirilmiştir (Wagenitz, 2008; Woodward ve Bartel, 2018). Daha sonra Linnaeus bitkiyi taksonomik olarak *Arabis* cinsine yerleştirirken, Thal'ın anısına bitkiyi *Arabis thaliana* olarak yeniden isimlendirmiştir (Woodward ve Bartel, 2018). İlerleyen zamanlarda farklı şekillerde de isimlendirilen bitki son olarak *Arabidopsis* türleri arasında sınıflandırılmıştır (Holl ve Heynhold, 1842; Casper, 1990; Candolle ve Candolle, 2011). Friedrich Laibach, deneysel *Arabidopsis* araştırmalarının kurucusudur ve bitkiye ait kromozomları tanımlamıştır (Laibach, 1943; Steinitz-Sears, 1963; Koornneef ve Meinke, 2010; Somssich, 2018). Laibach ayrıca *Arabidopsis*'in genetik çalışmalar açısından uygun olduğuna dair veriler ortaya koymuştur (Laibach, 1943).

Modern bilimin ve teknolojinin gelişmesine ek olarak *Arabidopsis thaliana*'nın model organizma olarak görülmesiyle birlikte bitki yapısı ve işlevlerinin keşfi hızlanmıştır. Buna ek olarak, *A. thaliana* Franz Josef Kribben tarafından 1964 yılında botanik *Drosophila*'sı olarak tanımlanmıştır (Koornneef ve Meinke, 2010; Woodward ve Bartel, 2018).

Bitkiler sundukları birçok avantaj sayesinde çeşitli araştırmalarda kullanılırlar. Diğer organizmaların çoğuna kıyasla metabolik karmaşıklığı sayesinde biyokimyasal araştırmalar için büyük önem taşırlar. Diğer bitki türleriyle karşılaştırıldığında ise *A. thaliana* tohumları çok küçüktür, hızlı büyür, kolayca yetiştirilebilir ve kendi kendine tozlaşabilir. Büyüme koşullarına bağlı olarak bir *Arabidopsis thaliana* tohumunun çimlendirilmesinden olgun ve tohum taşıyan bir bitki halini almasına kadar geçen süre yaklaşık altı haftadır (Şekil 2.1) (Leutwiler, ve diğ., 1984; Meyerowitz ve Pruitt, 1985; Provart ve diğ., 2016; Woodward ve Bartel, 2018).

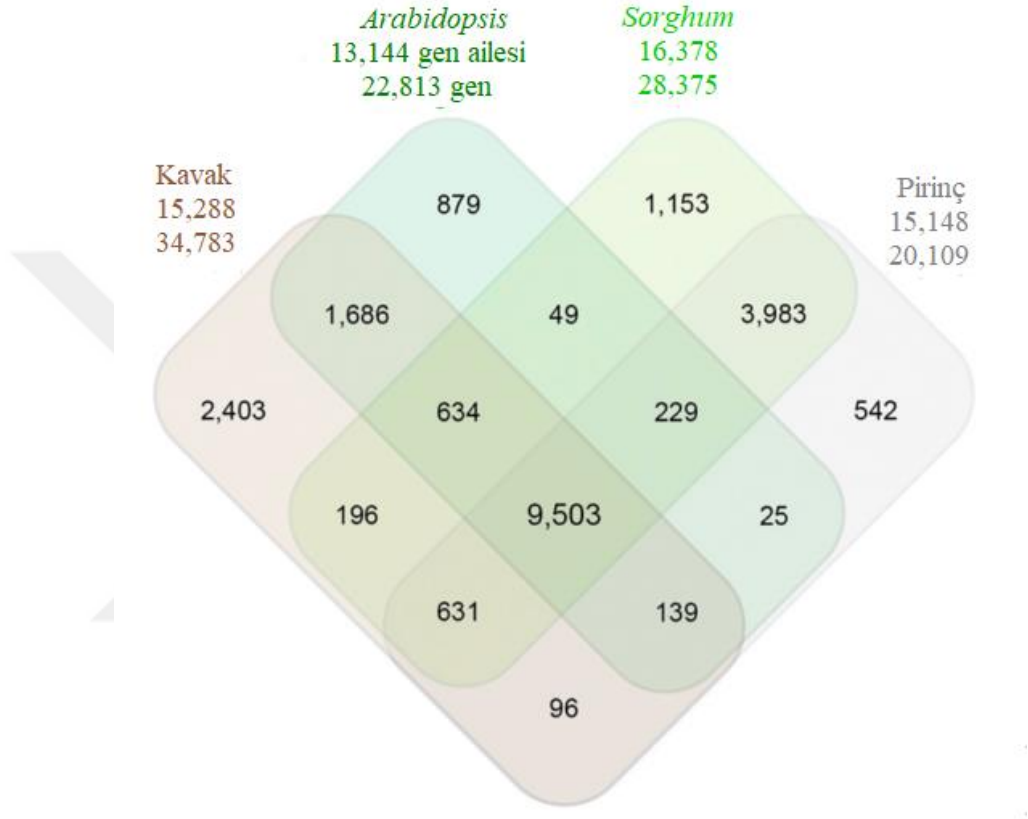


Şekil 2. 1: *Arabidopsis thaliana* bitkisinin yaşam döngüsü (Woodward ve Bartel, 2018).

Arabidopsis, büyüme hızının fazla olması ve boyutunun küçük olması sayesinde genetik araştırmalara uygundur. Diğer bitkilere kıyasla *Arabidopsis* genomu (132 Mbç) küçüktür, beş nükleer kromozomu ve bu kromozomlar arasında dağılmış olarak 20.000 protein kodlayan gen dahil olmak üzere 38.000 lokus bulunmaktadır (Leutwiler ve diğ., 1984; Kaul ve diğ., 2000; Cheng ve diğ., 2017).

Arabidopsis'in model organizma olması ve genetik araştırmaların ilerlemesi, ortak gen ailelerinin varlığı sayesinde diğer bitkilerin iç işleyişinin aydınlatılmasını sağlamıştır, birçok biyolojik süreç ilk olarak *Arabidopsis*'te gösterilmiştir (Meyerowitz ve Pruitt, 1985; Provat ve diğ., 2016). Chang ve Meyerowitz (1986) tarafından ilk *Arabidopsis* geninin klonlanması da moleküler genetik yaklaşımlarının sonuç vermeye başladığının ispatı olmuştur (Chang ve Meyerowitz, 1986). Bitki transformasyonundaki gelişmeler ve *Arabidopsis* bitkisinin *Agrobacterium tumefaciens* ile transformasyona elverişli olmasının anlaşılmasıyla *Arabidopsis*'in bitki çalışmalarında kullanılması yaygınlaşmıştır (Koornneef ve Meinke, 2010).

Arabidopsis'te bulunan dört gen ailesinden üçü diğer çiçekli bitkilerle ortaktır (Şekil 2.2). Bu sebeple *Arabidopsis*'te keşfedilen genler işlevleri bakımından diğer bitkiler ile karşılaştırıldıklarında genellikle benzerdir (Meyerowitz ve Pruitt, 1985; Woodward ve Bartel, 2018).



Şekil 2. 2: *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* (Kavak) ağaçları ve tahıl bitkileri *Sorghum bicolor* ile *Oryza sativa* (Pirinç) karşılaştırmalı genomiklerinin Venn şemasıyla gösterimi (Woodward ve Bartel, 2018). Verilen türlerin birbirleriyle ortak ve benzersiz olan gen ailelerinin sayısını gösterir. *Arabidopsis* ve *Populus* dikotil, *Sorghum* ve *Oryza* monokotil bitkidir.

Genlerin işlevlerini anlayabilmek için tercih edilen mutant taramaları, normalde referans (yabani tip) genotipi temsil eden bir kendileştirilmiş hat ile gerçekleştirilir. *Arabidopsis* için referans (yabani tip) olarak Columbia-0 (Col-0) ve Landsberg *erecta* (Laer-0) ve Wassilewskija (Ws) tercih edilir ve en yaygın kullanılanı ise Col-0 ekotipidir (Huala ve diğ., 2001; Passardi ve diğ., 2007).

2.2. BİTKİLERDE STRES

Bitkinin büyümesini, hayatta kalabilmesini, devamlılığını sürdürebilmesini ve gelişimini olumsuz yönde etkileyen bu çevresel faktörler stres olarak tanımlanır. Abiyotik ve biyotik olarak iki gruba ayrılan bu stres faktörleri, bitki için tehdit oluşturabilmektedir (Osmond ve diğ., 1987; Fedoroff ve diğ., 2010; Hacquard ve diğ., 2017; Gong ve diğ., 2020). Bitkiler doğada bakteri, mantar gibi biyotik stres faktörlerine ya da soğuk, yüksek sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, ağır metaller, besin eksikliği, radyasyon, sel gibi abiyotik stres faktörlerine maruz kalabilirler ve bu stresler tarla bitkilerinin büyümesini, gelişimini ve verimliliğini negatif yönde etkilemektedir (Mahajan ve Tuteja, 2005; Fedoroff ve diğ., 2010; Hacquard ve diğ., 2017; Hussain ve diğ., 2018).

Stres belli bir dinamiğe sahiptir; bitki stabilitesinin kaybedilmesi, strese karşı direnç ve iyileşmenin teşvik edilmesi aşamalarından oluşur. Bu stres dinamiği bitkide üç karakteristik fazın gelişimini içermektedir. Bu fazlar sırasıyla alarm aşaması, direnç aşaması ve son aşama olarak isimlendirilir. İlk aşama olan alarm aşamasında bitki stres faktörü ile karşılaşarak stabilitesini kaybeder, yaşamsal faaliyetlerini sürdürmesi engellenir. Stres faktörünün ortamdaki hızlı artışı, savunma mekanizmalarının bitkide o sırada aktif olmaması sebebiyle hücrel bütünlüğün çok hızlı bir şekilde zarar görmesine ve çöküşüne sebep olur. Bu durumda, alarm aşamasında katabolizma faaliyetleri anabolizma faaliyetlerine baskın gelerek stres cevabının başlamasına neden olur. Stres faktörünün yoğunluğu onarımda görevli olan proteinlerin sentezini etkilemezse, onarım işlemi hızlıca başlatılır. Direnç aşamasına geçiş, stres faktörüne maruz kalma süresi ile ilişkilidir. Sürekli strese maruz kalan bitki, ikinci aşama olan direnç aşamasına geçerek bu duruma adaptasyon sağlamaya başlar. Son aşamada, bitkinin maruz kaldığı stres faktörünün yoğunluğunda artış olursa ya da bu faktöre maruz kalma süresi çok uzunsa bu durum bitkide bitkinliğe sebep olarak savunmanın azalmasına ve ortaya çıkan enfeksiyonlara karşı duyarlı hale getirebilir. Duyarlı hale gelmiş olan bitkide, savunmanın azalması sebebiyle erken çökme ya da bitki ölümü görülebilir. Bununla birlikte, eğer stres faktörüne maruz kalınan süre ve yoğunluk az ise, durumun geçici olması sayesinde bitki eski işlevselliğini onarım mekanizmaları sayesinde geri kazanır (Etherington ve Larcher, 1996; Carmo ve diğ., 2012).

2.2.1. Kuraklık Stresi

Kuraklık stresinin temel sebepleri, beklenen ortalama yağışın düşük olması veya hiç olmaması, normalin üzerinde buharlaşmanın olması sebebiyle oluşur (Praba ve diğ., 2009; Alghabari ve diğ., 2016). Araştırma sonuçları 21. yüzyılın başlarında toplam arazinin %10'unun kuraklık stresine maruz kaldığını ve bu oranın yüzyılın sonuna doğru %40 gibi endişe verici bir orana çıkacağını öngörmektedir (Burke ve diğ., 2006). Kuraklık bitkilerde fizyolojik, morfolojik ve moleküler değişikliklere neden olur. Ayrıca bitki biyokütlesinin ve mahsul veriminin topraktaki su miktarının sınırlı olmasından dolayı azalmasına sebep olur (Challinor ve diğ., 2004; Anithakumari ve diğ., 2012). Fotosentez, solunum, pigment içeriği, su alımı, zar bütünlüğü kuraklık stresinden etkilenmektedir (Praba ve diğ., 2009; Anjum ve diğ., 2016). Bitkiler kuraklık stresine maruz kaldıklarında hayatta kalabilmek için büyüme hızlarını yavaşlatır, hücre ve dokulardaki su dengesini ayarlar, anti-oksidatif savunma sistemlerini aktif hale getirirler (Duan ve diğ., 2007; Praba ve diğ., 2009; Anjum ve diğ., 2011). Bitkinin sürgün kısmı ile kök büyümesi kıyaslandığında, sürgün büyümesinin daha fazla engellendiği görülmüştür (Anithakumari ve diğ., 2012).

Bitkilerin kuraklık stresine duyarlılıkları türlerine, maruz kaldıkları stresin derecesine ve süresine, hangi gelişim aşamasında bulunduklarına bağlıdır (Demirevska ve diğ., 2009). Bitkilerin kuraklık stresine dayanıklılığını değerlendirmek için kök ve yaprak özellikleri, su potansiyeli, hücre zar stabilitesi ve absisik asit (ABA) içeriği gibi parametreler kullanılmıştır (Ha ve diğ., 2012). Bağıl su içeriği (RWC; "Relative Water Content") bitki ile su arasındaki ilişkinin anlaşılması için stoma iletkenliği, terleme hızı, yaprak sıcaklığı ve yaprak su potansiyeli gibi karakteristik bir özelliktir. Bitkilerin çoğunluğu kuraklık stresine yanıt verirken RWC'de düşüş görülür (Ings ve diğ., 2013).

Kuraklık stresi, ROS üretimiyle ilişkilidir ve oksidatif patlama olarak da bilinen ROS üretimi, bitkilerde su stresine karşı erken savunma yanıtıdır. ROS üretiminin artışı ikincil haberci görevi görür ve bitkinin savunma mekanizmasını tetikler (Miller ve diğ., 2010). Hücrel bileşiklerle etkileşime giren ROS, hücre ölümüne sebep olabilir (Scandalios, 2002).

2.2.2. Azot Açlığı Stresi

Bitki büyümesi ve gelişimi için Azot (N), en önemli makro besin olmasının yanında, sudan sonra en önemli ikinci gereksinimdir. Proteinlerin, nükleik asitlerin, klorofillerin sentezi için azot gereklidir (Clarkson, 1996). Azotun bitki verimi için önemli olduğunun anlaşılmasının ardından N içeren sentetik gübre üretimi yaygın hale gelmiştir, optimum N koşulları sağlanarak bitkiler yetiştirilmiştir ve tarım arazilerinde verim artmıştır (Lu ve Tian, 2017). Azot içeren sentetik gübre uygulaması sonucunda, uygulanan azotun çoğunda buharlaşma, mikrobiyal tüketim, gaz halinde kayıplar meydana gelir. Toplam azot miktarının %40'ından daha azı buğday, pirinç, mısır gibi bitkiler tarafından alınabilir (Raun ve Johnson, 1999; Good ve Beatty, 2011; Kant ve diğ., 2011).

Azot, nitrat (NO_3^-), amonyum (NH_4^+) gibi farklı formlarda bulunabilir (Kant ve diğ., 2011). Nitrat formu çoğu tarım toprağında bulunabilirliği bakımından sınırlıdır. Bu sebeple bitkiler N yakalama mekanizmalarını değişken toprak konsantrasyonlarına göre hızlıca adapte edebilmelidirler. Dolayısıyla nitrat elde etme süreci ve bu sürecin düzenlenme mekanizmalarını anlamak, bitkilere N içeren gübrelerin uygulanması sonucu verimi artırmak açısından önemlidir (Bouguyon ve diğ., 2012; Wang ve diğ., 2012).

Bitkide azota karşı verilen tepkilerin anlaşılması düşük nitrat redüktaz (NR) aktivitesi gösteren genotiplerle yapılan çalışmalar sonucu keşfedilmiştir. NR enziminin eksikliği olan genotiplerin biriktirdiği nitrat seviyesinin yüksek olmasının yanında düşük seviyelerde amino asitler ve azot içeren diğer metabolitlerin olduğu, büyüme oranlarının ve protein miktarlarının az olduğu gösterilmiştir (Scheible ve diğ., 1997; Scheible, ve diğ., 1997; Wang ve diğ., 2004).

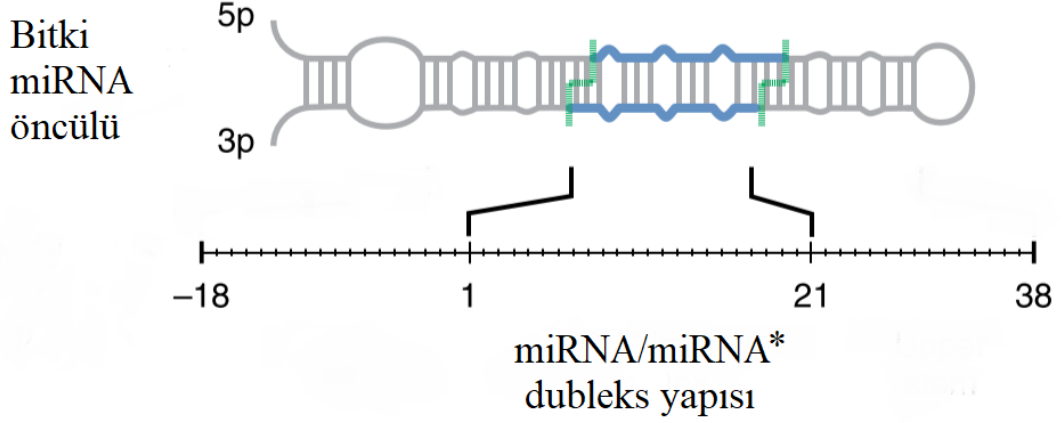
Nitrat, bitki için besin molekülü olmasının yanında hücre içi taşıma ve asimilasyonda görevli genlerin anlatımlarını teşvik etme (Medici ve Krouk, 2014), yaprak gelişimi (Chiu ve diğ., 2004), çiçeklenme zamanı (Marín ve diğ., 2011), yan kök gelişimi (Remans ve diğ., 2006) gibi süreçlerde bulunan önemli bir sinyal molekülüdür ve organik asit ve glikoz metabolizması başta olmak üzere bitki canlılığı için önemli olan mekanizmalarla ilişkili genlerin anlatımını etkiler (Scheible ve diğ., 1997; Wang ve diğ., 2004; Marín ve diğ., 2011).

2.3. MİKRORNA'LAR

MikroRNA'lar (miRNA'lar), çok hücreli organizmalarda çoklu biyolojik yolları düzenleyen, kodlama yapmayan, tek iplikli, 20-24 nükleotit uzunluğunda endojen küçük RNA'lardır (Llave ve diğ., 2002; Dinger ve diğ., 2008; Bustin, 2015; Cheng ve diğ., 2017). miRNA'lar, hayvanlarda ve bitkilerde gen anlatımını post-transkripsiyonel olarak düzenlemekle görevli olan küçük RNA'lardır. İlk olarak 1993 yılında Lee ve diğ. tarafından bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiş olan miRNA'ların gen anlatımını düzenleyebildiklerinin anlaşılmasıyla birlikte bu alanda çalışmalar artmıştır ve ilk bitki miRNA'ları *Arabidopsis*'te keşfedilmiştir (Lee ve diğ., 1993; Llave ve diğ., 2002; Reinhart ve diğ., 2002). RNA-İndüklenmiş Susturma Kompleksi (RISC; "RNA-Induced Silencing Complex") olarak adlandırılan ve miRNA'lar tarafından etkilenen bu kompleksin önemli bir bileşeni olan ARGONAT (AGO) proteininin *ago1* mutantındaki miRNA düzenlenmesinde meydana gelen eksiklik sebebiyle yapraklarında görülen şekil bozukluğu sayesinde ilk olarak *Arabidopsis*'te keşfedilmiştir (Bohmert ve diğ., 1998).

2.3.1. Bitki miRNA Biyogenezi

Bitkilerde bulunan miRNA'ların, RNA polimeraz II (Pol II) tarafından, olgun miRNA yapısını elde etmeden önce daha uzun transkriptleri yapılır (Achkar ve diğ. 2016; Yu ve diğ. 2017). miRNA'lar, bu birincil transkriptlerin kollarından birine gömülü şekilde bulunurlar ve birincil transkriptler miRNA/miRNA* baz eşleşmesi yapacak şekilde kusurlu bir geri katlama yapısı oluştururlar (Şekil 2.3). Bitkilerde miRNA öncülü içinde gömülü halde bulunan bu olgun miRNA'yı serbest bırakma işlemlerinin tamamı nukleus içinde ve DICER-LIKE1 (DCL1), HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) ve SERRATE (SE) gibi proteinlerin yardımıyla oluşturulan kompleks tarafından gerçekleştirilir (Achkar ve diğ. 2016; Yu ve diğ., 2017). DCL1, olgun miRNA dizilerini çevreleyerek 2 nükleotitlik 3' çıkıntılı kesim yapar. Bu sayede ~21 nükleotitlik eşleştirilmiş iki RNA zinciri (miRNA/miRNA* dubleks yapısı) serbest bırakılır. Bu küçük RNA'lardan biri, bir AGO proteinine dahil edilerek hedef RNA'ların tanımlanması için dizi özgüllüğü sağlar (Şekil 2.4) (Fang ve Qi, 2015; Ma ve Zhang, 2018). *Arabidopsis* genomu, on adet AGO proteini kodlamaktadır (Fang ve Qi, 2015; Ma ve Zhang, 2018).

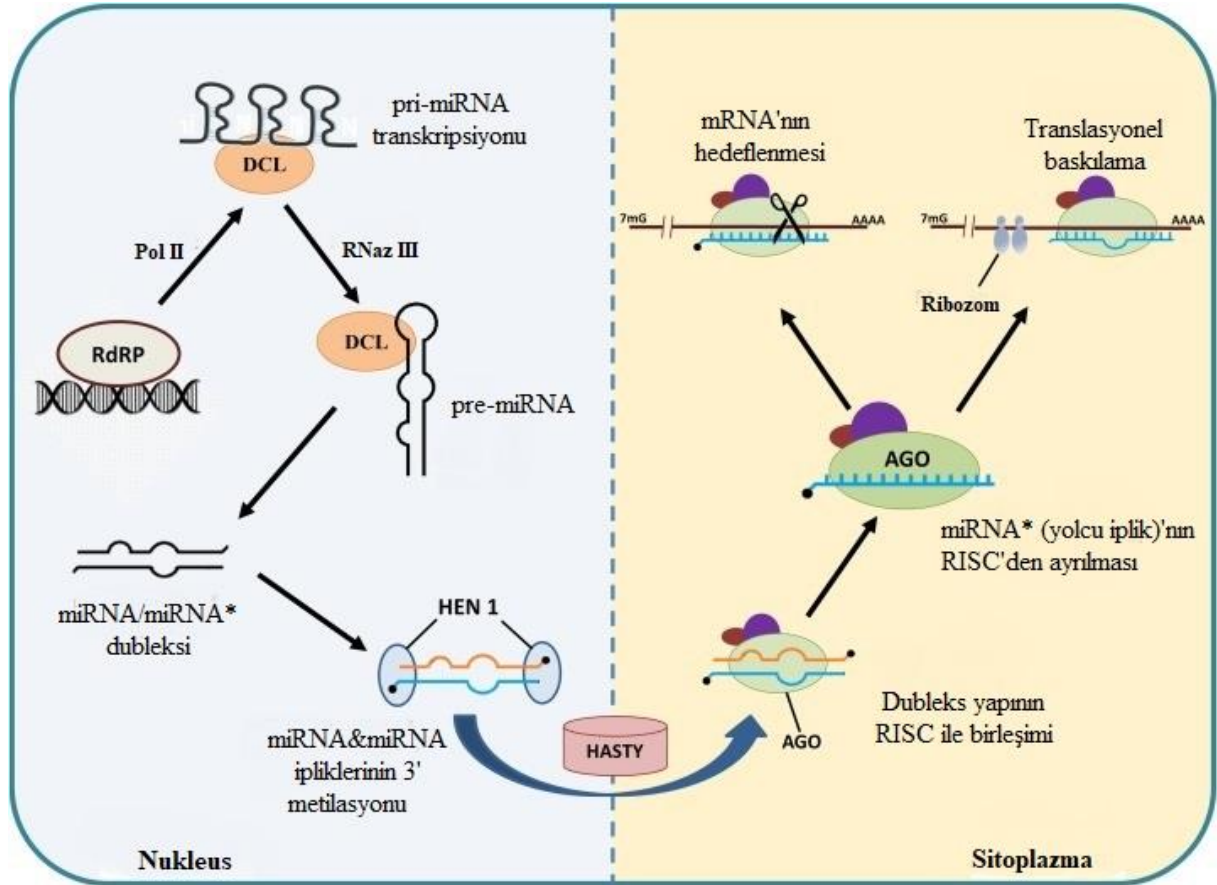


Şekil 2. 3: Bitki miRNA öncülünün şematik gösterimi. Mavi renk miRNA/miRNA* dupleks yapısını, yeşil renk DCL1 kırılma bölgelerini ifade etmektedir (Rojas ve diğ., 2020).

Olgun miRNA'ların miRNA öncülünden kusursuz bir şekilde çıkarılması miRNA biyogenezinin belirleyici özelliğidir ve bu özellik hedef RNA'larla baz eşleşmesi yaparak spesifik olarak düzenlenmesi ile ilişkilidir (Bustin, 2015; Yu ve diğ., 2017). miRNA'ların çoğu evrimsel olarak iyi korunmuştur ve hormon sinyal iletimi, bitki gelişimi gibi bitki canlılığının devamı için önemli rollere sahip olan transkripsiyon faktörlerini düzenlemekle görevlidirler. Bu nedenle, miRNA biyogenez mekanizmasında meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon, bitki büyümesinde önemli bir hataya sebep olabilir, hatta öldürücü etki oluşturabilir ve diğ. 2017). Bitki miRNA öncüllerinin boyutları ve şekilleri önemli ölçüde değişkenlik gösterir, spesifik miRNA dizilerini doğru şekilde serbest bırakabilmeleri için işlenirler (Bologna ve diğ., 2013; Zhu ve diğ., 2013; Moro ve diğ., 2018).

Çoğu miRNA öncülünde, Şekil 2.3'teki miRNA/miRNA* dupleks yapısının sol tarafında şematize edilen ve 15-17 bç'lik dsRNA (çift iplikli RNA; "double stranded RNA") segmentine sahip olan ilmek ("loop") kısmı, DCL1 için kılavuz işlevi görür ve ilk ayrılma bu bölgeye yakın kısımdan başlar (Song ve diğ., 2010; Zhu ve diğ., 2013). Diğer miRNA öncüllerinde ise miRNA/miRNA* dupleks yapısının sağ tarafında şematize edilmiş ve dsRNA segmentine sahip olan terminal loop bölgesi aynı işlevi görür (Bologna ve diğ., 2013; Chorostecki ve diğ., 2017). Bu ikinci çeşit öncül grubunda kompleks yapı önce terminal loop bölgesini ayırır ve sonrasında miRNA/miRNA* dupleks yapısına doğru ilerleyerek ilk kesimi yapar (Addo-Quaye ve diğ., 2009; Zhu ve diğ., 2013). Her iki durumda da, ilk kesimi yaptıktan sonra DCL1

miRNA/miRNA* dupleksini ayırarak şekilde ~21 bç uzaklıkta ikinci kesimi yapar (Zhu ve diğ., 2013).



Şekil 2. 4: miRNA biyogenezinin basitleştirilmiş taslağı ve bitkilerdeki etki mekanizması (Krishnatreya ve diğ., 2021). Siyah oklar, miRNA biyogenezi sürecine dahil olan sıralı adımları göstermektedir. RdRP (RNA'ya bağımlı RNA Polimeraz), pri-miRNA (birincil miRNA) transkriptlerini kopyalar. RNaz III aktivitesine sahip DCL (DICER-LIKE) proteini önce pri-miRNA'yı keserek pre-miRNA (öncül miRNA) yapısının oluşumunu sağlar, daha sonra miRNA/miRNA* dupleksini serbest bırakmak için pre-miRNA'ları parçalar. Dupleksin her iki zincirinin de 3' ucu bu uçlardaki son nükleotitin ribozunda HEN1 (HUA artırcı 1) tarafından metillenir. Dupleks (mavi okla gösterildiği gibi) HASTY yardımıyla nukleustan sitoplazmaya doğru hareket eder. Sitoplazmaya geçen dupleks yapı, AGO (ARGONAT) proteinine sahip olan RISC'ye (RNA-indüklenmiş Susturma Kompleksi) yüklenir. Yolcu iplik (miRNA*) kompleksin dışına çıkar ve kılavuz iplik hedef mRNA'nın bölünmesini ya da tamamlayıcı olma derecesine bağlı olarak translasyonunun inhibisyonunu sağlar.

2.3.2. GEN ANLATIMININ miRNA ARACILI DÜZENLENMESİ

Kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNA; “noncoding RNA”) gen anlatım seviyesinin düzenlenmesinde, epigenetik, kırılma ve translasyon ile ilişkilidir (Frith ve diğ., 2006; Dinger ve diğ., 2008). ncRNA'lar uzun kodlama yapmayan RNA'lar (lncRNA; “long noncoding RNA”) ve küçük kodlama yapmayan RNA'lar (sncRNA; small noncoding RNA”) olarak ikiye ayrılır. Nükleotid uzunlukları 200'den fazla olanlar lncRNA'lar, kısa olanlar ise sncRNA olarak sınıflandırılmışlardır (Tomari ve Zamore, 2005). sncRNA'lar ise küçük interferans RNA'lar (siRNA; “small interfering RNA”) ve miRNA'lar olarak ayrılmaktadırlar. Diğer küçük RNA'lardan farklı olarak yalnızca miRNA'ların sap-ilmek (“stem-loop”) öncüllerinden transkripsiyonlarının yapıldığı tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Grimson ve diğ., 2008). miRNA ve siRNA'lar post-transkripsiyonel düzenlemelerde önemli role sahiptir. Bu küçük RNA'lar, sayıları türler arasında çeşitliliğe sahip olan genlerin transkripsiyon ürünleridir ve aynı zamanda AGO ve Dicer (DCR) ailesine ait proteinlerin oluşturduğu kompleksleri tamamlayarak mRNA hedeflerine yönlendirir (Vaucheret ve diğ., 2004; O'Carroll ve diğ., 2007).

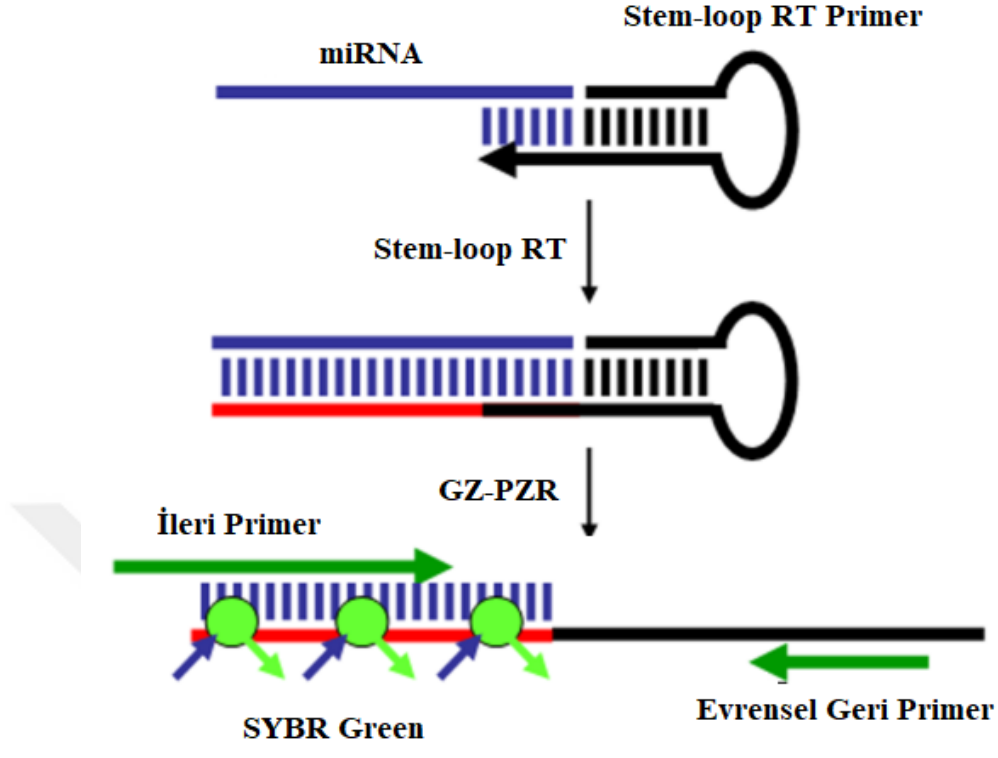
Gen anlatımının düzenlenmesinde miRNA'lar temel olarak iki farklı mekanizma ile çalışır: Eğer miRNA hedefle yüksek tamamlayıcılığa sahipse bölünme mekanizmasını, kısmi ya da küçük tamamlayıcılığa sahipse translasyonel baskılama yöntemini kullanır (Tan ve diğ., 2009). Bununla birlikte, AGO proteinleri, miRNA öncülü (pre-miRNA), uzun yapılandırılmamış tek sarmallı RNA ve DNA ile bir araya gelerek RISC'i oluşturabilir (Wang ve diğ., 2008; Janas ve diğ., 2012). Oluşturulan bu kompleks ile olgun miRNA mRNA'yı hedefleyerek sitoplazmada mRNA'nın degradasyonunu sağlar (Ledda ve diğ., 2020).

2.4. miRNA ANLATIMININ GZPZR İLE ANALİZLERİ

Bitki miRNA'ları genellikle bitki gelişimi için önemli olan transkripsiyon faktörlerini (Llave ve diğ., 2002; Rhoades ve diğ., 2002) ve stres ile düzenlenen genleri hedefler (Sunkar ve Zhu, 2004; Sunkar ve diğ., 2006). Bitki miRNA'ları hedef genlerin aktivitelerini ortadan tamamen kaldırmak yerine, bu hedef genleri baskılayarak işlevlerini yerine getirirler (Tang ve diğ., 2003; Mallory ve diğ., 2004).

miRNA-aracılı gen düzenlenmesinin anlaşılabilmesi için anlatım analizlerinin güvenilir bir yöntem ile yapılması ihtiyacı doğmuştur. Bol miktarda transkript sınıfını temsil eden miRNA'lar, hücre ve doku farklılıklarına bağlı olarak ekspresyon seviyelerinde de değişiklikler göstermektedir. Hücre içinde az miktarda bulunan ve kısa dizilerden oluşan miRNA'ların anlatım analizlerinin yapılabilmesi için geleneksel teknolojiler arasında yer alan klonlama, Northern hibridizasyonu, mikrodizileme ("microarray") analizi gibi teknikler yeterli hassasiyete sahip olmayabilir. Bununla birlikte, bitki miRNA'ları, son derece karmaşık küçük RNA fraksiyonlarına sahiptir (Llave ve diğ., 2002; Lu ve diğ., 2005).

Geleneksel teknolojilerin duyarlılığının zayıf oluşu, veriminin düşüklüğü gibi sorunların bulunması sebebiyle hassas bir yöntem olan Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RTPZR) yöntemi kullanılabilir. miRNA'ların boyutunun küçük olması sebebiyle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile miRNA'ları tespit etmek zordur, bundan dolayı miRNA'ların tespit edilebilmesi için kantitatif RTPZR (qRTPZR) tekniği geliştirilerek optimize edilmiştir (Chen ve diğ., 2005; Tang ve diğ., 2006).



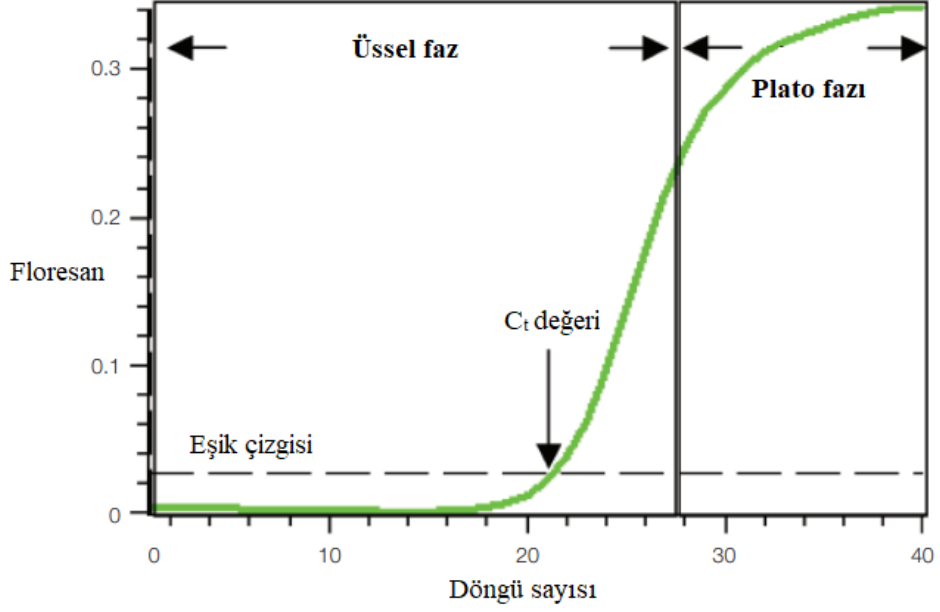
Şekil 2. 5: “Stem-loop” RT-PZR miRNA analizinin şematik gösterimi (Varkonyi-Gasic ve diğ., 2007).

GZPZR, Higuchi ve diğ. tarafından 1992 yılında tanıtıldı ve kullanıma başlandı (Higuchi ve diğ., 1992). Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, floresan boya teknolojisini kullanarak düşük konsantrasyonda bile nükleik asitlerin kesin olarak ölçümüne izin verir (Varkonyi-Gasic ve diğ., 2007).

RNA’ların analizi için diziye özgü TaqMan gibi problemler ya da spesifik olmayan SYBR Green gibi ışıma yapan boyalar kullanılır (Higuchi ve diğ., 1992; Livak ve Schmittgen, 2001; Varkonyi-Gasic ve diğ., 2007). Laboratuvarlarda maliyetinin düşük olması ve spesifik problemlere göre kullanımının daha kolay olması sebebiyle SYBR Green daha fazla tercih edilir (Fraga ve diğ., 2008). RTPZR ile sentezlenen cDNA’daki hedef bölgenin amplifikasyonu eş zamanlı üretilen floresan ışıma GZPZR ile saptanır (Higuchi ve diğ., 1992). Amplifikasyon ve ışıma eş zamanlı olarak gözlemlendiği için jel elektroforezine ihtiyaç kalmaması sayesinde de klasik PZR’ye göre avantajlı bir yöntemdir (Stanton, 2001).

Amplifikasyon sonucu oluşan ürün miktarını görebilmek için ışımanın eşik döngüsünü (“cycle threshold”, C_t) geçmesi gerekir. C_t değeri arka plan floresans yoğunluğunu ifade eder. Arka plan

floresans yoğunluğunu geçtiği noktaya zaman noktası denir. Hedef kopya sayısı ne kadar fazlaysa C_t değeri o kadar düşüktür, bunun sebebi C_t değerinin PZR reaksiyonunun üssel fazında belirlenmesidir (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda amplifikasyon eğrisi (Bio-Rad Laboratories, 2006).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Neslihan Turgut Kara'nın Biefeld Üniversitesi, Biyoteknoloji Merkezi, Genom Araştırma Bölümü'nde görevli Dr. Ralf Stracke'ten temin ettiği *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) tohumları kullanıldı.

Familiya: *Brassicaceae*

Cins: *Arabidopsis*

Tür: *Arabidopsis thaliana*

3.2. BİTKİ BESİYERİ VE DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARI

3.2.1. MS Besiyerinin Hazırlanması

Arabidopsis thaliana tohumlarının çimlendirilmesinde, büyütülmesinde ve kallus kültürü çalışmalarında Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962) besiyeri kullanıldı. MS besiyeri temel tuz karışımı içeriği Tablo 3.1'de, MS besiyerinin hazırlanması için gerekli bileşenler ve konsantrasyonları ise Tablo 3.2'de verilmiştir. Besiyerleri hazırlanırken mikro ve makro elementlerin karışımından oluşan toz halindeki MS (Caisson, MSP09), sukroz (Sigma, 84097) ve katılaştırıcı ajan olarak agar (Sigma, 05039) kullanıldı. 250 ml besiyeri hazırlamak için, yaklaşık 200 ml distile suya 7.5 g sukroz ve 1.1 g MS tozu ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcıda tamamen çözdürüldü. Çözünmenin ardından 5 N NaOH (Merck, 1.06462.1000) ile pH'sı 5.7 olacak şekilde ayarlanıp çözeltinin hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Son olarak 2.25 g agar (Sigma, 05039) ilave edilerek hazırlanmış olan besiyeri otoklavda (Nüve, OT 012) 15 dakika boyunca 1.2 atm basınçta 121°C'de steril edildi. Steril edilmiş besiyerlerinin sıcaklığı 50-60°C'ye kadar düştükten sonra laminar hava akımlı steril kabinde (Telstar Bio II Advance, EN-12469) 1000X MS vitamin çözeltisinden (Sigma, M3900) 250 µl eklendi.

Tablo 3. 1: MS temel tuz karışımı bileşenleri (Murashige ve Skoog, 1962).

Bileşenler	Konsantrasyon (mg/L)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Nikotinik Asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1
myo-inositol	100
Glisin	2.0
Sakkaroz	30000

Tablo 3. 2: MS besiyeri bileşenleri ve konsantrasyonları.

Bileşenler	Miktar
MS Temel Tuz Karışımı	4,4 g/L
Sukroz	30 g/L
Agar	9 g/L
MS Vitamin Çözeltisi	1000X

Kallus kültürü çalışmalarında kullanılan MS besiyerlerinde bitki büyüme düzenleyicisi olan 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) (Sigma, D7299) kullanıldı. 1 mg/l 2,4-D hazırlamak için etil alkolle (Isolab, 920.026.2500) 2,4-D çözdürüldükten sonra distile su ile hacmi tamamlandı. 250 ml MS besiyeri için 125 µl 2,4-D (1 mg/l) besiyerlerine eklendi ve karıştırıldı. Hazırlanan besiyerleri 9 cm çaplı petri kaplarına ve magentalara döküldükten sonra katılaşması beklenildi. Tamamen katılaşmasının ardından parafilmle hava alması engellendi ve +4°C’de muhafaza edildi.

3.2.2. Azot Açlığı Besiyerinin Hazırlanması

Azot açlığı stres ortamının hazırlanması için MS Besiyeri hazırlanırken NH_4NO_3 içermeyen toz halindeki MS (Sigma, M2909) kullanıldı. 250 ml azot açlığı stres besiyerini hazırlamak için 7.5 g sukroz ve 0.675 g NH_4NO_3 içermeyen MS tozu, manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Tamamen çözüldükten sonra çözeltinin pH’sı 5.7 olacak şekilde 5 N NaOH ile ayarlandı ve distile su ile 250 ml’ye tamamlandı. 2.25 g agar eklendikten sonra besiyeri 15 dakika 1.2 atm basınçta 121°C’de otoklavlanarak steril edildi. Steril edilmiş olan besiyerinin sıcaklığı 50-60°C’ye düştükten sonra 125 µl MS vitamini ve 250 µl 2,4-D eklendi. Petrilere aktarılan besiyerleri katılaştıktan sonra parafilm ile kapatıldı ve kullanılabileceği kadar +4°C’de muhafaza edildi.

3.2.3. Kuraklık Besiyerinin Hazırlanması

Kuraklık stresi besiyeri protokolü (Van Der Weele ve diğ., 2000; Verslues ve Bray, 2004) 0.7 Mpa (Ozmotik Potansiyel) olacak şekilde hazırlandı. Kuraklık ortamını oluşturmak için iki katmanlı besiyeri hazırlandı ve Polietilen Glikol 8000 (PEG 8000) (Sigma, P2139) kullanıldı.

250 ml kuraklık besiyerinin alt katmanı $\frac{1}{2}$ MS besiyeri olarak hazırlandı. 200 ml distile su içerisinde 0.3 g MES (2-(N-morfolino) etansülfonik asit) (Sigma, M-8250), 0.55 g MS tozu ve 7.5 g sukroz manyetik karıştırıcı yardımıyla sırayla çözündürüldü ve pH'sı 5.7 olacak şekilde 5 N NaOH ile ayarlandıktan sonra 250 ml'ye tamamlanıp 3.75 g agar eklendi. Hazırlanan besiyeri 15 dakika 1.2 atm basınçta 121°C koşullarında otoklavlanarak steril edildi ve uygun sıcaklığa geldikten sonra 125 µl MS vitamini ve 250 µl 2,4-D eklendi. Hazırlanan $\frac{1}{2}$ MS besiyeri 20 ml olacak şekilde steril mezür yardımıyla laminar hava akımlı kabin içinde 9 cm çaplı petri kaplarına dağıtıldı.

250 ml PEG üst katmanının hazırlanmasında steril edilmiş beher kullanıldı. Beher içerisinde 0.55 g MS ve 0.3 g MES 200 ml distile su içerisinde tamamen çözündürüldü. pH'sı 5.7 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 250 ml'ye distile su ile tamamlandı ve alüminyum folyo ile iyice kapatılıp otoklavlanarak steril edildi. Steril edilen üst katmanın soğuması beklenmeden 0.7 Mpa olması için 100 g PEG 8000 kademeli olarak eklendi ve steril laboratuvar kaşığı ile hızlıca karıştırılarak çözündürüldü. Çözünen PEG üst katmanı tamamen donmuş olan 20 ml $\frac{1}{2}$ MS besiyerlerinin her birine 30 ml olarak paylaştırıldı. Besiyerleri dikkatlice parafilm ile sarıldıktan sonra PEG üst solüsyonunun alt katmana difüze olması için oda sıcaklığında en az 12-15 saat bekletildi. Ardından üst solüsyon dikkatli bir şekilde döküldü ve parafilmlelenerek +4°C'de saklandı.

3.2.4. Azot Açlığı ve Kuraklık Kombine Besiyerinin Hazırlanması

Azot açlığı ve kuraklık kombine stres besiyeri hazırlanırken kuraklık besiyeri protokolüne uygun olacak şekilde iki katmanlı besiyeri, NH_4NO_3 içermeyen MS tozu ve PEG 8000 ile hazırlandı.

250 ml kombine besiyerinin alt katmanı $\frac{1}{2}$ MS besiyeri olarak hazırlandı. 200 ml distile su içerisinde 0.3 g MES, 0.3375 g NH_4NO_3 içermeyen MS tozu ve 7.5 g sukroz manyetik karıştırıcı yardımıyla sırayla çözündürüldü ve pH'sı 5.7 olacak şekilde 5 N NaOH ile ayarlandıktan sonra 250 ml'ye tamamlanıp 3.75 g agar eklendi. Hazırlanan besiyeri 15 dakika 1.2 atm basınçta 121°C koşullarında otoklavlanarak steril edildi ve uygun sıcaklığa geldikten sonra 125 µl MS vitamini ve 250 µl 2,4-D eklendi. Hazırlanan $\frac{1}{2}$ MS besiyeri 20 ml olacak şekilde steril mezür yardımıyla laminar hava akımlı kabin içinde 9 cm çaplı petri kaplarına dağıtıldı.

250 ml PEG üst katmanının hazırlanmasında steril edilmiş beher kullanıldı. Beher içerisinde 0.3375 g NH_4NO_3 içermeyen MS tozu ve 0.3 g MES 200 ml distile su içerisinde tamamen çözündürüldü. pH'sı 5.7 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 250 ml'ye distile su ile tamamlandı ve alüminyum folyo ile iyice kapatılıp otoklavlanarak steril edildi. Steril edilen üst katmanın soğuması beklenmeden 0.7 Mpa olması için 100 g PEG 8000 kademeli olarak eklendi ve steril laboratuvar kaşığı ile hızlıca karıştırılarak çözündürüldü. Çözünen PEG üst katmanı tamamen donmuş olan 20 ml $\frac{1}{2}$ MS besiyerlerinin herbirine 30 ml olarak paylaştırıldı. Besiyerleri dikkatlice parafilm ile sarıldıktan sonra PEG üst solüsyonunun alt katmana difüze olması için oda sıcaklığında en az 12-15 saat bekletildi. Ardından üst solüsyon dikkatli bir şekilde döküldü ve parafilmlenerek 4°C'de saklandı.

3.3. *Arabidopsis thaliana* TOHUMLARININ YÜZEY STERİLİZASYONU

Yüzey sterilizasyonu için 40 adet *Arabidopsis thaliana* Col-0 tohumlarına %70'lik 1 ml etil alkol eklendi ve 2 dakika 600 rpm'de (ScanSpeed Mini) santrifüj edilerek etil alkol uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Ardından %100'lük 1 ml etil alkol eklendi ve 2 dakika 600 rpm'de santrifüj edilerek alkol uzaklaştırıldı. Steril edilmiş tohumlar laminar hava akımlı kabin içerisinde kuruyana kadar yaklaşık 20-25 dakika beklendi ve MS besiyeri içeren petrilere ekildi. Parafilm ile hava alması engellenerek bitki büyütme kabininde [$25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 saat ışık/8 saat karanlık (Nüve, TK 252)] çimlenmeye bırakıldı.

3.4. BİTKİLERİN ÇİMLENDİRİLMESİ

MS besiyeri içeren petrilere ekilen tohumların çimlenmesi için dört hafta beklendi. Çimlenmiş olan *A. thaliana* bitkileri MS besiyeri içeren magentalara aktararak bitki büyütme kabininde 14 gün boyunca boy uzaması için bırakıldı.

3.5. KALLUS KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI

In vitro kültürlen 3 haftalık *A. thaliana* bitkilerinin kök kısımları eksplant olarak seçildi ve kallus kültürü kurmak için kullanıldı. Bitkinin kök kısımları bistüri yardımıyla 1'er cm'lik parçalara bölündü ve kallus oluşumunu teşvik etmek için kullanılan 1 mg/l 2,4-D içeren yeni MS besiyeri bulunduran petrilere aktarıldı. Bitki eksplantlarından kallus elde etmek için bitki büyütme kabininde bir ay bekletildikten sonra elde edilen kalluslar yeni 1 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerlerine aktarıldı ve bu alt kültürleme işlemi ayda bir olacak şekilde devam ettirildi.

3.6. STRES UYGULAMASI

1 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerinde bulunan kalluslar stres uygulaması için 1 mg/l 2,4-D içeren kontrol, azot açlığı, kuraklık ve kombine MS besiyerlerine aktarıldı. Kalluslar bitki büyütme kabininde 7 ve 14 gün bekletilerek uygulama sonunda örnekler toplandı. Toplanan örnekler fizyolojik analizler için kullanıldı. Moleküler analizler için kullanılmak üzere toplanan kallus örnekleri 100 mg'lık porsiyonlara ayrılarak sıvı azot yardımıyla kullanılacak zamana kadar muhafaza etmek için donduruldu ve -80°C'de saklandı.

3.7. FİZYOLOJİK VE MORFOLOJİK ANALİZLER

3.7.1. Büyüme İndeksinin Belirlenmesi

Farklı stres koşullarına maruz bırakılan *A. thaliana* kallus örneklerinin morfolojik olarak analizi kapsamında başlangıç ağırlıkları (IW) ile 7. gün ve 14. gün uygulama sonrası ağırlıkları (FW) tartıldı. Aşağıda verilen Denklem 3.1 ile büyüme indeksi yüzde değeriyle hesaplandı (Mendonça ve diğ., 2012).

$$\%Büyüme = ((FW-IW)/IW) \times 100 \quad (3.1)$$

FW: Son ağırlık, IW: Başlangıç ağırlığı

3.7.2. Hücre Zarı Hasarı Analizi

Fizyolojik analiz kapsamında zar iyon sızıntısındaki değişimin ölçümüyle zar hasarı belirlendi. İyon sızıntısının ölçümünde iyon sızıntısı iletkenlik ölçer [“conductivity meter” (HORIBA B-137)] kullanıldı. Azot açlığı, kuraklık ve kombine streslerine maruz bırakılan *A. thaliana* Col-0 kök kallus örneklerinin iyon sızıntısı analizi için 7. gün ve 14. gün kallus örnekleri toplanarak belirtilen yöntemle göre yapıldı ve aşağıda verilen denkleme göre hesaplandı (Wang ve diğ., 2009).

Farklı stres koşullarına maruz bırakılmış olan kallus örnekleri 0.5 g tartıldı ve 3 kez distile su ile yıkandı. Cam tüplere alınan her bir kallus örneğinin üstüne 10 ml distile su eklendi ve 25°C sıcaklıkta 2 saat bekletildi. İnkübasyon sonunda, yıkama solüsyonundan 100 µl örnek alınarak kondaktivite değeri (C1) ölçüldü. Solüsyon 95°C'de 30 dakika bekletildi ve 100 µl örnek alınarak kondaktivite tekrar ölçüldü (C2). Zar hasarı yüzdesi Denklem 3.2'ye göre hesaplandı.

$$\text{Zar Hasarı} = (C1/C2) \times 100 \quad (3.2)$$

3.8. RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu için -80°C'ye kaldırılmış kontrol grubu kallus örnekleri ile azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarına maruz bırakılan örnekler kullanıldı. 100 mg kallus örneği sıvı azot ile steril edilmiş soğuk havanda havan eli yardımıyla mekanik olarak parçalandı. Parçalanıp ezilmiş kallus örneklerine 1 ml Trizol (Hibrogen, Hibrizol) eklenerek homojenize edildi ve eppendorf tüplere aktararak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 0.2 ml kloroform (Isolab, 910.033.2500) eklenerek 15 saniye yavaşça ters düz edildi ve 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler +4°C'de 12000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi (Nüve, NF 800R). Santrifüj sonrası supernatant dikkatlice yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0.5 ml izopropanol (Sigma, 24137) eklendikten sonra 15 saniye yavaşça ters düz edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonun ardından +4°C'de 12000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra supernatant kısmı uzaklaştırılarak pelletler %75'lik etil alkol ile yıkandı. Örnekler +4°C'de 7500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve supernatant yeniden uzaklaştırıldı. RNA pelletleri 35-45 µl DEPC'li su ile 37°C'de çözdürüldü (Biosan, TS-100 Thermo Shaker).

3.9. RNA'LARIN KONSANTRASYON VE SAFLIĞININ BELİRLENMESİ

3.9.1. Spektrofotometre ile Ölçüm

RNA örnekleri DEPC'li su ile çözdürüldükten sonra saflık ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000 Spectrophotometer) cihazı ile ölçüldü. RNA örneklerinin saflığının belirlenmesinde A_{260}/A_{280} oranı kullanıldı. A_{260}/A_{280} oranı ≈ 2.0 olan RNA'lar saf kabul edildi ve konsantrasyonları Denklem 3.3'e göre hesaplandı. Konsantrasyonu ve saflık oranı uygun görülen RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

$$\text{RNA (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times \text{sulandırma kat sayısı} \times 40 \quad (3.3)$$

3.9.2. Agaroz Jel Elektroforezi

RNA örneklerinin nanodrop spektrofotometre cihazı ile saflıklarının ve konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından bütünlüklerinin değerlendirilmesi için kalitatif analiz yöntemi olarak agaroz jel elektroforezi tercih edildi. Agaroz jel elektroforezi ve 50X Tris-asetat-EDTA tamponu Tablo 3.3'te belirtilen yöntemle uygun olarak yapıldı (Koontz, 2013).

Tablo 3. 3: 50X TAE hazırlanışı (Koontz, 2013).

Bileşen	Son Konsantrasyon	Stok	Miktar
Tris-base	2 M	N/A	242 g
EDTA pH 8.0	1X	0.5 M	100 ml
Glasiyel asetik asit	N/A	N/A	57.1 ml
dH ₂ O			1000 ml tamamlanır.

Agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütülmesinde kullanılacak olan 50X TAE tamponunu hazırlamak için 242 g Tris-base (Sigma, T-8524) yaklaşık 750 ml distile su içerisinde çözdürüldü. pH değeri 8.0 olan 0.5 M EDTA (Merck, 324503) eklenerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü ve 57.1 ml glasiyel asetik asit (Merck, 101830) eklenerek karıştırıldı. Solüsyonun hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Agaroz jel elektroforezi için 50X TAE tamponu 1X'e seyreltilerek kullanıldı. 1X TAE tamponundan 1000 ml hazırlamak için 20 ml 50X TAE tamponuna 980 ml distile su eklendi ve karıştırıldı.

%1.2'lik agaroz jel, RNA örneklerini yürütmek amacıyla protokole uygun olarak hazırlandı. Agaroz jeli hazırlamak için 40 ml 1X TAE tamponuna 0.48 g agaroz (Sigma, A5073) eklendi ve mikrodalga fırında ısıtılarak çözdürüldü. Sıcaklığı 50-60°C'ye düştükten sonra çözeltiye 3 µl Etidyum Bromür (EtBr) (10 mg/ml) (Sigma, E7637) dikkatlice eklendikten sonra karıştırıldı. Jelin döküleceği 6x9 cm boyutundaki agaroz jel kasetine (Thermo, EC 320) tarak ve lastik yerleştirildi, hava kabarcığı kalmayacak şekilde kasete agaroz jel döküldü ve polimerize olması için soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra lastikler ve tarak çıkarılarak TAE tamponu ile doldurulan yürütme tankına yerleştirildi.

RNA örnekleri ~200-300 ng/µl olacak şekilde DEPC'li su ile sulandırıldı. 0.7 µl 6X yükleme boyası (Thermo Fisher, R0611) ile 3.5 µl örnek karıştırılarak kuyulara yüklendi. 120 mA 70

Volt güçte 30 dakika boyunca yürütüldü ve UV görüntüleme cihazıyla (Avenegene-Xlite 30R) jelin fotoğrafı alındı.

3.10. cDNA SENTEZİ

Kallus örneklerinden izole edilen RNA'ların cDNA sentezi TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, 00575529) kullanılarak Thermal Cyclers (BIORAD, T100) cihazında yapıldı.

miRNA cDNA sentezi için 10 µM Primer Havuzu miRNA “stem-loop” primerlerinden hazırlandı. Primer havuzunu hazırlamak için 10 µl hacimde 100 µM miRNA stem-loop primerleri ile 20 µl hacimde 50 µM oligodT23 eklendi ve primer havuzunun hacmi ddH₂O ile 100 µl'ye tamamlandı, cDNA sentezi için hazırlanan primer havuzları Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3. 4: cDNA sentezi için “stem-loop” primerleri ile hazırlanan primer havuzları.

Primer Havuzu 1	Primer Havuzu 2	Primer Havuzu 3	Primer Havuzu 4
ath-miR169b-5p ath-miR169c	ath-miR165a-3p ath-miR165b	ath-miR167c-5p	ath-miR396b-5p
ath-miR169d ath-miR169e ath-miR169f-5p ath-miR169g-5p	ath-miR167a-5p ath-miR167b	ath-miR167d	ath-miR399f
ath-miR169h ath-miR169i ath-miR169j ath-miR169k ath-miR169l ath-miR169m ath-miR169n	ath-miR319a ath-miR319b	ath-miR319c	ath-miR827
ath-miR396a-5p	ath-miR399d	ath-miR399e	
ath-miR399a			
ath-miR399b			

Kitin protokolüne uygun olacak şekilde tüm RNA'ların konsantrasyonları 500 ng/ μ l'ye sabitlendi. Tablo 3.5'te yer alan bileşenler kullanılarak sentez için 15 μ l son hacimli reaksiyon oluşturuldu. Buzda 5 dakika inkübasyonun ardından Tablo 3.6'da yer alan cDNA sentezi reaksiyon koşullarına uygun olarak cDNA sentezlendi. Sentezin ardından cDNA'lara 80 μ l nükleaz içermeyen dH₂O eklendi ve -20°C'de saklandı.

Tablo 3. 5: cDNA sentez reaksiyon bileşenleri.

cDNA Reaksiyon Bileşenleri	1 örnek için hacimleri
RT Primer Pool (10 μ M)	6.00 μ l
dNTPs with dTTP (100 mM)	0.30 μ l
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ l)	3.00 μ l
10X RT Buffer	1.50 μ l
Rnase Inhibitor (20 U/ μ l)	0.20 μ l
Nuclease-free water	1.00 μ l
Toplam Hacim	15 μ l

Tablo 3. 6: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.

Zaman	Sıcaklık
30 dakika	16°C
30 dakika	42°C
5 dakika	85°C
∞	4°C

3.11. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZPZR) analizi için BIORAD CFX96 cihazı kullanıldı. miRNA anlatımlarının analizleri için kontrol grubu, azot açlığı, kuraklık ve kombine stres uygulanan 7. ve 14. gün kallus örneklerinden elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanıldı. GZPZR için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.7'de, reaksiyon koşulları ise Tablo 3.8'de verildi.

Tablo 3. 7: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri	Hacimleri
SYBR Green Master Mix (2X)	10 µl
10 µM miRNA Forward Primer	1 µl
10 µM miRNA Universal Reverse Primer	1 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	6 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 3. 8: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	
İlk denatürasyon	95°C	10 dakika	
Denatürasyon	95°C	15 saniye	45 döngü
Bağlanma	62°C	1 dakika	
Erime eğrisi	60°C	5 saniye	
	95°C		

GZ PZR ile cihazdan elde edilen C_t değerleri kullanılarak Denklem 3.4'e göre $\Delta\Delta C_t$ değerleri hesaplandı ve ardından $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü kullanılarak miRNA anlatım katsayıları belirlendi (Livak ve Schmittgen, 2001).

$$\Delta\Delta C_t = [C_t (\text{uygulama}) - C_t (\text{aktin})] - [C_t (\text{kontrol}) - C_t (\text{aktin})] \quad (3.4)$$

3.11.1. Gen Anlatımı Analizinde Kullanılan miRNA'lar, Genler ve Özellikleri

GZPZR ile *A. thaliana* kallus örneklerinde, stres koşullarıyla ilişkili olan miRNA'ların anlatım analizleri gerçekleştirildi. Bu tez kapsamında anlatım analizinde kullanılan miRNA'lar ve erişim numaraları dizileriyle birlikte Tablo 3.9'da, "stem-loop" ve ileri primerleri evrensel geri primerle birlikte Tablo 3.10'da, anlatımları araştırılan miRNA'lar, etkilendikleri stres koşulları, potansiyel rolleri ve hedefleri Tablo 3.11'de verildi. Referans genin ileri ve geri primerleriyse Tablo 3.12'de verildi. İçsel kontrol için *Aktin* seçildi.

Tablo 3. 9: GZPZR için anlatım analizi yapılmış olan miRNA'lar, erişim numaraları ve dizileri.

miRNA	Erişim numaraları	miRNA Dizisi
ath-miR165a-3p	MIMAT0000187	TCGGACCAGGCTTCATCCCCC
ath-miR165b	MIMAT0000188	
ath-miR167a-5p	MIMAT0000196	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA
ath-miR167b	MIMAT0000197	
ath-miR167d	MIMAT0000905	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGG
ath-miR167c-5p	MIMAT0001018	TAAGCTGCCAGCATGATCTTG
ath-miR319a	MIMAT0000511	TTGGACTGAAGGGAGCTCCCT
ath-miR319b	MIMAT0000512	
ath-miR319c	MIMAT0001016	TTGGACTGAAGGGAGCTCCTT
ath-miR396a-5p	MIMAT0000944	TTCCACAGCTTTCTTGAAGT
ath-miR396b-5p	MIMAT0000945	TTCCACAGCTTTCTTGAAGTT
ath-miR399a	MIMAT0000951	TGCCAAAGGAGATTTGCCCTG
ath-miR399b	MIMAT0000952	TGCCAAAGGAGAGTTGCCCTG
ath-miR399d	MIMAT0000954	TGCCAAAGGAGATTTGCCCGG
ath-miR399e	MIMAT0000955	TGCCAAAGGAGATTTGCCTCG
ath-miR399f	MIMAT0000956	TGCCAAAGGAGATTTGCCCGG
ath-miR827	MIMAT0004243	TTAGATGACCATCAACAACT
ath-miR169b-5p	MIMAT0000906	CAGCCAAGGATGACTTGCCGG
ath-miR169c	MIMAT0000907	

Tablo 3.9 (devam):

ath-miR169d	MIMAT0000908	TGAGCCAAGGATGACTTGCCG
ath-miR169e	MIMAT0000909	
ath-miR169f-5p	MIMAT0000910	
ath-miR169g-5p	MIMAT0000911	
ath-miR169h	MIMAT0000913	TAGCCAAGGATGACTTGCTG
ath-miR169i	MIMAT0000914	
ath-miR169j	MIMAT0000915	
ath-miR169k	MIMAT0000916	
ath-miR169l	MIMAT0000917	
ath-miR169m	MIMAT0000918	
ath-miR169n	MIMAT0000919	

Tablo 3. 10: cDNA sentezinde ve GZPZR’de kullanılacak olan miRNA stem-loop, ileri ve evrensel geri primerleri.

miRNA	“Stem-loop” ve İleri Primer Dizileri
ath-miR165a-3p ath-miR165b	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGG GGGA F: GCGGCGGTCCGACCAGGCTTCATC
ath-miR167a-5p ath-miR167b	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTA GATC F: GCGGCGGTGAAGCTGCCAGCATG
ath-miR167d	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCC AGAT F: GCGGCGGTGAAGCTGCCAGCATG
ath-miR167c-5p	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCA AGAT F: GCGGCGGTAAGCTGCCAGCATG
ath-miR169b-5p ath-miR169c	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCC GGCA F:GCGGCGGCAGCCAAGGATGACTTG
ath-miR169d ath-miR169e ath-miR169f-5p ath-miR169g-5p	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCG GCAA F:GCGGCGGTGAGCCAAGGATGAC

Tablo 3.10 (devam):

ath-miR169h-n	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCA GGCA F: GCGGCGGTAGCCAAGGATGACTTG
ath-miR319a ath-miR319b	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAG GGAG F: GCGGCGGTTGGACTGAAGGGAG
ath-miR319c	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAA GGAG F: GCGGCGGTTGGACTGAAGGGAG
ath-miR396a-5p	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCA GTTC F: GCGGCGGTTCCACAGCTTTCTTG
ath-miR396b-5p	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAA GTTC F: GCGGCGGTTCCACAGCTTTCTTG
ath-miR399a	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCA GGGC F: GCGGCGGTGCCAAAGGAGATTTG
ath-miR827	SL:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAG TTTG F: GCGGCGGTTAGATGACCATCAAC
Evrensel primer	geri 5' ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG '3

Tablo 3. 11: Tez kapsamında, stres koşulları altında değişimleri incelenmiş olan miRNA aileleri, etkilendikleri stres faktörleri ve bitkideki potansiyel görevleri.

miRNA	Stres Koşulları	Potansiyel Roller ve Hedefleri	Referanslar
miR165	Tuz, 4°C	Gelişim, HD-ZIP III	(Liu ve diğ., 2008a)
miR167	Kuraklık, NaCl	Dişi ve erkek organ gelişimi, ARF6 ve ARF8	(Jones-Rhoades ve Bartel, 2004) (Liu ve diğ. 2008a) (Covarrubias ve Reyes, 2010)
miR169	Kuraklık	Nitrojen Homeostazisi, <i>NFYA5</i>	(Hsieh ve diğ., 2009) (Pegler ve diğ., 2019) (Liang ve diğ., 2012)
mir319	Tuz, 4°C	Morfogenez ve kök lateral organlar, TCP TFs	(Liu ve diğ., 2008a) (Covarrubias ve Reyes, 2010)
miR396	Kuraklık, NaCl, 4°C	Çiçeklenme, <i>GRL</i>	(Jones-Rhoades ve Bartel, 2004) (Liu ve diğ., 2008a) (Covarrubias ve Reyes, 2010) (Pegler ve diğ., 2019)
mir399a-f	Azot Açlığı	Fosfat Homeostazisi, Ubikitin Konjugaz E2, <i>PHO2</i>	(Jones-Rhoades ve Bartel, 2004) (Covarrubias ve Reyes, 2010) (Liang ve diğ., 2012) (Pegler ve diğ., 2019)
miR827	Azot Açlığı	Nitrojen/Fosfor Metabolizması, NLA	(Arteaga-Vázquez ve diğ., 2006) (Liang ve diğ. 2012)

Tablo 3. 12: GZPZR için kullanılan *Aktin* referans geninin forward ve reverse primerleri (Sáenz-Mata ve diğ., 2014).

Aktin 2/8	İleri Primer	5'GCCAGTGGTCGTACAACCG'3
AT1G49240	Geri Primer	5'TCATGAGGTAATCAGTAAGGTCAC'3
AT3G18780		
Ürün boyutu	142	

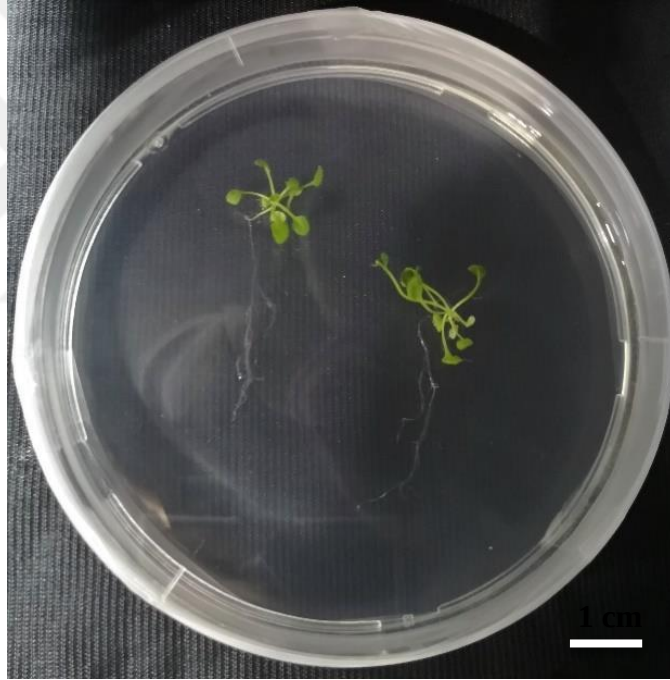
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler GraphPad 9.1.2 demo sürümü kullanılarak yapıldı. MiRNA anlatım analizlerinin istatistiksel olarak analizi için Tek Yönlü (“One Way”) ANOVA Tukey testi uygulandı ve $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. miRNA anlatımı deneyleri 3 biyolojik ve 3 teknik tekrar olacak şekilde yapıldı. miRNA anlatımlarıyla hazırlanan HeatMap için İki Yönlü (“Two Way”) ANOVA Tukey Testi yapıldı. Zar hasarının ve büyüme indeksinin analizi için Tukey analizi yapıldı ve $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi. Zar hasarı için 2 biyolojik tekrar ve 3 teknik tekrar, büyüme indeksinin hesaplanması için 2 biyolojik tekrar olacak şekilde ölçüm alındı.

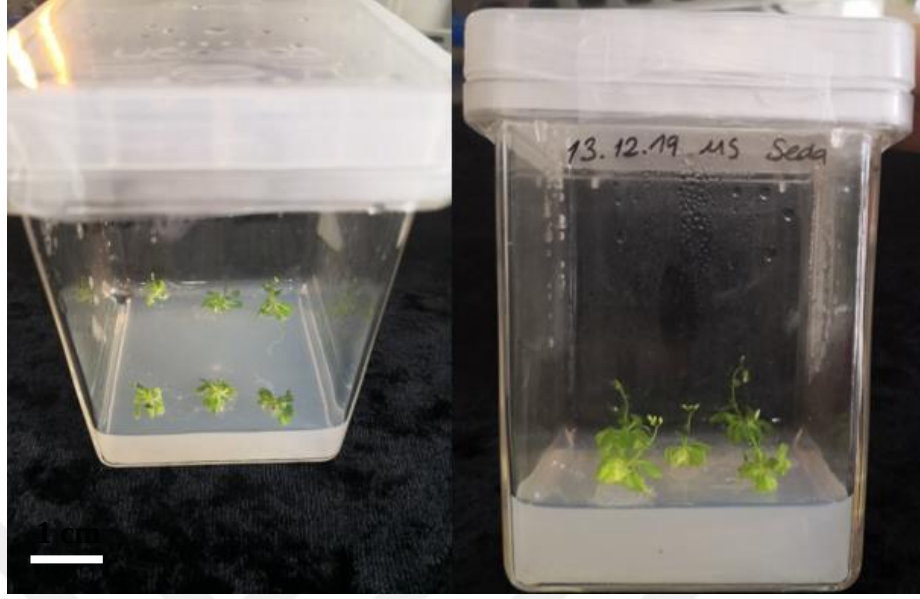
4. BULGULAR

4.1. TOHUM ÇİMLENMESİ VE KALLUS KÜLTÜRLERİNİN ELDE EDİLMESİ

A. thaliana Col-0 tohumları yüzey sterilizasyonlarının ardından MS besiyeri bulunan petri kaplarında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık periyotta bitki büyütme kabininde çimlendirildi. Bitkiler uygun büyüklüğe geldikten sonra (Şekil 4.1) kök ve boy uzamasını sağlamak için MS besiyeri içeren magentalara aktarıldı (Şekil 4.2). Bitki büyütme kabininde 14 gün büyümesi beklendikten sonra (Şekil 4.3) steril hava akımlı laminar kabinde bitkilerin kökleri 1'er cm olacak şekilde steril bistüri ucu ile parçalara ayrıldı. Bitki eksplantları, kallus oluşumunu teşvik eden ve bitki büyüme düzenleyicisi 2,4-D içeren MS besiyerlerine aktarıldı (Şekil 4.4).



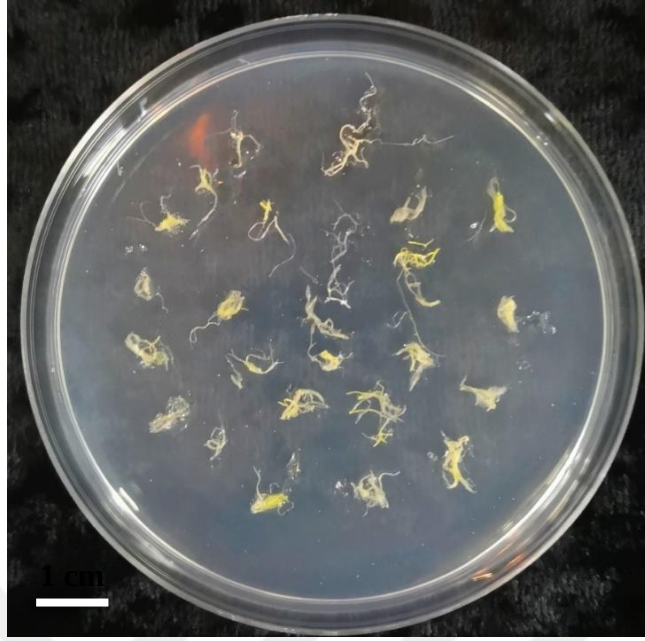
Şekil 4. 1: 3 haftalık *A. thaliana* bitkileri.



Şekil 4. 2: Boy ve kök uzaması için MS besiyeri içeren magentalara aktarılan üç haftalık *A. thaliana* bitkileri.



Şekil 4. 3: MS besiyeri içeren magentalarda 14 gün büyütülen 5 haftalık *A. thaliana* bitkileri.

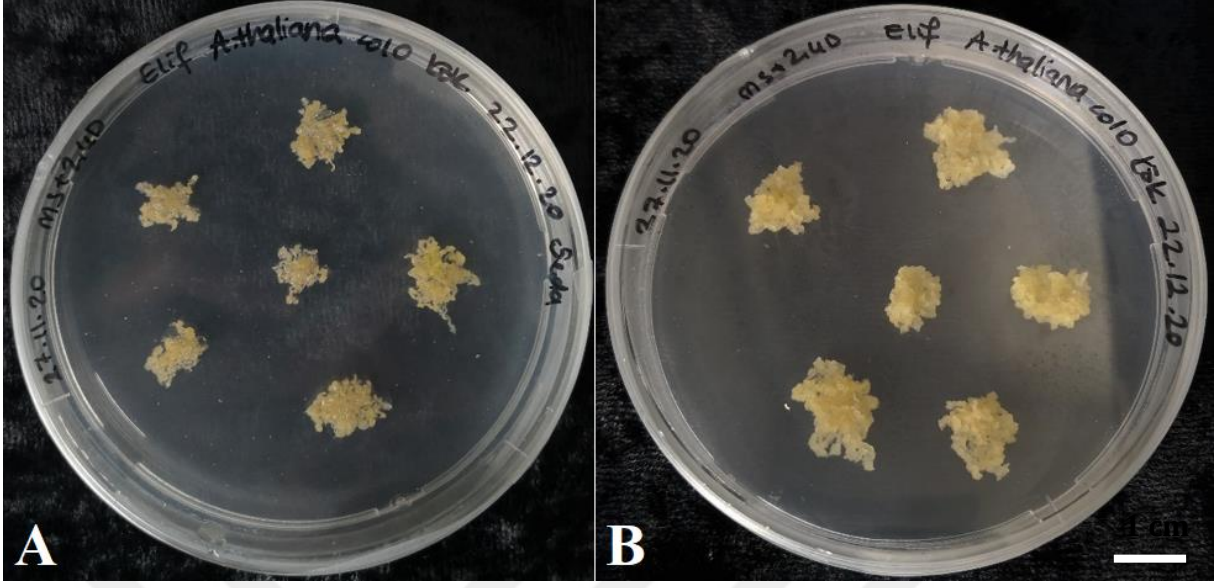


Şekil 4. 4: Bitki kök eksplantlarından kallus kültürlerinin kurulması.

Kallus oluşumunun indüklenmesi için bir ay boyunca 2,4-D'li MS besiyerinde tutulan bitki eksplantları Şekil 4.5'teki gibi kallus oluşumu görüldükten sonra 2,4-D içeren MS besiyeri kullanılarak alt kültürlenme işlemine ayda bir olacak şekilde devam edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4. 5: 1 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerinde 30 günün sonunda gözlenen kallus oluşumu.



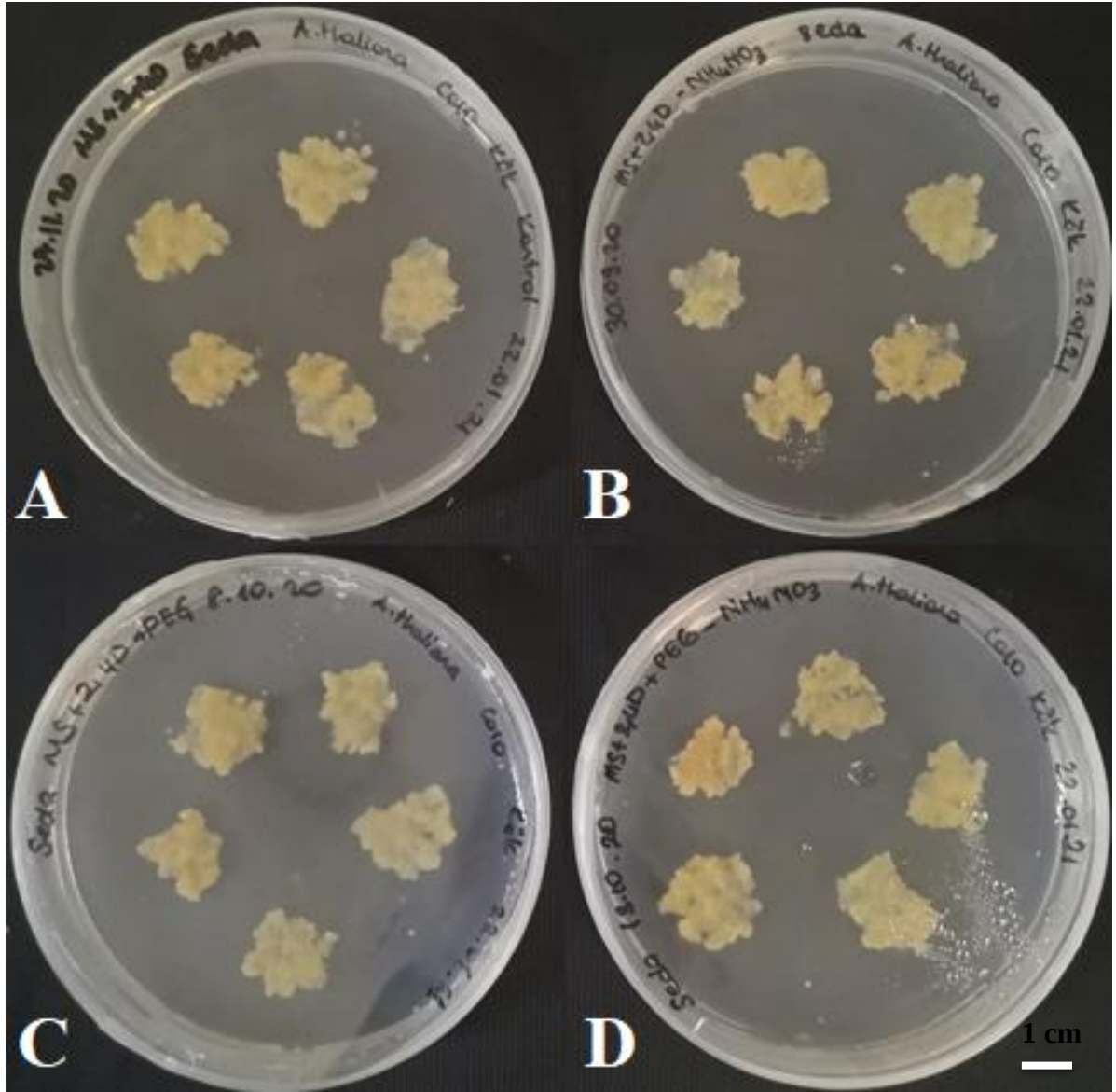
Şekil 4. 6: Alt kültürlen kallusların 2,4-D içeren MS besiyerinde 30 günlük büyümesi. A: Kallus indüklemesi başlangıcı. B: 30 gün sonunda kalluslardaki değişim.

4.2. STRES UYGULAMASININ MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ETKİLERİ

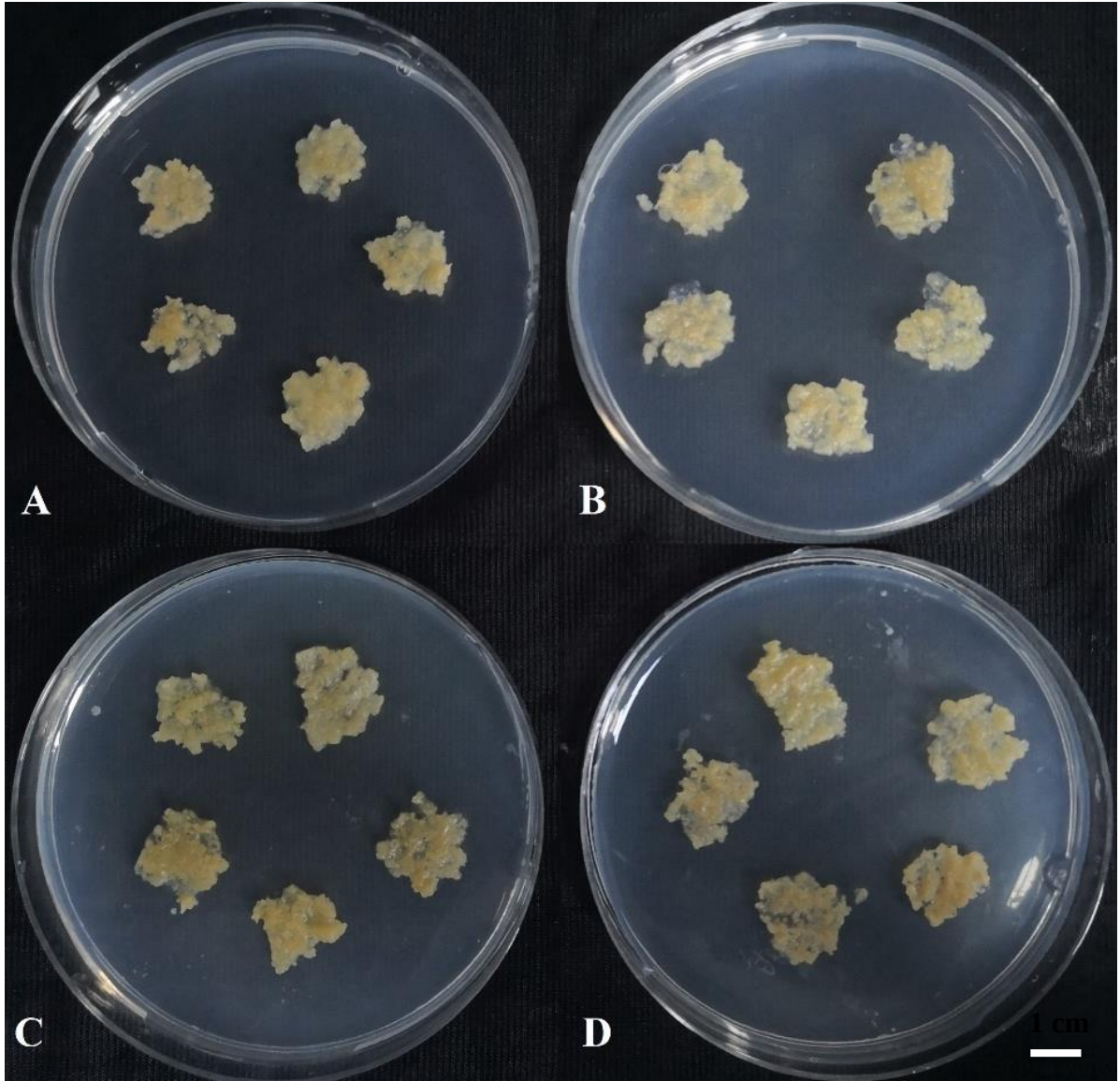
Deneyler için yeterli miktarda kallus alt kültürlendikten sonra kalluslar 7 gün ve 14 gün sonunda toplanmak üzere kontrol, azot açlığı, kuraklık ve kombine (azot açlığı ve kuraklık stres koşulunun sağlandığı) 1 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerilerine aktarılarak bitki büyütme kabininde tutuldu (Şekil 4.7).

Stres uygulaması yapılmış olan 7 ve 14 gün kallus örneklerinde kontrol grubuna göre renk değişimi gözlemlendi. Kombine stres uygulanmış olan kallusların renginin azot açlığı ve kuraklık uygulanmış olan kallus örneklerine kıyasla daha sarı renkli olduğu gözlemlendi. 7 ve 14 gün uygulamalarına bakıldığında 14 gün stres uygulaması yapılmış olan kallusların, 7 gün stres uygulaması yapılmış olan kallus örneklerine göre daha fazla sarı renkli olduğu gözlemlendi.

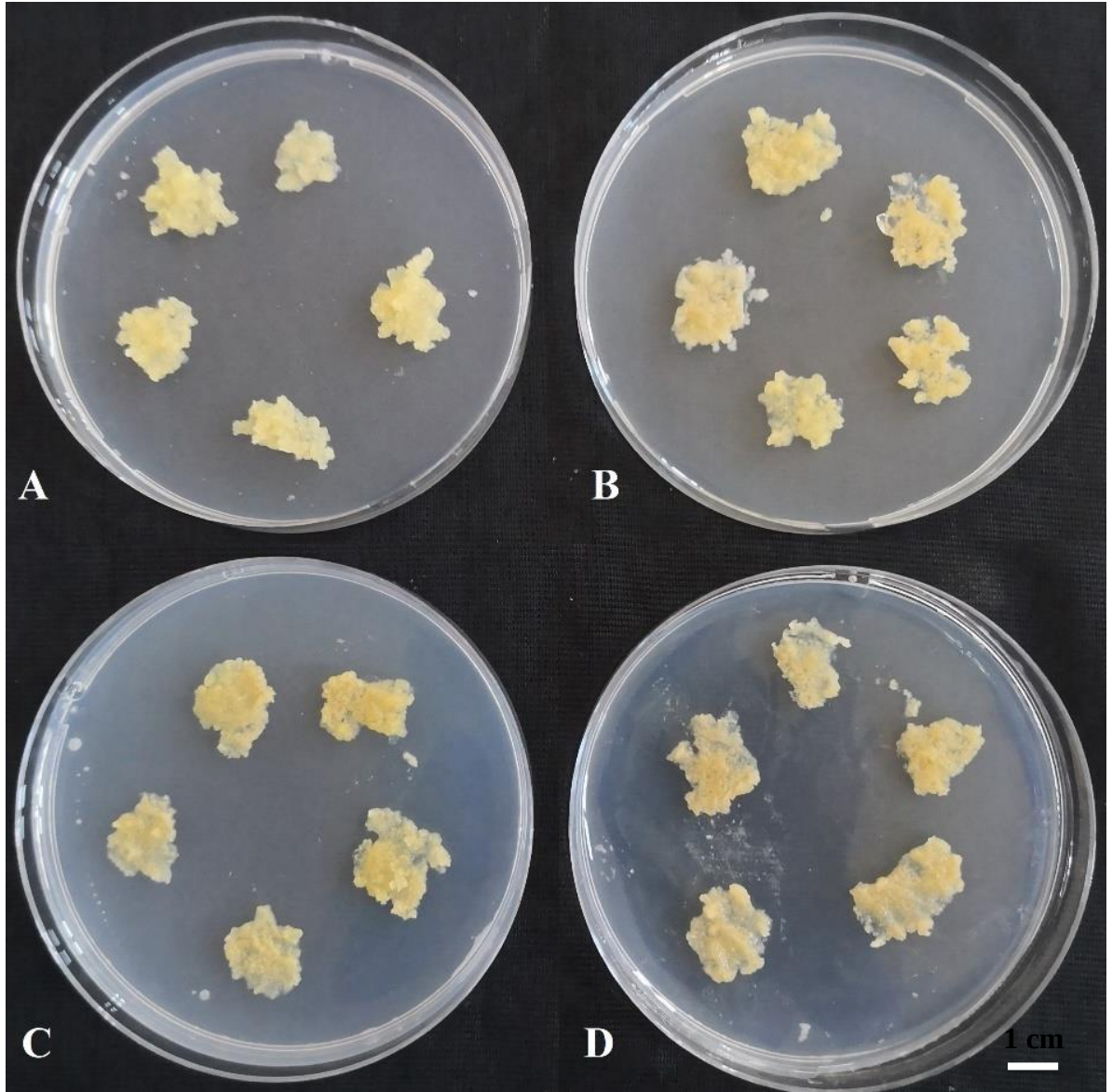
Kombine ve kuraklık stresi uygulanmış 7 ve 14 gün kallus örnekleri, kontrol grubu ve azot açlığı stresi uygulanmış olan 7 ve 14 gün kallus örneklerine kıyasla daha kuru bir yapıya sahip oldukları ve bu kallus doku parçalarında kolaylıkla dağılmalar olduğu gözlemlendi.



Şekil 4. 7: Stres besiyerlerine aktarılan kalluslar. A: 2,4-D MS kontrol besiyeri, B: 2,4-D Azot açlığı MS besiyeri, C: 2,4-D Kuraklık MS besiyeri, D: 2,4-D Kombine (Azot açlığı ve kuraklık) MS besiyeri.



Şekil 4. 8: 7 gün stres uygulaması yapılmış kalluslar. A: 7 gün 2,4-D MS kontrol besiyeri, B: 7 gün 2,4-D azot açlığı MS besiyeri, C: 7 gün 2,4-D kuraklık MS besiyeri, D: 7 gün 2,4-D kombine (azot açlığı ve kuraklık) MS besiyeri.



Şekil 4. 9: 14 gün stres uygulaması yapılmış kalluslar, A: 14 gün 2,4-D MS kontrol besiyeri, B: 14 gün 2,4-D azot açlığı MS besiyeri, C: 14 gün 2,4-D kuraklık MS besiyeri, D: 14 gün 2,4-D kombine (azot açlığı ve kuraklık) MS besiyeri.

4.2.1. Kuraklık ve Azot Açlığının Büyüme İndeksine Etkisi

Kallus örnekleri stres besiyerlerine ve kontrol besiyerine 0,5 g tartılarak aktarıldı. Örnekler 7 ve 14 gün stres uygulamasının ardından tekrar tartıldı ve % Büyüme oranları hesaplandı. Stres uygulamaları kıyaslandığında 7 gün örneklerinin tamamında ağırlık azalması gözlemlendi, en fazla ağırlık düşüşünün kuraklık stresinde olduğu belirlendi. 14 gün uygulamalarında ise kontrol grubundaki ağırlık artışına kıyasla kuraklık uygulamasında artış, kombine stres uygulamasında ise başlangıç ağırlığına göre azalma olduğu belirlendi (Tablo 4.1).

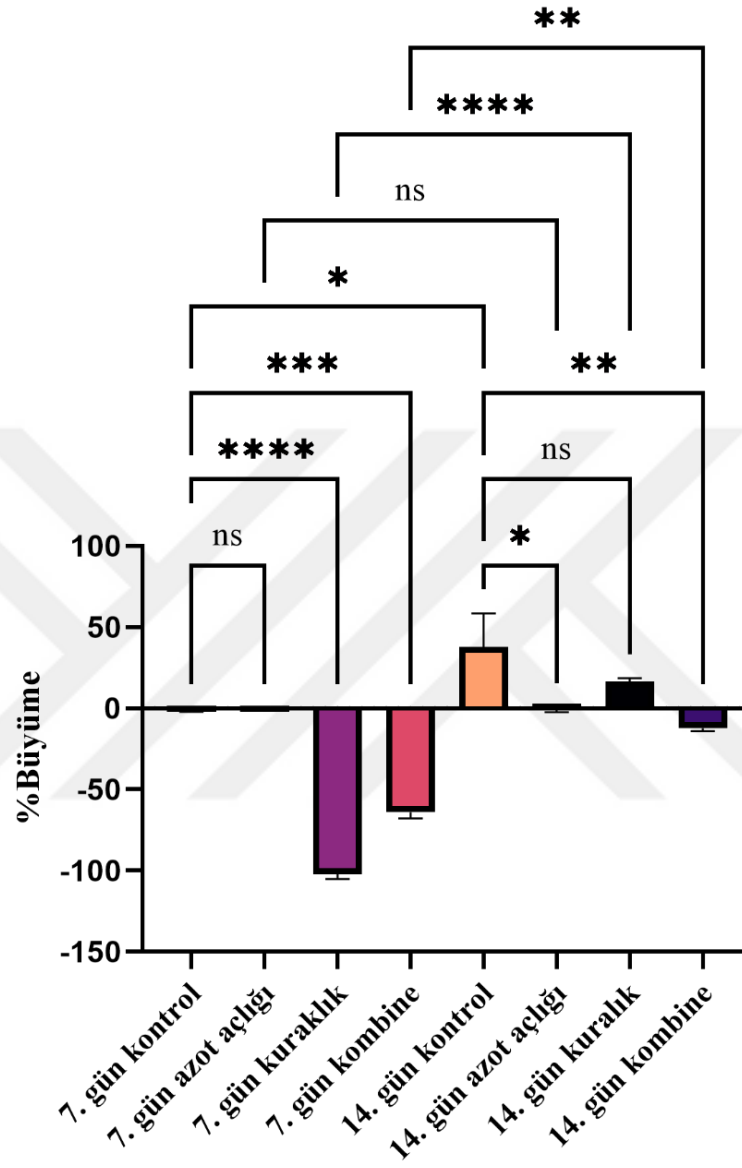
Tablo 4. 1: 7 ve 14 gün boyunca azot açlığı, kuraklık ve kombine stres uygulanmış olan kallus örneklerinin kontrol gruplarıyla birlikte ağırlıklarındaki değişim.

Uygulamalar	Başlangıç Ağırlığı (g)	Son Ağırlık (g)	% Büyüme
7. Gün Kontrol	0,5	0,49	-2,04
	0,49	0,48	-2,08
7. Gün Azot Açlığı	0,5	0,49	-2,04
	0,51	0,5	-2,00
7. Gün Kuraklık	0,49	0,24	-104,17
	0,5	0,25	-100,00
7. Gün Kombine	0,5	0,3	-66,67
	0,5	0,31	-61,29
14. Gün Kontrol	0,5	0,65	23,08
	0,5	1,05	52,38
14. Gün Azot Açlığı	0,5	0,49	-2,04
	0,5	0,5	0,00
14. Gün Kuraklık	0,5	0,59	15,25
	0,5	0,61	18,03
14. Gün Kombine	0,5	0,44	-13,64
	0,5	0,45	-11,11

GraphPad programı ile yapılan Tukey testi sonucunda 7. gün kontrol örneği ile kuraklık (**** $p < 0.0001$) ve kombine (** $p < 0.0006$) stres uygulamasında anlamlı bir farklılık olduğu, azot açlığı stres uygulaması sonucunda ağırlık değişiminin ise anlamlı olmadığı görüldü.

Bununla birlikte, 14. gün kontrol örneği ile azot açlığı (* $p < 0.0124$) ve kombine (** $p < 0.0024$) stres uygulamaları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü. Örnekler 7. gün ve 14. gün olarak kıyaslandığında azot açlığı streslerinde anlamlı bir değişimin olmadığı, kontrol grupları, kuraklık grupları ve kombine grupları arasında anlamlı değişim olduğu gözlemlendi (Şekil 4.10).

Büyüme İndeksi



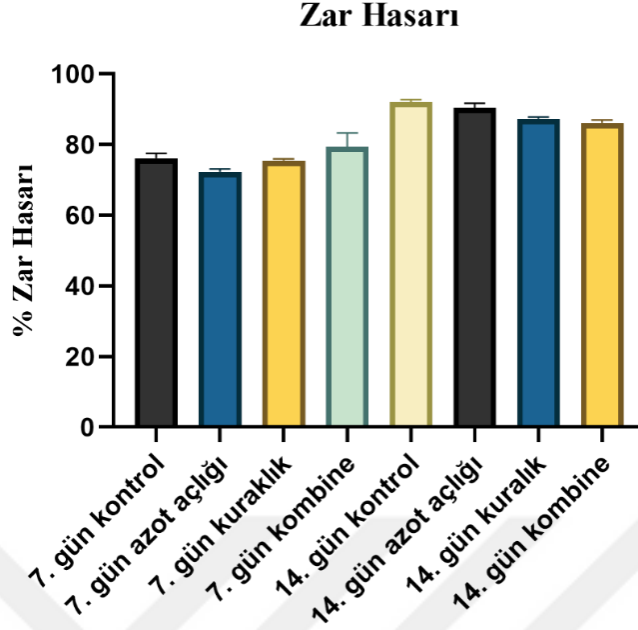
Şekil 4. 10: 7 ve 14 gün stres uygulanmış olan kallus örneklerinin kontrol grubuyla birlikte ağırlıklarındaki değişimin grafiği. $p < 0.1234$ (ns), $p < 0.0332$ (*), $p < 0.0021$ (**), $p < 0.0002$ (***), $p < 0.0001$ (****).

4.2.2. Zar Hasarının Belirlenmesi

Azot açlığı, kuraklık ve kombine stresine, 7 ve 14 gün maruz bırakılan kallus örneklerinde zar hasarı olduğu (Tablo 4.2), ancak 7. gün uygulamalarındaki zar hasarındaki değişim ile 14. günlerin uygulamalarındaki zar hasarı değişiminin anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.11).

Tablo 4. 2: 7 ve 14 gün stres uygulanmış kallus örneklerinin kontrol grubuyla birlikte % Zar Hasarı değerleri.

Uygulamalar	C1($\mu\text{s/cm}$)	C2($\mu\text{s/cm}$)	% Zar Hasarı
7. Gün Kontrol	126,5	164	77,13
	90,5	120,5	75,10
7. Gün Azot Açlığı	86	118	72,88
	64,5	90	71,67
7. Gün Kuraklık	150,3	200	75,15
	182	240	75,83
7. Gün Kombine	136	165,5	82,18
	137,5	179,5	76,60
14. Gün Kontrol	185	200	92,50
	156,5	171	91,52
14. Gün Azot Açlığı	94	105	89,52
	115,5	126,5	91,30
14. Gün Kuraklık	120,5	137,5	87,64
	80	92	86,96
14. Gün Kombine	71	83	85,54
	134	154,5	86,73



Şekil 4. 11: 7 ve 14 gün azot açlığı, kuraklık ve kombine stres uygulanmış kallus örneklerinin kontrol gruplarıyla birlikte % Zar Hasarı grafiği.

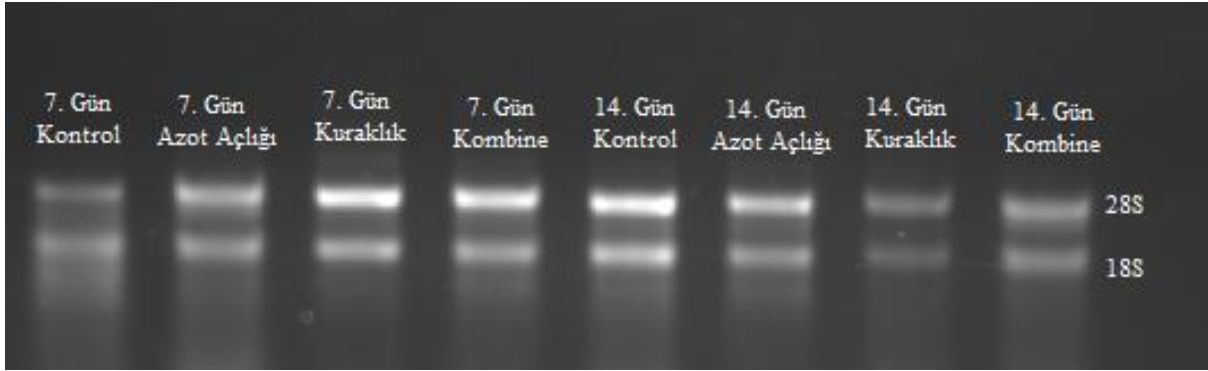
4.3. KURAKLIK VE AZOT AÇLIĞI STRESLERİNİN MİRNA ANLATIMLARINA ETKİSİ

4.3.1. RNA İzolasyonu

miRNA anlatım analizlerinin yapılabilmesi için azot açlığı, kuraklık ve kombine streslerine 7 ve 14 gün maruz bırakılmış olan kallus dokuları ve kontrol örneklerinden RNA izolasyonu üç biyolojik tekrarlı olacak şekilde yapıldı. İzole edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri yapılarak konsantrasyon ve saflık değerleri incelendi ve Tablo 4.3'te verildi. A_{260}/A_{280} oranı ~2.0 olan RNA'ların saflığı uygun olarak kabul edildi. Uygun saflıkta olduğu kabul edilen RNA'ların bütünlüğünün tespiti için agaroz jel elektroforezi yöntemiyle RNA'lar gözlemlendi (Şekil 4.12). Agaroz jel elektroforezinde bütünlüğü belirlenen RNA'lar GZPZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere primer havuzlarıyla hazırlanmış cDNA'lar sentezlendi.

Tablo 4. 3: Stres uygulaması yapılmış kallus örneklerinden izole edilen RNA'ların spektrofotometre değerleri.

Deney Grupları		Konsantrasyon (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
7. Gün Kontrol	1. Tekrar	1511,2	2,09
	2. Tekrar	1517,8	2,1
	3. Tekrar	171,1	1,94
7. Gün Azot Açlığı	1. Tekrar	4248	2,14
	2. Tekrar	917,8	2,09
	3. Tekrar	532,2	2,02
7. Gün Kuraklık	1. Tekrar	307,2	2
	2. Tekrar	266,5	1,9
	3. Tekrar	440,5	1,76
7. Gün Kombine	1. Tekrar	329,5	1,98
	2. Tekrar	219,5	1,82
	3. Tekrar	393,1	1,96
14. Gün Kontrol	1. Tekrar	6004,5	2,09
	2. Tekrar	371,4	2,08
	3. Tekrar	3888,8	2,09
14. Gün Azot Açlığı	1. Tekrar	403,6	1,87
	2. Tekrar	409	2
	3. Tekrar	998,3	2,08
14. Gün Kuraklık	1. Tekrar	583	1,99
	2. Tekrar	182,6	1,98
	3. Tekrar	2037	2,13
14. Gün Kombine	1. Tekrar	4634,9	2,09
	2. Tekrar	2117,9	2,1
	3. Tekrar	1339,5	2,13

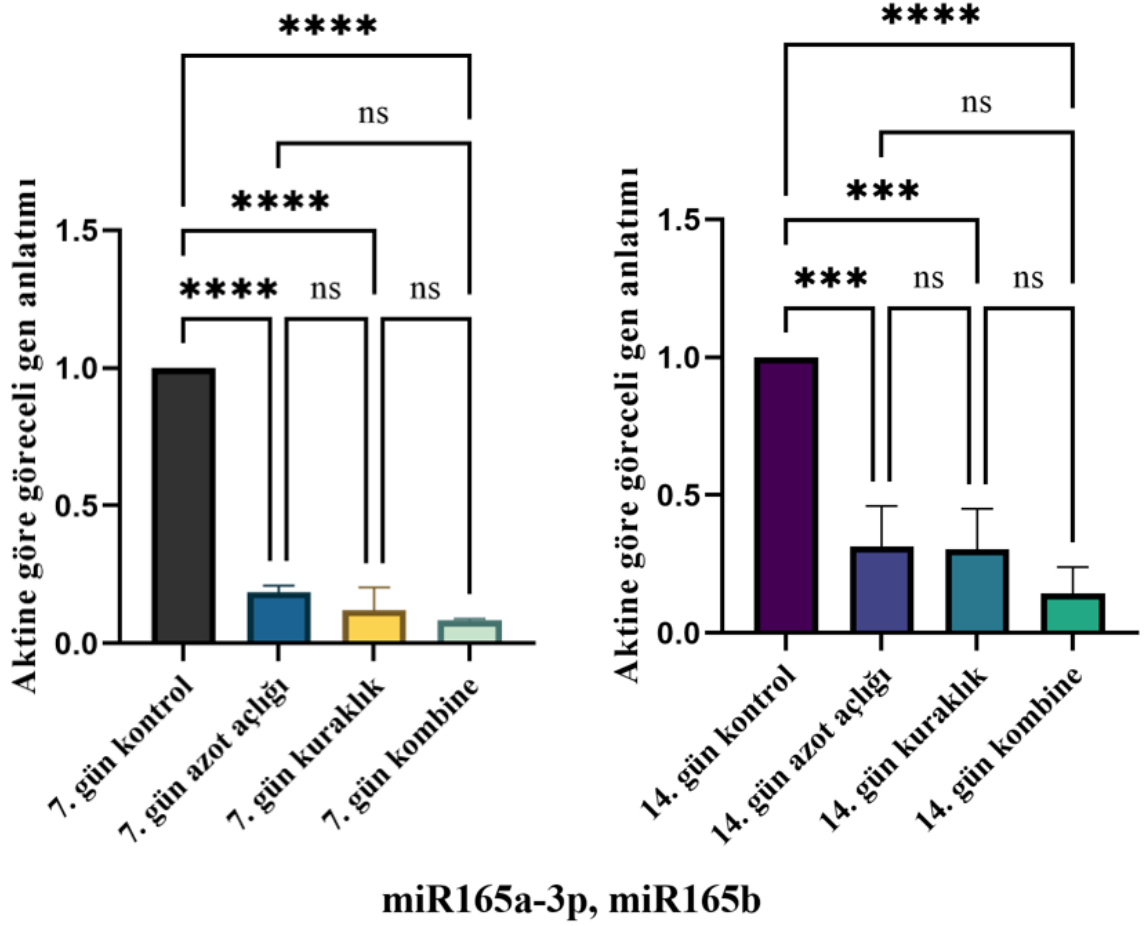


Şekil 4. 12: Stres uygulaması yapılmış kallus örneklerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel görüntüsü.

4.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

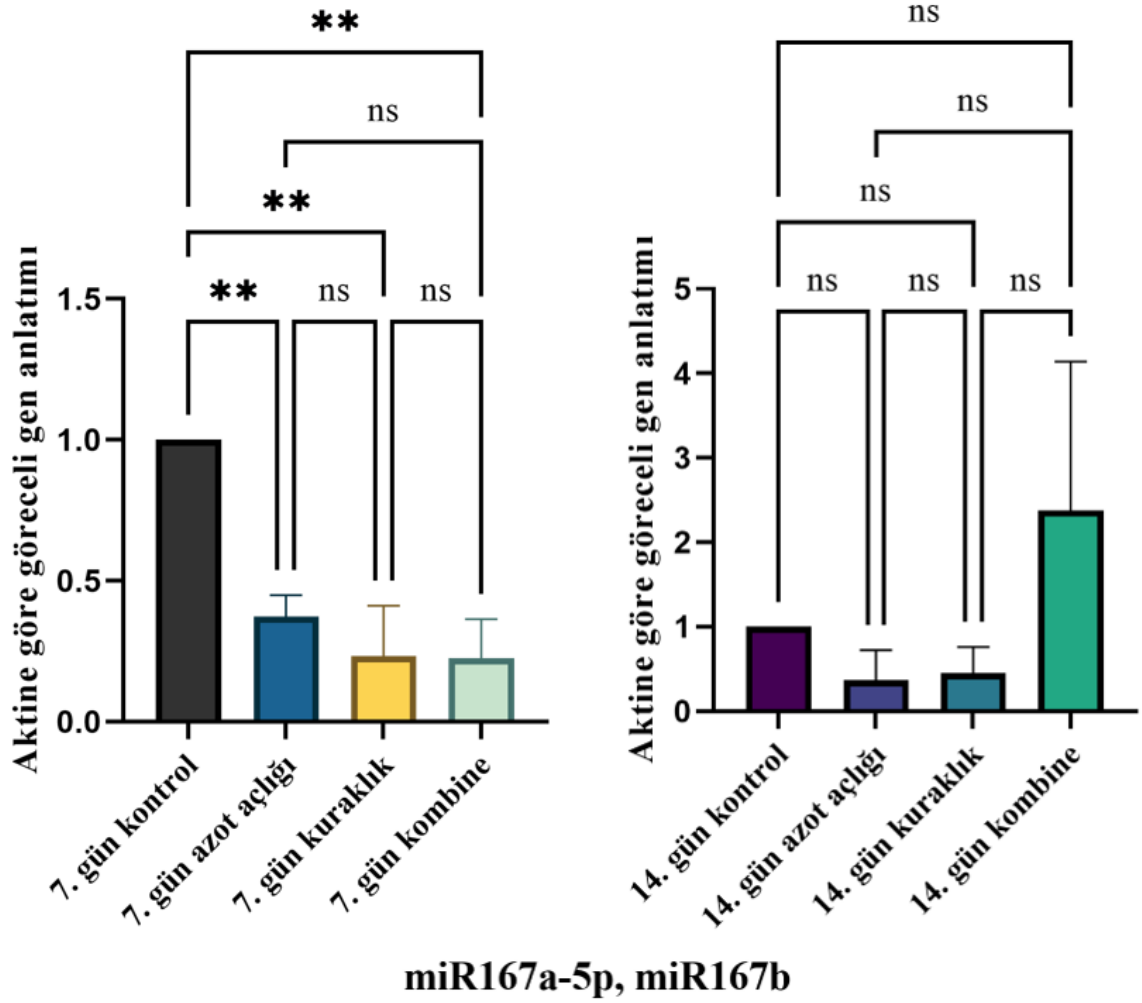
Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarına 7 ve 14 gün boyunca maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* kallus dokularından izole edilen RNA'ların cDNA'ya çevriminin ardından, Tablo 3.10'da verilmiş olan miRNA'ların anlatım analizleri Tek-yönlü ("One Way") ANOVA Tukey Testi ile analiz edildi ve $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

miR165a-3p, miR165b'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.13'te verildi. Kontrol grubuna kıyasla, 7 gün stres uygulaması yapılan örneklerin tümünde anlamlı bir azalma olduğu (**** $p<0.0001$), 14 gün stres uygulamalarında ise kontrol grubuna göre azot açlığında (** $p=0.0004$), kuraklıkta (** $p=0.0003$) ve kombine streste (**** $p<0.0001$) azalma olduğu görüldü (Şekil 4.13).



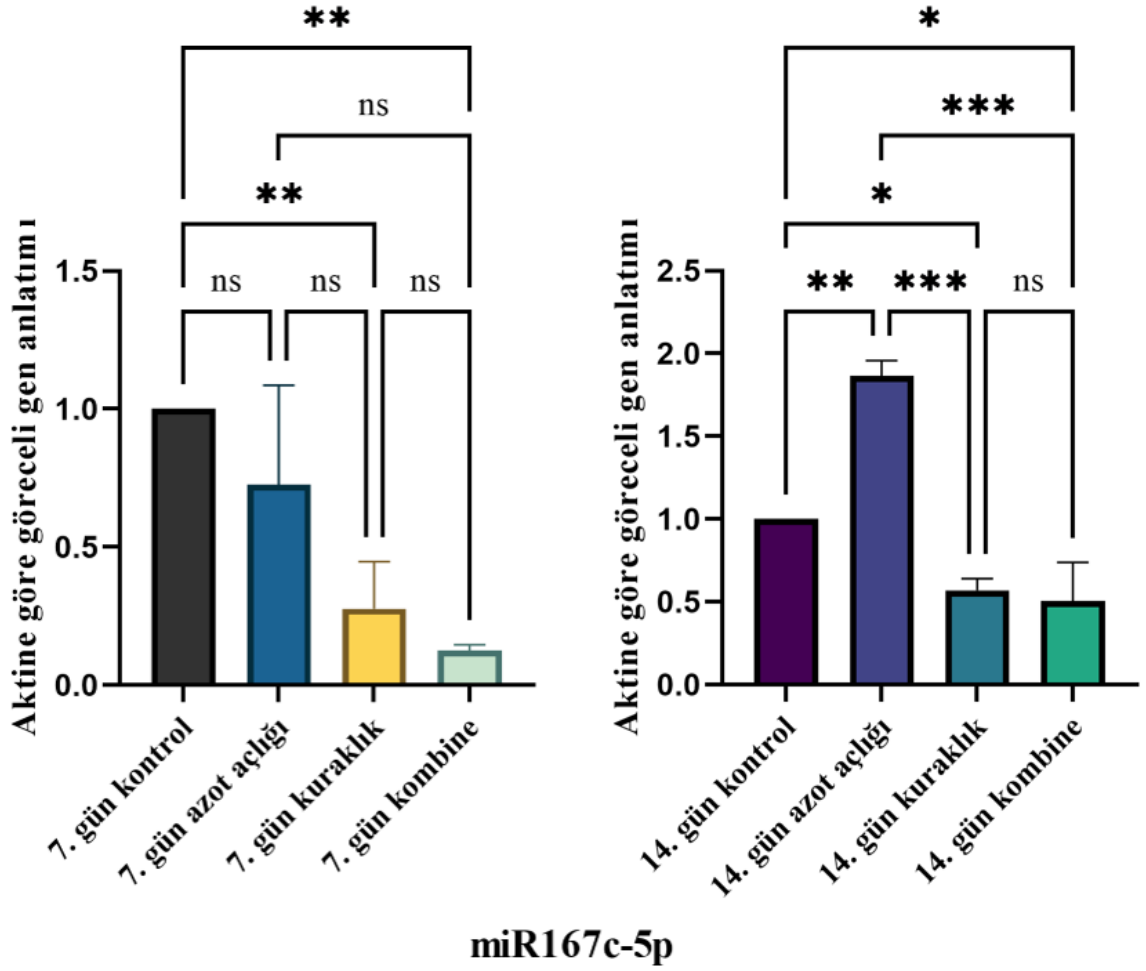
Şekil 4. 13: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR165a-3p, miR165b anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).

miR167a-5p, miR167b'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.14'te verildi. Kontrol grubuna kıyasla, 7 gün azot açlığı (**p=0.0055), kuraklık (**p=0.0010) ve kombine (**p=0.0018) stres uygulaması yapılan örneklerin tümünde anlamlı bir azalma olduğu görülürken, 14 gün stres uygulamalarında ise kontrol grubuna göre stres koşulları altında anlamlı bir değişim olmadığı görüldü (Şekil 4.14).



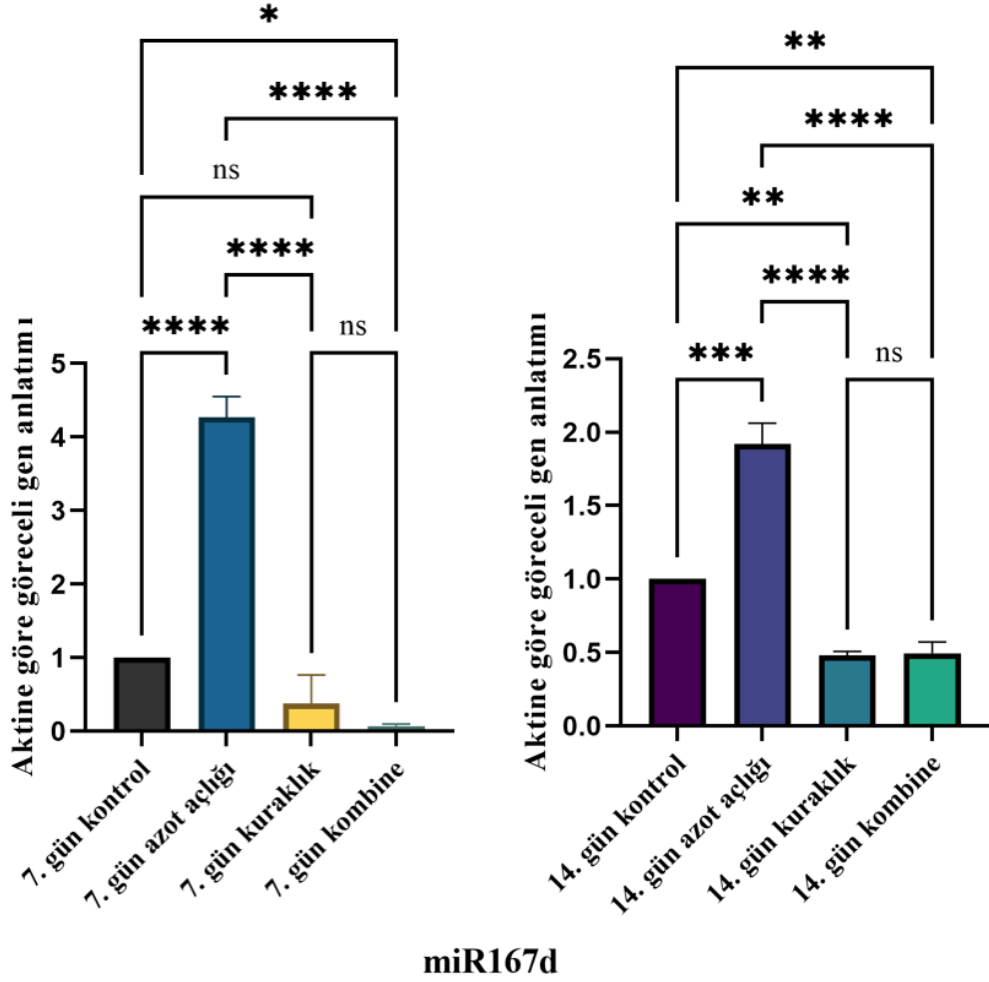
Şekil 4. 14: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR167a-5p, miR167b anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR167c-5p'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.15'te verildi. Kontrol grubuna kıyasla, 7 gün azot açlığı uygulamasında anlamlı bir değişim yokken, kuraklık (**p=0.0097) ve kombine (**p=0.0066) stres uygulaması yapılan örneklerin tümünde anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Bununla beraber, 14 gün stres uygulamalarında ise kontrol grubuna göre azot açlığı stresinde anlamlı bir artış (**p=0.0018) olduğu, kuraklık (*p=0.0356) ve kombine (*p=0.0204) stres koşulları altında ise anlamlı bir azalma olduğu görüldü (Şekil 4.14). miR167c-5p'nin 14 gün stres uygulamasında azot açlığının tek başına uygulandığı örneklerle kombine örneklerindeki anlatımları kıyaslandığında anlamlı şekilde (***p=0.003) azaldığı görüldü.



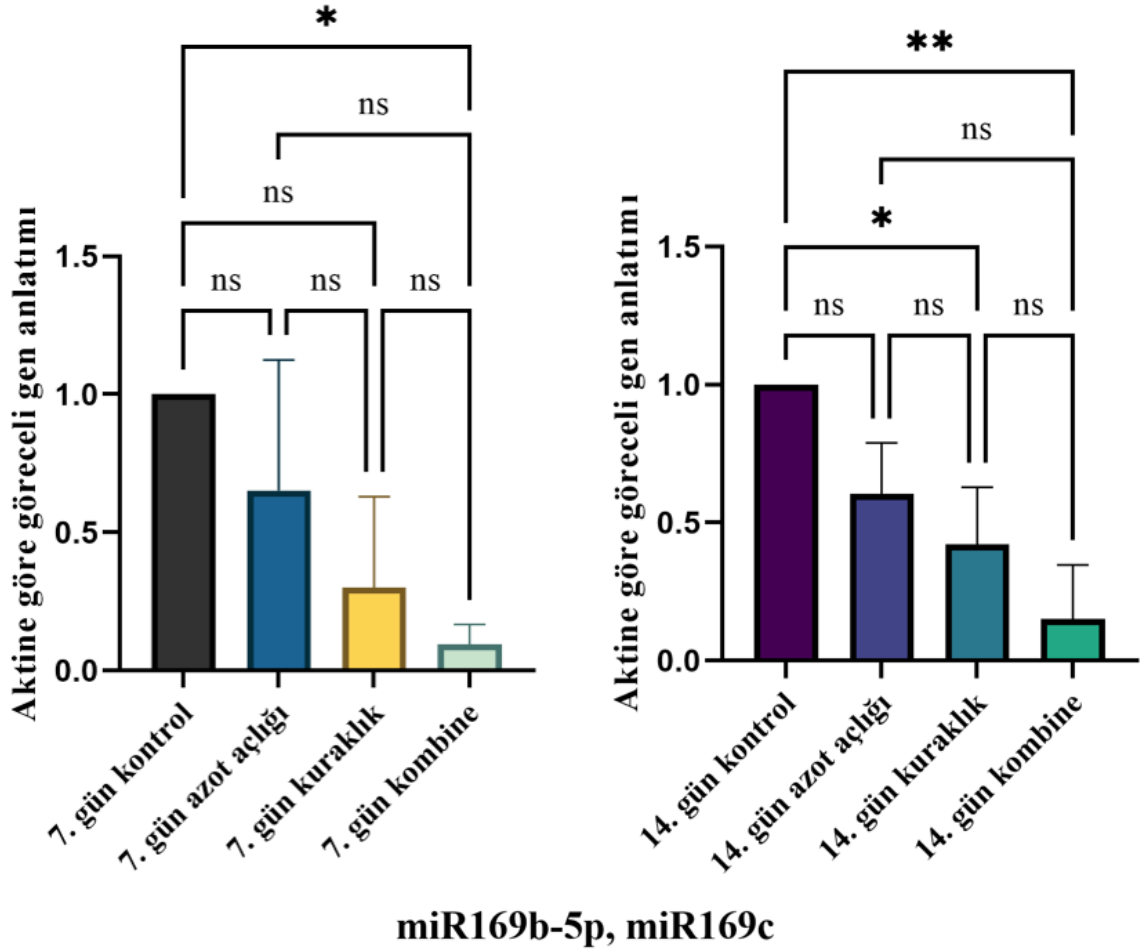
Şekil 4. 15: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR167c-5p anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR167d'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.16'da verildi. Kontrol grubuna kıyasla, 7 gün azot açlığı uygulamasında anlamlı bir ($****p<0.0001$) artış varken, kuraklıktaki azalmanın anlamsız ve kombine stres uygulaması yapılan örneklerdeki miR167d anlatımının anlamlı ($*p=0.0191$) bir azalma olduğu görüldü. Bununla beraber, 14 gün stres uygulamalarında ise kontrol grubuna göre azot açlığı stresinde anlamlı bir artış ($***p=0.0001$) olduğu, kuraklık ($*p=0.022$) ve kombine ($*p=0.0025$) stres koşulları altında ise anlamlı bir azalma olduğu görüldü. MiR167d'nin 7 ve 14 gün stres uygulamalarında azot açlığının tek başına uygulandığı örneklerle kombine örneklerindeki anlatımları kıyaslandığında her iki grupta da anlamlı şekilde ($****p<0.0001$) azaldığı görüldü (Şekil 4.16).



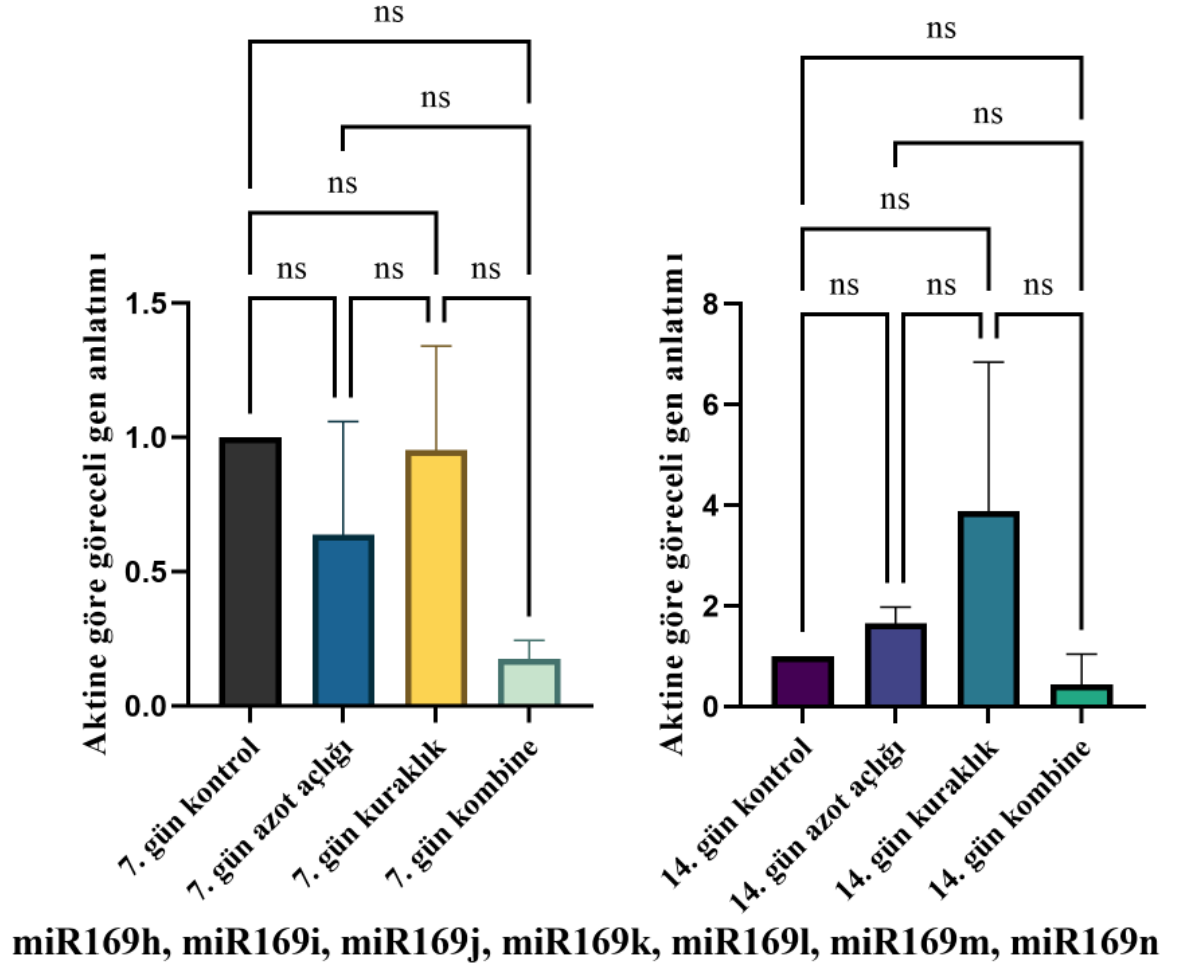
Şekil 4. 16: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR167d anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).

miR169b-5p, miR169c'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.17'de verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 gün uygulanan streslerde kombine anlamlı (*p=0.0138) azalma varken, diğer stres uygulamalarındaki azalmanın anlamlı olmadığı görüldü. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 14 gün stres uygulanmış örneklerde ise 7 gün uygulanan stres koşulları ile paralellik gösterecek şekilde azaldığı, ek olarak kuraklıkta (*p=0.0317) ve kombine (**p=0.0064) anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4.17).



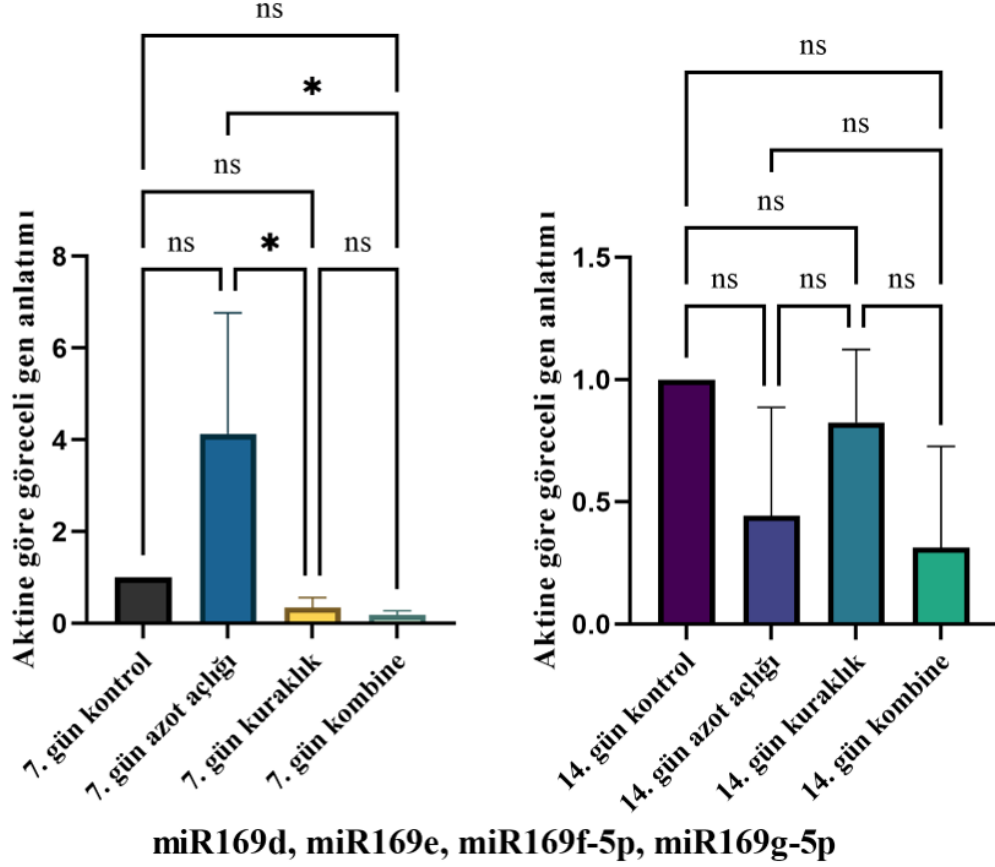
Şekil 4. 17: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR169b-5p, miR169c anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR169h, miR169i, miR169j, miR169k, miR169l, miR169m, miR169n grubunun azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.18’de verildi. Bu miR169 ailesi üyelerinin anlatımlarındaki değişimin stres koşulları altında anlamlı olmadığı görüldü (Şekil 4.18).



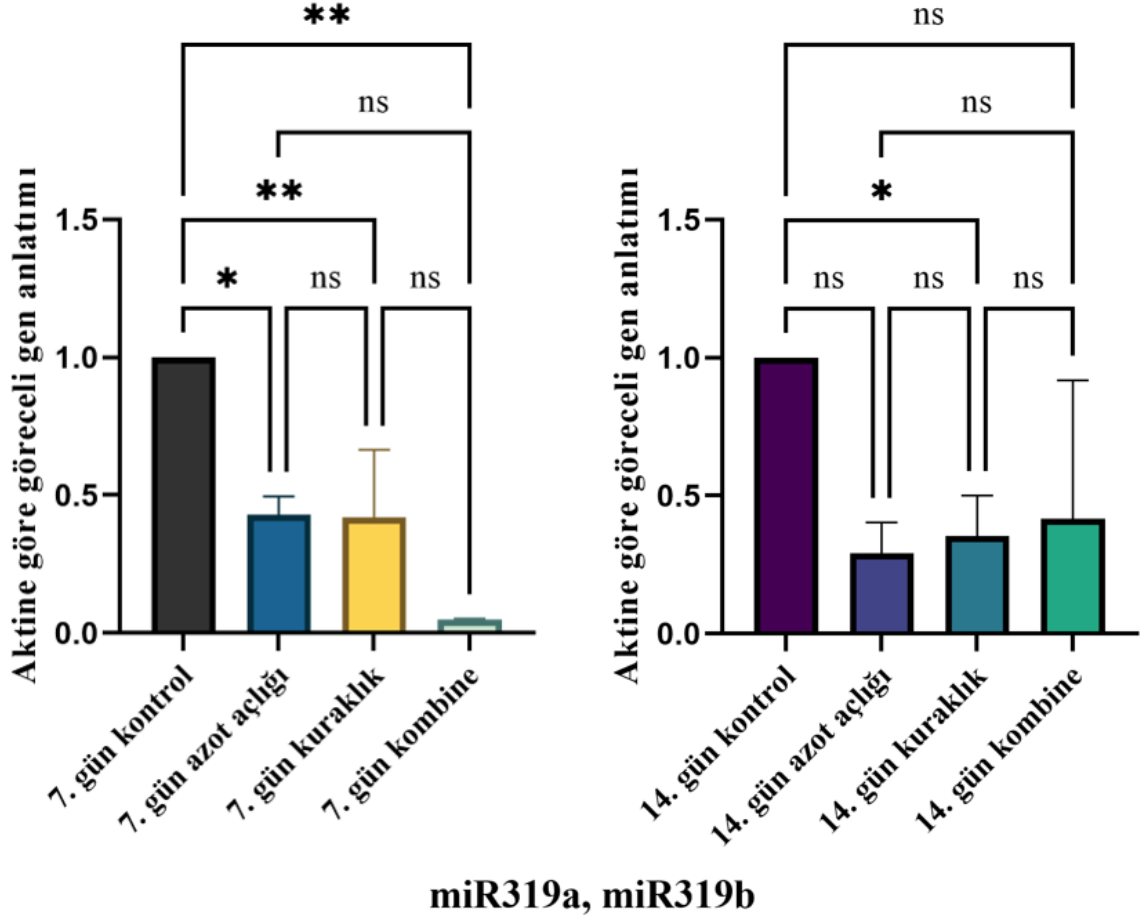
Şekil 4. 18: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR169h, miR169i, miR169j, miR169k, miR169l, miR169m, miR169n anlatım grafiği. $p < 0.1234$ (ns), $p < 0.0332$ (*), $p < 0.0021$ (**), $p < 0.0002$ (***), < 0.0001 (****).

miR169d, miR169e, miR169f-5p, miR169g-5p grubunun azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.19’da verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 ve 14 gün stres uygulaması yapılmış kallus örneklerindeki miRNA anlatımlarında anlamlı bir değişimin olmadığı, 7 gün stres uygulaması yapılan örneklerde ise azot açlığı ve kombine stresleri arasında anlamlı bir (*p=0.0279) azalma olduğu görüldü (Şekil 4.19).



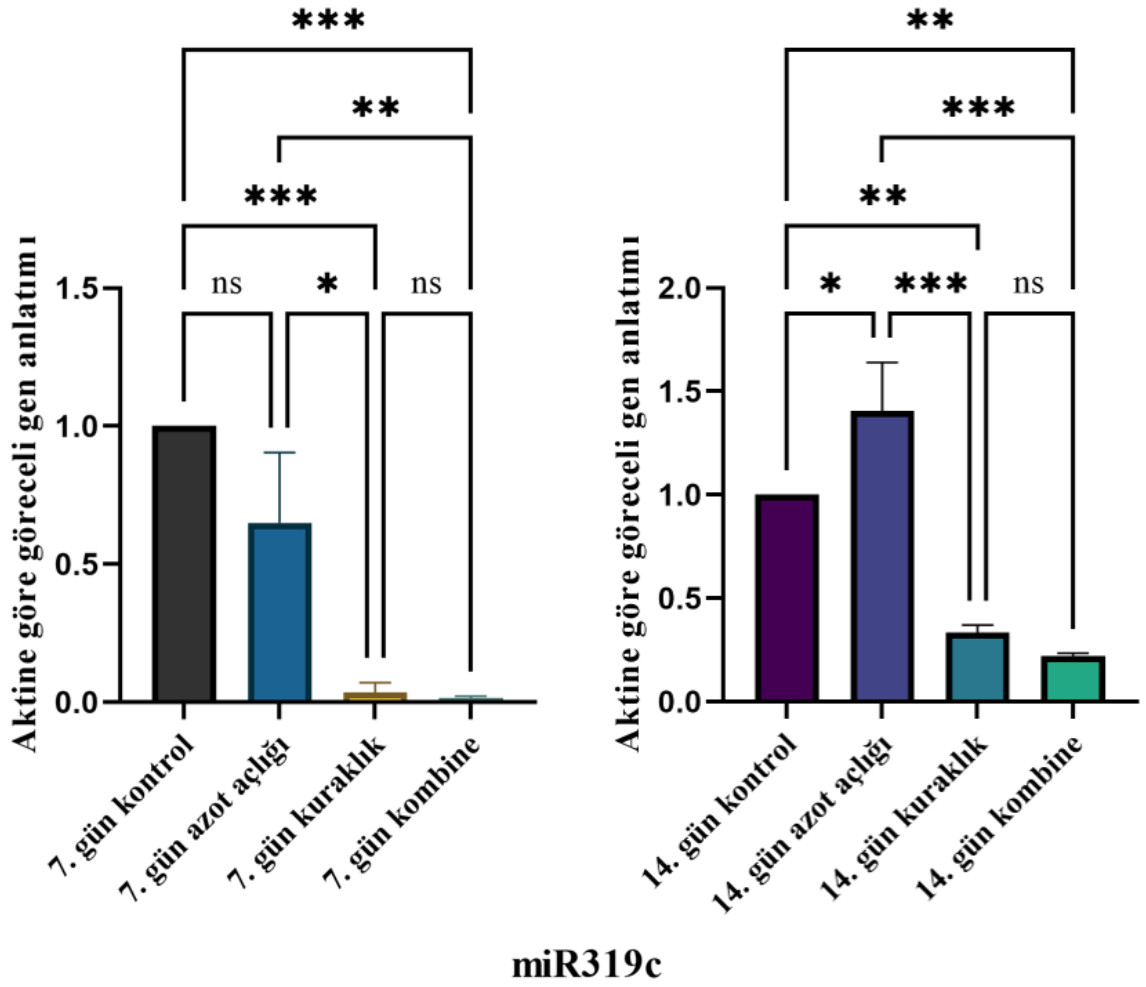
Şekil 4. 19: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR169d, miR169e, miR169f-5p, miR169g-5p anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR319a, miR319b'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.20'de verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 gün stres uygulanan örneklerde azot açlığında (*p=0.101), kuraklıkta (**p=0.094) ve kombine (**p=0.0010) azalma olduğu, 14 gün stres uygulamasında ise kontrol ve kuraklık arasında (*p=0.0488) yine bir azalma olduğu görüldü (Şekil 4.20).



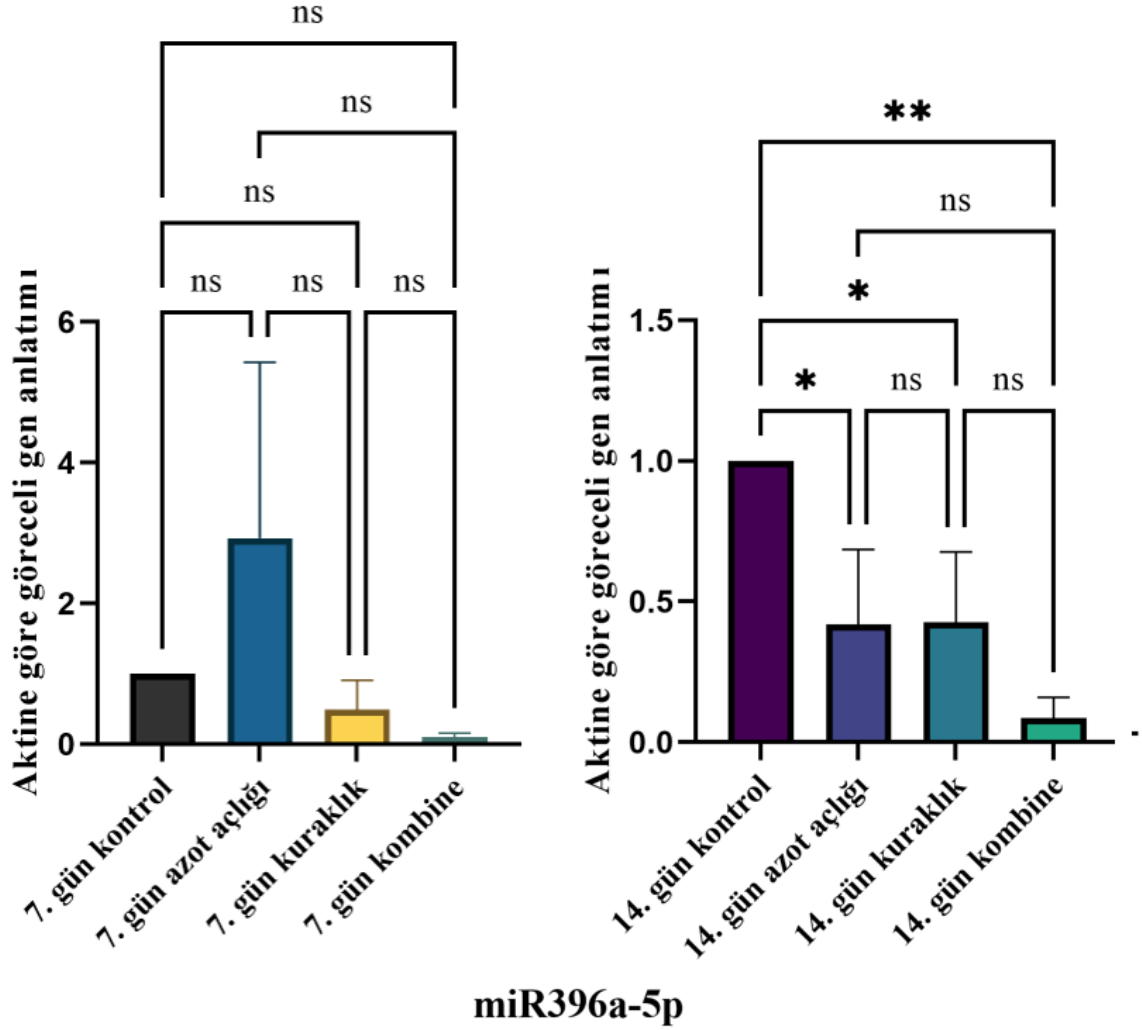
Şekil 4. 20: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR319a, miR319b anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR319c'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.21'de verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 gün stres uygulaması yapılan kuraklık (*p=0.0010) ve kombine (*p=0.0009) anlamlı bir azalma olduğu, 14 gün stres uygulamasının ardından ise kontrol grubuna kıyasla azot açlığında anlamlı (*p=0.0308) artış, kuraklıkta (*p=0.0028) ve kombine streste (**p=0.0018) anlamlı azalış görüldü (Şekil 4.21). Bu sonuçlara ek olarak, kombine stresin 7 ve 14 gün uygulamalarında kontrole göre azalmanın diğer streslere oranla daha fazla olduğu ancak 14 gün sonunda bu azalmanın 7 güne göre daha az olduğu görüldü.



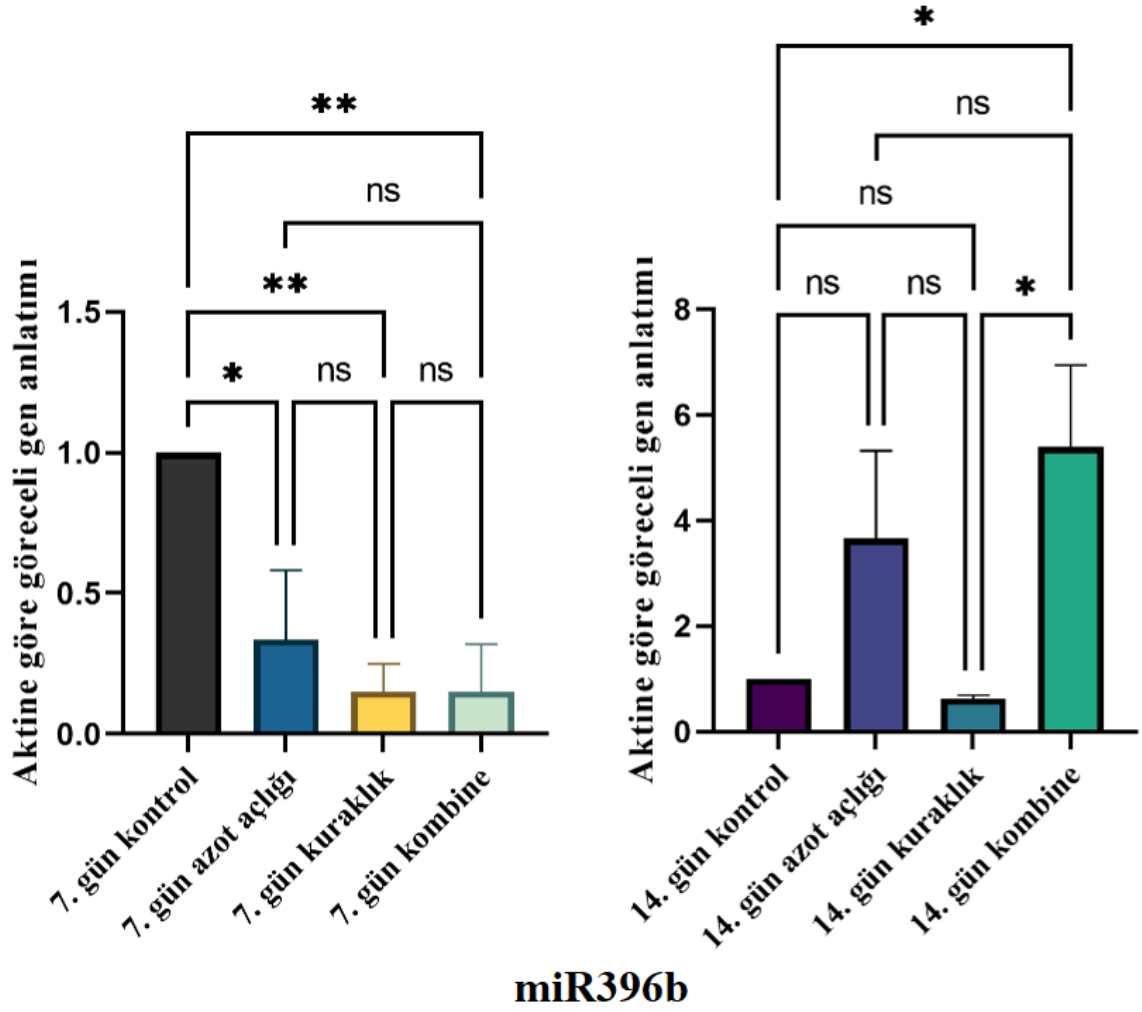
Şekil 4. 21: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR319c anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR396a-5p'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.22'de verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 gün stres uygulamasındaki değişimin anlamlı olmadığı, 14 gün stres uygulamasında ise kontrol ile azot açlığı (*p=0.0443), kuraklık (*p=0.0466) ve kombine (**p=0.0070) stres uygulamalarında anlamlı bir düşüş olduğu görüldü (Şekil 4.22).



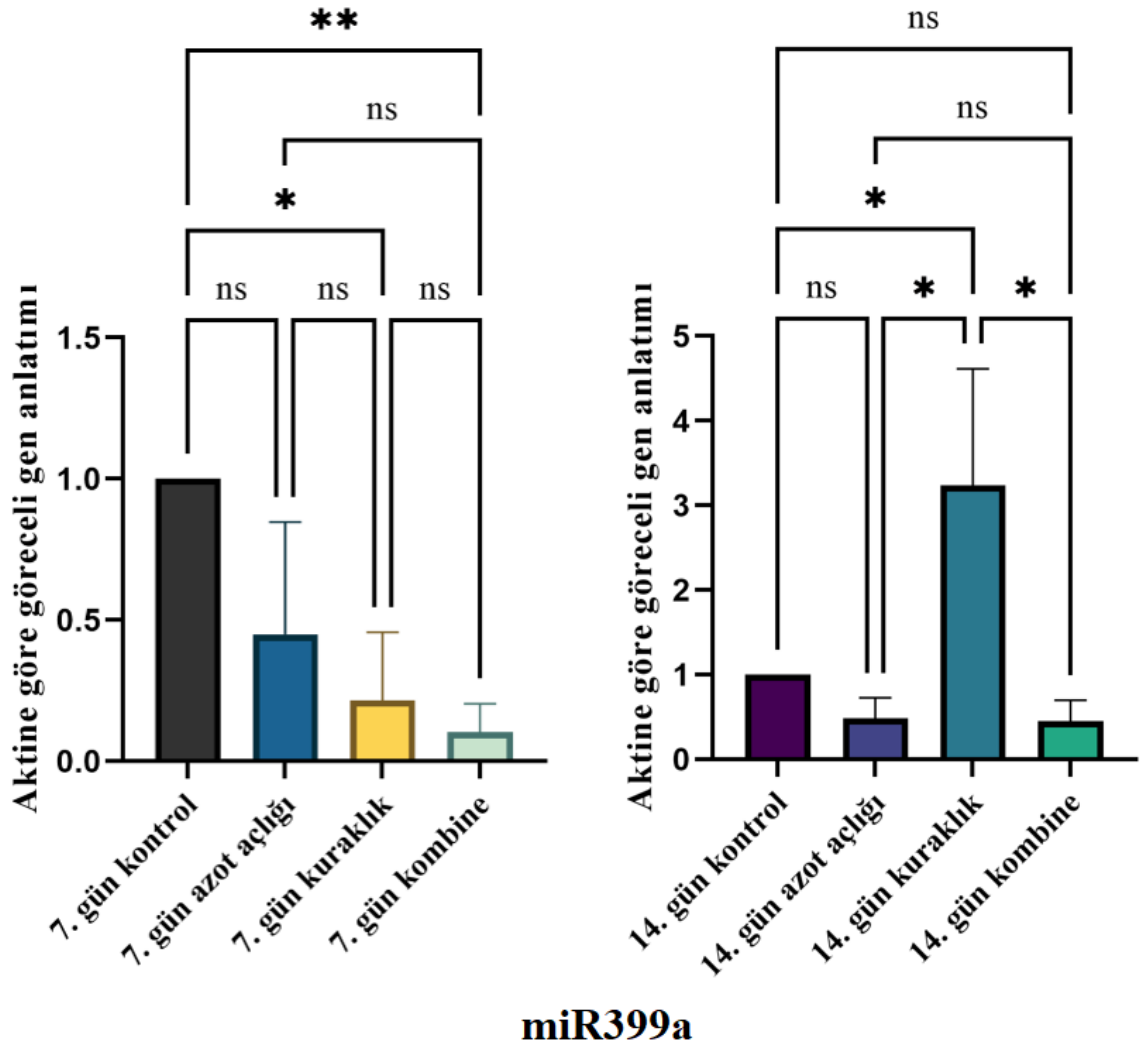
Şekil 4. 22: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR396-5p anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR396b'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.23'te verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 gün stres uygulaması yapılan azot açlığı (*p=0.0134), kuraklık (**p=0.0046) ve kombine (**p=0.0046) streste anlamlı azalma, 14 gün stres uygulaması sonunda ise kontrol grubu ile kombine arasında anlamlı (*p=0.0222) artma görüldü (Şekil 4.23).



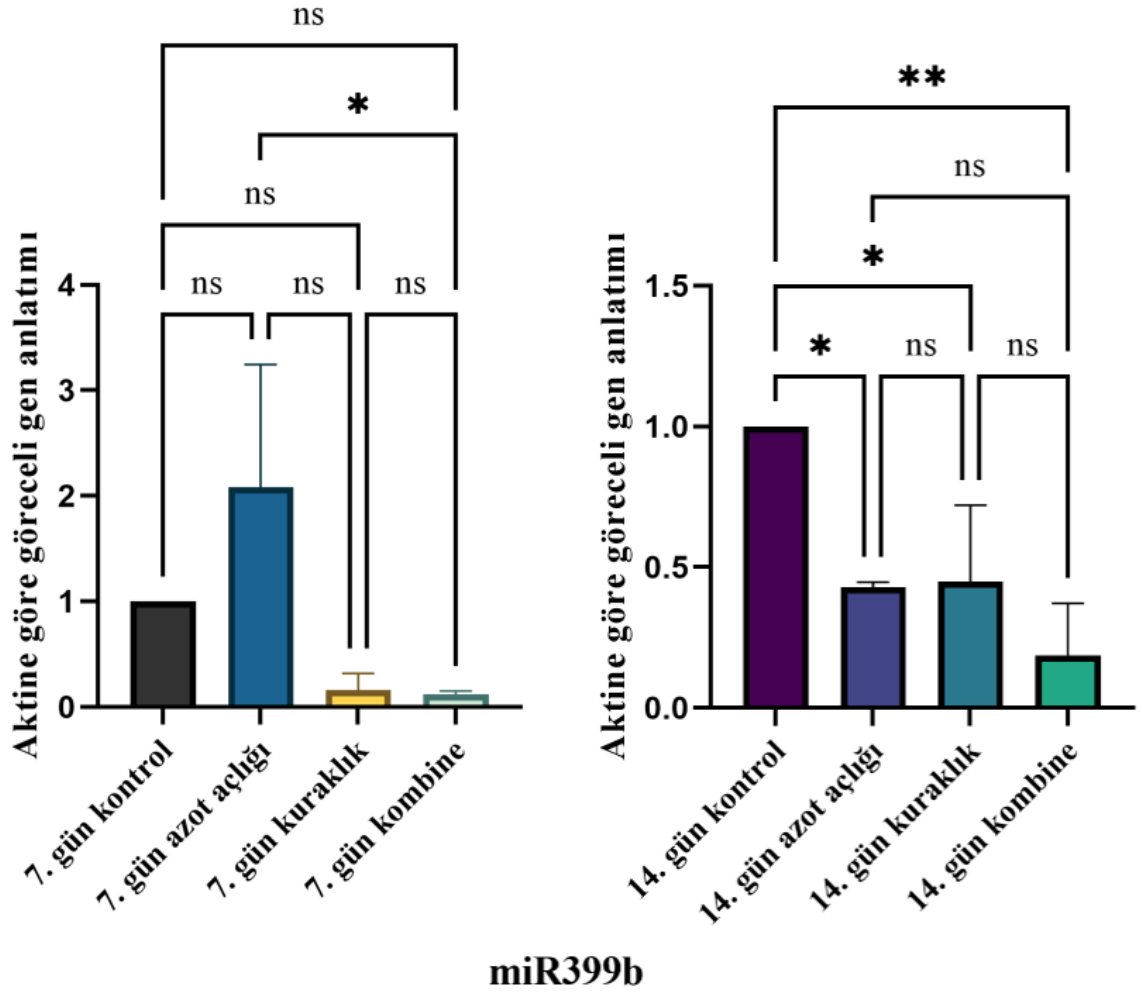
Şekil 4. 23: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR396b anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR399a'nın azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.24'te verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 ve 14 günlerde azot açlığındaki değişimin anlamlı olmadığı, 7 gün stres uygulamasında kontrol ile kuraklık (*p=0.0191) ve kombine (**p=0.0060) arasında anlamlı düşüş, 14 gün stres uygulaması sonrasında kontrol ile kuraklık arasında anlamlı (*p=0.0430) artış olduğu görüldü (Şekil 4.24).



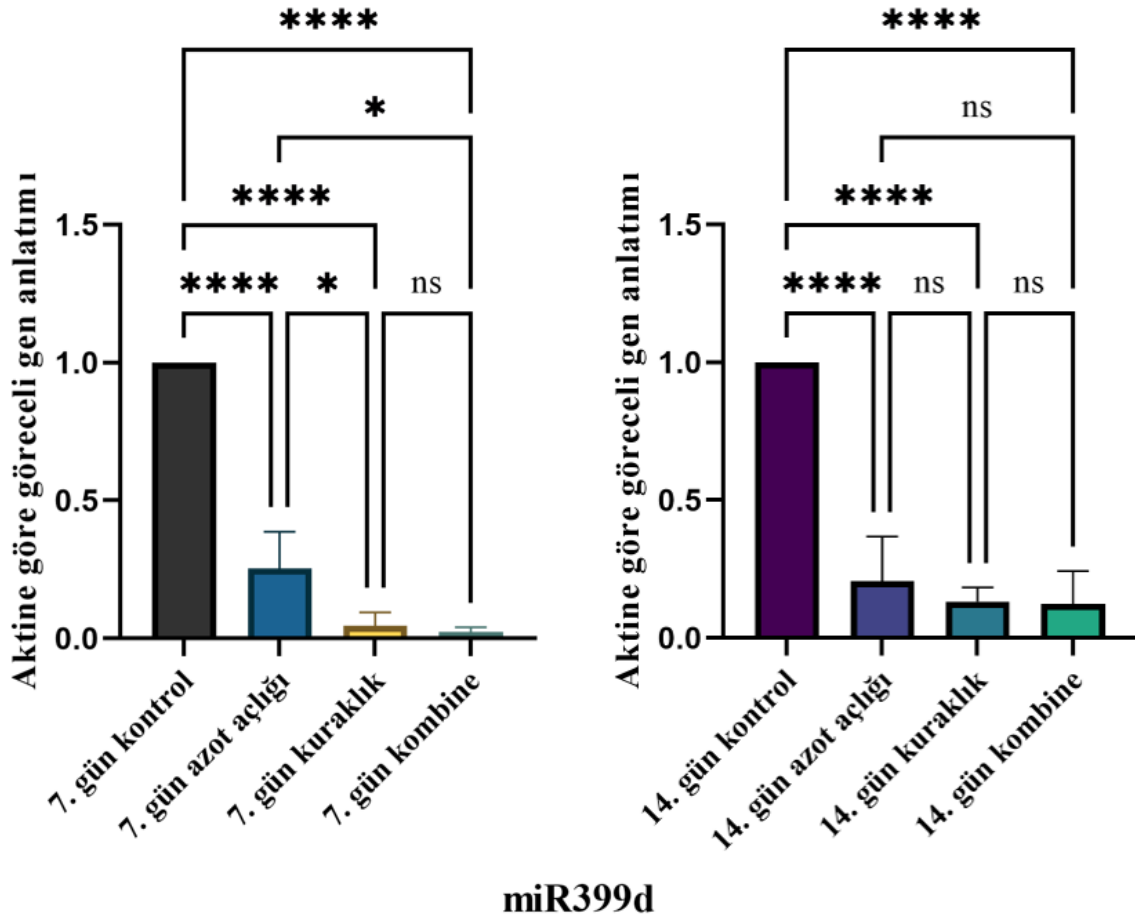
Şekil 4. 24: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399a anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR399b'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.25'te verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 gün stres uygulaması yapılan örneklerdeki miR399b anlatımındaki değişim anlamlı değilken, azot açlığı ile kombine arasında anlamlı azalma (* $p=0.0478$) olduğu görüldü. Uzun süreli yanıt incelendiğinde ise, 14 gün stres uygulaması sonucunda kontrol grubuna kıyasla azot açlığında (* $p=0.0296$), kuraklıkta (* $p=0.0341$) ve kombine strese (** $p=0.0068$) anlamlı düşüş olduğu görüldü (Şekil 4.25).



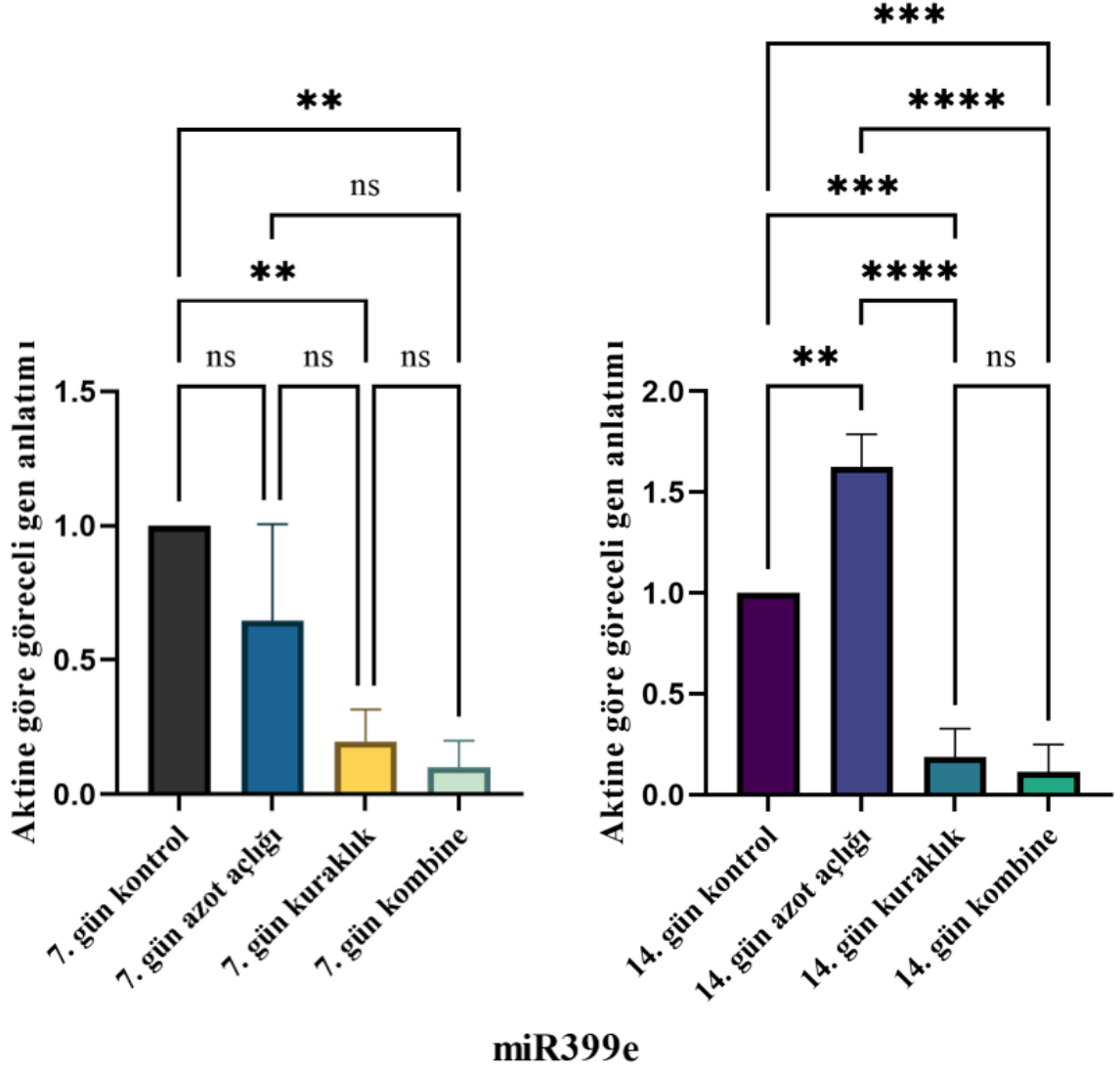
Şekil 4. 25: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399b anlatım grafiği. $p<0.1234$ (ns), $p<0.0332$ (*), $p<0.0021$ (**), $p<0.0002$ (***), <0.0001 (****).

miR399d'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.26'da verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 ve 14 günlerdeki tüm stres koşullarında anlamlı (**** $p < 0.0001$) azalma olduğu görüldü (Şekil 4.26).



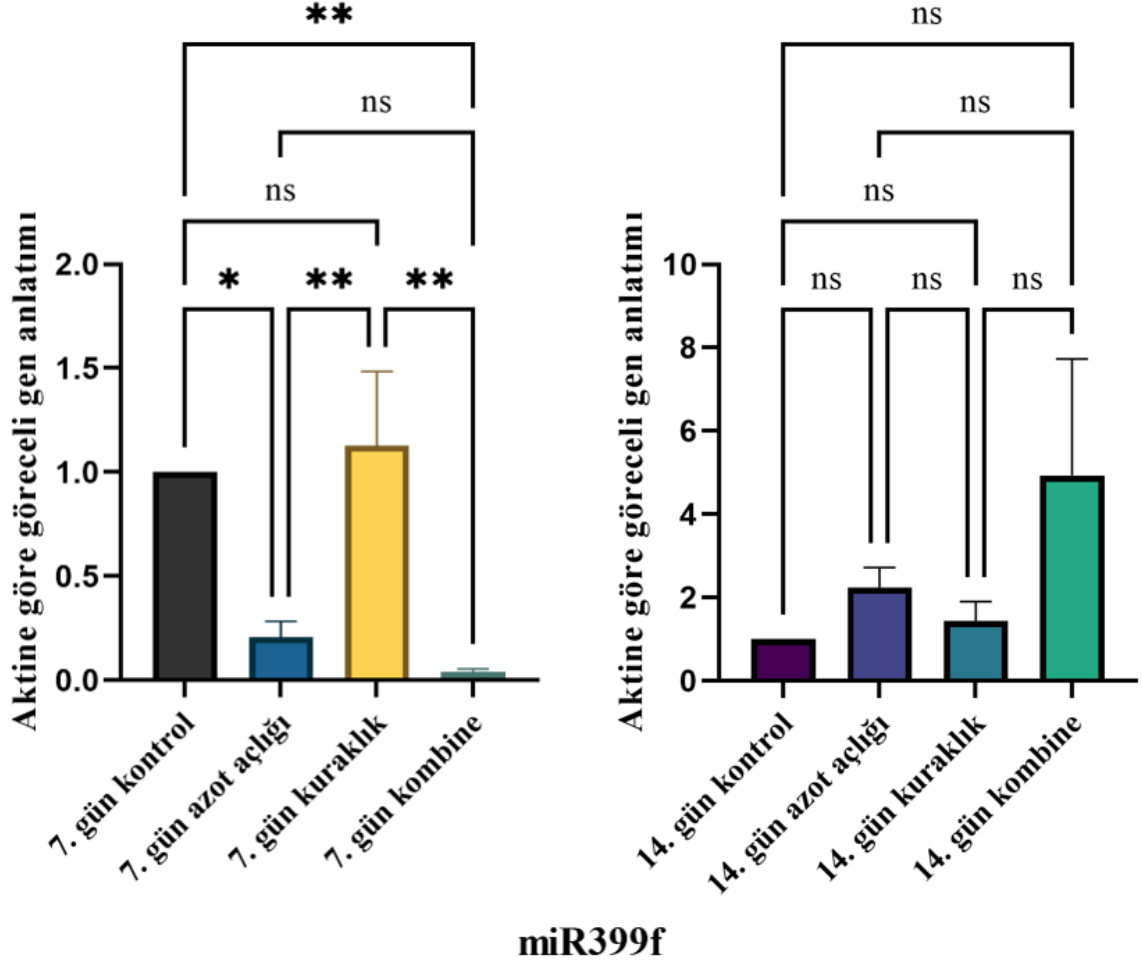
Şekil 4. 26: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399d anlatım grafiği. $p < 0.1234$ (ns), $p < 0.0332$ (*), $p < 0.0021$ (**), $p < 0.0002$ (***), < 0.0001 (****).

miR399e'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.27'de verildi. Kontrol grubuna kıyasla 7 gün stres uygulaması sonrası kuraklık (**p=0.0044) ve kombine **p=0.0043) anlamlı bir azalma varken 14 gün stres uygulaması sonrası kontrole kıyasla azot açlığında anlamlı (**p=0.0047) artış, kuraklık (**p=0.0006) ve kombine (**p=0.0007) ise anlamlı bir azalma olduğu görüldü (Şekil 4.27).



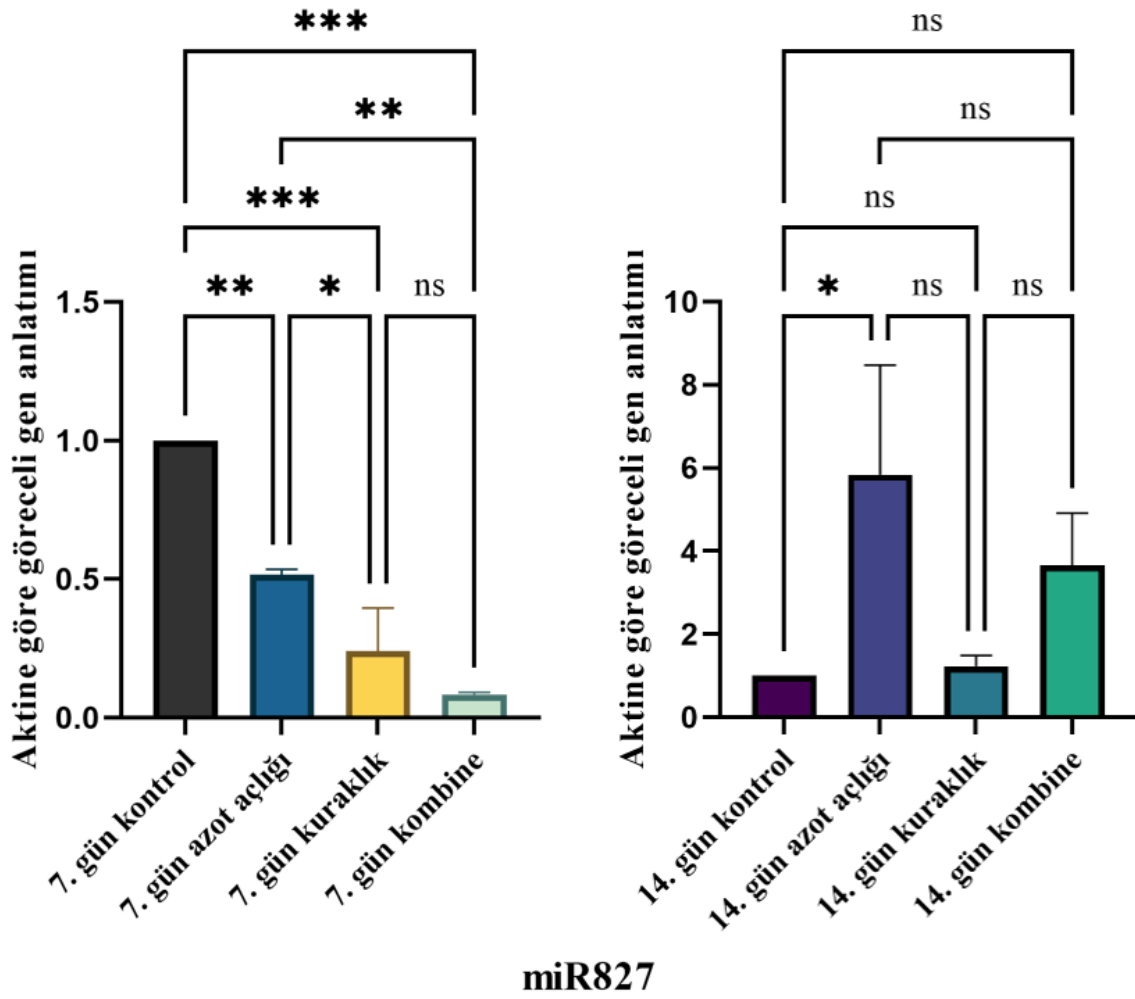
Şekil 4. 27: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399e anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR399f'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.28'de verildi. Kontrol grubuna kıyasla 14 gün sonrasındaki miR399f anlatımlarında anlamlı bir değişim gözlenmezken, 7 gün stres uygulaması sonrası azot açlığında (**p=0.0112) ve kombine (**p=0.0049) düşüş görüldü (Şekil 4.28).



Şekil 4. 28: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR399f anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miR827'nin azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında anlatımı Şekil 4.29'da verildi. Kontrol grubuna kıyasla azot açlığında (**p=0.0025), kuraklıkta (**p=0.0003) ve kombine (**p=0.0001) anlamlı bir azalma görülürken, 14 gün stres uygulaması yapılmış kallus örneklerinde kontrole kıyasla azot açlığında anlamlı (*p=0.0356) artış görüldü (Şekil 4.29).

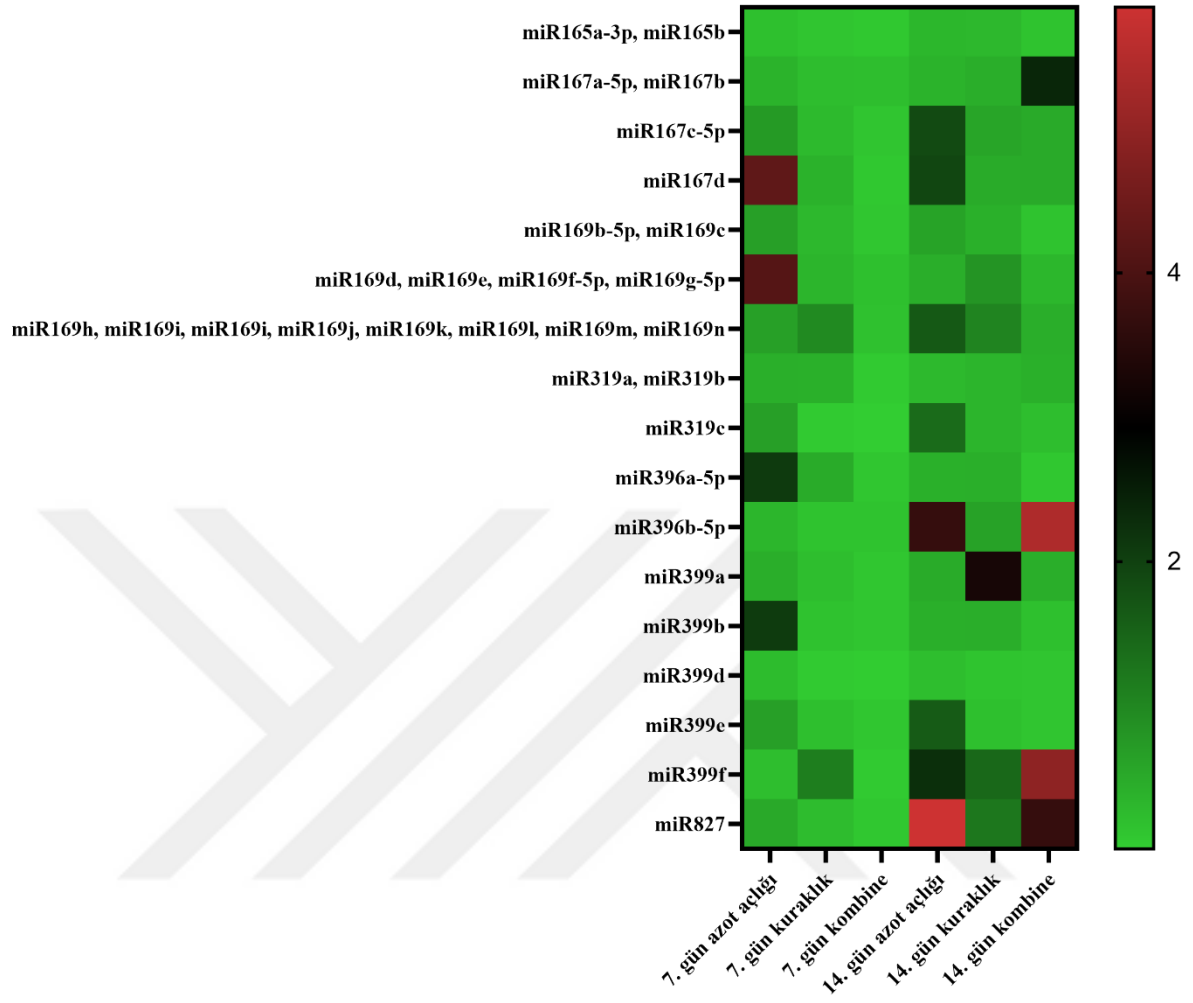


Şekil 4. 29: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarının 7 ve 14 gün uygulamalarında miR827 anlatım grafiği. p<0.1234 (ns), p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), <0.0001 (****).

miRNA anlatımlarına ait değişim katsayıları Tablo 4.4'te, bu değişim katsayıları ile hazırlanan HeatMap Şekil 4.30'da verildi.

Tablo 4. 4: miRNA anlatımlarının 7 ve 14 gün azot açlığı, kuraklık ve kombine stresleri uygulaması sonrası değişim katsayıları. ($\pm$ SH): Standart hatayı göstermektedir.

miRNA	7. Gün			14. Gün		
	Azot açlığı	Kuraklık	Kombine	Azot Açlığı	Kuraklık	Kombine
miR165a-3p, miR165b	0,19 $\pm$ 0,023	0,12 $\pm$ 0,081	0,08 $\pm$ 0,006	0,31 $\pm$ 0,147	0,3 $\pm$ 0,147	0,14 $\pm$ 0,096
miR167a-5p, miR167b	0,37 $\pm$ 0,076	0,23 $\pm$ 0,179	0,22 $\pm$ 0,139	0,37 $\pm$ 0,350	0,45 $\pm$ 0,312	2,38 $\pm$ 1,761
miR167c-5p	0,73 $\pm$ 0,360	0,27 $\pm$ 0,169	0,12 $\pm$ 0,021	1,87 $\pm$ 0,097	0,57 $\pm$ 0,263	0,5 $\pm$ 0,229
miR167d	4,27 $\pm$ 0,275	0,38 $\pm$ 0,389	0,07 $\pm$ 0,030	1,92 $\pm$ 1,032	0,48 $\pm$ 0,214	0,5 $\pm$ 2,928
miR169b-5p, miR169c	0,65 $\pm$ 0,236	0,3 $\pm$ 0,231	0,1 $\pm$ 0,046	0,6 $\pm$ 0,132	0,42 $\pm$ 0,146	0,15 $\pm$ 0,138
miR169d, miR169e, miR169f-5p, miR169g-5p	4,13 $\pm$ 1,867	0,35 $\pm$ 0,150	0,19 $\pm$ 0,066	0,44 $\pm$ 0,312	0,82 $\pm$ 0,211	0,31 $\pm$ 0,292
miR169h-n	0,64 $\pm$ 0,210	0,95 $\pm$ 0,315	0,17 $\pm$ 0,050	1,65 $\pm$ 0,162	1,04 $\pm$ 1,480	0,44 $\pm$ 0,425
miR319a, miR319b	0,43 $\pm$ 0,068	0,42 $\pm$ 0,245	0,05 $\pm$ 0,003	0,29 $\pm$ 0,112	0,35 $\pm$ 0,146	0,42 $\pm$ 0,503
miR319c	0,65 $\pm$ 0,249	0,04 $\pm$ 0,036	0,01 $\pm$ 0,003	1,4 $\pm$ 0,233	0,34 $\pm$ 0,035	0,22 $\pm$ 0,019
miR396a-5p	2,09 $\pm$ 1,768	0,49 $\pm$ 0,077	0,1 $\pm$ 0,048	0,42 $\pm$ 0,189	0,43 $\pm$ 0,176	0,09 $\pm$ 0,053
miR396b-5p	0,33 $\pm$ 1,873	0,15 $\pm$ 1,165	0,15 $\pm$ 3,170	3,67 $\pm$ 1,658	0,62 $\pm$ 1,152	5,39 $\pm$ 2,600
miR399a	0,45 $\pm$ 0,198	0,21 $\pm$ 0,171	0,1 $\pm$ 0,070	0,49 $\pm$ 0,193	3,24 $\pm$ 0,690	0,45 $\pm$ 0,178
miR399b	2,08 $\pm$ 0,822	0,16 $\pm$ 0,113	0,12 $\pm$ 0,029	0,43 $\pm$ 0,013	0,45 $\pm$ 0,192	0,19 $\pm$ 0,131
miR399d	0,25 $\pm$ 1,939	0,04 $\pm$ 0,049	0,02 $\pm$ 0,222	0,21 $\pm$ 0,162	0,13 $\pm$ 0,050	0,12 $\pm$ 0,119
miR399e	0,65 $\pm$ 2,867	0,2 $\pm$ 0,119	0,1 $\pm$ 3,458	1,63 $\pm$ 0,872	0,19 $\pm$ 0,139	0,11 $\pm$ 1,497
miR399f	0,21 $\pm$ 1,196	1,13 $\pm$ 0,685	0,04 $\pm$ 1,590	2,25 $\pm$ 0,474	1,44 $\pm$ 0,464	4,93 $\pm$ 2,800
miR827	0,51 $\pm$ 2,830	0,24 $\pm$ 1,076	0,09 $\pm$ 2,191	5,84 $\pm$ 3,142	1,22 $\pm$ 2,246	3,67 $\pm$ 3,282



Şekil 4. 30: Azot açlığı, kuraklık ve kombine stres koşullarında kontrol grubuna göre 7. ve 14. gün miRNA anlatımlarını ifade eden şematik gösterim.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerin maruz kaldığı ve abiyotik stres olarak isimlendirilen azot açlığı ve kuraklık stresleri bitkilerin gelişimini, büyümesini ve verimini önemli düzeyde etkiler (Clarkson, 1996; Wang ve diğ., 2004). Bitkilerdeki bu yaşamsal süreçlerin devam edebilmesi için nitrat önemli bir besin molekülü olmasının yanında hücrede farklı görevleri olan genlerin anlatımını teşvik eden önemli bir sinyal molekülüdür (Wang ve diğ., 2004; Marín ve diğ., 2011; Medici ve Krouk, 2014). Bununla beraber, bitkiler kuraklık stresine maruz kaldıklarında fotosentez, solunum, pigment içeriği ve zar bütünlüğünü etkiler, hayatta kalabilmek için büyüme hızlarını yavaşlatırlar, anti-oksidatif savunma sistemlerini aktif hale getirirler (Duan ve diğ., 2007; Praba ve diğ., 2009; Anjum ve diğ., 2016). Bitkiler bu streslerle baş edebilmek için fizyolojik, morfolojik ve moleküler değişikliklerle stres yanıtı oluştururlar (Challinor ve diğ., 2004; Anithakumari ve diğ., 2012).

Bu tez çalışmasında, *Arabidopsis thaliana* kallus örneklerine 7 ve 14. günlerdeki azot açlığı, kuraklık ve bu iki stresin birlikte uygulamasının büyüme indeksine etkisi, oluşturduğu zar hasarı ve stresle ilişkili miRNA'ların anlatımları değerlendirilmiştir. *A. thaliana* Col-0 tohumlarının çimlendirilmesinin ardından MS besiyerlerinde büyümesi sağlanmış ve ardından 1 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerlerinde kök kallus kültürleri kurulmuştur. İlk alt kültürlemenin ardından kallus örnekleri azot açlığı stresini oluşturmak için NH_4NO_3 içermeyen 2,4-D'li MS besiyerine, 0.70 Mpa olacak şekilde kuraklık stresini oluşturmak için PEG 8000 içeren 2,4-D'li MS besiyerine aktarılmıştır. Kuraklık besiyeri hazırlanırken ozmatik potansiyeli stres ortamı oluşturmak için 0.70, 1.2, 1.7 Mpa değerleri arasından kuraklık stresi için çoğunlukla kullanılmış olan oran seçilmiştir (Van Der Weele ve diğ., 2000; Verslues ve Bray, 2004). Kombine stres uygulaması için 2,4-D'li MS besiyeri NH_4NO_3 içermeyen MS ve PEG 8000 ile hazırlanmıştır. Stres uygulamaları maruz kalınan süre ile kallus örneklerinin miRNA anlatımları üzerindeki etkileri ve değişimi görebilmek için uygulama yapılacak süreler 7 ve 14 gün olarak seçilmiştir.

Kuraklık stresi, tarımsal üretimi olumsuz etkileyen en önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir. Haitao Shi ve diğ.'nin (2015) yaptığı çalışmada, kuraklık stresine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yabani tipinde zar hasarında artış olduğu gösterilmiştir (Shi ve diğ., 2015). Bitkiler abiyotik stresle karşılaştıklarında stres yanıtı olarak ABA

biyosentezinde artış görülür. ABA biyosentezi için tanımlanmış olan *ZEP* geninin özellikle bitkilerin yapraklarında bulunduğu bilinmektedir (Xiong ve diğ., 2002). Zar hasarının belirlenmesinde iyon sızıntısı miktarının ölçümü önemlidir. İyon sızıntısında görülen artış hücre zarının geçirgenliğiyle ilişkilidir (Jiang ve diğ., 2014). Bu tez çalışmasında, uygulanan streslerin kontrol grubundaki zar hasarı yüzdesiyle anlamlı bir farklılık ortaya koymadığı görülmüştür. Zar hasarında anlamlı sonuç elde edilememesi, önceki çalışmalarla birlikte incelendiğinde bitki materyali olarak kallus dokusu kullanılmasından kaynaklanan farklılık ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür.

Bitkinin bulunduğu ortamda kuraklık stresine maruz kalması bitki büyümesini ve gelişimini etkiler, üretkenliği azaltır, dolayısıyla ekonomik olarak ciddi kayıplara neden olur. Kuraklık stresi ile mücadele edebilmek için fizyolojik ve gelişimsel adaptasyon sağlayan sinyal yolları aktive edilir (Roca Paixão ve diğ., 2019). Çevresel faktörlerin varlığındaki değişim bitkide ani ve geçici yanıt oluşturabilir. Bununla beraber, azot kaynağının az olması sürgün gelişimini etkilemektedir (Gastal ve Lemaire, 2002)

Arabidopsis thaliana Col-0 kallus örneklerinde 7 ve 14 gün stres uygulaması sonucunda 7. gün kallus örneklerinde kontrol ve azot açlığı stresi arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, kuraklık stresinde ağırlık azalışının başlangıç ağırlığının yarısı olduğu ve kontrol grubuna göre büyüme indeksinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. Bu sonuç, Roca Paixão ve diğ.'nin 2019'da yaptığı çalışmada ifade edilen kuraklık stresinin bitki büyümesine olan etkisini desteklediği görülmektedir. Aynı zamanda, kombine stres uygulanmış olan 7. gün kallus örneklerinde de $63,98 \pm 3,80$ azalma görülmesi, azot açlığı stresinin kallus büyümesine üzerindeki etkisinin kısa süreli yanıtta kuraklıktan daha az etkili olduğunu düşündürmüştür. 14. gün kallus örneklerinde ise kontrol grubunda büyüme gözlenirken, azot açlığı stresinde büyümenin olmadığı, kuraklık stresinde kontrole göre ağırlık artışının daha az olmasına rağmen artış olduğu ve kombine stres uygulamasında ise kallus örneklerinde uzun süresi stres altında $12,37 \pm 1,78$ oranında azalma olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, azot açlığı stresinin uzun süreli yanıtta etkili olduğunu kuraklık stresinin ise erken yanıtta bitki büyümesini etkilediğini düşündürecek niteliktedir.

Arabidopsis thaliana moleküler modifikasyonlar için uygun olması yönüyle abiyotik stres toleransı fenotiplerinin gözlenebilmesi açısından genetik model bitkidir (Pegler ve diğ., 2019). Bitki miRNA'ları, ilk olarak *Arabidopsis*'te tanımlanmış ve protein kodlaması yapmayan bu

küçük düzenleyici RNA'ların bitki gelişiminde görevli gen anlatımlarının düzenlenmesinde kilit öneme sahip oldukları defalarca gösterilmiştir (Palatnik ve diğ., 2003; Chen, 2004). Bu miRNA'lar genlerin anlatımını düzenlemek için biyotik strese sebep olan viral, fungal ya da bakteriyel patojenlere karşı savunma yanıtı oluşturabildikleri gibi (Kasschau ve diğ., 2003; Yan Li ve diğ., 2010), abiyotik stres olan kuraklık, tuz, sıcaklık gibi faktörlere karşı da savunma yanıtını yönlendirebilirler (Sunkar ve Zhu, 2004; Liu ve diğ., 2008b). Her bir *Arabidopsis* miRNA'sı, RNA Polimeraz II (Pol II) tarafından özgül MİKORNA (MIR) genlerinden kendi üzerine katlanarak "stem-loop" yapısı oluşturmuş olan öncül miRNA transkriptlerinden işlenir (Bartel, 2004; Vazquez ve diğ., 2004). Protein kodlaması yapan lokuslarda olduğu gibi, çoğu MIR geninin promotör bölgeleri abiyotik stres gibi hücre dışı sinyallerden etkilenecek gen anlatımının düzenlenmesinde etkili olan cis-elementlerini bulundurur (Megraw ve diğ., 2006; Zhao ve Li, 2013; Pegler ve diğ., 2018). MIR gen anlatımının değişmesi, olgun miRNA miktarının da değişimini sağlar. Bu değişim, miRNA-İndüklenmiş Susturma Kompleksine (miRISC; "miRNA-induced silencing complex") yüklenen miRNA'nın hedeflediği genin mRNA'sını (haberci RNA; "messenger RNA") keserek ya da RNA susturma mekanizmasının transkripsiyonel baskılanmasıyla gerçekleşir (Baulcombe, 2004; Chen, 2004; Baumberger ve Baulcombe, 2005; Reis ve diğ., 2015).

Arabidopsis 'te miRNA/hedef gen anlatım modüllerinin abiyotik strese bağlı olarak değiştiğini ve bu sayede strese karşı uyum sağlayabildiği gösterilmiştir (Sunkar ve diğ., 2007; Khraiwesh ve diğ., 2012). Pegler ve diğ. (2019), *A. thaliana* bitkisinde kuraklık, sıcaklık ve tuzluluk streslerinin belli miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedeflediği genler üzerindeki etkisini Col-0 ekotipi kullanarak incelemiştir. Tohumlar 8 gün besiyerinde çimlendirildikten sonra stres uygulaması yapılacak olanlar stres besiyerlerine aktarılacak 7 gün tutulmuş ve 15 günlük kontrol grubuna göre miRNA'lar ve hedeflerinin gen anlatımları GZPZR ile analiz edilmiştir. Kuraklık stresinin 111 miRNA üzerinde anlatımını artırıcı, 2 miRNA üzerinde ise azaltıcı etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır. miR169g'nin tuz stresi altında 8,7 kat kontrole göre azaldığını göstermişlerdir. Ek olarak miR169f ve miR169h'nin uygulanan üç abiyotik strese karşı anlatımlarında azalma olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, miRNA'ların kodlama lokuslarında bulunan promotör bölgelerinin, farklı stres koşulları altında anlatım etkinliğini değiştirmesine neden olacak olan MIR gen anlatımlarını değişikliğe yönlendiren çoklu cis elementlerini içerdiğini göstermektedir (Megraw ve diğ., 2006; Zhao ve Li, 2013; Pegler ve diğ., 2018). GZPZR ile, miR169'un 7,4 kat azaldığı gösterilmiştir. miR169 seviyelerindeki düşüş

Arabidopsis'te daha önce yapılan çalışmalarda da raporlanmıştır (Li ve diğ., 2008; Zhao ve diğ., 2011). Kuraklık stresinde ise *NFYA5* ("NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A5"; AT1G54160) anlatımının etkilendiği gösterilmiştir (Li ve diğ., 2008). *NFYA5*'in aşırı ekspresyonu, bitki hatlarında stoma açıklığının azaldığını ve yaprak su kaybına neden olduğu gösterilmiştir (Pegler ve diğ., 2019). Tez kapsamında 7 ve 14 gün olarak uygulanan üç farklı stres koşulunun etkileri miR169 ailesinde incelenmiştir. Aynı "stem-loop" ve ileri primerlere sahip olan miR169 ailesi üyesi miRNA'lar birlikte değerlendirilmiştir. miR169b-5p, miR169c anlatımlarına bakıldığında, 7. gün kontrol ve kombine örnekleri kıyaslandığında anlamlı bir azalma ($*p<0.0138$) olduğu görülmüştür. Uzun süreli etkisi incelendiğinde ise kontrol örnekleri ile kuraklık ($*p<0.0317$) ve kombine ($**p<0.0064$) stres uygulanmış 14. gün örnekleri arasında anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Pegler ve diğ. (2019) yaptığı çalışma ile bu açıdan paralellik gösteren bu miR169 ailesi miRNA'larının kuraklık stresinden etkilendiğini düşündürmektedir. miR169d, miR169e, miR169f-5p ve miR169g-5p grubuna 7 gün stres uygulanan örneklerde azot açlığı ile kuraklık ve kombine stresleri arasında anlamlı bir düşüş olduğu görülürken uzun süreli stres yanıtında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. miR169h,j,k,l,m,n miRNA'ları arasında ise herhangi bir anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. *Arabidopsis*'te miR169'un genel olarak kuraklık stresi (Yanjie Li ve diğ., 2010), fosfat koşullarının sınırlı olması (Hsieh ve diğ., 2009) ve azot açlığı (Li ve diğ., 2008) streslerinde azaldığı gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmalar (Hsieh ve diğ., 2009; Yanjie Li ve diğ., 2010; Zhao ve diğ., 2011; Pegler ve diğ., 2019), *Arabidopsis*'in bütün fide, kök ve sürgün kısımlarında miR169 anlatımlarının azaldığını ve *NFYA5* anlatımının baskılandığını göstermektedir. Bu veriler, miR169 ailesinin abiyotik stres yanıtı oluşturması ve karmaşık moleküler ağları bağlama bakımından potansiyel bağlantı noktası "crosstalk junction" olabileceği Pegler ve diğ. tarafından belirtilmiş, kilit bir rol oynadığını düşündürmüştür. Tez çalışmasında incelenen miR169 ailesi arasında anlamlı farklılık olmadığı görülen miR169h,j,k,l,m,n grubunun doku farklılığı ile ilişkili olabileceği düşünülebilir.

miR319 *A. thaliana*'da kuraklık ve tuzluluk stresleriyle ilişkilendirilmiştir ve miR319 ailesi TCP transkripsiyon faktörlerini hedeflemektedir (Liu ve diğ., 2008b; Zhou ve Luo, 2014). Tez çalışmasında miR319a,b'nin GZPZR ile anlatım analizi yapıldığında 7 gün stres uygulaması yapılan örneklerde kontrole göre anlamlı bir azalma görülürken 14 gün uygulama yapılan örnekler arasında yalnız kontrol ve kuraklık arasında düşüş olduğu görülmüştür. miR319c'de ise 7 gün uygulamaları arasında azot açlığında anlamlı bir değişim yokken, uzun süreli stres

uygulaması sonucunda artış olmuştur. miR319'daki süreye bağlı olarak anlatım profilindeki bu değişiklik yanıtın erken ya da geç oluşmasıyla ilişkilendirilebileceğini düşündürmüştür.

miR396 tuzluluk ve kuraklık streslerinden etkilenmektedir ve *GRL* ("GROWTH REGULATION FACTOR") genlerini hedeflemektedir (Covarrubias ve Reyes, 2010). Pegler ve diğ. (2019) yapmış olduğu çalışmada, kuraklık stresi uygulanan *Arabidopsis* bitkilerinde GZPZR ile miR396'nın 2,9 kat arttığı gösterilmiştir (Pegler ve diğ., 2019). Bu tez çalışmasında 7 gün stres uygulaması yapılmış olan kallus örneklerinde anlamlı bir değişim gözlenmemesine rağmen, uzun süreli etkide kontrol grubuna kıyasla uygulanan üç stres faktöründe de azalma olduğu görülmüştür ve azot açlığı ile kuraklık arasındaki azalma miktarı neredeyse eşittir. miR396b ise 7 gün stres uygulaması sonucunda anlamlı bir düşüş sergilemiştir.

Arabidopsis'te, miR165/166 sürgün apikal meristemde (SAM) ve vasküler dokularda lokalize olmaktadır (Kidner ve Martienssen, 2004; Li ve diğ., 2005; Williams ve diğ., 2005) ve HD-ZIP III genlerini hedeflemektedir (Tang ve diğ., 2003; Kim ve diğ., 2005). HD-ZIP III genlerinde meydana gelecek fonksiyon kaybı mutasyonlarının bitkide büyüme ve gelişimini etkilediği gösterilmiştir (Caruana ve diğ., 2020). Caruana ve diğ.'nin yaptığı bu çalışmada, miR165'in fazla anlatımının bitki gelişimi, büyümesi, yaprak ve kökleri üzerindeki etkilerinin hedef genlerle birlikte araştırılması hedeflenmiştir. Çalışma verileri miR165'in anlatımının artışının bitki gelişimi için önemli olan genlerle ilgili olduğunu göstermiştir. Yapılan bu tez çalışmasında farklı stres koşullarına maruz bırakılan *A. thaliana* kallus örneklerinde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında her bir stres grubunda anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir.

Azot açlığı stresi bitki köklerini etkilerken yan kök gibi daha güçlü bir kök sisteminin oluşmasına neden olur. miR167'nin kök sistemindeki değişim ile ilişkili olduğu düşünülmüştür ve sonrasında kök sistemi mimarisini, ARF6 ("AUXIN RESPONSE FACTOR6") ve ARF8 transkripsiyon faktörlerinin anlatımını değiştirdikleri gösterilmiştir (Caruana ve diğ., 2020). Liang ve diğ. (2012), azot açlığı stresinde 10 gün tuttıkları bitkilerin yan köklerinde artış olduğunu ve azot eksikliğinde miR167'nin anlatımının azaldığını raporlamıştır ve diğ., 2012). miR167'nin kuraklık stresine de yanıt oluşturduğu bilinmektedir (Covarrubias ve Reyes, 2010). Bu tez çalışmasında incelenen miR167 anlatım analizlerinde, miR167a-5p,b grubunun 14 gün stres uygulanmış örnekler arasında anlamlı bir sonuç görülmezken, 7 gün stres uygulamalarında azot açlığı stresine ek olarak kuraklık ve kombine streslerin de kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gösterdikleri gözlenmiştir. miR167c-5p'de ise 7 gün stres uygulamalarında azot

açlığı ile kontrol arasında anlamlı bir sonuç görülmezken, kuraklık ve kombine streslerde miR167c-5p anlatımında kontrole göre azalma olmuştur. Bunlara ek olarak miR167c-5p 14 gün stres uygulaması sonucunda kontrol grubuna göre kuraklık ve kombine streslerde anlatımının azaldığı görülürken, azot açlığında anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. Son olarak miR167d anlatımları değerlendirildiğinde ise her iki gündeki uygulama sonuçlarında da kontrol grubuna göre azot açlığı stresinde anlamlı bir artış görülmüştür ancak 14 gün uygulanan stres yanıtının 7 güne göre nispeten daha az arttığı görülmektedir. Bu sonuçlar incelendiğinde, miR167a-5p,b'nin 7 gün uygulamalarındaki değişim Liang ve diğ.'nin çalışması (2012) ve Covarrubias ve Reyes'in (2010) çalışmasıyla uyumlu olduğu söylenebilir. miR167c-5p ise, 7 gün stres uygulamasının ardından azot açlığındaki değişim anlamlı değilken 14 gün sonrasında artış gözlenmesi uzun süreli strese maruz kaldığında geç yanıt oluşturduğu, diğer stres koşullarında ise yine bu iki çalışmaya paralel sonuçların elde edildiği görülmüştür. miR167d'nin uygulanan stres koşulları altında 7 ve 14 gün uygulamalarında önceki çalışmalarla uyumlu olacak şekilde değişim olduğu gözlenmişken, 7 gün stres uygulaması sonrası kuraklık stresinin henüz yanıt oluşturmadığı düşündürmüştü, uzun süreli strese maruz kalmanın ardından kontrole kıyasla azalma olduğu görülmüştür. miR167 ailesinin *A. thaliana* bitki materyali üzerindeki anlatımlarının, kallus dokularında da paralel sonuçların görülmesi sebebiyle kök sistemi üzerinde etkili olan ve bu ailenin hedeflediği ARF6 ve ARF8 transkripsiyon faktörlerinin anlatımlarında değişim oluşup oluşmayacağının görülmesinin ardından, başka sistemleri de etkileyip etkilemediği ile ilgili fikir verebileceğini düşündürmüştür.

Azot açlığı stresinin Liang ve diğ. tarafından 2012'de yapılan çalışmada çeşitli miRNA anlatımları üzerinde etkili olduğu ve miR399 ve miR827'nin anlatımında azalma olduğunu göstermişlerdir ve azot açlığına yanıt veren miRNA'ları Azot Açlığı Bastırılmış (NSS; "N-starvation-suppressed") ve Azot Açlığı Uyarılmış (NSI; "N-starvation-induced") olarak iki gruba ayırmışlardır (Liang ve diğ., 2012). Bitki miRNA'larının fonksiyonları, hedef genlerin anlatımında negatif yönde etkilemeleri nedeniyle miRNA/hedef gen ilişkisini ortaya koymak önemlidir. Bitki miRNA'ları hedef genleriyle tamamlayıcı baz eşleşmesi yaptıkları için belirlemek kolaydır (Liang, He ve Yu, 2012). miR399a-f *Arabidopsis*'te, ubiquitin konjugaz E2 ailesini hedefler ve bu aile fosfat homeostazisinde rol oynar. Fosfat açlığına maruz kalan bitkide, miR399 uyarılarak *PHO2* transkriptlerini hedefler ve fosfat alımını destekler (Chiou ve diğ., 2006).

miR827 *Arabidopsis*'te Nitrojen/Fosfor Metabolizması ile ilişkilendirilmiş ve azot açlığı stresinden etkilenmektedir (Chiou ve diğ., 2006; Hsieh ve diğ., 2009; Kant ve diğ., 2011). Azot açlığı stresi altında miR827'nin NLA'yı ("NITROGEN LIMITATION ADAPTATION") hedeflediği gösterilmiştir (Kant ve diğ., 2011). Yabani tip bitkiler azot eksikliğinde *nla* mutantları ile kıyaslandığında, *nla* mutantlarının daha fazla fosfat biriktirdiği, fosfat-toksik etkilerin gözlemlendiği ve antosiyanin sentezinin düştüğü gösterilmiştir. miR399 ve miR827'nin azot açlığı stresi altında anlatımlarında düşüş olduğu ve hedeflediği *PHO2* ve NLA'da ise anlatımın arttığı ortaya konmuştur (Liang ve diğ., 2012). Ayrıca daha önceki çalışmalar, miR399 tarafından hedeflenen *PHO2*'nin tuz stresi altında kök sisteminde değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir (Bari ve diğ., 2006; Kawa ve diğ., 2016). Tez çalışmasında, 7 ve 14 gün stres uygulanan miR399 ailesi ayrı ayrı incelenmiştir, azot açlığına ek olarak kuraklık stresinin ve kombine stres uygulamasının da anlatımlarına etkisi olduğunu düşündüren anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. miR399a'nın kontrol grubuna kıyasla 7 gün stres uygulanan kuraklık ve kombine örneklerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte 14 gün stres uygulanan örneklerde ise kontrol ve kuraklık stresi uygulaması arasında anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu durum, bitkilerin stres koşullarına karşı oluşturdukları savunma cevabının aşamalarındaki gen anlatımının değişimi ile ilişkilendirilebilir (Etherington ve Larcher, 1996; Carmo ve diğ., 2012). miR399b, 14 gün stres uygulaması yapılan örneklerde kontrol ile azot açlığı, kuraklık ve kombine stresleri arasında anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. miR399d, miR399e ve miR399f'de 7 gün stres uygulaması sonucunda kontrol ile azot açlığı stres koşulu arasında anlamlı bir azalma olduğu ancak miR399e 14. gün örneklerinin kontrol ile azot açlığı stresi arasında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. *PHO2* ve NLA genlerini hedefleyen miR827'nin, kısa süreli ve uzun süreli yanıtlarında azot açlığı profilinde farklılık gözlenmiştir. 7 gün stres uygulaması yapılan örneklerde kontrol grubuna kıyasla miR827 anlatımında anlamlı bir azalma görülürken, 14 gün stres uygulamasında kontrol grubuna göre azot açlığı stres uygulamasında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Bu durum, farklı stres sürelerinin araştırılması gerektiği ile ilgili görüş bildiren Liang ve diğ.'nin (2012) düşüncesini destekler nitelikte olduğu söylenebilir.

Bitkilerde miRNA'lar gelişim, büyüme ve stres yanıtı gibi biyolojik süreçlerde etkili olan genleri düzenleyici moleküllerdir. Bu sebeple hücresel süreçlerde rol oynayan miRNA'ların stres koşullarına verdikleri yanıtların ve hedefledikleri genlerin belirlenmesiyle moleküler mekanizmaların aydınlatmasına katkı sağlayabilir. Bu çalışma ile elde edilen verilerin

bitkilerde kuraklık ve azot açlığı stres yanıtlarının açıklanmasında katkısı olacağı düşünülmektedir. Doğada bitkiler aynı anda birden fazla strese maruz kalabilirler ve bunun sonucunda miRNA anlatımlarında değişim gözlenebilir. Bu çalışmada kuraklık ve azot açlığı streslerinin kombine uygulanması sonucunda bitkilerin bu iki stres koşulu altında verdikleri moleküler yanıtlardaki farklılıklar bu görüşü destekleyici niteliktedir. Buna ek olarak, bitkilerin stres koşuluna maruz kalma süresinin erken ve geç yanıt üzerinde etkili olduğu ve ilerleyen çalışmalarda stres koşulunun uygulama süresindeki değişim ile hedeflenen genlerin moleküler mekanizmalar üzerindeki etkilerinin aydınlatılması açısından önemli olduğunu düşündürmektedir.



KAYNAKLAR

- Achkar, N. P., Cambiagno, D. A., & Manavella, P. A., 2016. miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends in Plant Science*.
- Addo-Quaye, C., Snyder, J. A., Park, Y. B., Li, Y. F., Sunkar, R., & Axtell, M. J., 2009. Sliced microRNA targets and precise loop-first processing of MIR319 hairpins revealed by analysis of the *Physcomitrella patens* degradome. *RNA*, 15(12).
- Alghabari, F., Ihsan, M. Z., Khaliq, A., Hussain, S., Daur, I., Fahad, S., & Nasim, W., 2016. Gibberellin-sensitive Rht alleles confer tolerance to heat and drought stresses in wheat at booting stage. *Journal of Cereal Science*, 70.
- Anithakumari, A. M., Nataraja, K. N., Visser, R. G. F., & van der Linden, C. G., 2012. Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population. *Molecular Breeding*, 30(3).
- Anjum, S. A., Tanveer, M., Ashraf, U., Hussain, S., Shahzad, B., Khan, I., & Wang, L., 2016. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17).
- Anjum, S. A., Xie, X. yu, Wang, L. chang, Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W., 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*.
- Arteaga-Vázquez, M., Caballero-Pérez, J., & Vielle-Calzada, J. P., 2006. A family of microRNAs present in plants and animals. *Plant Cell*, 18(12), 3355–3369.
- Bari, R., Pant, B. D., Stitt, M., & Scheible, W. R., 2006. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology*, 141(3), 988–999.
- Bartel, D. P., 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. Cell Press.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature*. Nature Publishing Group.
- Baumberger, N., & Baulcombe, D. C., 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11928–11933.
- Bio-Rad Laboratories., 2006. *Applications Guide Real-Time PCR Applications Guide*.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., & Banning, C., 1998. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO Journal*, 17(1).
- Bologna, N. G., Schapire, A. L., Zhai, J., Chorostecki, U., Boisbouvier, J., Meyers, B. C., & Palatnik, J. F., 2013. Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Research*, 23(10).

- Bouguyon, E., Gojon, A., & Nacry, P., 2012. Nitrate sensing and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
- Burke, E. J., Brown, S. J., & Christidis, N., 2006. Modelling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with the Hadley Centre climate model. *Journal of Hydrometeorology*, 7(5).
- Bustin, S., 2015. Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition; ISBN: 9780815344643; and Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition, The Problems Book; ISBN 9780815344537. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12).
- Candolle, A. de, & Candolle, A. P. de., 2011. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis, sive, Enumeratio contracta ordinum generum specierumque plantarum huc usque cognitarium, juxta methodi naturalis, normas digesta /auctore Aug. Pyramo de Candolle. Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis, sive, Enumeratio contracta ordinum generum specierumque plantarum huc usque cognitarium, juxta methodi naturalis, normas digesta /auctore Aug. Pyramo de Candolle.*
- Carmo, B., Zanelato, F., & de Almei, A.-A. F., 2012. Regulation of Gene Expression in Response to Abiotic Stress in Plants. İçinde *Cell Metabolism - Cell Homeostasis and Stress Response*. InTech.
- Caruana, J. C., Dhar, N., & Raina, R., 2020. Overexpression of Arabidopsis microRNA167 induces salicylic acid-dependent defense against *Pseudomonas syringae* through the regulation of its targets ARF6 and ARF8. *Plant Direct*, 4(9), 1–16.
- Casper, S. J., 1990. International Code of Botanical Nomenclature. Adopted by the Fourteenth International Botanical Congress. Berlin. July–August 1987 (Regnum vegetabile vol. 118). W. Greuter, V.H. M. Burdet. W. G. Chaloner, V. Demoulin, R. Grolle, D. L. Hawksworth, D. H. Nicolson, P. c. Silva, F. A. Stafleu, E. G. Voss, J. McNeill (edits.).–XIV/328 pp. Königstein. FRG: Koeltz Scientific Books. 1988. ISBN 3-87429-278-9. DM 60,00. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 75(1).
- Challinor, A. J., Wheeler, T. R., Craufurd, P. Q., Slingo, J. M., & Grimes, D. I. F., 2004. Design and optimisation of a large-area process-based model for annual crops. *Agricultural and Forest Meteorology*, 124(1–2).
- Chang, C., & Meyerowitz, E. M., 1986. Molecular cloning and DNA sequence of the Arabidopsis thaliana alcohol dehydrogenase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(5).
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Guegler, K. J., 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20).
- Chen, X., 2004. A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science*, 303(5666), 2022–2025.
- Cheng, C. Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., & Town, C. D., 2017. Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome.

Plant Journal, 89(4).

- Chiou, T. J., Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Chiang, S. F., & Su, C. L., 2006. Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(2), 412–421.
- Chiu, C. C., Lin, C. S., Hsia, A. P., Su, R. C., Lin, H. L., & Tsay, Y. F., 2004. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant and Cell Physiology*, 45(9).
- Chorostecki, U., Moro, B., Rojas, A. M. L., Debernardi, J. M., Schapire, A. L., Notredame, C., & Palatnik, J. F., 2017. Evolutionary footprints reveal insights into plant microRNA biogenesis. *Plant Cell*, 29(6).
- Clarkson, D., 1996. Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. second edition. 889pp. London: Academic Press, £29.95 (paperback). *Annals of Botany*, 78(4).
- Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L., 2010. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 481–489.
- Demirevska, K., Zasheva, D., Dimitrov, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M., & Feller, U., 2009. Drought stress effects on Rubisco in wheat: Changes in the Rubisco large subunit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(6).
- Dinger, M. E., Pang, K. C., Mercer, T. R., & Mattick, J. S., 2008. Differentiating protein-coding and noncoding RNA: Challenges and ambiguities. *PLoS Computational Biology*.
- Duan, B., Yang, Y., Lu, Y., Korpelainen, H., Berninger, F., & Li, C., 2007. Interactions between water deficit, ABA, and provenances in *Picea asperata*. *Journal of Experimental Botany*, 58(11).
- Etherington, J. R., & Larcher, W., 1996. Physiological Plant Ecology. *The Journal of Ecology*, 84(4).
- Fang, X., & Qi, Y., 2015. Rnai in plants: An argonaute-centered view. *Plant Cell*.
- Fedoroff, N. V., Battisti, D. S., Beachy, R. N., Cooper, P. J. M., Fischhoff, D. A., Hodges, C. N., Zhu, J. K., 2010. Radically rethinking agriculture for the 21st century. *Science*.
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S., 2008. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 00(1), 10.3.1-10.3.34.
- Frith, M. C., Bailey, T. L., Kasukawa, T., Mignone, F., Kummerfeld, S. K., Madera, M., Mattick, J. S., 2006. Discrimination of non-protein-coding transcripts from protein-coding mRNA. *RNA Biology*, 3(1).
- Gastal, F., & Lemaire, G., 2002. *N uptake and distribution in crops: An agronomical and ecophysiological perspective*. İçinde *Journal of Experimental Botany* (C. 53, ss. 789–799). Oxford University Press.
- Gong, Z., Xiong, L., Shi, H., Yang, S., Herrera-Estrella, L. R., Xu, G., Zhu, J. K., 2020. Plant

- abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*.
- Good, A. G., & Beatty, P. H., 2011. Fertilizing nature: A tragedy of excess in the commons. *PLoS Biology*, 9(8).
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B. J., Chiang, H. R., King, N., ... Bartel, D. P., 2008. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*, 455(7217).
- Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P., 2012. Cytokinins: Metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science*.
- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., & Schulze-Lefert, P., 2017. Interplay between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annual Review of Phytopathology*, 55.
- Holl, F., & Heynhold, G., 1842. *Flora von Sachsen*. Verlag von Justus Nauman (C. 1).
- Hsieh, L. C., Lin, S. I., Shih, A. C. C., Chen, J. W., Lin, W. Y., Tseng, C. Y., ... Chiou, T. J., 2009. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant Physiology*, 151(4), 2120–2132.
- Huala, E., Dickerman, A. W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., Rhee, S. Y., 2001. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): A comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Research*, 29(1).
- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S., & Wang, L., 2018. Chilling and drought stresses in crop plants: Implications, cross talk, and potential management opportunities. *Frontiers in Plant Science*.
- Ings, J., Mur, L. A. J., Robson, P. R. H., & Bosch, M., 2013. Physiological and growth responses to water deficit in the bioenergy crop *Miscanthus x giganteus*. *Frontiers in Plant Science*, 4(NOV).
- Janas, M. M., Wang, B., Harris, A. S., Aguiar, M., Shaffer, J. M., Subrahmanyam, Y. V. B. K., Novina, C. D., 2012. Alternative RISC assembly: Binding and repression of microRNA-mRNA duplexes by human Ago proteins. *RNA*, 18(11).
- Jiang, Q., Xu, Z. S., Wang, F., Li, M. Y., Ma, J., & Xiong, A. S., 2014. Effects of abiotic stresses on the expression of Lhcb1 gene and photosynthesis of *Oenanthе javanica* and *Apium graveolens*. *Biologia Plantarum*, 58(2), 256–264.
- Jones-Rhoades, M. W., & Bartel, D. P., 2004. Computational identification of plant MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14(6).
- Kant, S., Bi, Y. M., & Rothstein, S. J., 2011. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*.

- Kant, S., Peng, M., & Rothstein, S. J., 2011. Genetic regulation by NLA and microRNA827 for maintaining nitrate-dependent phosphate homeostasis in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 7(3).
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., & Carrington, J. C., 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Developmental Cell*, 4(2), 205–217.
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., Somerville, C., 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, 408(6814), 796–815.
- Kawa, D., Julkowska, M. M., Sommerfeld, H. M., Ter Horst, A., Haring, M. A., & Testerink, C., 2016. Phosphate-dependent root system architecture responses to salt stress. *Plant Physiology*, 172(2), 690–706.
- Khraiweh, B., Zhu, J. K., & Zhu, J., 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137–148.
- Kidner, C. A., & Martienssen, R. A., 2004. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, 428(6978).
- Kim, J., Jung, J. H., Reyes, J. L., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Chung, K. S., Park, C. M., 2005. microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant Journal*, 42(1), 84–94.
- Koontz, L., 2013. Agarose gel electrophoresis. İçinde *Methods in Enzymology* (C. 529).
- Koornneef, M., & Meinke, D., 2010. The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant Journal*.
- Krishnatreya, D. B., Agarwala, N., Gill, S. S., & Bandyopadhyay, T., 2021. Understanding the role of miRNAs for improvement of tea quality and stress tolerance. *Journal of Biotechnology*, 328.
- Laibach, F., 1943. Zur Ätiologie der Blütenbildung. *Die Naturwissenschaften*, 31(21–22).
- Ledda, B., Ottaggio, L., Izzotti, A., Sukkar, S. G., & Miele, M., 2020. Small RNAs in eucaryotes: new clues for amplifying microRNA benefits. *Cell and Bioscience*.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V., 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5).
- Leutwiler, L. S., Hough-Evans, B. R., & Meyerowitz, E. M., 1984. The DNA of Arabidopsis thaliana. *MGG Molecular & General Genetics*, 194(1–2).
- Li, H., Xu, L., Wang, H., Yuan, Z., Cao, X., Yang, Z., Huang, H., 2005. The putative RNA-dependent RNA polymerase RDR6 acts synergistically with ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 to repress BREVIPEDICELLUS and MicroRNA165/166 in Arabidopsis leaf

- development. *Plant Cell*, 17(8), 2157–2171.
- Li, W. X., Oono, Y., Zhu, J., He, X. J., Wu, J. M., Iida, K., Zhu, J. K., 2008. The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*, 20(8), 2238–2251.
- Li, Yan, Zhang, Q. Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., & Zhou, J. M., 2010. Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology*, 152(4), 2222–2231.
- Li, Yanjie, Fu, Y., Ji, L., Wu, C., & Zheng, C., 2010. Characterization and expression analysis of the Arabidopsis mir169 family. *Plant Science*, 178(3), 271–280.
- Liang, G., He, H., & Yu, D., 2012. Identification of Nitrogen Starvation-Responsive MicroRNAs in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 7(11), 48951.
- Linné, C. von., 2012. *Caroli Linnæi ... Species plantarum exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Caroli Linnæi ... Species plantarum exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas.*
- Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A., & Zheng, C. C., 2008a. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *RNA*.
- Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A., & Zheng, C. C., 2008b. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *RNA*, 14(5), 836–843.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4).
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., & Carrington, J. C., 2002. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 14(7).
- Lu, Chaoqun, & Tian, H., 2017. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: Shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth System Science Data*, 9(1).
- Lu, Cheng, Tej, S. S., Luo, S., Haudenschild, C. D., Meyers, B. C., & Green, P. J., 2005. Genetics: Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*, 309(5740).
- Ma, Z., & Zhang, X., 2018. Actions of plant Argonautes: predictable or unpredictable? *Current Opinion in Plant Biology*.
- Mahajan, S., & Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Jones-Rhoades, M. W., Tang, G., Zamore, P. D., Barton, M. K., & Bartel, D. P., 2004. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development:

- Importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO Journal*, 23(16).
- Marín, I. C., Loef, I., Bartetzko, L., Searle, I., Coupland, G., Stitt, M., & Osuna, D., 2011. Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta*, 233(3).
- Medici, A., & Krouk, G., 2014. The Primary Nitrate Response: A multifaceted signalling pathway. *Journal of Experimental Botany*.
- Megraw, M., Baev, V., Rusinov, V., Jensen, S. T., Kalantidis, K., & Hatzigeorgiou, A. G., 2006. MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. *RNA*, 12(9), 1612–1619.
- Mendonça, E. G., Paiva, L. V., Stein, V. C., Pires, M. F., Santos, B. R., & Pereira, F. J., 2012. Growth curve and development of the internal calli structure of eucalyptus camaldulensis dehn. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(6), 887–896.
- Meyerowitz, E. M., & Pruitt, R. E., 1985. *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science*, 229(4719).
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33(4).
- Moro, B., Chorostecki, U., Arikat, S., Suarez, I. P., Hobartner, C., Rasia, R. M., Palatnik, J. F., 2018. Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants. *Nucleic Acids Research*, 46(20).
- Murashige, T., & Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*.
- O'Carroll, D., Mecklenbrauker, I., Das, P. P., Santana, A., Koenig, U., Enright, A. J., Tarakhovsky, A., 2007. A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes and Development*, 21(16).
- Osmond, C. B., Austin, M. P., Berry, J. A., Billings, W. D., Boyer, J. S., Dacey, J. W. H., Winner, W. E., 1987. Stress Physiology and the Distribution of Plants. *BioScience*, 37(1).
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D., 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425(6955), 257–263.
- Passardi, F., Dobias, J., Valério, L., Guimil, S., Penel, C., & Dunand, C., 2007. Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of Plant Physiology*, 164(8).
- Pegler, J. L., Grof, C. P. L., & Eamens, A. L., 2018. Profiling of the Differential Abundance of Drought and Salt Stress-Responsive MicroRNAs Across Grass Crop and Genetic Model Plant Species. *Agronomy*. MDPI AG.
- Pegler, J. L., Oultram, J. M. J., Grof, C. P. L., & Eamens, A. L., 2019. Profiling the abiotic stress responsive microRNA landscape of *arabidopsis thaliana*. *Plants*, 8(3), 58.

- Praba, M. L., Cairns, J. E., Babu, R. C., & Lafitte, H. R., 2009. Identification of physiological traits underlying cultivar differences in drought tolerance in rice and wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(1).
- Provart, N. J., Alonso, J., Assmann, S. M., Bergmann, D., Brady, S. M., Brkljacic, J., McCourt, P., 2016. 50 years of Arabidopsis research: Highlights and future directions. *New Phytologist*, 209(3).
- Raun, W. R., & Johnson, G. V., 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agronomy Journal*.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P., 2002. MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, 16(13).
- Reis, R. S., Hart-Smith, G., Eamens, A. L., Wilkins, M. R., & Waterhouse, P. M., 2015. Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins. *Nature Plants*, 1.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Gojon, A., 2006. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50).
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., & Bartel, D. P., 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110(4).
- Roca Paixão, J. F., Gillet, F. X., Ribeiro, T. P., Bournaud, C., Lourenço-Tessutti, I. T., Noriega, D. D., Grossi-de-Sa, M. F., 2019. Improved drought stress tolerance in Arabidopsis by CRISPR/dCas9 fusion with a Histone AcetylTransferase. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9.
- Rojas, A. M. L., Drusin, S. I., Chorostecki, U., Mateos, J. L., Moro, B., Bologna, N. G., ... Palatnik, J. F., 2020. Identification of key sequence features required for microRNA biogenesis in plants. *Nature Communications*, 11(1).
- Scandalios, J. G., 2002. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Scheible, W. R., González-Fontes, A., Lauerer, M., Müller-Röber, B., Caboche, M., & Stitt, M., 1997. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*, 9(5).
- Scheible, W. R., Lauerer, M., Schulze, E. D., Caboche, M., & Stitt, M., 1997. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal*, 11(4).
- Shi, H., Ye, T., Yang, F., & Chan, Z., 2015. Arabidopsis PED2 positively modulates plant drought stress resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(9), 796–806.
- Somssich, M., 2018. A short history of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Columbia-0.
- Song, L., Axtell, M. J., & Fedoroff, N. V., 2010. RNA Secondary Structural Determinants of

- miRNA Precursor Processing in Arabidopsis. *Current Biology*, 20(1).
- Stanton, L. W., 2001. Methods to profile gene expression. *Trends in Cardiovascular Medicine*.
- Steinitz-Sears, L. M., 1963. Chromosome Studies In Arabidopsis Thaliana. *Genetics*, 48(4).
- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K., 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science*. Elsevier.
- Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J. K., 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18(8).
- Sunkar, R., & Zhu, J. K., 2004. Novel and stress regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis w inside box sign. *Plant Cell*, 16(8).
- Tan, G. S., Garchow, B. G., Liu, X., Yeung, J., Morris IV, J. P., Cuellar, T. L., Kiriakidou, M., 2009. Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2. *Nucleic Acids Research*, 37(22).
- Tang, F., Hajkova, P., Barton, S. C., Lao, K., & Surani, M. A., 2006. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 34(2).
- Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P., & Zamore, P. D., 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes and Development*, 17(1).
- Tomari, Y., & Zamore, P. D., 2005. Perspective: Machines for RNAi. *Genes and Development*.
- Van Der Weele, C. M., Spollen, W. G., Sharp, R. E., & Baskin, T. I., 2000. Growth of Arabidopsis thaliana seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), 1555–1562.
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P., 2007. Protocol: A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(1).
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., & Bartel, D. P., 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes and Development*, 18(10).
- Vazquez, F., Gascioli, V., Crété, P., & Vaucheret, H., 2004. The Nuclear dsRNA Binding Protein HYL1 Is Required for MicroRNA Accumulation and Plant Development, but Not Posttranscriptional Transgene Silencing. *Current Biology*, 14(4), 346–351.
- Verslues, P. E., & Bray, E. A., 2004. LWR1 and LWR2 are required for osmoregulation and osmotic adjustment in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136(1).
- Wagenitz, G., 2008. Deutsche floren: Der weg vom Latein zum Deutsch, von Linné zum natürlichen system. *Feddes Repertorium*.
- Wang, H., Liang, X., Wan, Q., Wang, X., & Bi, Y., 2009. Ethylene and nitric oxide are involved

- in maintaining ion homeostasis in *Arabidopsis* callus under salt stress. *Planta*, 230(2).
- Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R. A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Crawford, N. M., 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(1).
- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., & Patel, D. J., 2008. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*.
- Wang, Y. Y., Hsu, P. K., & Tsay, Y. F., 2012. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*.
- Williams, L., Grigg, S. P., Xie, M., Christensen, S., & Fletcher, J. C., 2005. Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development*, 132(16), 3657–3668.
- Woodward, A. W., & Bartel, B., 2018. Biology in bloom: A primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics*, 208(4).
- Wu, G., Higuchi, K., & Meroney, R. N., 1992. Applications of digital image processing in wind engineering. *Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics*, 42(1–3).
- Xiong, L., Schumaker, K. S., & Zhu, J. K., 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14(SUPPL.).
- Yu, Y., Jia, T., & Chen, X., 2017. The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. *New Phytologist*.
- Zhao, M., Ding, H., Zhu, J. K., Zhang, F., & Li, W. X., 2011. Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 190(4), 906–915.
- Zhao, X., & Li, L., 2013. Comparative Analysis of MicroRNA Promoters in *Arabidopsis* and Rice. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 11(1), 56–60.
- Zhou, M., & Luo, H., 2014. Role of microRNA319 in creeping bentgrass salinity and drought stress response. *Plant Signaling and Behavior*, 9(APR).
- Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-González, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y. T., Zhang, X., 2013. Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by *Arabidopsis* Dicer-like1. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(9).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Seda Yaşar
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Makale ve Bildiriler	
Yasar S., Hatipoglu D., Karpuz B., Cakir O., 2019. Determination of the effect of Curcumin on superoxide dismutase and catalase activity in tomato. In proceeding title; 7 th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey; Istanbul; MolBiyKon'19; PT068	