

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

**HAŞHAŞ (*Papaver Somniferum* L.) MİKRO-RNA'LARININ (miRNA)
TANIMLANMASI VE miRNA HEDEF GEN EKSPRESYON
ANALİZLERİNİN BELİRLENMESİ**

Hatice Böke

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Turgay Ünver

Ağustos

2013

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Hatice Böke


İmzası

Doç. Dr. Turgay Ünver danışmanlığında, Hatice Böke tarafından hazırlanan bu çalışma ~~31.07.2013~~ tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

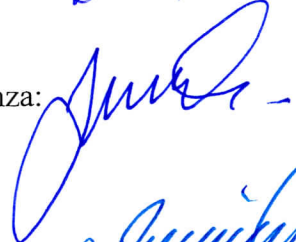
Başkan : Prof. Dr. Cengiz SANCAK

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Neşet ARSLAN

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Serkan URANBEY

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Ali ERGÜL

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Turgay ÜNVER

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Adı Soyadı
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Mikro-RNA'larının (miRNA) Tanımlanması ve miRNA Hedef Gen Ekspresyon Analizlerinin Belirlenmesi

Hatice Böke

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç.Dr. Turgay Ünver

Mikro-RNA'lar (miRNA) 21 nukleotid uzunluğunda küçük, çoğu organizmada gen ifadesinde düzenleyici olarak rol alan ve kodlanmayan RNA'lardır. Haşhaş bitkisi özellikle narkotik morfin, öksürük kesici kodein ve kas gevşetici papaverin başta olmak üzere birçok çeşit benzilisokuinolin tipi alkaloidi üretebilen bir bitkidir. Şimdiye kadar alkaloid senteziyle ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen haşhaşta yer alan miRNA'larla ilgili hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu tez kapsamında haşhaşta yer alan ve alkaloid sentez yolağı ile ilişkili miRNA'ların saptanması amacıyla bir dizi çalışmalar yapılmıştır. Haşhaş bitkisinin çeşitli dokularına ait küçük RNA kütüphaneleri yüksek işlem hacimli Illumina Solexa teknolojisi ile dizilenmiştir. Toplam 11,999,328 küçük RNA okuması yapılmış bu okumalardan 2,999,700 tanesi benzersiz küçük RNA okuması olarak saptanmıştır. Derinlemesine dizileme teknolojisi yardımıyla toplam 12550 haşhaş miRNası saptanmış olup, bu miRNA'ların 124 miRNA familyasına ait olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışma ile 7 adet haşhaş özgü yeni miRNA bulunmuştur. Haşhaş transkriptomu için farklı doku örneklerinden izole edilen RNA'lar ile miRNA mikroarray uygulaması yapılmıştır. Derinlemesine dizileme teknolojisi ve miRNA mikroarray sonuçları bir araya getirilerek haşhaş bitkisinde miRNA profillemesi yapılmıştır. Haşhaşta ifade edilen bazı miRNA'lardan seçim yapılarak bu miRNA ve hedef genlerinin dokulardaki ifade düzeyi kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR (qRT-PCR) ile doğrulanmıştır ve ölçülmüştür. Ayrıca haşhaş özgü yeni miRNA'lar ile RNA'lar miR156, miR157, miR167 ve miR535'in hedef genleri 5' modifiye RLM-RACE metoduyla tespit edilmeye çalışılmış ve sonuçta pso-miR535'in alkaloid senteziyle yakından ilgili *LOX* genini hedeflediği bulunmuştur. Alkaloid sentez mekanizmasının haşhaş bitkisinde regülasyonunu sağlayan 23 adet miRNA bu çalışma kapsamında tespit edilmiştir. Bu miRNA'lardan pso-miR13 ve pso-miR408' in doğrudan alkaloid sentezinde yer alan genleri hedeflediği belirlenmiştir.

2013, 212 sayfa

Anahtar Kelimeler: alkaloid sentezi, derinlemesine dizileme, miRNA, miRNA mikroarrayi, *Papaver somniferum*, RLM-RACE

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Identification of Opium Poppy Micro-RNAs (miRNA) and Expression Analyses of Their Target Gene Transcripts

Hatice Böke

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Turgay Ünver

MicroRNAs (miRNA) are ~21 nucleotide long, small endogenous and non-coding regulatory RNAs. The opium poppy, *Papaver somniferum* L., produces several types of benzyloisoquinoline alkaloids including the narcotic analgesic morphine, the cough suppressant codeine, the muscle relaxant papaverine, and the anti-microbial agents sanguinarine and berberine. Although there are many studies related to biosynthesis of alkaloids; no studies on the regulatory roles of miRNAs in opium poppy. In this thesis, several studies were conducted on determination of the miRNAs associated with alkaloid synthesis pathway in opium poppy. A small RNA library from different tissues of opium poppy was constructed and sequenced by the Illumina platform. A total of 11,338,273 small RNA reads were obtained. 1,047,447 total reads representing 12550 unique sRNAs were matched to known opium poppy miRNAs. These miRNAs were belong to 124 miRNA family. Since no homolog has been found for other plant species 7 novel miRNAs were considered to be species specific. miRNA transcriptome analysis, miRNA-microarrays by using sRNA samples isolated from different tissues of opium poppy were performed. Some of the miRNAs with significant expression levels were chosen and analyzed in detail. Expression levels of selected miRNAs in different tissues were validated by qRT-PCR. In addition, novel papaver miRNAs and miR156, miR157, miR167 and miR535 target genes were identified with a modified 5'RLM-RACE method. The *LOX* gene targeted by the pso-miR535 was found to be closely related to the alkaloid biosynthesis. On the other hand, 23 miRNAs identified as responsible for the regulation of alkaloid synthesis mechanism. Such miRNA target genes, pso-miR13 and pso-miR408 target genes were discovered that they are directly involved in the alkaloid biosynthesis .

2013, 212 pages

Key words: Alkaloid biosynthesis, high-throughput sequencing, miRNA, miRNA microarray, *Papaver somniferum*, RLM-RACE

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca paylaştığı bilgi ve deneyimlerini tez çalışmam süresince de esirgemeyen, tezimi yürütebilmem için gerekli laboratuvar ortamı ve imkanları sağlayan, araştırma yöntemlerine ilişkin kafamdaki soru işaretlerini gideren değerli danışmanım **Doç. Dr. Turgay Ünver**'e, insana saygısı, içtenliği ve ilkeli yöneticiliği ile bana örnek olan, yakın ilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen hocam **Prof. Dr. Sebahattin Özcan**'a, tez çalışmam süresince sevinçli ve sıkıntılı anlarımı paylaştığım ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım **Uzm. Biyolog Emine Gülden Erkiş**'a,

Eğitimim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, mutlu ve üzüntülü anlarımı paylaşan sevgili annem **Yaşar Bozkurt** ve babam **Mehmet Bozkurt**'a, ihtiyaç duyduğumda hep yanımda bulduğum sevgili eşim **Kaan Böke** ve oğullarım **Erkan Enes** ile **Fırat Burak**'a, ilkokuldan itibaren üzerimde emeği olan **tüm hocalarıma** ve yanımda olan sevgili **arkadaşlarıma** en içten duygularla teşekkür ederim.

Bu tez çalışmam 'Yeni Mikro-RNA'ların Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Bitkisinde Tanımlanması ve Karakterizasyonu' adlı 109O661 kodlu TÜBİTAK projesi ve DPT2010K120720 kodlu DPT projesi tarafından desteklenmiştir. Bu desteğinden dolayı **TÜBİTAK** ve **DPT**'ye teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Haşhaş (<i>Papaver somniferum</i> L.)	3
2.2. Haşhaş (<i>Papaver somniferum</i> L.) 'da Alkaloid Sentez Mekanizması	4
2.2.1. Alkaloidler	4
2.2.2. Benzilizokinolin alkaloidleri (BIA) ve Sentez Mekanizması	5
2.3. Mikro-RNA (miRNA)	10
2.4. Bitkilerde miRNA'lar	11
2.5. Bitkilerde miRNA'ların Biyogenezi ve Çalışma Mekanizması	12
2.6. Bitkilerde miRNA'ların Görevleri	15
2.7. Bitkilerde miRNA'ların Tanımlanması ve İfade Düzeylerinin Ölçülmesi	21
2.8. Bitkilerde miRNA'ların Biyoenformatik Olarak Bulunması	21
2.9. Bitkilerde miRNA'ların Moleküler Yöntemlerle Deneysel Olarak Bulunması	25
2.9.1. Küçük RNA'ların Doğrudan Klonlanması	26
2.9.2. miRNA'ların qRT-PCR ile Tanımlanması ve Ölçülmesi	27
2.9.3. miRNA'ların Derinleme Dizileme (Deep-Seq) ile Tanımlanması	29
2.9.4. miRNA'lara Ait İfade Düzeylerinin miRNA Mikroarray ile Karakterizasyonu	33
2.10. Bitkilerde miRNA'ların Hedeflediği Genlerin Bulunması	37
2.10.1. Hedef Genlerin Biyoenformatik Olarak Bulunması	39
2.10.2. Hedef Genlerin RLM-RACE Yöntemiyle Deneysel Olarak Bulunması	39
3. GEREKÇE VE AMAÇ	41
4. MATERYAL VE YÖNTEM	43
4.1. Bitki Materyali	43
4.2. RNA ve Küçük RNA (sRNA) İzolasyonu	43
4.2.1. Trizol İle Total RNA İzolasyonu	43
4.2.2. miRVana Kiti Yardımıyla Küçük RNA'larca Zengin Total RNA İzolasyonu	44
4.3. İzole Edilen RNA'ların Karakterizasyonu	45
4.4. miRNA Mikroarray Çalışması	45
4.5. miRNA Derinlemesine Dizileme	47

4.6. Morfin Sentezinde Rol Oynayan Genleri Hedefleyen miRNA'ların Bulunması	49
4.7.. qRT-PCR ile miRNA'ların Saptanması ve Ölçülmesi	49
4.8. qRT-PCR ile miRNA Hedef Genlerinin Ekspresyon Analizi	53
4.9. miRNA Hedef Genlerinin Modifiye 5' RLM-RACE ile Belirlenmesi	55
4.10. Örneklerin Jelden Geri Kazanılması	55
4.11. Jelden Geri Kazanılan Örneklerin Vektöre Ligasyonu	57
4.12. <i>E.coli</i> Bakterisine Transformasyon.....	57
4.13. Seçilen Koloniler İçin Koloni RCR Doğrulanması.....	58
4.14. Plazmit İzolasyonu.....	59
4.15. Plazmitlerin Dizi Analizi	60
4.16. Biyoenformatik Olarak Derinlemesine Dizileme Sonucu Bulunan miRNA'ların Hedef Genlerinin Bulunması	60
4.17. Biyoenformatik Olarak Bulunan miRNA Hedef Genlerinin GO Analizi	60
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	62
5.1. RNA İzolasyonu	62
5.2. Derinlemesine Dizileme Çalışması	64
5.3. Morfin Sentezinde Rol Oynayan Genleri Hedefleyen miRNA'lar.....	70
5.4. Haşhaşa Derinlemesine Dizileme Sonucu Bulunan Yeni miRNA'lar	70
5.6 Haşhaş miRNA'larının Hedef Genleri.....	77
5.7. Seçilen Bazı miRNA'lar ve Hedefledikleri Genlerin qRT-PCR Analizleri.....	85
5.8. miRNA Hedef Genlerinin Modifiye 5' RLM-RACE ile Saptanması.....	93
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	100
6.1. Derinlemesine Dizileme Sonucu Elde Edilen miRNA'lar	100
6.2. miRNA Mikroarrayi Sonucu Bulunan miRNA'lar	101
6.3. Seçilen ve qRT-PCR ile Analiz Yapılan Bazı miRNA'lar ve Hedefledikleri Genler Arasındaki İlişki.....	109
6.4. miRNA'lar ile Alkaloid Sentez Mekanizmasının İlişkilendirilmesi.....	114
6.5. Sonuç.....	118
KAYNAKLAR.....	120
EKLER	132
EK1: Derinlemesine Dizilemede Bulunan miRNA Ailelerinin Olgun miRNA Dizileri ..	132
EK2:Derinlemesine Dizileme Sonucu Bulunan Bazı Korunmuş miRNA'ların Pre-miRNA Dizileri	135
EK3: Derinlemesine Dizilemede Okunan Küçük RNA'ların Morfin Sentezinde Rol Oynayan Genlerle Örtüştürülmesi, Bu küçük RNA'ların Papaver EST lerinde Bulunması ve İlgili miRNA'lar ve Hedeflediği Genlerin Tüm In Siliko Analizleri	140
EK4: Derinlemesine Dizileme Sonucu Bulunan Yeni miRNA'ların Pre-miRNA Dizileri	157
EK5: Tüm Haşhaş miRNA Mikroarray Sonuçları	158
EK6: Tüm Haşhaş miRNA'larının Biyoenformatik Olarak Bulunan Hedef Genleri	188

EK7: qRT-PCR’da Ölçülen miRNA ve Genlere Ait Ct Değerleri Ve Standart Sapma Değerleri	197
EK8: 5’ Modifiye RLM-RACE Primerleri	208
ÖZGEÇMİŞ	211

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye’de haşhaş ekimine izin verilen iller	3
Şekil 2.2. Haşhaş’da papaverin, sanguinarin, noskapin ve morfin oluşumunu gösteren önemli benzilizokinolin yolakları	5
Şekil 2.3. L-Tirozinden (S)-retikulin oluşumu esnasında meydana gelen ara ürünler ve tepkimeye giren enzimler	7
Şekil 2.4. Haşhaşta BIA sentezinin gerçekleştirdiği hücre çeşitleri. Latisfer (sarı), kalburlu borular ve arkadaş hücreleri (kırmızı)	8
Şekil 2.5. lin-4 ve let-7 miRNA’larının tahmin edilen stem loop yapıları	11
Şekil 2.6. Bitkilerde miRNA’ların oluşumu ve çalışma mekanizması.....	13
Şekil 2.7. miRNA’ların çeşitli stres koşullarında verdikleri yanıtlar	15
Şekil 2.8. Kök, yaprak ve çiçek gibi ana organlarında biyolojik olayları düzenleyen miRNA’lar	17
Şekil 2.9. Pre-miRNA yapısındaki benzerlik, olgun miRNA yapısındaki homoloji	22
Şekil 2.10. Bir bitkinin EST ve/veya GSS içerisinde pre-miRNA ve olgun miRNA yapılarının bulunması	24
Şekil 2.11. Küçük RNA’ların (sRNA) klonlanması.....	26
Şekil 2.12. End-point PCR’in şeması.....	28
Şekil 2.13. TagMan URL Prob analizi	29
Şekil 2.14. miRNA-seq için küçük RNA kütüphanesinin hazırlanması	31
Şekil 2.15. Adım adım miRNA’ların derinlemesine dizileme yöntemiyle bulunması (miRNA-seq)	32
Şekil 2.16. miRNA mikroarrayinin akış şeması	36
Şekil 2.17. miRNA’ların hedef mRNA’lar ile eşleşme çeşitleri	38
Şekil 5.1. RNA agaroze jel (%2) görüntüleri	63
Şekil 5.2. Bioanalyzer 2100 agilent cihazı yardımıyla miks RNA’lar için yapılan ayrıntılı analiz raporu.	64
Şekil 5.3. Haşhaş olgun miRNA’larının uzunluklarının dağılımı	65
Şekil 5.4. Haşhaşta bulunan yeni miRNA’ların pre-miRNA yapısı.....	71
Şekil 5.5. Pso-miR2 ve hedeflediği F-box/Kelch-repeat protein (AT1G30090) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.....	86
Şekil 5.6. Pso-miR3 ve hedeflediği putative retroelement pol polyprotein (NP455428) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.....	86
Şekil 5.7. Pso-miR5 ve hedeflediği RSY3 RASPBERRY3 (AT3G24560.2) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü	87
Şekil 5.8. Pso-miR7 ve hedeflediği putative auxin response factor (NP305750) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.....	87
Şekil 5.9. Pso-miR11 ve hedeflediği Leucine-rich repeat protein kinase family protein (AT2G01210.1) ve ATHB-15 (AT1G52150) genlerinin farklı dokularda ifade düzeylerinin qRT-PCR ölçümleri.....	88

Şekil 5.10. Pso-miR13 ve hedef geni <i>7-O-methyltransferase (7-OMT)</i> (FJ156103.1) farklı dokularda ifade düzeylerinin qRT-PCR ölçümleri.....	88
Şekil 5.11. Pso-miR164 ve hedeflediği NAC1 no apical meristem protein (AT1G56010) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.....	89
Şekil 5.12. Pso-miR159 ve hedeflediği MYB101 (AT2G32460) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü	89
Şekil 5.13. Pso-miR395 ve bu miRNAnun hedeflediği <i>APS4 Sulphate adenylyltransferase</i> (AT5G43780) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.....	90
Şekil 5.14. Pso-miR535'in hedeflediği <i>Lipoxygenase (LOX gene)</i> (FM164378.1)'e geninin farklı dokularda yapılan ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü	91
Şekil 5.15. t0047847 numaralı küçük RNA ve hedeflediği <i>COR</i> (FJ624147.1) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.....	91
Şekil 5.16. t0013376 numaralı küçük RNA ve hedeflediği <i>SAT</i> (FJ200354.1) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü	92
Şekil 5.17. t0000199 numaralı küçük RNA ve hedeflediği <i>TYDC</i> (AF025435.1) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.....	92
Şekil 5.18. Pso-miR2'nin hedeflediği gene özgü primerler kullanılarak elde edilen gen parçasının BLAST sonucu.....	94
Şekil 5.19. Pso-miR2, pso-miR157 ve pso-miR535in hedef genlerini bulmak için yapılan PCR'in agaroz jel görüntüsü	94
Şekil 5.20. Plazmitler içerisinde yer alan pso-miR2 ve pso-miR535 in hedeflediği genlere ait olduğu düşünülen gen parçalarının M13 koloni PCR görüntüsü	95
Şekil 5.21. Pso-miR535'in hedeflediği gene özgü primerler kullanılarak elde edilen gen parçasının BLAST sonucu.....	96
Şekil 5.22. Pso-miR157, pso-miR167, pso-miR4, pso-miR11 ve pso-miR3'ün hedef genlerini bulmak için yapılan PCR'in agaroz jel görüntüsü	97
Şekil 5.23. Plazmitler içerisinde yer alan pso-miR3 ve pso-miR157 nin hedeflediği genlere ait olduğu düşünülen gen parçalarının M13 koloni PCR görüntüsü	97
Şekil 5.24. Pso-miR3'ün hedeflediği gene özgü primerler kullanılarak elde edilen gen parçasının BLAST sonuçları	98
Şekil 5.25. Pso- miR535 ve <i>Lox</i> geninin komplementer bölgesi	99
Şekil 6.1. Haşhaşta tespit edilen miRNA'ların alkaloit sentez yolağına müdahalesi.....	116

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kök, yaprak ve çiçek gibi ana organlarında fizyolojik olayları düzenleyen miRNA'lar ve hedefledikleri genler	16
Çizelge 4.1. qRT-PCR ile saptanmaya çalışılan miRNA'ların primerleri	52
Çizelge 4.2. qRT-PCR ile ifade düzeyleri belirlenmeye çalışılan hedeflerin primerleri	54
Çizelge 5.1. İzole edilen RNA'ların kalite ve konsantrasyon tayinleri.....	63
Çizelge 5.2. Haşhaşa ait küçük RNA dizi okumalarının kategorilere göre dağılımı	65
Çizelge 5.3. Derinlemesine dizileme sonucu haşhaşta bulunan miRNA aileleri	66
Çizelge 5.4. Derinlemesine dizileme sonucu bulunan yeni miRNA'lar	71
Çizelge 5.5. Haşhaş bitkisinde 4 farklı dokuya ait miRNA'ların mikroarray analizleri	73
Çizelge 5.6. Haşhaş bitkisinde tespit edilen korunmuş ve yeni miRNA'ların hedefledikleri genler	78
Çizelge 5.7. Tüm haşhaş miRNA'larının Gen ontolojisi (GO) sonuçları	81
Çizelge 5.8. Modifiye 5' RLM-RACE çalışması sonucu bulunan genlerin ID ve adları	93
Çizelge 5.9. Modifiye 5' RLM-RACE çalışması sonucu okunan cDNA parçaları	95

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
AGO	Argounot protein
bp	Baz çifti (base pair)
C	Sitozin
cDNA	Komplementer DNA
DCL1	Dicer benzeyen 1
dk	dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozidtrifosfatlar
F primer	Forward Primer (ileri doğru olan primer)
G	Guanin
Kcal	kilokalori
miRNA(miR)	mikroRNA
ml	mililitre
mM	milimolar
mRNA	mesajcı RNA (messenger RNA)
p	plazmit
pmol	pikomol
PCR	Polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase chain reaction)
ppm	milyonda bir ölçütü
R primer	Reverse primer (geri yönde olan primer)
RE	Restriksiyon Endonükleaz
RISC	RNA indüklenmiş susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferans
sn	saniye
T	Timin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Erime sıcaklığı
U	Unit
µg	mikrogram
µl	mikrolitre

1. GİRİŞ

miRNA'lar olarak adlandırılan mikroRNA'lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan, proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğundaki küçük RNA molekülleridir (1). İlk defa 1993 yılında keşfedilmişlerdir (2), ancak mikroRNA terimi 2001 yılında kullanılmaya başlanmıştır (1, 3).

miRNA'lar kodlanmayan RNA'lardır, pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA'lara, sonra da olgun miRNA'lara dönüştürülürler. Olgun miRNA molekülleri bir veya daha çok mesajcı RNA (mRNA) ile kısmî komplementer olup, bu mRNA'ları hedefleyerek kesme dolayısıyla yıkma veya translasyonel baskılama yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyici rol oynamaktadır (1)

Son yıllarda bitki miRNA'larıyla ilgili araştırmalarda önemli artışlar olmuştur. Günümüzde fonksiyonel genomik alanı ile beraber miRNA'ların saptanması ve rollerinin araştırılması popüler konular arasında yer almaktadır. Bugüne kadar çeşitli bitki türlerinde 25000 den fazla miRNA tespit edilebilmiştir (4). Aynı şekilde miRNA hedefleri olan mRNA'ların pek çoğu deneysel olarak doğrulanmıştır (5).

Bitki miRNA'ları yaprak morfogenezi (6-9), floral organ oluşumu (8-10) ve kök gelişimi (7, 9, 11, 12) gibi organ gelişimindeki önemli fonksiyonlarına ilave olarak, küçük RNA yolağında düzenleyici ve bazı (small interfering RNA) siRNA'ların doğrudan biyogenesizinde de fonksiyon göstermektedir (8, 9, 13). Üstelik bunlar oksidatif stres (9, 14), mineral beslenme (9, 15, 16), kuraklık stresi (9, 17), patojen stresi (9, 18), soğuk (9, 19, 20) ve mekanik stres (21) gibi çeşitli stres yanıtlarında da görev almaktadır.

Özellikle sentezlediği alkaloidler yönünden önemli olan endüstriyel bitkilerden birisi de haşhaş (*Papaver somniferum* L.) dir. Haşhaştan elde edilen alkaloidlerden başlıcaları morfin (en etkili ağrı kesici), kodein (öksürük engelleyici), tebain (kas gevşetici), sanguinarin ve berberin (antimikrobiyal ajan), papaverin (damar gevşetici) ve noskapin (öksürük kesici ve güçlü antikanserojen) dir (22, 23). Haşhaşta biyosentezi yapılan alkaloidler diğer sekonder veya özelleşmiş metabolitler gibi bitkide normal büyüme ve gelişme için değil, abiyotik stres şartları (kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, UV-B radyasyonu,

besin eksikliği, oksidatif stres) altında yaşamı devam ettirebilme ve biyotik stres (fungus, bakteri,virüs ve nematod saldırıları) altında savunma sistemini aktifleştirerek, patojenlerle mücadele edebilme amaçlı üretilmektedirler (23).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarla haşhaşta alkaloitlerin enzimatik sentezleri hemen hemen açıklanmış olmasına rağmen birçok gen, bunların koordinasyonu ve regülasyonu hakkındaki bilgiler halen yetersizdir.

Sunulan bu tezle birçok alanda kullanılan morfin gibi alkaloitleri üreten haşhaş bitkisinde, ifade olan tüm miRNA'ların karakterizasyonu yapılarak bu bitkiye özgü miRNA profilinin açığa çıkarılması ve miRNA'ların alkaloit sentez mekanizmasında ki rolünün daha iyi anlaşılması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Haşhaş (*Papaver Somniferum L.*)

Ülkemizde tarımı yapılan haşhaş, *Papaver somniferum L.* tek yıllık bir kültür bitkisidir. Bilimsel sınıflandırmaya göre *Papaver somniferum L.*, *Rhoedales* takımının *Papaveraceae* familyasındandır. Bu familyanın da *Papaver* cinsi içerisinde yer almaktadır. *Papaver* Latince gelincik, *somniferum* ise ‘rüya görmek’ veya ‘uyku verici’ anlamına gelmektedir (24)

Haşhaş Türkiye’de fazla yağışlı Doğu Karadeniz ve fazla sıcak olan Güneydoğu Anadolu hariç hemen her bölgede yetiştirilebilmekle birlikte haşhaş ekimi izne bağlıdır (25). Ülkemizde haşhaş ekimine izin verilen iller Şekil 2.1’de gösterilmiştir (24).



Şekil 2.1. Türkiye’de haşhaş ekimine izin verilen iller; Eskişehir, Kütahya, Balıkesir, Afyon, Manisa, Uşak, Denizli, Burdur, Isparta, Amasya, Tokat, Çorum (2009 yılı Haşhaş Raporu, Tarım Mahsülleri Ofisi, 2010)

Ülkemizde haşhaş bitkisi hem gıda amaçlı hemde sentezlediği önemli alkaloidler (morfin, kodein, tebain, sanguarin) nedeniyle tıbbi amaçlı üretilmektedir (24). Haşhaş bitkisi özellikle narkotik morfin, öksürük kesici kodein, antimikrobiyal ajanlar sanguarin ve berberin ile kas gevşetici papaverin başta olmak üzere benzilisoquinolin tipi alkaloidi

üretebilen bir bitkidir. Tıbbi öneme sahip olan ana alkaloidlerin yanı sıra yaklaşık 30 adet değişik alkaloid ihtiva ettiği bilinmektedir (23)

2.2. Haşhaş (*Papaver somniferum L.*) 'da Alkaloid Sentez Mekanizması

2.2.1. Alkaloidler

Bitki ve hayvanlar tarafından üretilen alkaloidler amin yapıda olup bazik özellik gösterirler. Ayrıca alkaloidlerin insan ve hayvan fizyolojisi üzerinde kuvvetli etkileri bulunmaktadır. Genel olarak, alkaloidler suda az, organik çözücülerde daha fazla çözünürler. Bitkilerin en az % 25 'i alkaloid içerir. Genellikle % 0.01 den daha az alkaloid içeren bitkiler, alkaloid içeren bitkiler olarak tanımlanmazlar (26).

Alkaloidler bitkilerce savunma amaçlı sentezlenir (23). Potansiyel biyolojik aktivitelerine bağlı olarak bilinen yaklaşık 12.000 alkaloid, farmasötik, uyarıcı, narkotik ve zehir olarak kullanılmaktadır. Bitkilerin genellikle belli bir organında (kök, kabuk, yaprak, meyve, tohum gibi) bulunur (22, 23).

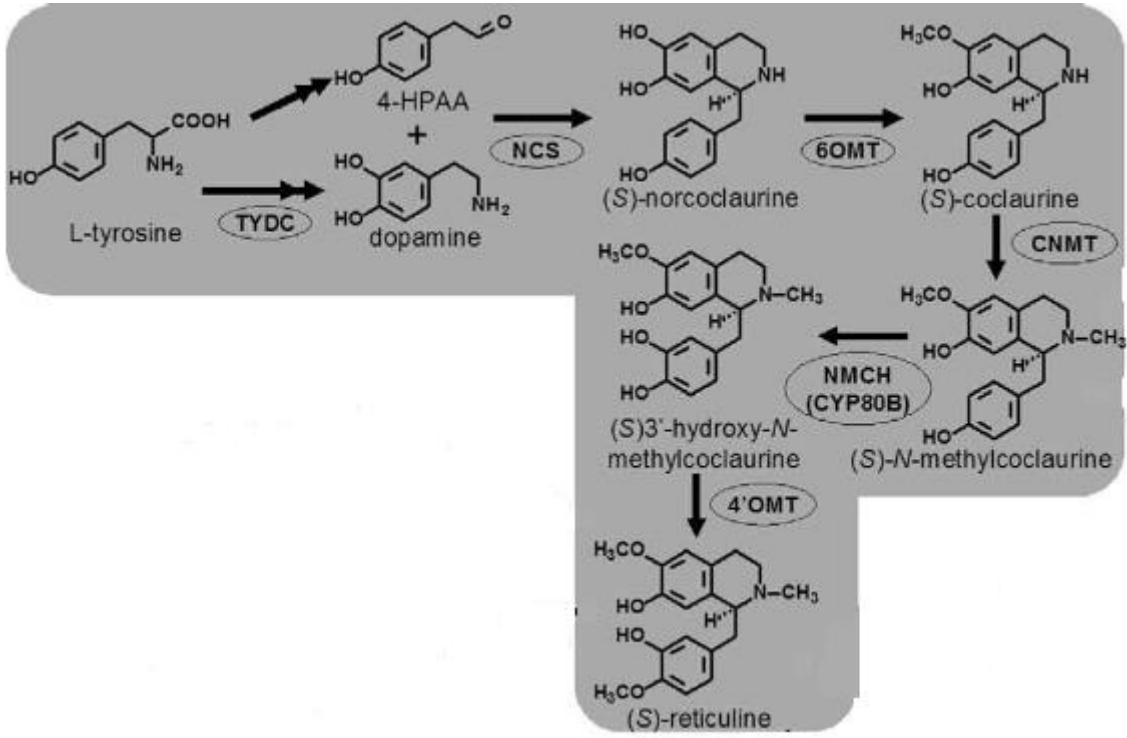
Bilinen alkaloid çeşitleri şunlardır:

- Monoterpenoid indol alkaloidleri,
- Tropan alkaloidleri ve nikotin,
- Pürin alkaloidleri,
- Pirolizidin alkaloidleri,
- Quinolizidin alkaloidleri,
- Benzilzokinolin alkaloidleri (BIA).

Haşhaş bitkisinde sentezlenen önemli alkaloidler ise benzilzokinolin alkaloidleri (BIA) sınıfında yer alır (22, 23, 26).

sanguinarin (27). Bu bileşikler ve ilgili yollarda yer alan enzimlerle ilgili tüm detaylar Şekil 2.2. 'de (28) gösterilmektedir.

BIA biyosentezi, temel olarak tirozinin hem dopamin hem de 4-hidroksifenilasetaldehit molekülüne tirozindekarboksilaz (TYDC) enzimi ile dekarboksilasyon, orto-hidroksilasyon ve deaminasyonu ile başlar. Dopamin, izokinolin kısmının öncülü iken tiraminin deaminasyonundan oluşan 4-hidroksifenilasetaldehit ise, benzil bileşeni olarak katılmaktadır. Sentez yolunun ilk kararlı adımını norkoklaurin sentaz (NCS) ile katalizlenir (28, 29). NCS, dopamin ve 4-hidroksifenilasetaldehiti birleştirerek (S)- Norkoklaurini oluşturur. (S)- Norkoklaurin bitkilerde tüm BIA sentezi için merkezi öncül moleküldür (28, 29). (S)- Norkoklaurin den sonra oluşan bileşik (S)-koklaurin dir ve bu bileşikten sonra bir çeşit P450 monooksijenaz olan 3'OHaz enzimi ile basit benzilizokinolin alkaloidlerinden papaverinin oluşumu için yolda ilk dallanma başlar (28, 29). Dallanma oluşturmadan devam eden (S)- Norkoklaurinin (S)-retikuline dönüşümü, 6. pozisyondaki O-metilasyon, N-metilasyon 3'-hidroksilasyon ve ikinci bir 4-O-metilasyonu içerir. Norkoklaurin 6-O metiltransferaz (6-OMT) ve 3-hidroksi-N-metilkoklaurin 4-O-metiltransferaz (4-OMT) II. sınıf O-metiltransferazlardır ve sıkı bir bölge spesifik özellik göstermektedirler. (S)-retikulin, çoğu BIA yapısal tiplerinin olduğu sentez yolunda, merkezi ara üründür (28, 29). Tirozin amino asidinden (S)- retikulin oluşumu Şekil 2.3.' de (27) ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Bu aşamada yolak 3 kola ayrılır. Birinci yolda (S)-retikulin 7-OMT enzimiyle laudanin alkaloidine dönüştürülür (28, 29).

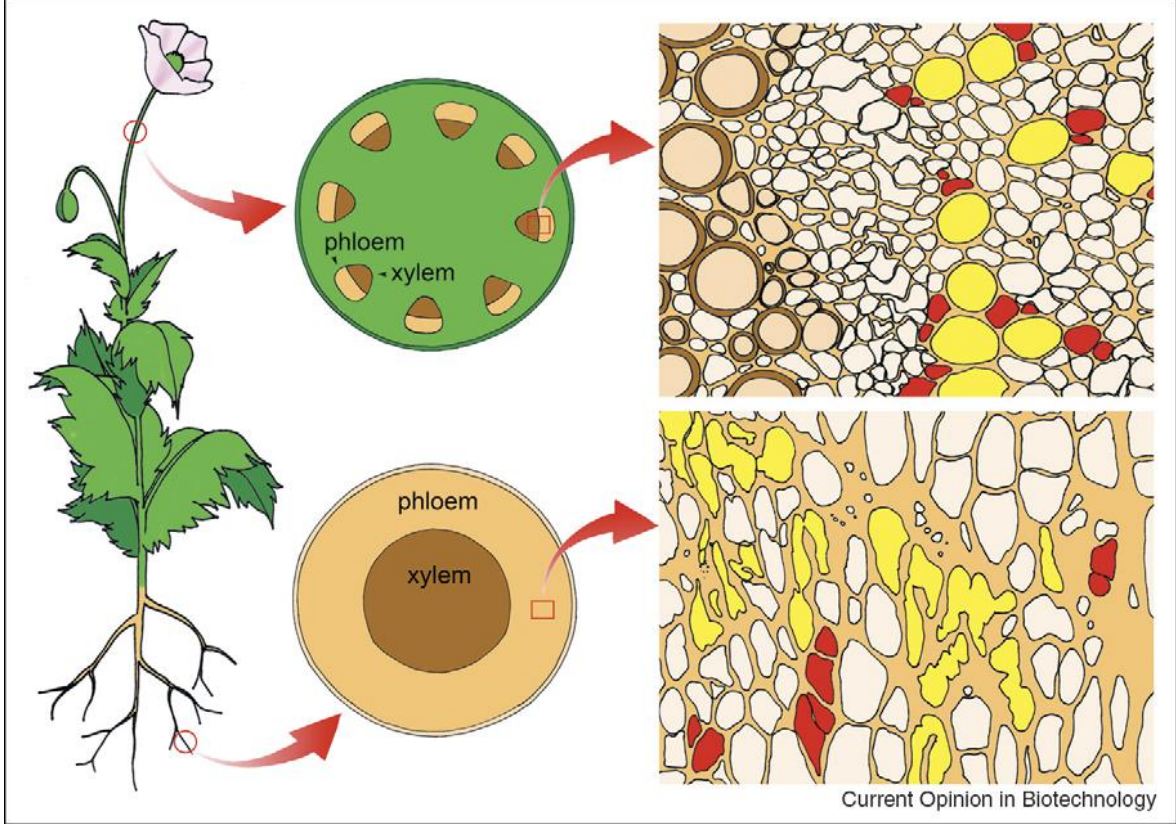


Şekil 2.3. L-Tirozinden (S)-retikulin oluşumu esnasında meydana gelen ara ürünler ve tepkimeye giren enzimler (Ziegler *et al.* 2009'dan alınarak değiştirilmiştir)

İkinci yol aynı zamanda morfin ve türevlerinin oluştuğu yoldur. (S)-retikulin, 1,2-dehidroretikulin sintaz 1,2-dehidroretikulin reduktaz enzimlerinin etkisiyle epimerizasyona uğrar ve (R)-retikuline dönüşür. Salutaridin sentaz ile (R)-retikulin salutaridine, salutaridin reduktaz ile salutaridinole dönüşür (29). Salutaridinol 7-O-asetiltransferaz ile tebaine dönüşür (29). Morfin biyosentezinin son basamağı haşhaşa özgüdür ve tebaine 6-O-demetilaz (T6ODM), kodein reduktaz ve kodein O-demetilaz (CODM) enzimlerince katalizlenir (28, 29).

Üçüncü yol; berberine bridge enziminin (BBE) (S)-retikolini (S)-skoulerine dönüştürmesi ile protoberberin, benzofenantridin (örnek; sanguinarine) ve fitalideizokinolin (örneğin; noscapine) biyosentez yolağının ilk kararlı bileşiği oluşmuş olur (28, 29). Sanguinarin yolağında, sırasıyla (S) keilantifolin, (S)-stilopin, (S)-N-Metil stilopin, protopin, dihidrosanguinarin ve sangiunarin bileşikleri sırasıyla stilopin sintaz, tetrahidroprotoberberine cis-N-metiltransferaz, N-metilstilopin 14-hidroksilaz and protopine 6-hidroksilaz ve dihidrobenzofenantiiridin oksidaz enzimleriyle katalizlenir (28, 29)

Benzilzokinolin alkolitleri (BIA)'nin sentez mekanizması dışında, haşhaş bitkisinde bu yolda yer alan enzimler ve ara maddelerin sentezlendikleri bitki hücreleri üzerinde de bir çok çalışma yapılmıştır (30-32). Haşhaş bitkisindeki bu araştırmalar lateksin yoğun olduğu kapsül ve gövde de ağırlık kazanmış, bazılarında kök organında dahil edilmiştir (Şekil 2.4.) (32).



Şekil 2.4. Haşhaşta BIA sentezinin gerçekleştirdiği hücre çeşitleri. Latisferler (sarı), kalburlu borular ve arkadaş hücreleri (kırmızı) (Liscombe and Facchini 2008).

Alkolit biyosentezi, floemde yer alan üç hücre tipi tarafından gerçekleştirilir (30-32). Latisferler havalandırma dokusu içerisinde yer alan kalburlu borular ve arkadaş hücreleriyle yan yanadır. Bu durum kökte gözlenmemektedir (Şekil 2.4.). Alkolit biyosentez enzimleri arkadaş hücrelerinde üretilir sonradan kalburlu borulara geçerler. Kalburlu borularda üretilen alkolitler depolanmak için latisferlere geçerler (31, 32). Ayrıca kapsül ve gövdede, O-metiltransferaz ve O-asetiltransferaz'ın daha çok parankimal hücrelerde, kodein redüktaz enziminin daha çok latisferlerde bulunduğu, gelişen köklerde ise O-metiltransferaz ve O-asetiltransferazların iç periskılnda, berberine bridge enzimininde, kök korteksinin parenkima hücrelerinde yoğunlaştığı saptanmıştır (31).

Alkaloitlerin sentezlendiği ve biriktirildiği bitki organlarının bir kısmı metabolitler açısından bilinse de bunların bitkinin hangi gelişim aşamasında ve hangi dokusunda toplandıkları konusu tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu güne kadar yapılan çalışmalar sonucunda morfin gibi bazı alkaloitlerin tüm hücrelerde bulunabilirken sanguinarin gibi bazı alkaloitler kökte daha yoğun olarak bulunduğu, ayrıca bazı alkaloitlerin çimlenmeyi takip eden kısa bir süre içinde üretildiği bulunmuştur (33).

Morfin sentez yolunda rol oynadığı bilinen bir çok genin ifade düzeyleri elisitör muamelesi, yaralama yapılarak ve bitkinin farklı doku ve organları baz alınarak ölçülmüştür. Sonuçlara göre aynı gene ait transkript ifade düzeyi, değişik doku ve organda farklılık gösterebilmektedir. Örneğin *TYDC* geni kökte gövde ve çiçek aksamına nispeten, *SAT* geni gövdede yaprak ve kök aksamına nispeten daha çok ifade edilmektedir (34).

Alkaloit sentez yolağının regülasyonunun anlaşılması için pek çok çalışmalar yapılmıştır. RNAi kullanılarak *COR* enziminin fazla ifadesi ile morfin ve türevlerini arttırılmasının hedeflendiği bir çalışma sonucunda *COR* enziminin miktarının artmasıyla birlikte toplam alkaloit miktarında % 28, morfin miktarında %22, kodein miktarında %58'lik artış, miktarında artma beklenmeyen tebainde ise %75 oranında artışla karşılaşılmıştır (35). Aslında yolakta tebain oluşumu *COR* enziminin aktivite göstermesinden önce gerçekleşmektedir. Genetik olarak müdahale edilmemiş haşhaş bitkisinde normalde toplam alkaloit miktarının %22'si S-retikulin ve metillenmiş türevlerinden oluşmaktayken *COR* geninin susturulduğu bir çalışmada %25'lik bir artış saptanmıştır (36). *Bbe* geni susturulmuş ve sonuçta sanguinarin kontrol edildiği gösterilmiştir. *CYP80B3* geni haşhaşa aşırı ürettirilmiş ve toplam alkaloit miktarında %450 artış saptanmış ve tebain ile oripavin alkaloitinde azalma tespit edilmiştir (37). *SalAT* geninin aşırı ifade ettirilmesi sonucu tebain, morfin, kodeinde artış saptanmış ve tüm alkaloit içeriğini yaklaşık %40 oranında arttırılmıştır. (36). *SalAT* geninin susturulması sonucu ise salutaridinde beklenmedik bir azalma ve tebain ile kodeinde düşme gözlenmiştir (38).

Alkaloit sentez yolağının tüm yönleriyle aydınlatılabilmesi için yapılan moleküler çalışmaların miRNA yönüyle eksik kaldığı görülmektedir. Yolağın regülasyonunda yer alan miRNA'ların tespit edilmesiyle, susturulan veya aşırı ifade ettirilen genlerin beklenmeyen sonuçlarının kolaylıkla açıklanabileceği düşünülmektedir.

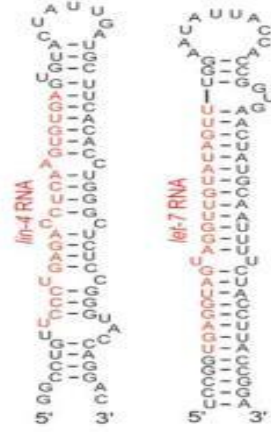
2.3. Mikro-RNA (miRNA)

Ribonükleik asit veya RNA bir nükleik asit olup nükleotitlerden (azotlu baz, riboz şeker, fosfat) oluşur. RNA molekülü temelde proteine dönüştürülen ve proteine dönüştürülmeyenler olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Proteine dönüştürülenler mRNA (mesajcı RNA), proteine dönüştürülmeyenler ise tRNA, rRNA ve küçük RNA'lar olarak adlandırılmaktadır. Küçük RNA'ların bir çok çeşiti vardır. Bunlar siRNA (küçük sessizleştirici RNA), snoRNA (küçük nükleolar RNA), snRNA (küçük nüklear RNA) ve miRNA (mikro RNA) (39).

Mikro-RNA'lar, kendilerine özgü genler veya intron bölgelerinden kodlanan, proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 20-24 nükleotit uzunluğunda, küçük RNA molekülleridir (9, 40-42).

RNA interferans (RNAi), canlı hücreler içinde yer alan ve hangi genlerin proteine translasyon olacağını belirleyen ve kontrol eden transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır. Bu mekanizma doğal bir işlem olup, canlı organizmadaki biyolojik fonksiyonu, hem virüs kalıtım materyali ve transpozonlar gibi hareketli genetik elementlere karşı genomu korumak hemde ökaryotik organizmaların gelişimsel programlarının fonksiyonu için önemli olan transkripsiyon sonrası gen susturma ile gen regülasyonunda önemli rol oynamaktadır (43, 44). MikroRNA (miRNA) ve küçük interfering RNA (siRNA), RNAi nin küçük moleküllerinin iki tipidir. Genlerin doğrudan ürünü olan, bu küçük RNA'lar, faaliyetlerini artırmak veya azaltmak amacıyla diğer özel RNA'lar (mRNA) ile bağlanabilirler. (41, 45).

Mikro-RNA (miRNA) terimi 2001 yılında kullanılmaya başlansa bile, ilk miRNA'nın bulunması 1993 yılında olmuştur. Lee, Feinbaum ve Ambros adlı üç araştırmacı buldukları ve lin-4 olarak adlandırdıkları ilk miRNA'yı bilim dünyasına tanıtmışlardır. Lee ve arkadaşları 1993'de denek olarak yuvarlak solucan *Caenorhabditis elegans*'ı kullanmış, lin-4 (Şekil 2.5.) adlı genin küçük bir RNA transkribe ettiğini ve hiçbir proteini kodlamadığını da bildirmişlerdir (46). Bu keşifden 7 yıl sonra canlılığın gelişim zamanlamasını düzenleyen başka bir mikroRNA, let-7 (Şekil 2.5.) olarak adlandırılmış ve bunun bir çok türde korunmuş olduğu belirlenmiştir (42, 47, 48).



Şekil 2.5. lin-4 ve let-7 miRNA'larının tahmin edilen yapıları (Lee *et al.* 1993; Reinhart *et al.* 2000).

2.4. Bitkilerde miRNA'lar

2002 yılında *Arabidopsis*'te miRNA'ların ilk defa keşfedilmesinden (49) sonra, iki farklı yaklaşım (üç farklı yöntem) kullanılarak 25141 bitki miRNA'sı ve karakterize edilmiştir (miRBase v. 19) (4). Bu yöntemler;

- Farklı dokular ve koşullardaki küçük RNA kütüphanelerinden doğrudan klonlama (deneysel yaklaşım),
- *C. elegans*'da küçük RNA'ların ilk kez tespitine neden olan geleneksel mutant tarama metodu (deneysel yaklaşım)
- Bitki miRNA'larının korunan sekansları üzerinden mevcut genomik veri tabanlarından yapılan biyoenformatik tahmin (biyoenformatik yaklaşım) (9).

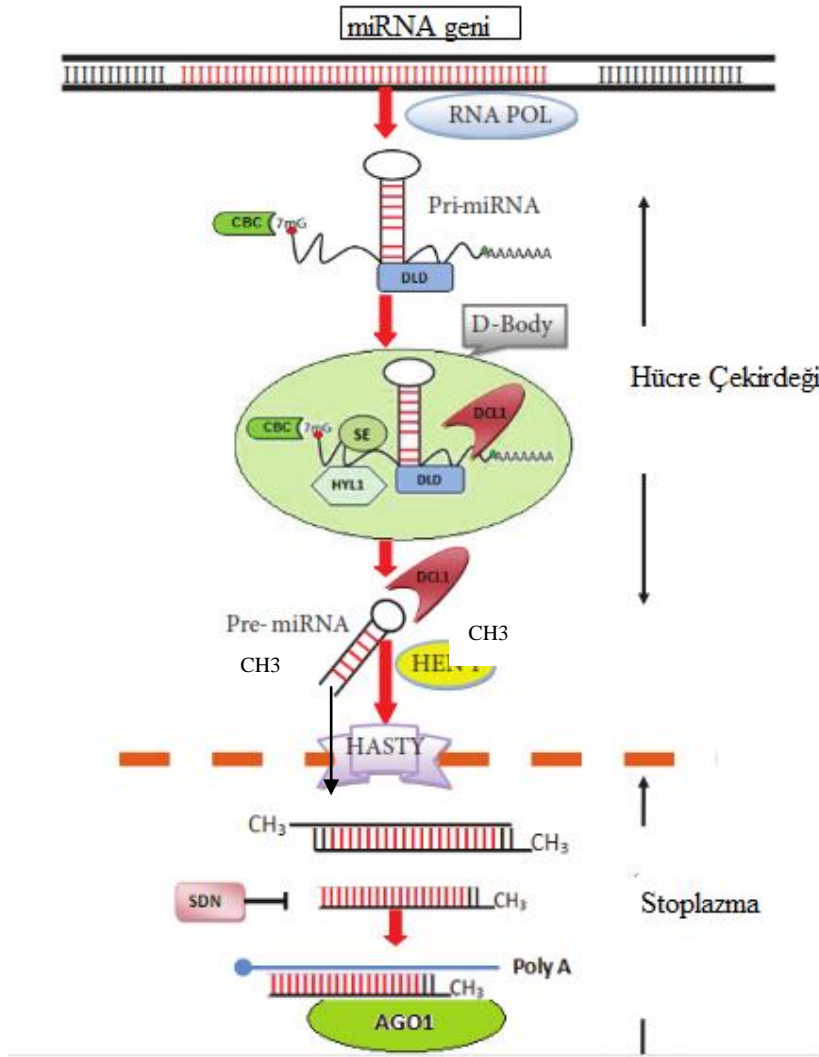
Genellikle hayvan miRNA'larının biyogenezi ve fonksiyonel mekanizması benzer olmasına rağmen bitki miRNA'larında birkaç farklılık görülmektedir. Bu farklılardan ilki, bitki pre-miRNA'larının daha büyük ve daha fazla çeşitte stem-loop yapısına sahip olmasıdır. İkincisi, olgun bitki miRNA'ları tam komplementerliğe yakın hedef bölgeleriyle eşleşmektedir. Üçüncüsü hayvanlarda miRNA'lar genellikle mRNA'ların 3'UTR lerindeki birkaç hedef dizisini tanıyıp, transkripsiyonel inhibisyona sebep olurken; bitki miRNA'ları genellikle kodlama bölgesindeki tek bir hedef bölgeyi tanıyıp, kesim yapmak için mRNA'ya yönlendirilmektedirler. Kodlama bölgesinde bulunan bitki miRNA hedeflerinin sadece birkaç bazında görülen yanlış eşleşme, bitki miRNA'larının small interfering RNA

(siRNA)'lara daha benzer aktivite gösterebildiğini akla getirmektedir (50). Diğer bir farklılık bitki miRNA'larının 5' terminalinde 'U' nükleotidini daha fazla tercih etmesidir (49, 51, 52).

Arabidopsis'te ilk kez rapor edilen miRNA'lar ağırlıklı olarak transkripsiyon faktörleri olan mRNA'ları (50) veya Dicer-like-1 (DICER) ve Argonaute1 (AGO1) gibi RNA interferans mekanizmasına ait faktörleri hedeflemektedir (13, 53). *Arabidopsis*'te daha sonra tespit edilen miRNA'lar farklı fizyolojik süreçlerde görevli proteinleri kodlayan mRNA'ları da hedeflemektedir. Daha sonraki zamanlarda bir sürpriz olarak miRNA'ların negatif düzenleyiciliğinden daha ileri fonksiyonları olduğu tespit edilmiştir. Örneğin miR173 ve miR390 *Arabidopsis* de ilk transkript kesim evresinde siRNA biyogenezine de yön verebilmektedir. Öngörülen birçok miRNA hedeflerinin bazıları onaylanmış, bazıları deneysel olarak doğrulanmıştır (8). Araştırmacılar, miRNA'ların hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığını ifade etmektedirler (9, 54).

2.5. Bitkilerde miRNA'ların Biyogenezi ve Çalışma Mekanizması

miRNA'lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelmektedir. İlk adımda miRNA genlerinden veya bazı intronlardan primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür. Üçüncü ve son adımda olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (9).



Şekil 2.6. Bitkilerde miRNA'ların oluşumu ve çalışma mekanizması (Eldem *et al.* 2013'den değiştirilerek alınmıştır)

MikroRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan veya intron bölgelerinden sentezlenmektedir. Pri-miRNA (500-3000 baz), 'cap' ve 'poli A' kuyruğuna sahip stem-loop yapısındadır. Pri-miRNA mikroprosesi adı verilen Dicer benzeri-1 tipi RNAz III (DCL1), serrate (SE), nükleer cap bağlama kompleksi (CBC) ve hyponastic leaves1 (HYL1) içeren kompleks tarafından işlenerek pre-miRNA oluşturulur. Bu işlemler D-body adı verilen bölgede olur ve işlem tamamlanmaya kadar bir çeşit RNA bağlayıcı protein olan Dawdle (DLD) tarafından pri-miRNA'nın ikincil yapısı stabilize edilir. miRNA: miRNA* dubleksinin 3' ucuna hua enhancer1 (HEN1) tarafından metil takılır. Böylece bu dubleks küçük RNA'ları degrade edici nükleaz (SDN) saldırısından korunmuş olur. Daha sonra bu yapı exportin-5 benzeri HASTY (HST) proteini tarafından sitoplâzmaya gönderilir (5, 9, 54). Dicer, pre-

miRNA'nın stem-loop yapısı kestikten sonra, miRNA:miRNA* dubleksinden sadece birisi (5' ucu daha kararlı olanı) RNA, RNA –indükleyici gen susturma (RISC) kompleksine (Argonaute, PAZ ve PIWI) dahil olmaktadır. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNaz olan Argonaute'un etkisiyle bu iki iplikçikten uygun olanı seçilmektedir. Bu iplikçik kılavuz iplikçik (guide strand) olarak adlandırılmakta, diğer iplikçik RISC kompleksinin substratı olarak parçalanmaktadır (40). MikroRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, Argonaute (AGO1) proteinleri yardımıyla hedef mRNA ile baz eşleşmesi yaparak, onun kesilmesine dolayısıyla yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olmaktadır (5, 9). RISC kompleksi yapısında bulunan 3' ucu kıvrılarak PAZ domainine tutturulmuş miRNA tarafından hedef mRNA tanınmaktadır. Hedef mRNA PIWI domaini ve miRNA arasındaki boşluğa yerleştirilmekte ve uygun miRNA nin 5' ucundan 1-10 baz arasına komplementer olan mRNA kesilmektedir (Şekil 2.6.). Daha sonra bu ikiye ayrılmış hedef mRNA, çoğunlukla sitoplazmada bulunan RNA-bağlı RNA polimeraz (RdRP) aktivitesiyle ortaya çıkan ikincil siRNAda olduğu gibi XRN4 tarafından degrade edilmektedir. RISC kompleksi bilinmeyen bir mekanizma ile translasyonel inhibisyona da aracılık etmektedir (9, 40, 55).

Pekçok miRNA geninin, öncelikle monokotil bir tür olan çeltik ve dikotil bir tür olan *Arabidopsis thaliana*'da korunduğu belirlenmiştir. Bryophytes den tohumlu bitkilere kadar geniş bir bitki spektrumunda *class III homeodomain-leucine zipper* (HD-ZIP III) genine ait miRNA bağlanma bölgesinin korunması, 400 milyon yılı aşkın bir süredir miR166'nın aracılık ettiği posttranskripsiyonel düzenlemenin kopya edilebilen bir mekanizması olduğunu göstermektedir (56) Yine miR160 ve miR390 *Polytrichum juniperinum* yosununda tespit edilmiş ve klonlanmıştır. Bu durum temel olarak pek çok bitki miRNA'sının çiçekli bitkilerin ortaya çıkmasından önceki evrimsel süreçte değişmeden kaldığını göstermektedir (57). Tekli primer PCR amplifikasyonu ile, pek çok farklı bitki genomundan hairpin yapısı oluşturabilen sekans segmentlerinin pek çoğu elde edilebilmiştir. Aynı miRNA gen ailesine ait hairpin yapıları türler arasında korunmuştur (57). Ancak, bitki miRNA ailesinin büyük bir kısmı türler arasında farklılık göstermektedir. Bu farklılığın bitkilerde çeşitli spesifik süreçlerin düzenlenmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Allen ve arkadaşları *Arabidopsis*'de miRNA genlerinin evrimsel konumlarına dair fikir ileri sürmüşlerdir. Bu çalışma *Arabidopsis*'e ait bazı miRNA genlerinin son zamanlarda ortaya çıktığını ve monokot ve dikotlarda korunmadığını göstermektedir. Yeni bitki

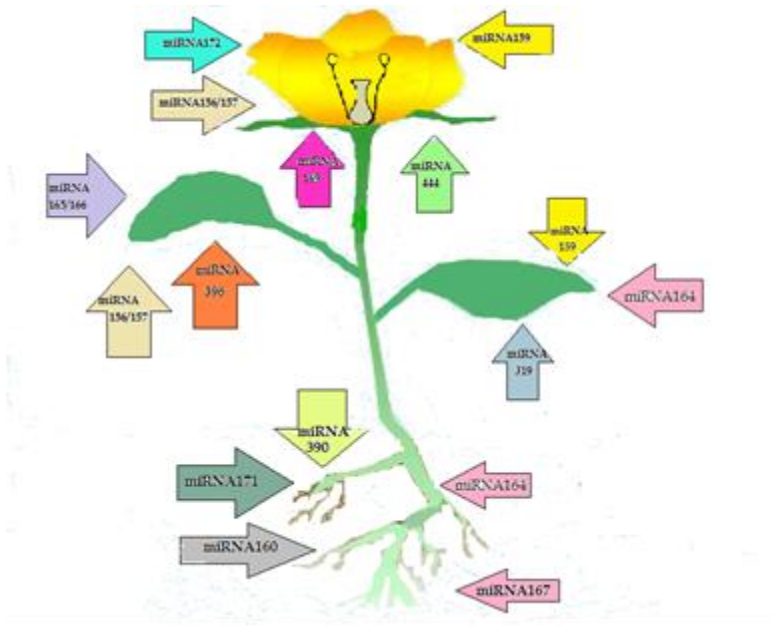
Kök gelişimi, yaprak gelişimi ve morfolojisi, çiçek organ gelişimi ve çiçeklenme zamanı, tohum gelişimi ile ilgili miRNA'lar Şekil 2.8.'de ve bu miRNA'ların hedef genleri Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Kök, yaprak ve çiçek gibi ana organlarında fizyolojik olayları düzenleyen miRNA'lar ve hedefledikleri genler

Kök Gelişim		Yaprak Gelişimi ve morfolojisi		Çiçek organ gelişimi ve çiçeklenme zamanı		Tohum gelişimi	
miRNA	Hedef gen	miRNA	Hedef gen	miRNA	Hedef gen	miRNA	Hedef Gen
miR390	<i>tas3, arf</i>	miR164	<i>nac1, cuc2</i>	miR164	<i>nac1, cuc2</i>	miR164	<i>nac1, cuc2</i>
miR164	<i>nac1, cuc2</i>	miR165/166	hd-zip III gen ailesi, <i>phb, phv</i>	miR165/166	hd-zip III gen ailesi, <i>phb, phv</i>	miR165/166	hd-zip III gen ailesi, <i>phb, phv</i>
miR160	<i>arf10, arf16</i>	miR159	<i>cin, tcp, gamyb</i>	miR159	<i>cin, tcp, gamyb</i>	miR159	<i>cin, tcp, gamyb</i>
miR171	<i>scl6</i>	miR156/157	<i>sbp box</i>	miR156/157	<i>sbp box</i>	miR156/157	<i>sbp box</i>
miR167	<i>arf6, arf8</i>	miR396	<i>grf</i>	miR171	<i>scl6</i>	miR160	<i>arf10, arf16</i>
		miR319	<i>tcp4, lanceolate</i>	miR159	<i>cin, tcp, gamyb</i>	miR319	<i>tcp4, lanceolate</i>
				miR172	<i>toe1, toe2, toe3, ids1, gloy15</i>	miR167	<i>arf6, arf8</i>
				miR169	<i>cbf-b/nf-ya</i>	miR397&miR528	<i>ao</i>
				miR167	<i>arf6, arf8</i>	miR319	<i>tcp4, lanceolate</i>
				miR444	<i>mads-box</i>	miR1530	<i>tkl</i>

miR156/157 ve miR172 arasındaki interaksiyon hem monokotillerde hem de dikotillerde gelişim aşamalarının birbiri ardınca düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. . *Arabidopsis*'de yaşlılıkta yaprakta trikomlar görülür. Yapraklar daha daralmış, uzun ve tırtıklıdır. Yaşlanmış mısır (*Zea mays*) da yaprakların şekli değişir, üretilen epidermal

mum depolanır, yapraklarda hücrelerin özelleşmesi ile tüyler oluşur. *Arabidopsis*'de de mısırdada da bu değişimlerin nedeni miR156 ve miR172 nin antagonistik çalışmasıdır. Hem miR156'nın hedeflediği *Squamosa Promoter Binding Protein-Like (SPL)* hem de miR172'nin hedeflediği *Apetala 2 (AP2)* genleri aynı zamanda transkripsiyon faktörleridir. miR156'nın miktarındaki artış miR172'nin azalmasına, yaşlılığın ve çiçeklenmenin gecikmesi ile sonuçlanırken; miR172'nin ifadesinin artmasıyla olgun yaprak özelliklerinin erkenden görülmesi, erken çiçeklenme ile sonuçlanır (8-10, 61, 62).



Şekil 2.8. Kök, yaprak ve çiçek gibi ana organlarda biyolojik olayları düzenleyen miRNA'lar

AP2 (Apetala 2), çiçek organlarının belirlenmesinde yer alan önemli bir genidir. *AP2* geninin mutasyonu çiçek örtüsü organlarının yer değiştirmesine neden olmaktadır. *AP2* miR172 için komplementer bir bölge taşımakta ve miR172 tarafından negatif olarak düzenlenmektedir. Çiçek organları ve çiçeklenme zamanının belirlenmesinde görevli *AP2* genlerinin baskılanmasında miR172 kritik bir role sahiptir. miR172'nin sadece çiçeklenme de değil aynı zamanda soğuk stresinde de rol oynamaktadır. miR172'nin ifadesinin, +4 °C'de bekletilerek soğuk stresine maruz bırakılan *Arabidopsis* bitkisinde, strese maruz kalmamış bitkiye kıyasla 2 kat arttığı belirlenmiştir. Ayrıca kuraklık ve tuzluluk stresine maruz bırakılan tütün bitkisinde de miR172'nin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (17, 63, 64).

Bitkinin yaprak morfogenezi, yaşlanma, çiçeklenme zamanı ve tohum gelişimi (Şekil 2.8.) gibi biyolojik süreçlerinde yer alan SBP (SQUAMOSA promoter binding protein) transkripsiyon faktör ailesi miR156 tarafından kontrol edilmektedir. Ayrıca kuraklık, tuzluluk, bor fazlalığı, soğuk gibi biyotik stresler ile fungal patojenler gibi biyotik stresler, miR156'nın bitkideki ifadesini değiştirmektedir (9, 17, 19, 21, 64-67).

Oksin bitki büyüme ve gelişmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Gövdenin büyümesi, fototropik yanıtlar, apikal dormansi ve kök oluşumu gibi olayları yönlendirmektedir. Oksine bitki yanıtı oksin/indole-3-asetik asit (Aux/IAA) proteinleri, oksin cevap faktörleri (ARFs) ve protein degradasyon yolağı komponentleriyle gerçekleştirilmektedir (68). Son yıllarda oksin sinyalinde görevli pek çok gen miRNA hedefi olarak doğrulanmış veya onaylanmıştır (7, 9, 65, 69-71). miR160'ın *arf10*, *arf16* ve *arf17* genlerini; miR167'nin ise *arf6* ve *arf8* genlerini transkripsiyon sonrası düzenlendiği tespit edilmiştir. miR160'ın *Arabidopsis* de *arf10* ve *arf16* mRNA'larını hedefleyerek kök kaliptrası (kökte büyüme bölgesini örten koruyucu doku) oluşumunda da görev aldığı bilinmektedir (7, 69). Oksin cevap faktörlerinden *arf6* geni miR160'ı indükleyerek *arf17*'nin baskılanmasını sağlar çünkü bu genin bitkilerde aşırı ifade olması sonucu kök büyüme kusurları dahil, pleiotropik gelişim anormallikleri ortaya çıkarmaktadır (7). *Arf17* geni ise miR167'yi *arf6* ve *arf8*'i koordine etmek için aktive eder. Bu iki miRNA (miR160 ve miR167) birbirlerini regüle ederek oksin hormonuna yanıtı sağlarlar. Bunun yanında oksin hormonu çiçek organ gelişimiyle de yakından ilişkilidir. Bu nedenle miR167'nin hedeflediği *arf6* ve *arf8* genlerinin gynoecium ve stamen gelişiminde, bir de fertilité de rol alır. miR167'nin bitkide fazla ifadesi çiçek organında kusurlar oluşturur (9, 70, 72). Ayrıca miR167'nin zeytinde peryodisitenin düzenlenmesi (73) kuraklık, tuzluluk, soğuk, bakteriyel patojen gibi stres cevabında da rolü olduğu bilinmektedir (8, 9, 16, 17, 20, 63, 66, 71, 74, 75).

miR159'un hedef geninin MYB (myeloblastosis) transkripsiyon faktör ailesi olduğu doğrulanmıştır. miR159'un aşırı ifade olduğu transgenik bitkilerde fark edilebilir düzeyde fenotipik değişiklik gözlemlenmiştir. İlk olarak, çiçeklenmeye geçiş kısa gün koşullarında gecikmiştir. İkinci olarak bu bitkiler normal dışı anter gelişimi sebebiyle döllenememiş, çoğalamamıştır (8). miR159/miR319 tohum büyüklüğü ve tohum gelişimi üzerinede etkilidir. miR159a ve miR159b nin her ikisinde meydana gelen bir mutasyon sonrası tohumların küçük ve şekilsiz olduğu gözlemlenmiştir (76). Tohum çimlenmesinde rol alan

myb33, *myb101* genlerinin aktiviteleri miR159 tarafından baskılanmaktadır. miR159'un fazla ifadesi absisik asit karşı duyarlılığı arttırmaktadır. miR159 *myb33*, *myb101* ve *myb65* transkripsiyon faktör genlerini hedefleyerek kuraklık, tuzluluk, bor toleransı, bakteriyal patojen yanıtında da görev almaktadır (9, 63, 67, 71, 77). Ayrıca miR159'un *hd-zip* ve *tcp* transkripsiyon faktör genlerini doğrudan regüle ederek yaprak taslağının oluşumu ve gelişiminde rol oynadığı da bilinmektedir (78). Bu miRNA'nın zeytinde yaprakta meyve dokusuna oranla daha fazla ifade edildiği gösterilmiştir (73)

Arabidopsis'de NAC-domain transkripsiyon faktör genleri olan (*CUP-SHAPED COTYLEDON1(CUC1)*, *CUC2*, *NAC1*, *AT5G07680* ve *AT5G61430*) genleri, miR164'ün hedefleridir (8). miR164 ün aşırı ifade olması; çiçek organ füzyonuna ve kotiledon füzyonuna, yan köklerin çıkışında azalmaya neden olmaktadır (7, 11, 79). *CUC1* geninin aşırı ifade olması durumunda ise sepal miktarında azalma, petal miktarında azalma, geniş yaprak oluşumu ve embriyonik gelişimde başkalaşmaya sebep olmaktadır (7, 8) Ayrıca miR164'ün kavak da mekanik stres yanıtında görev aldığı da belirlenmiştir (21). Ayrıca şeftali kök ve yapraklarında bu miRNA'nın ifade seviyesinin susuzluk stresine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (71).

miR319 *Arabidopsis*'te miRJAW olarak adlandırılmakta, TCP adlı bitkiye özgü transkripsiyon faktör genlerini hedeflemektedir. *Tcp4* geni aşırı ifade olduğunda anormal bir yaprak morfolojisi ortaya çıkmaktadır. Bu geni hedefleyen miR319 fazla ifade olursa süper birleşik yapraklar oluşmaktadır. Yine TCP gen ailesinden olan *cinnata (cin)* geni düz yaprak oluşumu sırasında hücre bölünmesinin regülasyonunu sağlar (9). Yine miR319 tarafından hedeflenen TCP (TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PCF), transkripsiyon faktör ailesi jasmonik asit biyosentezini kontrol etmektedir. Çeşitli lipoxygenaz genleri arasından özellikle *LOX2*'nin TCP tarafından regüle edildiği belirlenmiştir (80, 81). miR319'un fazla ifade olması yaşlı yapraklarda çok ifade olunan ve hedeflenen TCP4 gen ürününün azalmasına neden olur. Böylece bitki daha uzun süre yeşil kalır. miR319 tarafından regüle edilen TCP genleri yaprak gelişimini olumsuz yönde, yaşlanmayı ise olumlu yönde düzenlemektedir ve bort fazlalığında dayanıklı arpa bitkisinde kök dokusunda oldukça fazla ifade edildiği gösterilmiştir (67, 80, 81).

Bitkilerde damarlanmanın oluşumu provasküler hücrelerin oluşumu ile başlar. Daha sonra prokambium gelişir. Damar gelişiminde HD-ZIP transkripsiyon faktör ailesi rol oynar. Bu ailede yer alan *athb15*, *athb8*, *phavoluta (phv)*, *phabulosa (phb)* ve *revoluta (rev)*, genleri

miR165 ve miR166 tarafından regüle edilmektedir. miR166a'nın fazla ifadesi sonucu atb15 mRNA miktarı azalır ve kambial/prokambial hücrelerinde hızlı bir değişiklik gözlenir. Bunun sonucu ksilem dokusu ve interfasküler bölgesi genişletilmiş bir damar sistemi ile karşılaşırız. miR165/166'nın çiçek gelişiminde etkilemektedir. Bu miRNA'nın fazla ifade olması çiçek gelişiminde eksikliklerin oluşmasına neden olmaktadır (7, 9, 82, 83). Zeytin bitkisinde yaprakta meyve dokusuna göre çok daha fazla miktarda bu miRNA'nın ifade edilmesi ayrıca gelişimindeki rolünü doğrulamaktadır (73). Tuzluluk, soğuk, kuraklık, kadmiyum, bori, fungal ve bakteriyal patojen gibi streslere bitkinin yanıtında da miR166 'ya rastlanmaktadır (9, 17, 19, 20, 64, 65, 67, 75).

Küçük RNA oluşumunun düzenlendiği yolaktaki DCL1 ve AGO1 proteinleri miRNA biyogenesizi ve fonksiyonunda görevli olan iki önemli proteindir (5). Pri -miRNA dan miRNA oluşturan molekül DCL1 enzimdir ve sonrasında ortaya çıkan ürün RISC için önemli bir komponenttir. Bu yolakta görevli genleri hedefleyen miRNA'ların olduğu bilinmektedir. miRNA oluşumu için gerekli DCL1, miR162 için bir bağlanma bölgesi bulundurmaktadır (53). Aynı şekilde AGO1 geni miR168 in hedef genidir (84). AGO1 in aşırı ifade edilmesi miR168 in fonksiyonunu etkilemektedir (13). Bunlarla beraber miR168'in kuraklık ve tuzluluk gibi çevresel streslerin varlığında bitkide fazla ifade olduğu belirlenmiştir (74).

Çeşitli çevresel koşullarda yetişen bitkiler çevresel streslere adapte olmak için evrimsel-karmaşık mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu durumdan sorumlu pek çok miRNA'nın olduğu tahmin edilmektedir ve bazıları abiyotik ve biyotik stresler, oksidatif stres, ağaç türlerinde mekanik stres, mineral madde stresi ve diğer çevresel uyarıcılar olarak bilinen pek çok stres yanıt tipinde deneysel olarak doğrulanmıştır (8). Klonlama stratejisiyle, büyük miktardaki miRNA'lar soğuk, kuraklık, tuzluluk ve bitki stres hormonu absisik asit (ABA)'in muamele edildiği *Arabidopsis* fidelerinden elde edilen küçük RNA kütüphanelerinden tespit edilmiştir (14). Birkaç miRNA'nın ifadesinde bir veya daha fazla stres uygulanmasıyla beraber artma veya azalma görülmüştür. miR393 NaCl, soğuk, kuraklık ve ABA uygulamasıyla yüksek oranda ifade olurken; miR397b ve miR402 tüm stres uygulamalarında hafif şekilde ifade olmuş, miR319c ise soğuk stresıyla aşırı ifade olmuş ancak kuraklık, NaCl veya ABA streslerinde bu duruma rastlanmamıştır (8). miR397, miR408 ve miR444 gibi bazı miRNA'ların bor fazlalığında arpa bitkisinde stres cevabı oluşturulmasında önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (67)

Günümüze kadar miRNA ile ilgili yapılan fonksiyonel genetik çalışmaları bitki miRNA'larının birçok gelişim evresinde çok önemli roller oynadığını göstermiştir. Ayrıca abiyotik ve biyotik strese bitkinin verdiği tepkide miRNA'lar önemli bir yere sahiptir. Tohum çimlenmesi, çiçeklenmenin başlaması, tohum üretimi gibi bitkinin gelişim sürecinde meydana gelen geçişleri düzenleyen moleküler mekanizmalar bir çok araştırmacı tarafından aydınlatılmaya çalışılmıştır. Gelişim dönemlerini düzenleyen oyunculardan birinin de miRNA'lar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca organ oluşumu (yaprak, çiçek oluşumu, kök gelişimi), siRNA mekanizmasının düzenlenmesi, stres (tuzluluk, kuraklık, mekanik, besin açlığı ve fazlalığı, patojen) cevabına yanıt, metabolizma, sinyal iletimi, periyodisite düzenlenmesi ve protein degradasyon prosesi gibi olaylar da miRNA'ların önemli fonksiyonlarındandır (9, 17, 19, 20, 65, 67, 71, 73-75, 85).

2.7. Bitkilerde miRNA'ların Tanımlanması ve İfade Düzeylerinin Ölçülmesi

Moleküler genetik çalışmalarında genel olarak kullanılan geri (reverse) ve ileri (forward) genetik adı verilen iki temel yaklaşım bulunmaktadır. 'Reverse' genetik yaklaşımında dizisi bilinen genlerin işlevleri ve bunların fenotipe yansımaları araştırılır. 'Forward' genetik ise klasik bir yaklaşım olup bilinen fenotip özelliklerinin hangi genler tarafından belirlendiğini araştırır.

miRNA ile ilgili yapılan araştırmaların birçoğu 'reverse' genetiğin iki ana stratejisi kullanılarak yapılmaktadır. Bunlar [1] deneysel (uygulamalı) ve [2] bilgisayar tabanlı (biyoenformatik) yaklaşımlardır. Üçüncü bir yaklaşım olan 'forward genetik' ise nadiren kullanılmaktadır (5).

2.8. Bitkilerde miRNA'ların Biyoenformatik Olarak Bulunması

Bitkilerde ve hayvanlarda yeni miRNA'ların keşfi için kullanılan en güncel metodlar biyoenformatik araçlar kullanılarak uygulanan yöntemlerdir. Biyoenformatik yaklaşım temelde hızlı, etkin, nispeten daha ucuz bir metod olarak miRNA'ların ve onların hedef genlerinin saptanması için kullanılmaktadır. Bu yaklaşımın ardında ki ana teori tek bir genom içerisinde daha önce bulunmuş ve dizisi bilinen miRNA'ların homologlarının aranmasıdır. miRNA'ların dizi ve yapılarındaki korunmuşluk sayesinde daha önce tespit edilen miRNA'ların başka bir canlı genomunda olup olmadığı biyoenformatik yöntemlerle çok hızlı bir şekilde aranabilmektedir. Bugüne kadar bu yöntemle yapılan bir çok çalışma

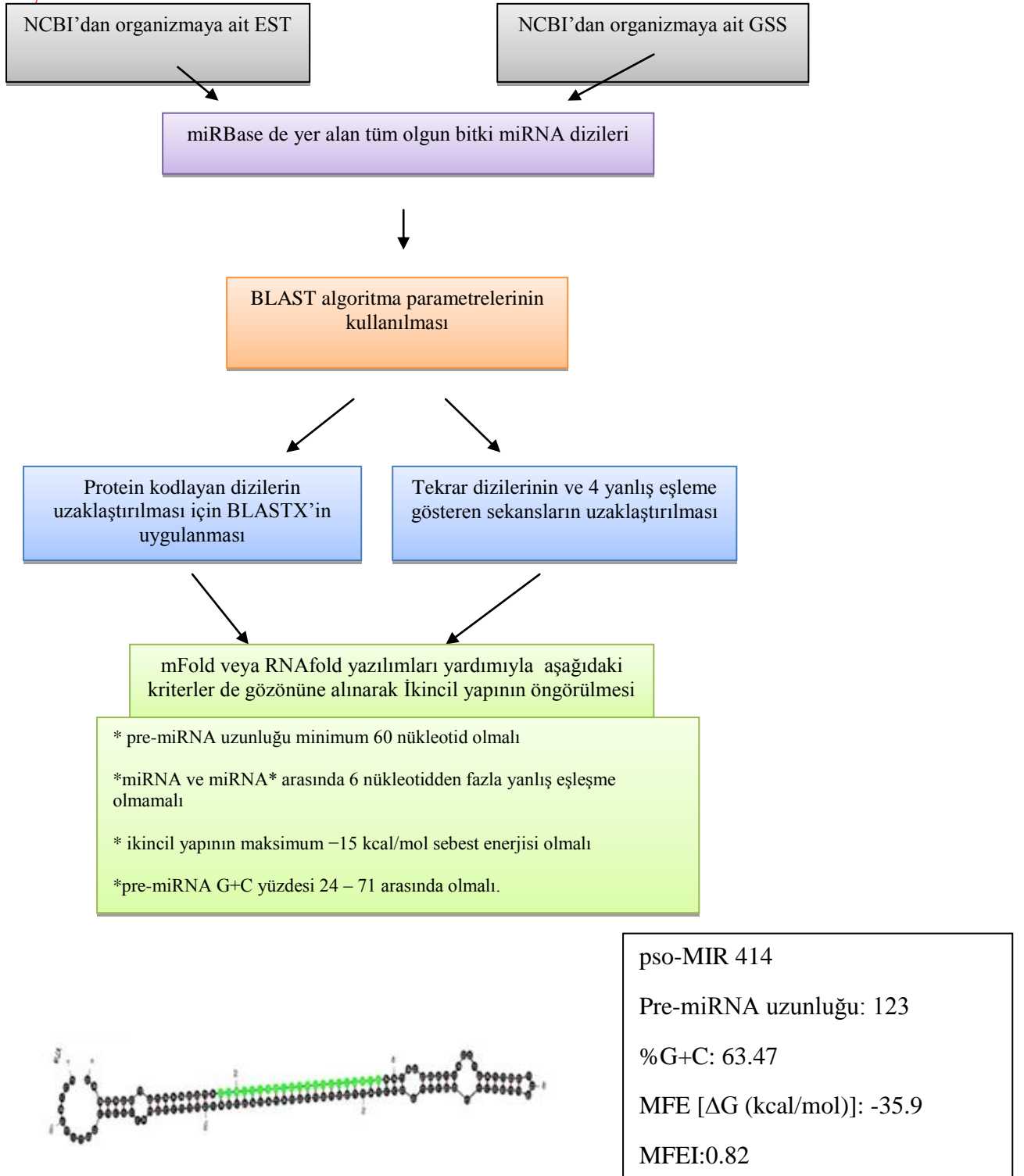
analizi, dizayn edilmesi ve alacağı ikincil yapının tespit edilmesi bu programla mümkündür (www.rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi, 2013) (87).

Olgun miRNA ve pre-miRNA'ların tespiti için bazı kriterlere uygunluk aranmaktadır. Bu kriterler kısaca; [1] olgun miRNA uzunluğu 19-24 nükleotid arasında olmalıdır, [2] minimum katlanma enerji indeksi (MFEI) 0,67 'den büyük ve negative katlanma enerjisi (MFE) maksimum -15 kcal/mol olmalıdır, [3] pre-miRNA üzerindeki olgun miRNA dizisi bir ilmek yapısı oluşturmamalı ve stem loop yapısındaki pre-miRNA'nın kollarında yer almalıdır, [4] pre-miRNA yapısında miRNA ve komplementeri (miRNA*) arasında 6 dan fazla nükleotidde yanlış eşleşme olmamalıdır, [5] pre-miRNA uzunluğu 60 nükleotidden kısa olmamalıdır, [6] pre-miRNA'da G+C yüzdesi 24-71 arasında olmalıdır (85, 88-91). MFEI değeri aşağıda verilen formülle hesaplanmaktadır.

$$\text{MFEI} = [\text{MFE}/\text{pre-miRNA uzunluğu}] * 100 / (\%G+C)$$

micro-HARVESTER, araştırmacı tarafından programa girilen diziler içerisinde miRNA homologlarını bulan bir biyoenformatik araçtır (www.ab.inf.uni-tuebingen.de/software/microHARVESTER, 2013) . Bu metod çok hassas bir yaklaşımla miRNA adaylarını tanımlanır. Bu programda ilk adımda BLAST araması yapılarak ön miRNA adayları belirlenir. Ardından bitki miRNA'larına özgü bir dizi spesifik karekterlere göre tekrar adaylar arasında eleme yapılır (92).

Bir bitkinin mevcut Expressed Sequence Tag (EST) ve Genomic Survey Sequence (GSS) dizileri içerisinde daha önce tanımlanan miRNA dizileri homologlarının bulunması Şekil 2.10.'de (5) şematize edilmiştir. Kısaca istenen bitkiye ait EST verileri GenBank, (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 'dan alınır. Daha önce belirlenmiş olan miRNA dizileri BLAST algoritması da kullanılarak. EST ve /veya GSS içerisinde taranır. miRNA dizisi ile EST den gelen sekanslar arasında 3'den fazla yanlış eşleşme olmamalıdır. Daha sonra tekrar dizileri ile protein kodlayan diziler, ön seçimi yapılan pre-miRNA adayları arasından çıkarılır. Daha önce belirtilen kriterler kullanılarak mFold programında ikinci yapılar öngörülür.



Şekil 2.10. Bir bitkinin EST ve/veya GSS içerisinde pre-miRNA ve olgun miRNA yapılarının bulunması (Unver *et al.* 2009'dan değiştirilerek alınmıştır)

Biyoenformatik yöntemlerle belirlenen miRNA adayları deneysel yöntemlerle doğrulanmalıdır. *Papaver somniferum*'un 20,382 adet EST'si içerisinde 1,328 adet bilinen olgun miRNA'lar aranmış ve 20 adet haşhaşda ifade olan miRNA tespit edilmiştir. Aralarından seçilen bazı miRNA'ları (pso-miR397a, pso-miR414, pso-miR171b, pso-miR169a ve pso-miR167) deneysel olarak teyit etmek için qRT-PCR yöntemi kullanılmış. Biyoenformatik olarak bulunan 20 miRNA'nın ,biyoenformatik olarak 41 adet hedef geni tespit edilmiştir Kök ve yaprak dokularında ifade düzeyleri belirlenen bu miRNA'ların olası hedef genleride qRT-PCR ile teyit edilmiştir. (91).

Asya pamuğu (*Gossypium arboreum* L.) diploid pamuk türlerinden biridir. Aralık 2011, tarihi itibariyle NCBI EST'de 41,781 Asya pamuğu EST si mevcuttur. Bu EST verileri içinden biyoenformatik olarak 49 miRNA ailesine ait 73 miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'lardan bazıları (miR156, miR172 ve miR399) seçilerek qRT-PCR ile deneysel olarakta ispat edilmiştir (93).

Leguminosea familyasında olan soya fasülyesi rizobial bakterilerden olan *Bradyrhizobium japonicu* ile simbiyoz bir ilişki kurar. Böylece bitki köklerindeki nodüllerde azot fiksasyonu gerçekleşir. Soya fasülyesi köklerinden izole edilen RNA ile küçük RNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Yaklaşık 35,000 küçük RNA dizilenmiştir. Ayrıca soya fasülyesi EST'side kullanılarak biyoenformatik olarak 55 miRNA ailesi tespit edilmiştir. Bazı miRNA'ların (miR166, miR168, miR396, miR398) 5'RLM-RACE yöntemiyle hedef genleri deneysel olarak da belirlenmiştir (94).

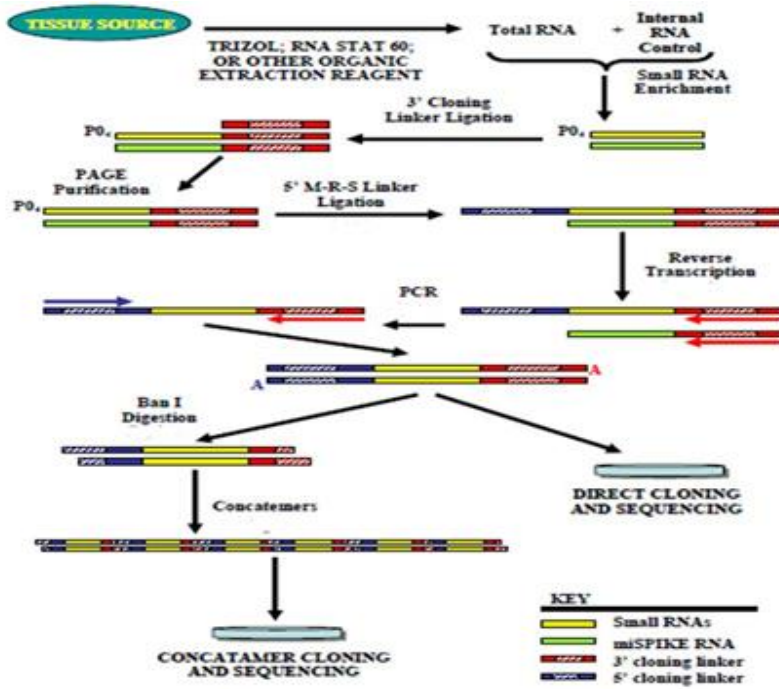
2.9. Bitkilerde miRNA'ların Moleküler Yöntemlerle Deneysel Olarak Bulunması

Bitkilerde deneysel metotlara kıyasla biyoenformatik metotlarla miRNA'ların tanımlanması hem hızlı, hem ucuz hemde kolaydır. Ayrıca biyoenformatik metotla bulunan miRNA miktarı ilgili bitkinin gen bankasında ki EST veya GSS miktarı ile doğru orantılıdır. Her ne kadar deneysel yöntemlerle miRNA bulmak zor ve pahalı olsada, türe ve dokuya özgü miRNA'ların bulunması, bulunan miRNA'ların çeşitli dokulardaki ifade miktarı ve bitkilerin tüm miRNA profillerinin çıkarılması deneysel metodlarla mümkündür.

Deneysel yöntemlerin başlıcaları şunlardır: [1] Doğrudan klonlama ve küçük RNA kütüphanelerinin diziletilmesi, [2] miRNA saptama ve ölçme metodları; (a) End-point PCR, (b) SYBR Green 1 analizi, (c) miRNA TaqMan URL prob deneyi, [3] miRNA mikroarrayi; [4] yüksek performanslı yeni nesil derinlemesine dizileme; [5] ‘forward’ genetik (5, 9)

2.9.1. Küçük RNA’ların Doğrudan Klonlanması

Doğrudan klonlama yapılabilmesi için öncelikle 6 aşamadan oluşan cDNA kütüphanesinin kurulması gerekmektedir. Bu aşamalar kısaca; [1] bitki dokusundan total RNA izolasyonu ve küçük RNA’larca zenginleştirilmesi; [2] küçük RNA’ların akrilamit jelde ayrılarak geri kazanımı; [3] küçük RNA’ların 3’ ve 5’ uçlarına adaptörlerin bağlanması; [4] ‘reverse’ transkripsiyon, RT-PCR ile küçük RNA’ların cDNaya çevrilmesi; [5] elde edilen cDNAların klonlanması ve [6] dizilemedir (Şekil 2.11) (95)



Şekil 2.11. Küçük RNA’ların (sRNA) klonlanması (http://eu.idtdna.com/Pages/docs/user-guides-and-protocols/user-guide-mircat.pdf?sfvrsn=7, 2013)

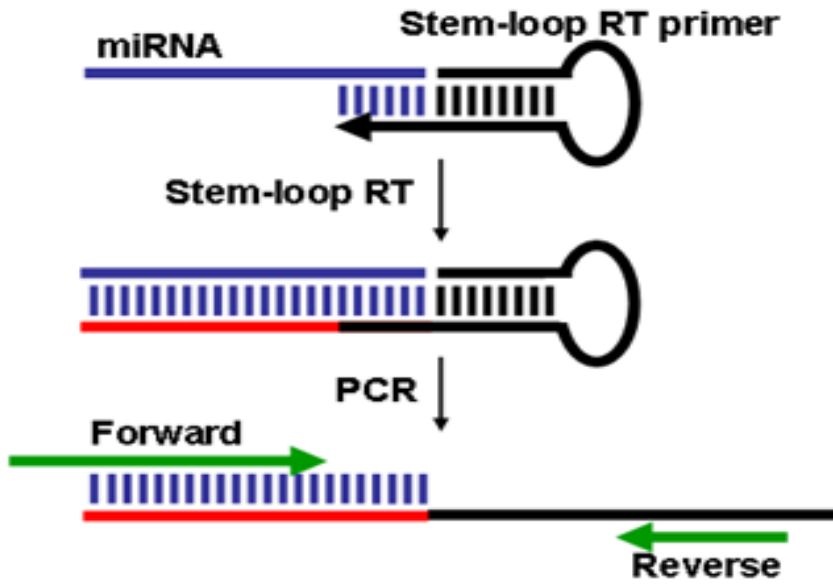
2.9.2. miRNA'larRNA'ların qRT-PCR ile Tanımlanması ve Ölçülmesi

Klasik PCR'a göre bir çok avantajı (hassaslık, spesifiklik, doğruluk, pratik kullanımı) olan qRT-PCR, deneysel olarak miRNA'larRNA'ların saptanıp ölçülebileceği en uygun metottur. (5, 9, 85, 91, 96). Bu yöntemle 25 pg (pikogram) kadar az total RNA kullanarak, etkin ve doğru sonuçlar almak mümkündür. Bu yöntem RNA izolasyonu olmadanda tek hücrelerde miRNA'larRNA'ların hızlı kantifikasyonu içinde kullanılır (9). Ayrıca mikroarray ve derinlemesine dizileme yöntemlerine göre daha ucuzdur. Bütün bu özelliklerin yanında qRT-PCR'ın kullanımında bazı önemli kısıtlamalar mevcuttur. Aslında bu kısıtlamaların bir çoğu miRNA'nın doğal yapısından kaynaklanmaktadır. Bunlar; olgun miRNA'nın kısa (19-24 nt) olması, olgun miRNA'larRNA'lardaki GC miktarındaki heterojenlik miRNA'larRNA'ların erime sıcaklığı arasında büyük farklılıklar oluşturması, olgun miRNA'nın reverse transkripsiyonun poly-A gibi bariz bir özelliği olmamasından dolayı zor olması ve aynı ailede yer alan miRNA'larRNA'ların sadece birkaç baz farklılığa sahip olmalarından kaynaklanır (9, 97, 98).

Spesifik olmayan çift zincirli DNA' nın çoğaltımında 'SYBR Green I' yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA' ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak 'real-time' PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. 'SYBR Green I' en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA' nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6' sını kaybeder (96, 99).

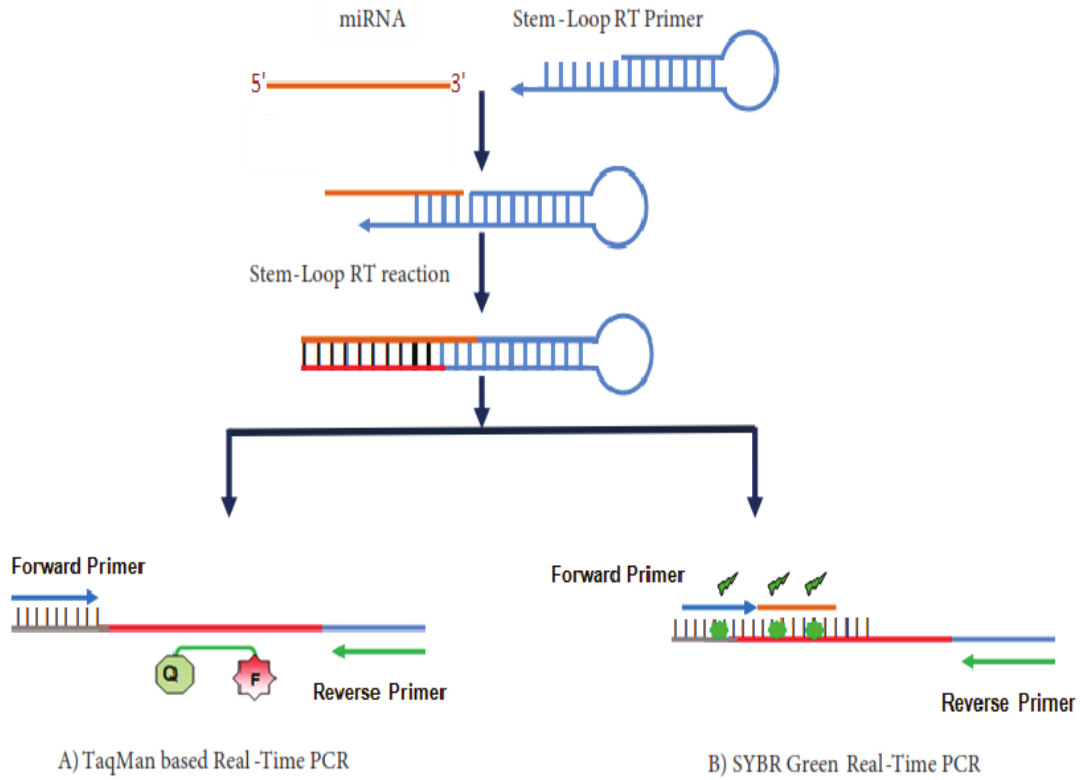
Çoğaltılan DNA' nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA' ların erime eğrisi analizleri ('melting curve', 'dissociation') yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi için qRT-PCR cihazı PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= Tm) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA' nın belirli bir erime sıcaklık (Tm) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimerlerinde) aranan DNA parçasının Tm derecesi arasında farklılıktır. Tm derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindedir (100).

miRNA saptama ve ölçme yöntemlerinden olan 'End Point PCR' yönteminde RNA'dan oluşturulan cDNA, template olarak kullanılır. PCR tamamlandıktan sonra jel elektroforezi yapılarak, bant boylarından beklenen sonuç yakalanmaya çalışılır. Etkinliği düşüktür. Ölçümler diğer yöntemlere göre hassas değildir (9, 96, 101). Şekil 2.12.'da (96) bu yöntem kısaca şematize edilmiştir.



Şekil 2.12. End-point PCR'in şeması (Varkonyi-Gasic *et al.* 2007)

TaqMan URL prob da bir çeşit eş zamanlı PCR (real-time PCR)' dır. Hedefe özgü problar kullanılmaktadır. Burada problarla testin özgüllüğü artırılmıştır. Problardan biri 3' ucundan floresans boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlenmiştir. Problar hedef ampliconlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır (5) (Şekil 2.13.) (9, 96).



Şekil 2.13. TagMan URL Prob analizi (A) . Yeşil renkli daire probun olduğu kısımdır SYBR GREEN analizi (B) (Varkonyi-Gasic *et al.* 2007, Eldem *et al.*2013).

Yakın bir zaman önce Varkonyi-Gasic ve ark.(2007), bitkilerde etkin olarak çalışan bir metod ileri sürmüşlerdir. miRNA saptamak ve ölçmek için uygulanan metod temelde iki aşamadan oluşur. İlk aşamada, bir stem-loop RT primeri dizayn edilir, bu primer ise ölçülmesi amaçlanan miRNA'ya yapışarak onun üzerinden cDNA sentezlenir. İkinci aşamada ise özel olarak miRNA için hazırlanan ileri primeri ve stem-loopa uygun olan universal geri primeri ile özel bir qRT-PCR reaksiyonu yapılır (96) (Şekil 2.12).

2.9.3. miRNA'larRNA'ların Derinleme Dizileme (miRNA-Seq) ile Tanımlanması

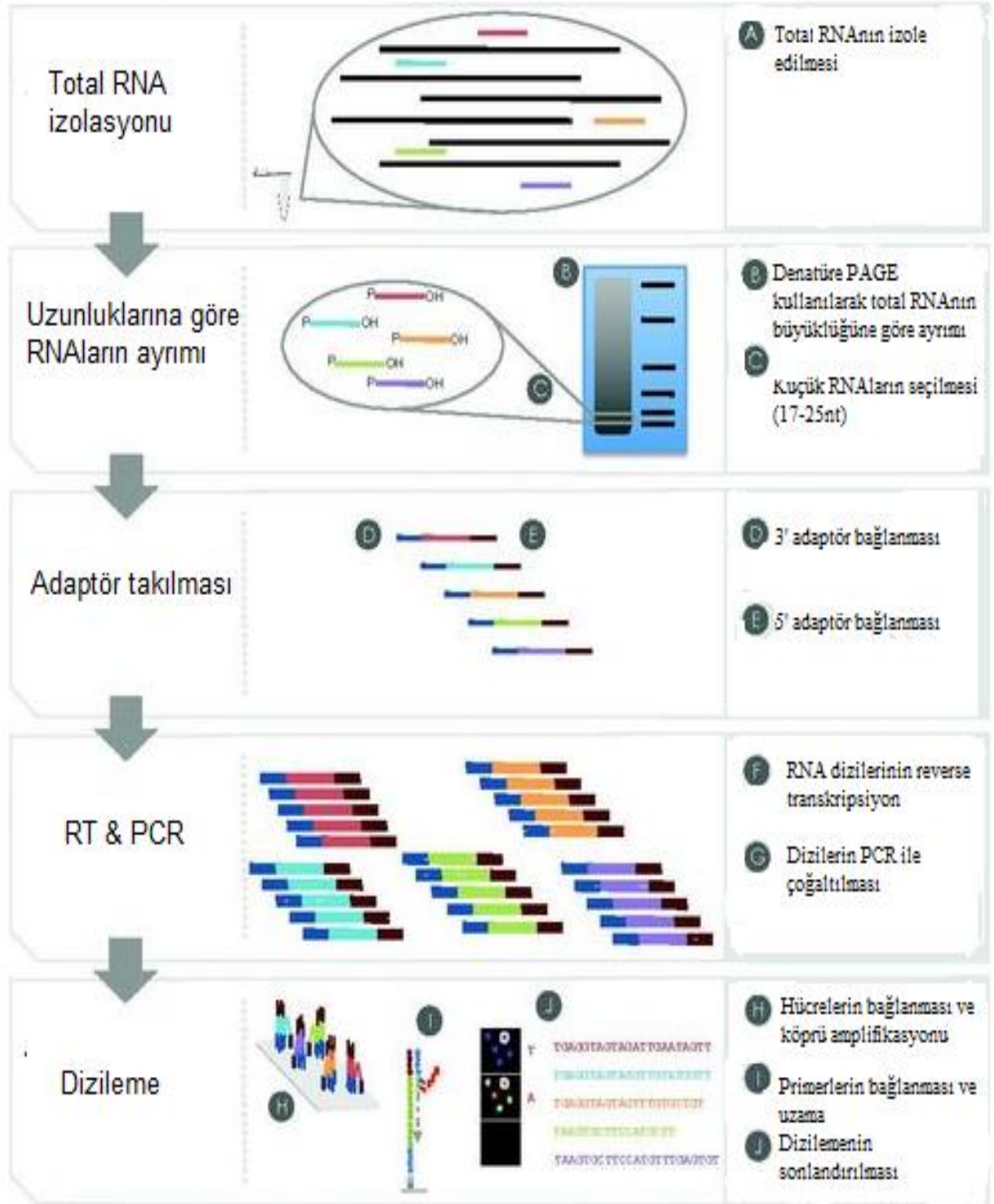
RNA analizinde devrim olacak derinlemesine dizileme tekniği aslında global olarak DNA molekülünün bir çok platform tarafından sekanslanmak istenmesi esnasında bulunan bir tekniktir. İlk genom projeleri başlatıldığında 120 milyon bazlık *D. melanogaster* genomunun tamamlanması birkaç yılda tamamlanmıştır. . Günümüzde ise aynı *D. melanogaster* genomu birkaç günde okunabilmektedir. 'RNA-Seq' adı verilen transkriptom analizinde kullanılan bu teknikle DNA fragmentleri çok hassas ve güvenli bir

şekilde defalarca okunabilir. İlgili transkriptin moleküler hibridizasyon ile yakalanması yerine başlangıç materyali içerisinde olan ilgili transkriptler dizilir. Bu diziler tekrar referans genoma göre haritalanır. Transkriptin kaç defa okunduğu ise araştırmacıya ilgili genin ekspresyon seviyesini gösterir (102, 103).

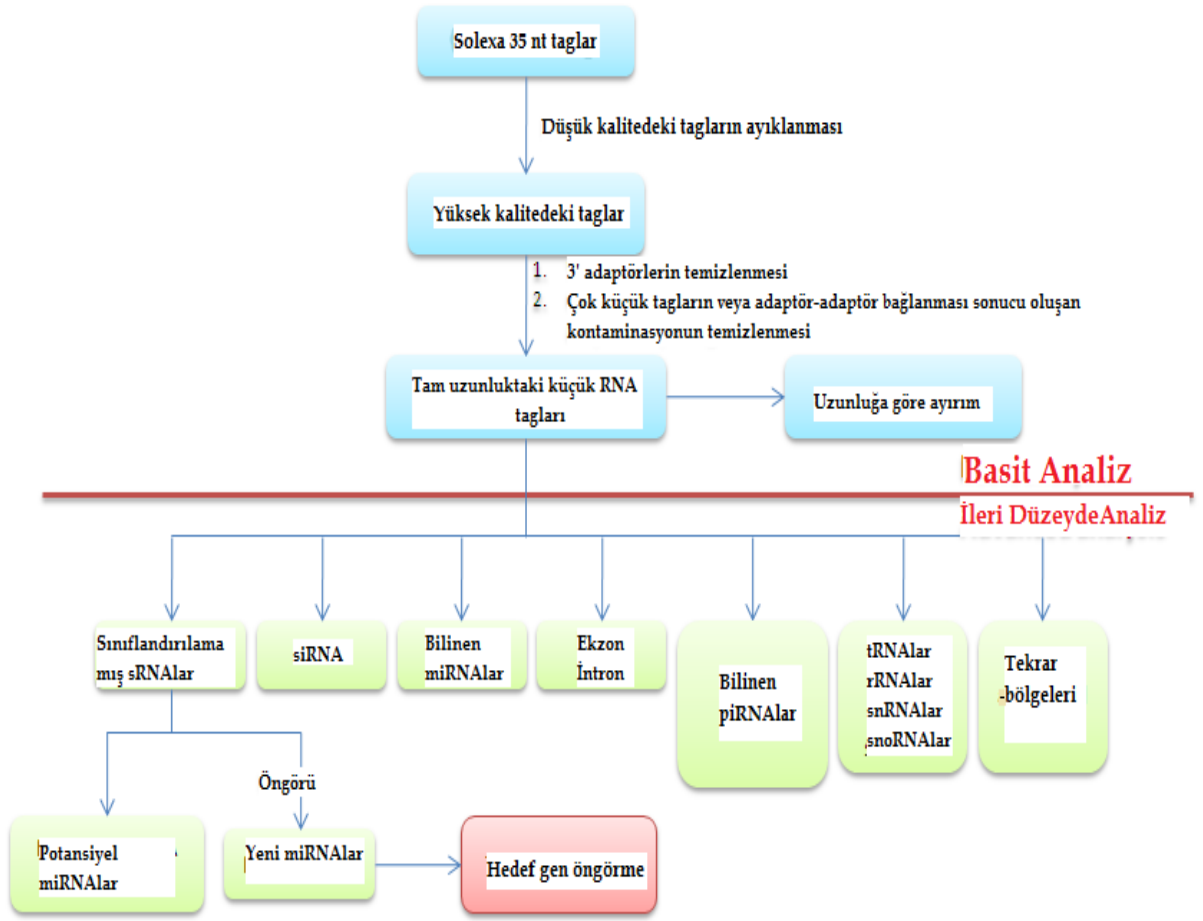
Derinlemesine dizileme sistemi geliştirilmeden önce miRNA'larRNA'lar klonlama ve biyoenformatik yöntemlerle bulunuyor ve miRBase gibi açık veritabanlarında depolanıyordu. Yeni türlere ait miRNA'larRNA'ların bulunması önceden bulunan miRNA'larRNA'ların dizileri ile mümkün oluyordu. Bu durumun tam tersine derinlemesine dizileme ile miRNA'larRNA'ların bulunması için önceden herhangi bir miRNA dizisinin bulunmasına gerek yoktur. miRNA-Seq olarak adlandırılan ve yeni nesil dizileme yöntemlerinden olan bu metodla türe spesifik ve doku spesifik miRNA'larRNA'lar bile kolayca saptanabilmektedir (103).

miRNA-seq çalışması iki aşamada gerçekleştirilir. Öncelikle küçük RNA kütüphaneleri oluşturulur ve dizilemeler yapılarak elde edilen veri üzerinden analiz yapılır. Bu yöntem Şekil 2.14. (104) ve Şekil 2.15.'de (105) kısaca şematize edilmiştir.

miRNA-Seq Kütüphanesinin Hazırlanması



Şekil 2.14. miRNA-seq için küçük RNA kütüphanesinin hazırlanması (<http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Miran-seq-library-prep.pdf>, 2013 değiştirilerek alınmıştır).



Şekil 2.15. Adım adım miRNA'ların derinlemesine dizileme yöntemiyle bulunması (miRNA-seq) (<http://www.genomics.cn/en/index>, 2013)

Küçük RNA kütüphanelerinin kurulması (a) total RNA izolasyonu; (b) jel elektroforez ile küçük RNA'ların büyüklüklerine göre ayrılması; (c) adaptörlerin bağlanması; (d) revers transkripsiyon ve PCR ile çoğaltım basamaklarından oluşur. Oluşturulan kütüphanelerin okumaları tamamlandıktan sonra önce temel düzeyde, sonra ileri düzeyde veri analizi yapılır (Şekil 2.14.) Her RNA parçasına, dizisi önceden bilinen 'tağ'lar takılarak okumalar yapılmıştır. Daha sonra 3' adaptörleri, kontaminantlar ve düşük kalitedeki okumalar temizlenir. Uzunluklarına göre bu okumalar ayrı. Normalde küçük RNA uzunluğu 18-30 nt arasındadır. Uzunluğa göre ayırım küçük RNA kategorilerinin görülmesini sağlar. Mesela mi RNA'lar normalde 21 nt veya 22 nt, siRNA 24 nt ve

piRNA ise 30 nt uzunluğundadır. miRNA adayları ayrıca NCBI ve RFAM gibi veritabanlarında da taranarak, diğer RNA türlerinden ayrıştırılır. Sınıflandırılmayan küçük RNA'lar potansiyel miRNA adaylarıdır. Biyoenformatik yöntemler kullanılarak (mFOLD, <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>, 2013) bu dizilerin ikincil yapıları öngörülmeğe çalışılır (67, 71, 73, 106-108).

Bu analizler yapılırken bir çok program kullanılır. Referans genom ile küçük RNA'ların örtüştürülmesi ise Linux işletim sistemi üzerinden çalışan 'SOAP' adlı program ile yapılmakta ve küçük RNA'ların ekspresyonu ve genomdaki durumları analiz edilmektedir. Küçük RNA'ların bilinen miRNA'lar ile de örtüştürülmesi yapılır. En son 19. versiyonu yayınlanan miRBase veritabanının miRNA'lar kullanılarak bilinen miRNA'lar ayrılır. Türe ait hiçbir miRNA yoksa yakın ilişkili diğer türlerde yer alan miRNA aileleri türün küçük RNA okumaları içerisinde 'tag2miRNA' programı kullanılarak tarama yapılır. Küçük RNA'ların bir tekrar bölgesiyle örtüşüp örtüşmediğinin analizi için 'hg18' veritabanında yer alan tekrarlar kullanılır. Bunun için 'tag2repeat' programı kullanılır. Küçük RNA'lar içerisinde 22-24 nt uzunluğundaki çift iplikli siRNA'ları bulmak için yapısal özelliklerinden (bir iplik diğerinden 3' bölgesinden 2 nt daha uzundur) faydalanılır. Tüm küçük RNA'lar birbirleri ile örtüştürülür. Pre-miRNA yapısının bulunması karakteristik hairpin yapısına göre olmaktadır. Yeni miRNA'ların küçük RNA'lar içerisinde seçilmesi için 'Mireap' programı kullanılır. 'Vienna RNA Structure' programı kullanılarak ikincil yapı, Dicer kesim bölgesi ve sınıflandırılmamış ama genom da yeri bulunmuş pre-miRNA'nın minimum serbest enerjisi gibi kriterler üzerinden yeni miRNA tespit edilir (105).

2.9.4. miRNA'lara Ait İfade Düzeylerinin miRNA Mikroarray ile Karakterizasyonu

DNA mikroarray, naylon membran veya cam gibi katı yüzeylerin üzerine iki boyutlu düzende sıralanıp immobilize olan prob temelli bir yöntemdir. Problar cDNA veya oligonükleotit dizileri şeklinde spotlanmış ve organizma, gen, genetik varyant (mutasyon veya polimorfizm) veya intergenik bölge için özgül olarak dizayn edilmiştir. Katı substrat üzerine çeşitli sayıdaki farklı problar immobilize olurken, problar çoklu kopyalar şeklinde yer almaktadır. DNA mikroarrayler DNA çipleri olarak da adlandırılmaktadır (109).

Yüksek işlem hacimli teknikleri içinde mikroarray çok önemli bir yere sahiptir. Bu teknikle bir genomdaki kodlanmış ve/veya küçük kodlanmayan genlerin ifadelerindeki değişiklikler sadece tek bir çalışma ile belirlenebilmektedir. Diğer nükleik asit hibridizasyon tekniklerine göre bu metod çok çeşitli moleküler biyoloji alanlarında kullanılabilir (9).

Genomik ölçekte genlerin ifade profillerinin tespit edilmesi için sıkça kullanılan mikroarray tekniği sayesinde araştırmacılar transkripsiyonal seviyede meydana gelen değişimleri kolayca belirleyebilmektedirler. Hastalıklarda olduğu gibi karmaşık fizyolojik ve patofizyolojik olaylar mikroarray tekniği kullanılarak daha kolay çözülmektedir (110). İnsan da zekâ geriliğinin genom profili (111), ülseratif kolit (UC) ve Crohn hastalığındaki (CD) doku gen ifade profili (112); *Arabidopsis* (113), pirinç (114), mısır (115), çilek (116) gibi bitkilerin farklı koşullardaki gen ifade profillerinin belirlenmesinde hep bu teknik kullanılmıştır.

Mikroarrayin kullanıldığı bir diğer alan ise DNA polimorfizmi ve bireyler arasında değişiklik gösteren SNP (tekli nükleotid polimorfizmi) nin belirlenmesi ve ölçülmesidir. Mikroarray çipler tek bir baz çiftindeki bir değişikliği saptayabilecek kadar hassas olduklarından genetik mutasyonlar, viral genomlar ve onkogenezdaki varyasyonlar ya da gen polimorfizmi analizinde etkilidir (112). *Neisseria gonorrhoeae*'nın siprofloksasin direncinden sorumlu iki geninde bulunan beş mutasyon, mikroarray teknolojisi ile çalışılmış ve sonuç olarak mikroarraylerin nokta mutasyonlarını yakalama becerisinin patojenlerin karakterizasyonu ve tanısında çok yararlı olduğu açığa çıkmıştır (117). SNP ile genetik bağlantı çalışmaları ile SNP markörlerinin genomik DNA dizileri arasından tespiti için de kullanılırlar (112). Mesela SNP ile ilişkili olan nöroblastoma hastalarındaki klinik sonucun tahmininde mikroarrayler kullanılmıştır (118).

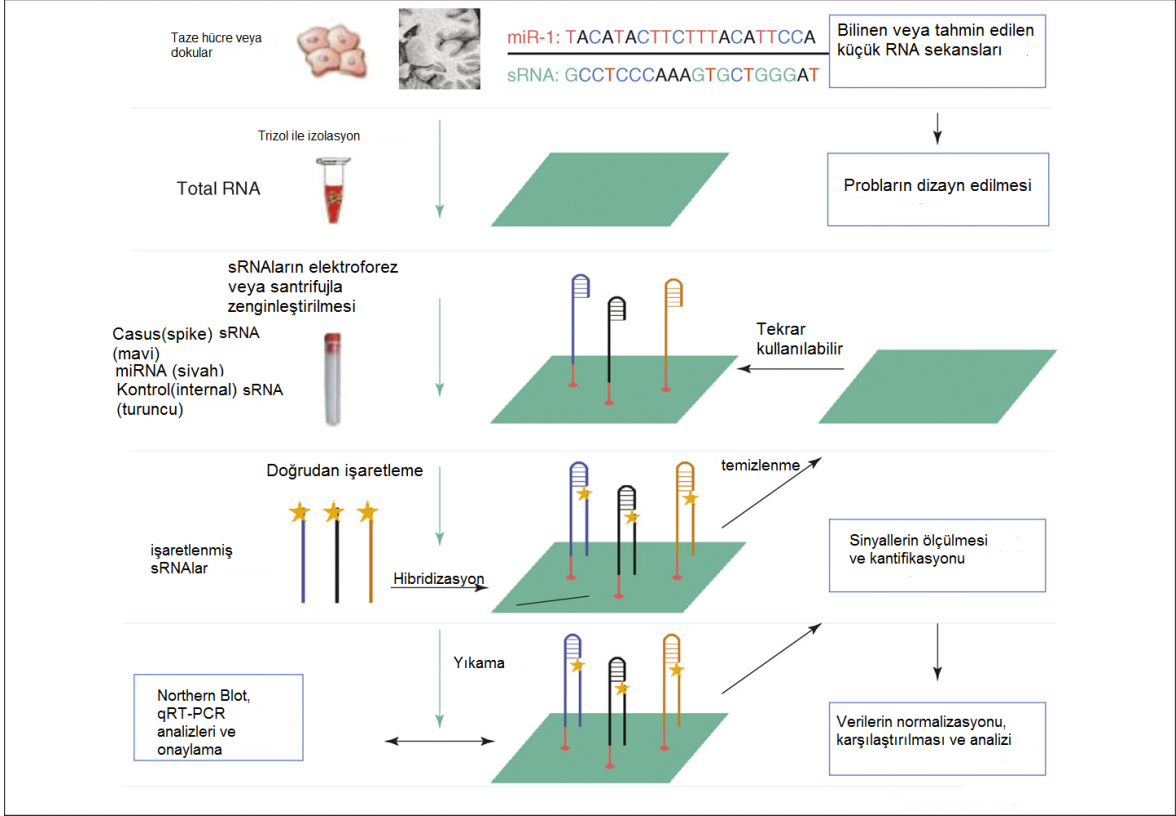
DNA metilasyonu, kromatin modifikasyonları gibi epigenetik modifikasyonların belirlenmesi mikroarraylerle mümkün olmaktadır. Bir çok çalışma memelilerde ve model bitkilerde DNA metilasyonu yapılan promotor bölgeleri genin susturulması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Anormal DNA metilasyonu kanser hücreleri için ayırıcı bir özelliktir ve epigenetik olarak tümör baskılayıcı genlerin susturulması insanda kanser oluşumunun nedenlerindedir (119). Multiple myeloma kanser hücre hatlarında demetilasyon yapıcı bir madde kullanıldığında apoptosiste yer alan 4 adet genin metilasyonla susturulduğu,

maddenin ortamdan uzaklaştırıldığında metilasyon bölgelerinin tamir edildiği ve susturulmuş genlerin tekrar aktif olduğu mikroarray ile belirlenmiştir (120).

Mikroarrayin kullanıldığı diğer önemli bir alanda miRNA ekspresyon profilinin çıkarılmasıdır. (9, 17, 89, 91, 121). miRNA mikroarrayleri diğer mikroarray çeşitleri ile aynı basamakları (cDNA'nın hazırlanması, örneğin işaretlenmesi, arrayin oluşturulması, hibridizasyon, tarama ve data analizi) içermesine rağmen teknik olarak farklılıkları (prob dizaynı, prob immobilizasyon kimyasalı, örnek işaretleme, sinyal algılama kimyasalları) vardır. miRNA mikroarraylerinde prob dizaynı biraz zordur. Çünkü kısa uzunlukta olan miRNA'lar ortamda düşük yoğunlukta olabilmekte ve çok geniş aralıklı erime sıcaklığına sahiptirler. Ayrıca aynı ailede olan çeşitli miRNA'lar benzer nükleotidleri içermektedir (122).

Bitkilerde miRNA-mikroarray teknolojisi çok çeşitli amaçlarla kullanılmıştır. Değişik organlardaki miRNA'ların tespit edilmesi (123, 124), biyotik (bakteri, virüs, nematod) ve abiyotik (kuraklık, soğuk, ağır metaller, mineral eksikliği) stres şartları altında miRNA ifadesinde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi (9, 11, 91) bunlardan bazılarıdır.

miRNA mikroarrayinde prob olarak bilinen ve miRBase veritabanında yer alan tüm olgun miRNA'lar ve pre-miRNA'lar kullanılmaktadır.



Şekil 2.16. miRNA mikroarrayinin akış şeması (Yin *et al.* 2008'den değiştirilerek alınmıştır)

miRNA mikroarrayi uygulamaları 3 önemli aşamadan oluşur (Şekil 2.16.) (89). (a) olgun miRNA'ların taze doku veya hücreden saflaştırılması, küçük RNA'ların ve büyük RNA'ların (>200nt) ayrılması, miRNA'ların zenginleştirilmesi ve işaretleme; (b) çipin dizayn edilmesi (prob dizaynı, kontrol dizaynı, probun spotlanması) ve array ile hibridizasyon; (c) deneysel sonuçların analizi (89) şeklinde sıralanır

Boechea cinsi hem apomiks (döllenme olmadan çekirdekli meyve oluşumu) hemde eşeyssel üreyebilen türler sahiptir. Eşeyssel ve apomiks olarak üreyen *Boechea* türlerinde floral dokudaki korunmuş miRNA profili miRNA-mikroarray tekniği ile belirlenmiştir.. Biyoenformatik olarak bulunan 22 miRNA ailesinin 15 tanesi mikroarray ile de teyit edilmiştir. Her iki türde miR156, miR157 mir160, miR172, miR167, miR170, miR319, miR394, miR395, miR398, miR408 ve miR414'de rastlanmıştır. Apomiks üreme gösteren türde diğer türden farklı olarak miR399'a, eşeyssel üreme gösteren türde diğer türden farklı olarak miR162'e rastlanmıştır. Ayrıca miR156/miR157 tarafından hedeflenen SPL11

geninin apomiktik genotipin ovul gelişim döneminde seksüel genotipe göre çok daha fazla ifade olduğu belirlenmiştir (123).

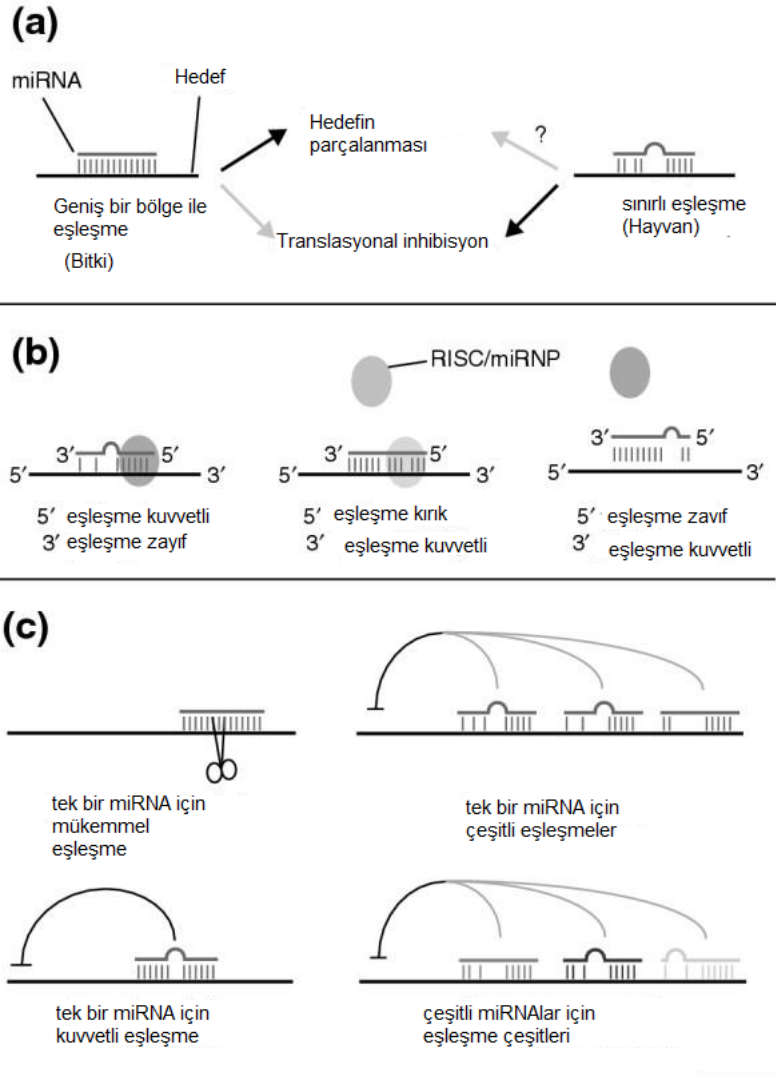
Pamuk terpenoid biyosentezleyen bitkilerden biridir. Salgı dokusunun morfogenezinde etkili olan miRNA'lar He ve ark. (2011) tarafından belirlenmiştir. 30 adet farklı ifade olan miRNA miRNA-mikroarrayi ile tespit edilmiştir. Bu miRNA'lardan 24 tanesi (miR156, miR157, miR166 ve miR390 aileleri) fazla, 6 tanesi ise (miR149, miR169, miR289, miR705, miR1224 ve miR1227 aileleri) düşük seviyede ifade olmuştur (125).

Biyotik stresin domates bitkisinde miRNA profili üzerine etkisi miRNA-mikroarrayi kullanılarak belirlenmiştir. *Botrytis cinerea* önemli bir patojen olup domates bitkisinde gri küf hastalığına neden olmaktadır. *Botrytis* stresine maruz kalan bitkide 2 tane (miR160, miR171) miRNA'nın az, 1 tane (miR169) miRNA'nın fazla ifade olduğu belirlenmiştir (126).

Abiyotik stres faktörlerinden olan tuzluluğun miRNA profiline etkisi *Populus cathayana* (Kavak) (tuzluluğa duyarlı) ve *Salix matsudana* (Çin söğüdü) (yüksek tuzluluğa dirençlilik) bitkileri kullanılarak açığa çıkarılmıştır. Tuz stresi altında *P. cathayana*'da 161 miRNA'nın ve *S. matsudana*'da 32 miRNA'nın ifade seviyesinde değişiklik meydana geldiği belirlenmiştir. Aynı miRNA'nın tuzluluğa dirençli veya duyarlı bitkilerde farklı ifade olduğu açıklanmıştır (127).

2.10. Bitkilerde miRNA'ların Hedeflediği Genlerin Bulunması

MikroRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye (untranslated region-UTR) veya hedef mRNA'nın ORF (açık okuma çerçevesi) bölgesine bağlanmaktadır. Bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya ne şekilde komplementer olduğuna bağlıdır. 3' UTR bölgesine bağlanma kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği sağlamakta ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.17.).(42, 128, 129) ORF bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği göstermekte ve Argonaute2 (AGO2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanmaktadır . Ayrıca, miRNA'ların her birinin birden fazla mRNA ya bağlanıp onların ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla mikroRNA tarafından hedeflenebildiği bilinmektedir (42, 128).



Şekil 2.17. miRNA'ların hedef mRNA'lar ile eşleşme çeşitleri (a) iki çeşit miRNA bağlanma bölgesi; (b) miRNA'nın 5'ucundaki 2-8. nükleotidler eşleşme için çok önemlidir. RISC/miRNP kompleksinin tanınması miRNA'nın 5'ucu ile hedefin oluşturduğu dubleks için çok önemlidir; (c) çeşitli miRNA eşleşme bölgeleri (Pillai 2005, Sun *et al.* 2010, Saydam *et al.* 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

miRNA tarafından hedeflenen ve böylece ifade düzeyleri düzenlenen transkriptler biyoenformatik veya deneysel yöntemlerle bulunabilir (5, 9).

2.10.1. Hedef Genlerin Biyoenformatik Olarak Bulunması

Bitkilerde miRNA'ların hedeflediği genlerin hem biyoenformatik hemde deneysel olarak bulunması için birkaç önemli kriter göz önünde tutulmaktadır: [1] miRNA ve hedef mRNA'nın birbirleriyle eşleştikleri komplementer bölgede 4 den fazla yanlış eşleşme olmaması; [2] komplementer bölgenin 10. ve 11. nükleotidinde yanlış eşleşme olmaması; ve [3] komplementer bölgede ard arda 3 yanlış eşleşme olmamasıdır.

Potansiyel bitki hedef mRNAsını belirlemeye yarayan psRNATarget sık kullanılan bir programdır (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>) (130). Bu veritabanı kullanılırken bilinen olgun miRNA sekansı (5'-3' olarak) yüklenir. Hangi organizmanın mRNA'ları kullanılacaksa ilgili canlı seçilir. Komplementer bölgede istenilen yanlış eşleşme sayısında yine isteğe bağlı olarak seçilir. Program aracılığı ile genin adı, numarası, yanlış eşleşme puanı, yanlış eşleşme sayısı ve hedef komplementer dizisi tespit edilir. Söz konusu program hedef genin dizisi biliniyorsa bu geni hedefleyen miRNA'larını bulunması amacı ile kullanılabilir. (65, 91, 131).

2.10.2. Hedef Genlerin 5' RLM-RACE Yöntemiyle Deneysel Olarak Bulunması

RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends), cDNA uçlarını RNA ligaz vasıtasıyla adaptor takılarak amplifikasyonu olarak isimlendirilen bir metottur. İsteğe göre cDNA'nın 5' veya 3' ucuna RNA ligaz kullanılarak adaptör takılabilir. Bu metotta izole edilen total RNA veya seçilen Poly (A) RNA öncelikle Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP) ile muamele edilir. CIP ile rRNA, tRNA, parçalanmış mRNA ve kontamine genomik DNA'nın 5'ucundaki fosfat grubu uzaklaştırılır Parçalanmamış mRNA'nın 5'ucunda Cap olduğu için CIP'den etkilenmez. Daha sonra RNA Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) ile muamele edilir ve mRNA'nın 5' ucundaki Cap bölgesi çıkartılır. Böylece serbest 5'fosfat geriye kalır. 45 nükleotid uzunluğundaki adaptör RNA ligaz yardımıyla mRNA'nın 5' ucuna takılır ve 'reverse' transkripsiyon ile cDNA oluşturulur. Takılan adaptör üzerinden , gen içine özgü primerlerle biri 'outer' biri 'inner' olmak üzere PCR yapılır ve agaroz jelde yürütülen örneklerden beklenen boydaki bant kesilir. Jelden geri kazanılan ve klonlanan PCR ürünleri dizi analizi ile miRNA hedefi olup olmadığı belirlenir.

5' RLM-RACE yönteminde miRNA hedef transkriptinin belirlenmesi amacıyla modifiye edilerekte kullanılır. Bu metotta total RNA veya poly(A) RNA CIP ve TAP ile muamele edilmez ve doğrudan adaptör takılır. Diğer işlemler 5' RLM-RACE'de yapıldığı gibi takip edilir (65, 131, 132).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

İlk olarak 1990'lı yıllarda adı duyulmaya başlanan miRNA'lar ile ilgili çalışmalar 2000'li yıllarda hız kazanmaya başlamıştır. Birçok bitkinin miRNA profili çıkarılmış, deneysel veya biyoenformatik olarak birçok miRNA ve hedeflendiği genler tespit edilmiştir. Tespit edilen bu genler veya miRNA'lar susturularak veya aşırı ifade ettirilerek bitkide miRNA'ların regülasyonu araştırılmıştır. Ekonomik yönden değerli bitkilerin istenilen ürün yönünden daha zengin olması için miRNA'lar kullanılarak transkriptomda düzenlemeler yapılmaya çalışılmıştır.

Haşhaş bitkisi yüzyıllardır bilinen çok değerli alkaloitleri üreten bir ekonomik bitkidir. Ülkemizde de yaygın olarak üretilen bu bitkinin daha verimli olması için tarımsal yönden birçok çalışma yapılmıştır. Dünyada ise moleküler yöntemler de kullanılarak verimin artırılması sağlanmaya çalışılmıştır.

Haşhaş bitkisinin tüm miRNA profili çıkartılmamıştır. Transkriptom düzeyinde etkili bu miRNA'ların hangi genlerle ilişkili olduğu ve nasıl etkilendiği; alkaloit sentez yolağını regüle eden miRNA'ların varlığı ve nasıl yolağı regüle ettiği; alkaloitlerce verimi yüksek haşhaş bitkilerinin elde edilmesi için miRNA'ların kullanılıp kullanılmayacağı gibi bir çok sorunun cevabını bulabilmek için bu tez çalışması yapılmıştır.

Bu tezin amacı haşhaşa ait miRNA'ların tespiti, tanımlanması ve moleküler ve fizyolojik karakterizasyonunun yapılmasıdır. Bu kapsamda bulunan bu yeni miRNA'ların, haşhaşın diğer dokularındaki ifade düzeyleri ve hedefledikleri genlerin saptanması, haşhaşın farklı doku ve organlarındaki miRNA ifade profillerinin çıkarılması ve alkaloid sentez yolağının regülasyonunda rol oynayan miRNA'ların bulunması da amaçlanmıştır.

Tez kapsamında haşhaşa (*P. somniferum*) ait mikro-RNA'lar deneysel ve biyoenformatik yaklaşımlar kullanılarak bir miRNA profili çıkarılacaktır. Bulunan miRNA'ların haşhaşın farklı dokularındaki ifade düzeyleri araştırılacağı gibi, miRNA'lar tarafından kesilmiş olan hedef genlerin ürünlerinden yola çıkarak farklı doku ve organlarda bu genlerin ifade düzeyleride araştırılacaktır. Bulunan tüm miRNA'ların hedef genleri ayrıca biyoenformatik olarak belirlenecek ve aralarından seçilen bazı hedef gen ve miRNAların qRT-PCR ölçümleri yapılacaktır. Öncelikle tüm haşhaş miRNA profili çıkartılacak ardından tüm miRNA'ların alkaloit sentez mekanizmasının regülasyonu ile ilişkisi araştırılacaktır

.Ayrıca bu tez kapsamında haşhaş bitkisine ait miRNA çalışmaları, RLM RACE deneyleri ve miRNA mikroarrayleri metodolojisi ilk defa uygulanmaktadır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Bitki Materyali

Papaver somniferum L. bitkisinin Ofis-95 çeşidi bu çalışmada kullanılmıştır. Bitkiler Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri deneme alanında ve büyütme kabininde (Binder KBW serisi) fotoperyot 16/8 (ışık/karanlık) ortam nemi %60 ve sıcaklık 24 °C programıyla ayarlı olarak yetiştirilmiştir.

4.2 Total RNA ve Küçük RNA(sRNA)larca Zengin Total RNA İzolasyonu

RNA izole edilirken iki farklı yöntem kullanılmıştır. miRNA mikroarray çip analizinde kullanılan küçük RNA'larca zenginleştirilmiş total RNA'nın izolasyonu için miRVana (Ambion kat no: AM1560) kiti kullanılmıştır. miRNA'ların ve seçilen bazı hedef genlerin dokular arasında ifade düzeylerini qRT-PCR ile ölçmek ve miRNA'ların hedeflediği genleri RLM-RACE metoduyla klonlamak için gerekli total RNA ise Trizol (Invitrogen, CA, USA) kimyasalı kullanılarak izole edilmiştir.

4.2.1. Trizol İle Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

1. Bitki dokuları (kök, gövde, yaprak, kapsül) sıvı azot kullanılarak havanda toz haline getirilmiştir.
2. Ependorf tüplere 1 mL Trizol (100mg doku için 1mL) eklenir. Toz haline getirilmiş numuneler bu tüplere hızlıca aktarılmıştır. Tüpler aşağı-yukarı hızlıca çevirilerek karıştırılmış ve homojen bir karışım elde edilmiştir.
3. Tüpler 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. 1 mL Trizol için 0.2 mL kloroform tüplere ilave edilmiştir. Tüplerin kapakları iyice kapatılmıştır. 15 sn. boyunca elle kuvetlice çalkalanıp, karıştırılmıştır (turuncu-kahverengi bir renk oluşumu gözlenir).
5. 2-3 dk. oda sıcaklığında bekletilip, 17 dk. 4°C'de 15.000 rpm'de tüpler santrifüj edilmiştir.
6. Üstteki sıvı faz yeni tüplere aktarılmıştır. RNA presipitasyonu için 500 µl soğuk izopropil alkolle karıştırılmıştır (1 mL Trizol için 500 µl izopropil alkol kullanılır).

7. 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. 15.000 rpm'de 4°C'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant atılmıştır.
8. Çöken RNA %75'lik etanolle 1 kez yıkanmış ve kullanılan Trizol (1 mL) reaktifi kadar etanol (1 mL) eklenmiştir. Bu aşamada örnekler -80°C'ye kaldırılmıştır.
9. Örnekler vorteks ile karıştırılarak 5 dk. 10.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. RNA çökeltisi dipte toplanmıştır. Üst sıvı atılmış ve çökelti kurumaya bırakılmıştır.
10. 30 µl ddH₂O ile çözülüp, 10 dk 57 °C'de bekletilmiş ve -80 °C'ye kaldırılmıştır. Sonuçlar Nanodrop 2100c spektrofotometresiyle (Thermo) ölçülerek kalite ve miktar tayin edilmiştir (133).

4.2.2. miRVana Kiti Yardımıyla Küçük RNA'larca Zengin Total RNA İzolasyonu

Bitki dokularından küçük RNA'lar zenginleştirilerek yapılan izolasyon protokolü aşağıdaki gibidir;

1. Bitki dokuları (kök, gövde, yaprak ve kapsül) sıvı azot kullanılarak havanda toz haline getirilmiştir.
2. Ependorfa alınan ezilmiş dokuların üzerine 1/10 hacim kadar miRNA Homogenate Additive maddesi eklenmiştir. (Bitki örneği 300µL ise 30µL eklenir). Kuvvetlice karıştırılarak ve 10 dk buzda inkübe edilmiştir.
3. Başta kullanılan bitki örneği ile aynı hacimde asit-fenol: kloroform eklenmiştir. 30-60 sn vortexle iyice karıştırılarak 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. En üst faz dikkatlice yeni tüpe alınmıştır.
4. Yeni tüpe aktarılan hacmin 1/3 kadar %100 etanol eklenmiş ve kuvvetlice karıştırılmıştır.
5. Etanol ve örnek karışımını dikkatlice 'Filter Cartridge' adı verilen filtreli özel koleksiyon tüplerine aktarılmış ve 15 sn 10000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Filtreden geçen sıvı faz uzaklaştırılmıştır.
6. 2/3 hacimde % 100 etanol eklenmiş ve karıştırılmıştır. Karışım yeni 'Filter Cartridge' adı verilen filtreli özel koleksiyon tüplerine aktarılmış ve 15 sn 10000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Filtreden geçen sıvı faz uzaklaştırılmıştır.
7. Yıkama aşamasında filtreli tüplere 700 µL miRNA 'Wash 1' solüsyonu eklenmiştir. 15 sn 10000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Filtreden geçen sıvı faz uzaklaştırılmıştır.

8. 500 µL ‘Wash 2/3’ solüsyonu eklenmiş ve 15sn 10000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Filtreden geçen sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Bu işlem tekrar edilmiştir. Filtre yeni bir tübe yerleştirilmiştir ve 1 dk boş olarak santrifüj yapılmıştır.

9. Daha önceden 95°C’de ısıtılmış olan ‘Elution’ solüsyonundan veya nükleazsız sudan 100 µL alınmıştır ve filtre üzerine dikkatlice ilave edilmiştir. 20-30 sn en yüksek hızda santrifüj edilmiştir (134).

4.3. İzole Edilen RNA’ların Karakterizasyonu

RNA’ların kalitesi ve intakt olması NanoDrop ölçümü ve jel elektroforezi ile teyit edilmiştir. Nanodrop (ND-2100c/Thermo) spektrometresinde 230, 260 ve 280 dalga boylarında ölçüm yapılmıştır. A260/A230 oranının 2,0-2,2 ve A260/A280 oranının 1,8-2,1 arasında olması, saf RNA izole edildiği anlamına gelmektedir. İzole edilen RNA’ların bütünlüğü %2’lik agaroz jele 1-2 µL örnek yüklenerek ve 100 volt enerjiyle 1 saat yürütüldükten sonra görülmüştür. RNA jel elektroforezi için 1X fosfat buffer kullanılmıştır (500 mL ddH₂O içerisine 13,9 g sodyum fosfat monobasic eklenir). İntak RNA’lar Agilent 2100 Bioanalyzer yardımıyla analiz edilmiştir

4.4. miRNA Mikroarrayi Çalışması

Bu çalışma için PMRD (Plant MiRNA Database) (135) veritabanından ve miRBase (4) veritabanının 2010 yılı Eylül ayında kullanımda olan 16. versiyonunda toplam 2018 bitki miRNA’sına ait problemler ve bu problemlerle beraber (100) ayrı kontrol probu taşıyan miRNA çipleri kullanılmıştır. miRNA çip hibridizasyonları miRNA mikroarray servisi olan, LC sciences (136)’da yapılmıştır.

Kök, gövde, yaprak ve genç kapsüller ait olan RNA örnekleri ile toplamda 2018 miRNA probu içeren miRNA çiplerinde tarama yapılmıştır. Bu çiplerde (*Arabidopsis thaliana*, 184 miRNA), soya (*Glycine max*, 78 miRNA), üçgül (*Medicago truncatula*, 30 miRNA), çeltik (*Oryza sativa*, 377 miRNA), mos (*Physcomitrella patens*, 220 miRNA), kavak (*Populus trichocarpa*, 234 miRNA), şeker kamışı (*Saccharum officinarum*, 16 miRNA), darı (*Sorghum bicolor*, 72 miRNA), mısır (*Zea mays*, 98 miRNA), kolza (*Brassica napus*, 46 miRNA), lahana (*Brassica oleracea*, 6 miRNA), hardal (*Brassica rapa*, 17 miRNA), papaya (*Carica papaya*, 1 miRNA), Levant pamuğu (*Gossypium herbaceum*, 1 miRNA),

Mexican pamuğu (*Gossypium hirsutum*, 13 miRNA), *Gossypium raimondii*, 2 miRNA, domates (*Solanum lycopersicum*, 30 miRNA), üzüm (*Vitis vitifera*, 140 miRNA), buğday (*Triticum aestivum*, 32 miRNA), çam (*Pinus taeda*, 37 miRNA), (*Selaginella moellendorffii*, 60), *Vigna unguiculata* (1), *Lotus japonicus* (2), miRNA ve bunların çeşitli kontrol ve tekrarlarıyla birlikte yer almıştır.

Total RNA izolasyonları eşit koşullarda büyütülmüş olan üç farklı haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinden izole edilerek arrayleri yapılmıştır.

Öncelikle çalışma boyunca 3'er farklı bitkiye ait olan kök, gövde, yaprak ve kapsül dokularından alınan RNA'lar aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır.

Grup No.	Örnek İsmi	Grup İsmi
1	poppy leaf-1	leaf (yaprak)
1	poppy leaf-2	Leaf
1	poppy leaf-3	Leaf
2	poppy capsule-1	capsule (kapsül)
2	poppy capsule-2	Capsule
2	poppy capsule-3	Capsule
3	poppy stem-1	stem (gövde)
3	poppy stem-2	Stem
3	poppy stem-3	Stem
4	poppy root-1	root (kök)
4	poppy root-2	Root
4	poppy root-3	Root

Deney 3 biyolojik, 3 teknik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu gruplandırmalar göz önüne alınarak miRNA'ların ifade seviyeleri birbirlerine göreceli olarak ölçülmüş ve sinyaller normalize edilerek ANOVA ve t-Test gibi istatistiksel analizler yapılmıştır.

Her bir arrayde birçok kontrol probu bulunmaktadır. Kontrol problemleri array üretimi, örnek işaretleme ve analiz şartlarının kalitesinin, kontrolü amacıyla kullanılmıştır. Kontrol problemlerinden PUC2PM-20B mükemmel eşleşme; PUC2MM-20B tek bazlık eşleşmeleri

tespit eden problemlerdir. 20-mer lik pozitif RNA kontrol sekansı örnekler işaretlenmeden önce RNA ile karıştırılmıştır. PUC2PM-20B and PUC2MM-20B oranındaki yoğunluğa bakılarak tahlil sınırları değerlendirilmiştir. Normalde ise bu oran 30 dan büyüktür. Dinamik görüş aralığını genişletmek için renkler sözde renklerle görüntülenmiştir. Cy3 ve Cy5 yoğunluğu, maviden yeşile veya sarıya veya kırmızıya gibi renk değişikliklerini görüntüler. Sinyal yoğunluğu 1 den 65,535 e kadar artabilir. Bu artış veya azalış renk değişikliği ile kendini gösterir. Cy3/Cy5 oranında, eğer Cy3 seviyesi Cy5'den fazla ise renk yeşil, Cy3 seviyesi Cy5 seviyesine eşitse renk sarı Cy5 seviyesi Cy3 seviyesinden fazla ise sinyal rengi kırmızı olarak toplanmıştır.

Hibridizasyon sonrası lazer tarayıcı (GenePix 4000B, Molecular Device) ile toplanan görüntü ArrayPro görüntü analiz yazılımı (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) ile dijital ortama aktarılmıştır. Veriler arka plan çıkarılarak ve sinyaller LOWESS (locally weighted regression) filtresi kullanılarak normalize edilmiştir. İki renk kullanılarak yapılan deneylerde, iki setin tespit edilen sinyalleri (logaritmik olarak düzenlenir) birbirine orantılanmış ve t-test ve P-değeri hesaplanmıştır. P-değeri <0,01 olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.5. miRNA Derinlemesine Dizileme

Küçük RNA'larca zengin kök, kapsül, gövde ve yaprak RNA'larından eşit konsantrasyonlarda alınarak bir RNA karışımı hazırlanmıştır. Her üç bitki için bu karışım ayrı ayrı hazırlanmıştır. Bu RNA karışımların 50µL alınarak tüplere konulmuştur. Kuru buz ile muhafazalı olarak BGI, Hong Kong'a dizileme için gönderilmiştir.

1. Her küçük RNA parçasına dizisi önceden bilinen 'taç'lar takılarak okumalar yapılmıştır. Daha sonra 5' adaptörleri, kontaminantlar ve düşük kalitedeki okumalar temizlenmiştir.
2. Uzunluklarına göre okumalar sınıflandırılmıştır. Her okuma için sırasıyla ID (her okunana özel), uzunluk, okunma sayısı ve baz dizilimi belirtilmiştir Normalde küçük RNA uzunluğu 18-30 nt arasındadır. Uzunluğa göre ayırım basit analizle küçük RNA katagorilerinin görülmesine yardım eder.

3. Referans genom ile küçük RNA'ların örtüştürülmesiyle küçük RNA'ların ekspresyonu ve genomdaki durumları analiz edilmiştir..
4. Küçük RNA'ların bilinen miRNA'lar ile örtüştürülmesi yapılmıştır. (Şu anda 19. versiyonu (Ağustos 2012) yayınlanan miRBase veritabanınının 15. versiyonundaki miRNA'lar kullanılmıştır).
5. Küçük RNA'lar bir tekrar bölgesiyle örtüşüp örtüşmediği, degrede olmuş mRNA kaynaklı olup olmadığının anlaşılması ve protein kodlayan bir sekans olup olmadığının anlaşılması için örtüştürmeler yapılmıştır. Bunun için NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gen bankası veritabanında ve RFAM (<http://www.rfam.sanger.ac.uk/>) veritabanında yer alan sekanslar kullanılmıştır.
6. Karakteristik stem loop yapısına göre yeni miRNA'ların küçük RNA'lar içerisinde bulunması için 'Mireap' programı 'Vienna RNA Structure' programı ile kullanılmıştır. Bu program ile yeni miRNA'yı ikincil yapı, Dicer kesim bölgesi ve sınıflandırılmamış ama genom da yeri bulunmuş küçük RNA'nın minimum serbest enerjisi gibi kriterler üzerinden yeni miRNA'yı bulmaktadır.

Bitkiler için aşağıdaki parametreler seçilmiştir. Bitki miRNA'ları için uygulanan parametreler;

1. Minimum miRNA sekans uzunluğu [18 nükleotit]
2. Maksimum miRNA sekans uzunluğu [25 nükleotit]
3. Minimum miRNA referans sekans uzunluğu [20 nükleotit]
4. Maksimum miRNA referans sekans uzunluğu [23 nükleotit]
5. Referans miRNA'nın maksimum kopya sayısı [20]
6. Pre-miRNA'nın maksimum serbest enerjisi ([-18 kcal/mol]
7. MiRNA ve miRNA* arasındaki maksimum ara [300 nükleotit]
8. MiRNA ve miRNA* eşleşmesindeki minimum baz çifti [16]
9. MiRNA ve miRNA* arasındaki maksimum yanlış eşleşme [4 nükleotit]
10. MiRNA/miRNA* dupleksindeki maksimum asimetri [4 nükleotit] olarak belirlenmiştir.

4.6. Morfin Sentezinde Rol Oynayan Genleri Hedefleyen miRNA'ların Bulunması

Derinlemesine dizileme sonucu okunan ve herhangi bir katagoride yer almayan 18-24 nükleotidlik küçük RNA'lar üzerinden çalışma tasarlanmıştır. *P. somniferum* genomu tamamıyla çıkarılmadığı için miRNA olabilecek okumalar sınırlı sayıdaki Papaver EST'si içerisinde bulunamaması ve/veya muhtemel bir pre-miRNA yapısının öngörülememesi nedeniyle yeni (novel) miRNA olarak adlandırılmamaktadır.

psRNATarget (137) veritabanı miRNA'ların hedefledikleri genlerin bulunmasında kullanılmaktadır. Bu veritabanında kullanıcıya farklı seçenek sunulmuştur. İstenilen miRNA dizileri ile istenilen gen dizileri veritabanına yüklenip miRNA hedef gen komplementerliği rahatlıkla tespit edilebilmektedir.

Bu veritabanına kullanıcı tarafından yüklenen küçük RNA'lar ve transkripler sekmesine kurallara uygun şekilde giriş ve yükleme yapılmıştır. Derinlemesine dizilemede okumalarından 2999700 adet 18-24 nt uzunluğundaki küçük RNA'lar ile NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veritabanından dizileri alınan morfin sentez yolağında yer alan *TYDC*, *4-OMT*, *6-OMT*, *7-OMT*, *SAT*, *CNMT* ve *COR* genlerine ait diziler ile örtüştürülmüştür.

Genler ile uygun örtüşmeyi sağlayan küçük RNA'ların derinlemesine dizileme sonuçları içerisinde katagorize olup olmadığı kontrol edilmiştir. Katagorize olmamış küçük RNA'lar Papaver EST'si içerisinde taranmıştır. En fazla 0-3 yanlış eşleşme ile EST'de yer alan küçük RNA'ların, pre-miRNA yapıları RNA mFOLD (87) veritabanı kullanılarak öngörülme çalışılmıştır. Bunun için küçük RNA'nın yer aldığı EST dizisinden yaklaşık 200-250 nt bölge programa aktarılmıştır. Program hesaplama yaparak %GC içeriği, MFE (minimum katlanma enerjisi) değeri, pre miRNA uzunluğu gibi değerleri vermiştir. Bölüm 2.8.'de belirtilen olgun ve pre-miRNA tespit kriterlerine uyan küçük RNA'lar miRNA olarak adlandırılmıştır

4.7. qRT-PCR ile miRNA'ların Saptanması ve Ölçülmesi

Haşhaş bitkisine ait çalışılan tüm miRNA'lar için izole edilen kapsül, yaprak, kök, gövde dokularına ait RNA'lardan cDNAlar elde edilmiş ve ardından miRNA ifade düzeylerini

tespit etmek için Roche Light Cycler-480 II cihazı kullanılarak, qRT-PCR protokolü uygulanmıştır (71, 96, 138).

cDNA elde etmek için Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) enzimi kullanılmıştır. Toplam 7 adet tüp kullanılmıştır.

Kapsül doku RNA'sı (1 numaralı tüp)

Kök doku RNA'sı (2 numaralı tüp)

Gövde doku RNA'sı (3 numaralı tüp)

Yaprak doku RNA'sı (4 numaralı tüp)

noRT (reverse transkriptaz enzimi yok) (5 numaralı tüp)

noRNA (RNA yok) (6 numaralı tüp)

noSSIII (SSIII enzimi yok) (7 numaralı tüp)

Bunlardan son üç tüp kontrol amaçlı kullanılmıştır. Eşit miktarda RNA ile çalışmaya başlamak amacıyla, her bir dokuya ait total RNA'lardan 1000 ng olacak şekilde, ayarlanarak RNA kullanılmıştır.

Her bir tüpe;

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
dNTP (10mM)	0,5 µl
RT primer (1pmol)	1 µl (Çizelge 4.1.)
RNA	değişken
Su (PCR Grade)	değişken

Realttime PCR cihazında tüpler önce 65°C'de 5 dk bekletilmiş ve hemen buza alınmıştır. Tüplere;

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
First Strand Buffer (5X)	4 µl
DTT (0,1M)	1 µl
RNase out (40 u/µl)	0,1 µl
SuperScript III TM (200 u/µl)	0,25 µl

(6. tüpe RNA eklenmemiş, 7. tüpe 0.25 µl SSIII yerine 0.25 µl su eklenmiştir).

Eklenerak tüm tüpler tekrar PCR cihazına konulmuş ve işlem devam ettirilmiştir. cDNA sentez protokolü uygulanmıştır.

Reaksiyon Koşulları;

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü Sayısı</u>
1.	16°C	30 dk	1
2.	30°C	30 sn	
	42°C	30 sn	60
	50°C	1 sn	
3.	10°C	24 sn	1

İşlem bitince tüpler -20°C'ye kaldırılmıştır veya q-RT-PCR protokolüne geçilmiştir.

qRT-PCR için kullanılacak tüm maddeler önceden karıştırılarak 50X'lik bir karışım hazırlanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
SYBR Master (2X)	10 µl
İleri primer (100pmol)	0,1 µl
Universal geri primer (100pmol)	0,1 µl
Su (PCR Grade)	7,8 µl

Kontrol amaçlı örnekler hariç diğer tüplerin herbirinin 1/2, 1/4, 1/8 seyreltmeleri yapılmıştır. Kontrol (5-6-7. tüp) gruplarında ise 1/10 sulandırma yapılmıştır. qRT-PCR plate üzerinde numuneler aşağıdaki gibi yerleştirilmiştir.

		<u>1/2</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>
1. Tüp-KAPSÜL-	A:	000	000	000
2. Tüp-KÖK	B:	000	000	000
3. Tüp-GÖVDE-	C:	000	000	000
4. Tüp-YAPRAK	D:	000	000	000
5. Tüp-No RT-	E:	000	(1/10)	
6. Tüp-No RNA-	F:	000	(1/10)	
7. Tüp-No SSIII-	G:	000	(1/10)	
Negatif Kontrol(NTC)-	H:	00		

Deney planına göre hazırlanan seyreltme tüplerinden 2'şer µl, master mix karışımından 18'er µl konulmuştur. H kuyucuğuna sample yerine su konulmuştur. 'Plate' in üzeri kapatılarak LightCycler480 (Roche) cihazına yerleştirilmiştir.

Reaksiyon Koşulları;

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü Sayısı</u>
1.	95 °C	5 dk.	1
2.	95 °C	5 sn	
	56 °C	10 sn	45
	72 °C	1 sn.	
3.	95 °C	1 sn.	
	40 °C	2 dk	1
	95 °C		devamlı

Çizelge 4.1 qRT-PCR ile saptanmaya çalışılan miRNA'ların primerleri

pso-miRNAs Adları	RT Primerler (5'→3')	İleri Primerler(F) (5'→3')
pso-miR2	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACtccagt	GCGGCGGTTCATCTCTTGCA
pso-miR3	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACtgaaac	GCGGCGGCCTATCCATCCTG
pso-miR5	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACggtgac	GCGGCGGGCTTACTCTCTATC
pso-miR6	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACattcag	GCGGCGGCCCGCCTTGCATC A
pso-miR7	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACatggca	GCGGCGGCCTGGCTCCCTGT
pso-miR11	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACcctcga	GCGGCGGGGAATGTTGTTT G
pso-miR13	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACtcttct	CGGCGGTGATGGAGGAGAAG
pso-miRNA395	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACccccca	CGGCGGCTGAAGTGTGGGG GG
pso-miRNA159	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACtccctt	GCGGCGGTATTGGAGTGAAG GGA
Pso-miRNA164	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACtgcctt	TCGCTTGAGAAGCAGGGCA
t0047847	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACtccaac	CGGCGGCATTGCGAGATTTT
t0013376	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACtccctt	CGGCGGAAAGGAAAACATGG G
t0000199	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACaggacg	CGGCGGTCTTTTTTATGTTA TTT
	Universal Geri Primer (R) (5'→3') GTGCAGGGTCCGAGGT	

4.8. qRT-PCR ile miRNA Hedef Genlerinin İfade Analizi

Haşhaş bitkisinin 4 farklı dokusunda (kapsül, gövde, yaprak, kök) 13 adet miRNA'nın hedef genlerinin ifade düzeyleri ölçülmüştür. qRT-PCR analizleri için Çizelge 4.2.'de verilen hedefler ve primerleri kullanılmıştır. Primerler Blast primer programı kullanılarak tasarlanmıştır (139). Verilerin analizi için 'threshold' (Ct) değeri alınır ve Pfaffl's modeli kullanılır (140). Roche LightCycler 480 cihazı ve SYBR Green I Master Miks kiti (Roche kat. No: 04707516001) kullanılmıştır. qRT-PCR deneyleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Öncelikle her bir örnekteki RNA miktarı 18S rRNA primerleri (X16077.1) kullanılarak normalize edilmiştir.

Bu primerlerin dizileri; 18S rRNA İleri 5'-TTTGACTCAACACGGGGAAA-3' ve 18S rRNA Geri 5'-CAGACAA ATCGCTCCACCAA-3'dir. Hazırlanan karışımdan deney planına göre belirlenen kuyucuklara 18'er µl dağıtılmıştır. 'Plate' in üzeri özel yapıştırma jelatiniyle kapatılıp, q-RT-PCR cihazına yerleştirilmiştir. q-RT-PCR deneyinde

Reaksiyon Koşulları

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü Sayısı</u>
1.	95 °C	5 dk	1
2.	95 °C	10 s	
	55 °C	20 s	41
	72 °C	10 s	
3.	95 °C	5 s	
	55 °C	1 dk	1
	97 °C		devamlı
4.	40°C	30 s	1

Çizelge 4.2. qRT-PCR ile ifade düzeyleri belirlenmeye çalışılan hedeflerin primerleri

Gen ID ve adı	pso-miRNA Adı	İleri Primer (5' >3')	Geri Primer(F) (5' ->3')
TC392432 F-box/Kelch-repeat protein	Pso-miR2	CCTGAGCAGATTGTAGACC	CCAACCGCGAGATGAAGA
NP455428 putative retroelement pol polyprotein	Pso-miR3	AGCCTAGACCTGGTCTGAATG	GGAGAGGGAGTAGGT
TC362196 RSY3 (RASPBERRY 3)	Pso-miR5	GAGGTTCGGCACATGGTT	CCTGAGAGCTTTTTGTGAGG
NP305750 putative auxin response factor	Pso-miR7	GGCAAGATCATTACCGTGGA	CATTGTCGCTGGACTCTTTG
AT2G01210.1 leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	pso-miR11	TCTAGTGCGGTGGGTACAGG	CCTCAGGAGCCAAACAAGG
AT1G52150 HD-ZIP protein ATHB-15	pso-miR11	GCTCAATGAAGGCCTTGCCCGT	GCACGCGAAGCCCTGTTGCA
FJ156103.1 7-OMT 7-O-methyltransferase	Pso-miR13	TGGAACCGTTCAGTAACAGAG	ATATGCCACGGAGCAAACA
AT1G56010 NAC1 No apical meristem (NAM)	Pso-miR164	TCAGCCACGCTCACAGGCT	GTCGGTCAGGAGGCTCTCCG
AT2G32460 MYB101	Pso-miR159	AGGTAACGGCAGGGTGGAA	CAATAGCATGACCCCAACGAG
NR1121 S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC)	Pso-miR535	CATGGCTCTGCTTCTCCAC	GATCTCAGCACCCCTTTGACC
FM164378.1 C. annuum cv. Bardenas mRNA for <i>lipoxygenase</i> (lox gene)	Pso-miR535	GGTGATCCTGCGAATGGTTT	CCTGCGACTAATGGGGTTC
AT5G43780 Sulphate adenylyltransferase, APS4	Pso-miR395	GTTGGTCGCGATCCTGCCG	CGCCAACCCACGCATCTTGTT
FJ624147.1 <i>P.somniferum</i> COR (codeinone reductase)	T0047847	TGATCTTGCTCCCTGCTC	TCAAGCTTACCGGATGGTGT
FJ200354.1 <i>P. somniferum</i> SAT ((7S)-salutaridinol-7-O acetyltransferase)	T0013376	CAACAAGGGTTGAGGTGGTT	TGGTGGGTCCATTTCTTTC
AF025435.1 <i>P. somniferum</i> TYDC (tyrosine/dihydroxy phenylalanine decarboxylase)	T0000199	GCAACCTCCAAGGCTACAAA	TGGCACAGAGAAACAATGGA

4.9. miRNA Hedef Genlerinin Modifiye 5' RLM-RACE ile Saptanması

Modifiye 5' RACE çalışmasında 5' RACE den farklı olarak başta uygulanan ilk iki basamak atlanır (Bölüm 2.3.5.2.'de açıklanmıştır). RNA'lara doğrudan adaptör ligasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada FirstChoice® RLM-RACE Kiti (Part Number AM1700, Invitrogen) kullanılmıştır. Primerler kit protokolünde anlatılan şekliyle tasarlanmıştır (141). Bunun için Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programı kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan tüm primerler EK-8'de belirtilmiştir.

Ligasyon Protokolü;

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
RNA (eşit hacimde tüm doku)	13 µl
5' RACE Adaptör (0.3 µg/µl)	2 µl
RNA ligaz buffer (10X)	2 µl
T4 RNA Ligaz (2,5 U/ µl)	4 µl
Su (PCR Grade)	4 µl

Yavaşça karıştırılır ve 37 °C inkübasyona bırakılmıştır. Bir sonraki aşamaya geçilmeyecekse -20 °C'de saklanmıştır. (pozitif kontrol amaçlı -cDNA oluşturulurken asıl protokol aynen takip edilmiş sadece 1µl konsantrasyonu en düşük olan dokunun RNA'sından ilave edilmiştir).

Reverse Transkripsiyonun gerçekleştirilmesi;

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
Adaptör takılmış örnek	2 µl
dNTP mix (10mM)	4 µl
Random Decamers(50µM)	2 µl
RT Buffer (10X)	2 µl
M-MLV Reverse Transkriptaz	1 µl
Su (PCR Grade)	20 µl

Yavaşça karıştırılır ve 42 °C inkübasyona bırakılır. Bir sonraki aşamaya geçilmeyecekse -20 °C'de saklanmıştır.

5'Outer PCR protokolü;

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
RNA mix	2 µl
5'RACE Outer Primer (10 µM)	1 µl
Gene özgü geri primer(10 µM)	1 µl
MgCl ₂	4 µl
dNTP (10mM)	2 µl

Taq pol. Buffer	5µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0,25µl
Su (PCR Grade)	36,75µl

Reaksiyon Koşulları

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü Sayısı</u>
1.	94 °C	5 dk	1
2.	94 °C	30 sn	
	64 °C	30 sn	8
	72 °C	30 sn	
	94 °C	30 sn	
	56 °C	30 sn	30
	72 °C	30 sn	
3.	72 °C	5dk	1

PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100V ve 100 amp. 20 dk yürütülmüştür.

5'inner PCR protokolü;

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
Outer PCR ürünü	1 µl
PCR Buffer (10X)	5 µl
dNTP mix (10 µM)	4 µl
MgCl ₂	4 µl
Gene özgü geri primer (10 mM)	2 µl
5'RACE Inner Primer (10 mM)	2 µl
Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	0,25 µl
Su (PCR Grade)	31,75 µl

5' inner PCR cihaz protokolü Outer PCR cihaz protokolü ile aynıdır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100V ve 100 amp. 20dk yürütülmüştür.

4.10. Örneklerin Jelden Geri Kazanılması

Jelden istediğimiz boydaki bantı geri kazanmak için Qiagen, Qiaquick Gel Extraction kiti (Kat. No: 28704) kullanılmıştır.

1. İstenilen boydaki bant temiz bir bistüri yardımıyla kesilerek tüpe konulmuştur.
2. Tartılan jelin üzerine 'Buffer QG' den her 1 hacim için örnek için 3 hacim eklenmiştir. 50 °C 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Jel sıvı hale gelinceye kadar, buffer ve jelin bulunduğu ependorf ara ara karıştırılmıştır.

3. 1 hacim isopropanol eklenmiş ve solüsyon karıştırılarak 'QIAquick column' (kolon) içine dökülmüştür. 1 dk 1000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
4. Alttaki sıvı kısım dökülmüş ve üzerine 0.75 mL 'Buffer PE' eklenmiştir. Kolonlar 1 min 10000 rpm'de birden fazla santrifüj edilmiştir.
5. 50 µL 'Buffer EB' kolonlara eklenmiş ve 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek 3dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Geri kazanılan DNA spektrofotometrede ölçülmüş ve ligasyon işlemine geçilmiştir.

4.11. Jelden Geri Kazanılan Örneklerin Vektöre Ligasyonu

Çalışmada vektör olarak pGEMT-Easy (Promega) kullanılmıştır. Ligasyon şu şekilde yapılmıştır:

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
Ligaz tampon çözeltisi (10X)	1,5 µl
pGEM-T vektör (1/5 seyreltik)	1 µl
DNA ligaz enzimi (3U/µl)	0,6 µl
Su (PCR Grade)	6,9 µl

Bağlanma işlemi 4 °C'de bir gece inkübe edilerek yapılmıştır.

4.12. *E.coli* Bakterisine Transformasyon

E. coli DH5a hücrelerinden kompetent hücre hazırlanmıştır.

1. Tek bir bakteri kolonisi 2 ml LB besiyerinde (5 g Tryptone, 2.5 g NaCl, and 2.5 maya ekstresi 500 mL distile suda çözülmüştür). 37°C 250 rpm sallanarak inkübasyona bırakılmıştır.
2. Bir gece boyunca büyüyen bakteriler 30 dk. buzda bekletilmiş ve 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
3. Dibe çöken hücrelerin üzerine 5 ml soğuk 4 mM CaCl konulmuştur. Tekrar 4000 rpm de 5 dk santrifüj yapılmıştır.
4. 2 ml soğuk 4 mM CaCl içinde resüspanse edilmiştir. Son aşama bir kez daha tekrar edilmiştir. Hücreler transformasyon için hazırdır (133).

5. *E.coli* Dh5- α 'kompetent' hücreleri 50 μ l alınmış 2 ml'lik steril tüpe aktarılmış, buzdaki bekletilmiş ve üzerine 5 μ L ligasyon ürünü konulduktan sonra 30 dakika buzdaki inkübe edilmiştir.
6. 42 °C'de 60 saniye sıcaklık şoku uygulanmış, üzerine 150 μ SOC besiyeri konularak 45 dakika 37 °C, 250 rpm'de sallanarak büyütülmüştür.
7. Büyüyen hücreler ampisilin ve X-gal içeren LB agar kültür tabaklarına ekilmiş, 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.
8. Seçilen tek koloniler, steril tüpün içine 500 μ LB (ampisilinli) konulmuş bir gece 37 °C, 250 rpm'de sallanarak büyütülmüştür ve 500 μ % 50 gliserol konularak -80 °C'de stoklanmıştır.
9. Seçilen kolonilerin içinde istenilen DNA parçasının olup olmadığını test etmek için tekrar primerlerle amplifikasyon yapılmıştır (PCR koşulları ilk amplifikasyon ile aynı olacaktır).
10. Bu bantlarda % 1 agaroz jelinde görüntüledikten sonra stoklanan hücreler tekrar 2 ml LB'de (ampisilinli) bir gece 37 °C, 250 rpm'de sallanarak büyütülmüş ve plasmid izolasyonu yapılmıştır (133).

4.13. Seçilen Koloniler İçin Koloni PCR Doğrulaması

Seçilen kolonilerin içinde istediğimiz DNA parçasının olup olmadığını test etmek için M13 primerleriyle amplifikasyon yapılmıştır. Steril bir kürdan ile koloninin üstüne batırılmıştır. Bulaşık kürdan steril distile su içeren tüpün içini sokularak hücreler su içine düşürülmüştür.

Koloni M13 PCR protokolü,

<u>İçerik</u>	<u>Hacim</u>
İçerisinde hücre olan distile su	5 μ l
M13 Forward primer (10 pmol)	1 μ l
M13 Reverse primer(10pmol)	1 μ l
MgCl	1,5 μ l
dNTP(10mM)	0,5 μ l
Taq pol. Buffer (10X)	2,5 μ l
Taq DNA pol (5U/ μ l)	0,25 μ l

Su (PCR Grade)

13,25 µl

Reaksiyon Koşulları,

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü</u>
1.	94 °C	5 dk	1
2.	95 °C	1 dk	
	54 °C	1 dk	35
	72 °C	1 dk	

Bu bantlarda % 1 agaroz jelinde görüntülenmiştir. Sonra, hücreler tekrar 3 ml LB'de (ampisilinli) bir gece 37 °C, 250 rpm'de sallanarak büyütülmüş ve plazmid izolasyonu yapılmıştır (133).

4.14. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit (Cat no: 27104) kullanılmıştır. Üretici firmanın talimatına uyularak plazmit izolasyonu yapılmıştır.

1. İstenilen koloniler alınarak 5 mL LB-ampicilline (1ug/1L) besiyerine ekilmiştir ve 37 °C'de 250 rpm'de sallanarak gece boyu büyütülmüştür.
2. Bakteriler 2 dk 14000 rpm'de santrifüj yapılarak toplanmış ve supernatant atılmıştır. 250 µL 'Buffer P1' (RNaz önceden eklenmiş (100 ug/mL)) pellet üzerine ilave edilmiştir. Vorteks yardımıyla süspansiyon hazırlanmıştır.
3. 250 µL 'Buffer P2' eklenmiş ve 5-10 kez tüp ters yüz edilerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
4. 'Buffer N3' eklenmiş ve yine ters yüz edilerek karıştırılmıştır. 14000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve supernatant spin kolonuna aktarılmıştır. 1 dk 14000 rpm'de santrifüj yapılarak dökülen sıvı kısım atılmıştır.
5. Spin kolonları 750 µL 'Buffer PE' ile yıkanmıştır. Bunun için 1 dk 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Sıvı kısım atılmış ve tekrar yıkama yapılmıştır.
6. Kolonlar yeni bir tüpe yerleştirilmiştir. 30 µL 'Elution Buffer' kolona eklenmiş ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Plazmitler 1 dk. 14000 rpm'de santrifüj yapılarak elde edilmiştir.

4.15. Plazmitlerin Dizi Analizi

Spektrofotometrede ölçümü yapılan plazmidler en az 30 ng ve 30 µL olacak şekilde ayarlanarak REFGEN (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Şirketi)'e (Ankara) gönderilmiştir. Sekans okumaları T7 ve M13 primerleriyle yapılmıştır.

4.16. Derinlemesine Dizileme Sonucu Bulunan miRNA'ların Hedef Genlerinin Biyoformatik Olarak Bulunması

Derinlemesine dizileme sonucu bulunan tüm haşhaş miRNA'larının hedef genleri Dai ve Zhao (2011) tarafından hazırlanan psRNATarget veritabanı (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>) yardımıyla bulunmuştur (137). Bu veritabanında ilgili bitkinin transkript ve/veya genomik kütüphanesi önceden yüklenmiştir. Olgun miRNA dizileri veritabanına yüklenerek hedef bitki veya model bitki belirlenerek önceden yüklenmiş transkript ve/veya genomik kütüphane seçilmiştir. Bu veritabanında ayrıca maksimum olasılık (0-5.0 arası), komplementer bölgenin uzunluğu (hspsize) (15-30 bp arası), hedefe erişebilirlik (hedef bölge eşleşmesinde izin verilen maksimum enerji, UPE) (0-100 arası, düşük tercih edilir), hedefe erişebilirlik analizi için hedef bölgenin yan sınır uzunluğu (5' ucundan 17bp / 3' ucundan 13 bp) ve translasyonel inhibisyon için komplementer bölgenin merkezindeki yanlış eşleşme aralığı (9-11 nt) gibi kullanıcı tarafından seçilen parametreler bulunmaktadır. Maksimum olasılık parametresi 3.0 olarak seçilmiştir. Çünkü bitkilerde hedef ile miRNA arasında 3 den fazla yanlış eşleşme olmaması gerekmektedir (131). Komplementer bölge uzunluğu minimum 20 bp olarak seçilmiştir. Çünkü 20 bp'den daha kısa miRNA'lar sağlıklı bir biçimde analiz edilememektedir. Diğer parametreler de herhangi bir değişiklik yapılmamıştır.

4.17. Biyoformatik Olarak Bulunan miRNA Hedef Genlerinin GO Analizi

Derinlemesine dizileme ve miRNA mikroarrayinde tespit edilen tüm miRNA'ların hedef genleri psRNATarget programı ile belirlenmiştir. Genlerin diğer genlerle ilişkisi; biyolojik proseslerde ve hücrenin bileşiminde yer alıp almadığı, moleküler fonksiyonu, herhangi bir yolakla ilişkisi Blast2GO (<http://www.blast2go.com/b2glaunch/start-blast2go>) programı yardımıyla kolayca tespit edilebilir (142). Bu program Java programı (www.java.com.tr) ile çalışır. Gen dizileri programa yüklenmiştir. İlk adımda BLAST yapılmıştır. Böylece gen

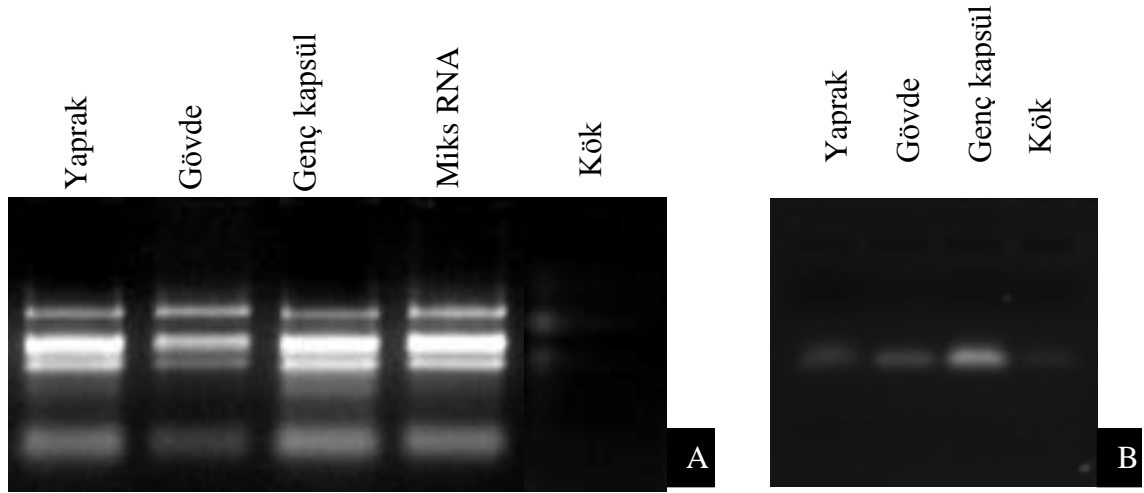
ile ilgili güncel bilgiler NCBI gibi veritabanlarından toplanmıştır. Bu işlem bittikten sonra GO (gen ontolojisi) yapılmıştır. Genin doğrudan veya dolaylı ilişkili olduğu tüm biyolojik ve moleküler prosesler belirlenmiştir. Üçüncü adımda KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) yapılmıştır. KEGG genin herhangi bir yolakda yer alıp almadığı alırsa bu yolaktaki işlevi, hangi reaksiyonlarda yer aldığı yolak haritasıyla beraber gösterilmiştir.

KEGG sistem bilgisi (Pathway, Brite, Module, Disease, Drug, Environ), genomik bilgi (Orthology, Genome, Genes, SSDB) ve kimyasal bilgi (Compound, Glycan, Reaction, Rpair, Rclass, Enzyme) olmak üzere 3 katagori altında yer alan 16 veritabanının birleşimiyle oluşmuştur. 2003 yılından önce sistem bilgisi katagorisi altında yer alan KEGG Pathway veritabanında enzim genleri EC ile başlayan bir numaraya sahipti. Fakat günümüzde hiyerarşik bir isimlendirilmenin temel aldığı KO ile başlayan sınıflandırılma kullanılmaktadır. Ayrıca bu enzim genlerinin biyolojik yolların neresinde rol aldığı ve ilgili enzimin katalizlediği reaksiyonun kimyasal formülasyonu da açıkça belirtilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonlarında iki farklı yaklaşım kullanılmıştır. İlk olarak miRNA mikroarray analizi yapmak için miRVana ile küçük RNA'ları zenginleştirilmiş RNA izolasyonu yapılmıştır (Şekil 5.1.b). Uygulanan ikinci yaklaşım ile tespit edilmiş olan miRNA'ları çoğaltmak ifade seviyelerini ölçmek (qRT-PCR ile) ve miRNA'ların hedeflediği genleri klonlamak (RLM-RACE ile) için total RNA izolasyonları Trizol, (Invitrogen) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 5.1.a).



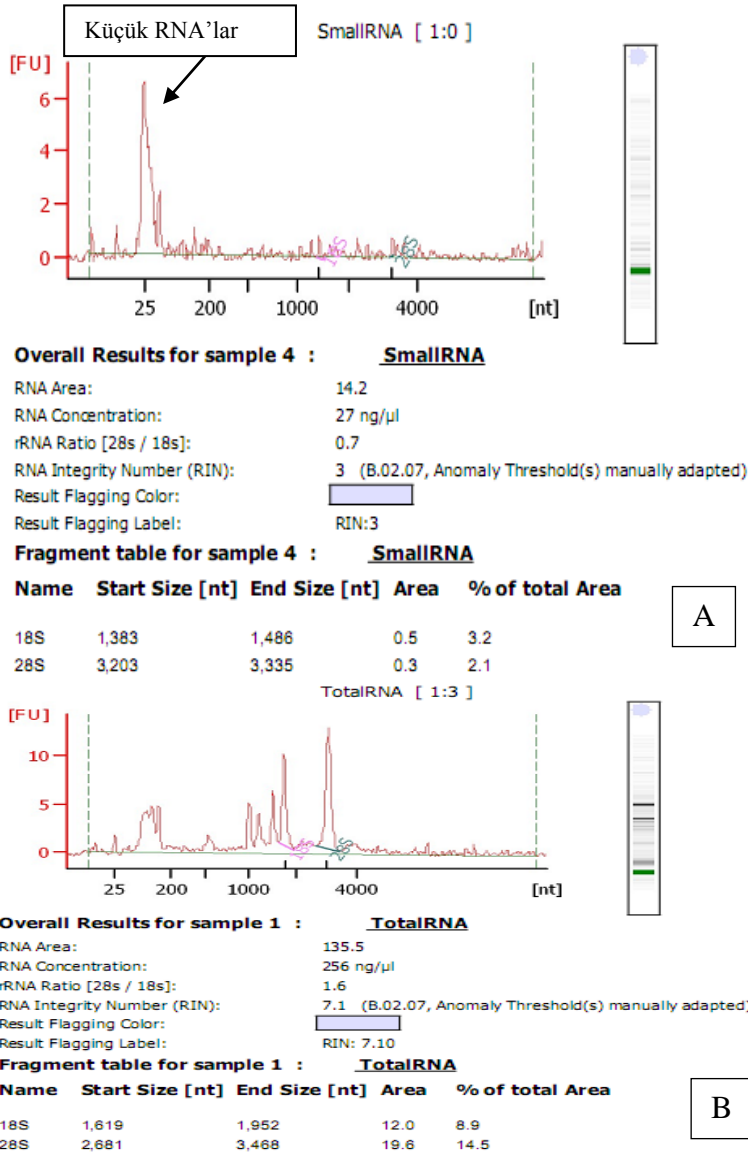
Şekil 5.1. RNA agaroz jel (%2) görüntüleri. A) Trizol yöntemiyle izole edilen total RNA izolasyon sonuçları. Miks RNA kök, gövde, yaprak ve genç kapsül RNA'larının eşit miktarda karışımıyla elde edilmiştir. B) miRVana izolasyonu ile elde edilen küçük RNA'ları yoğunlaştırılmış izolasyon sonuçları.

İzole edilen RNA'ların toplam kalite ve miktar tayinleri yapılarak sonuçlar. Şekil 5.1. ve Çizelge 5.1'de verilmiştir. Ayrıca Şekil 5.1.'de ki total RNA örneklerinde 4 adet bant (25s rRNA, 23s rRNA, 18s rRNA ve 16s rRNA) görülüp, intak total RNA'lar izole edilmiştir.

Çizelge 5.1. İzole edilen RNA'ların kalite ve konsantrasyon tayinleri

		Konsantrasyon (ng/μl)	Toplam volüm (μl)	Toplam miktar (μg)	OD260/ OD280	OD260/ OD230
miRVana küçük RNA izolasyonu	Kök	38	50	1.9	1.9	1.4
	Gövde	40	50	2.0	2.0	1.6
	Genç Kapsül	45	50	2.2	1.7	1.3
	Yaprak	45	50	2.2	1.8	1.6
	Miks	27	28	0.756	1.9	1.5
Trizol Toal RNA izolasyonu	Kök	258	50	12.9	2.1	2.2
	Gövde	700	50	3.5	2.0	2.0
	Genç Kapsül	1660	50	8.3	1.9	2.1
	Yaprak	250	50	12.5	1.9	1.9
	Miks	1024	18	18.4	2.1	1.9

Ayrıca Solexa derinlemesine sekanslama öncesi Biyoanalyzer Agilent 2100 ile RNA analizleri yapılarak dizileme için izole edilen RNA'ların yeterli kalitede olduğu teyid edilmiştir (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. Bioanalyzer 2100 agilent cihazı yardımıyla miRNA'lar için yapılan ayrıntılı analiz raporu. A) miRVana izolasyonu ile yapılan küçük RNA izolasyonu. B) Trizol ile izole edilen total RNA sonuçları

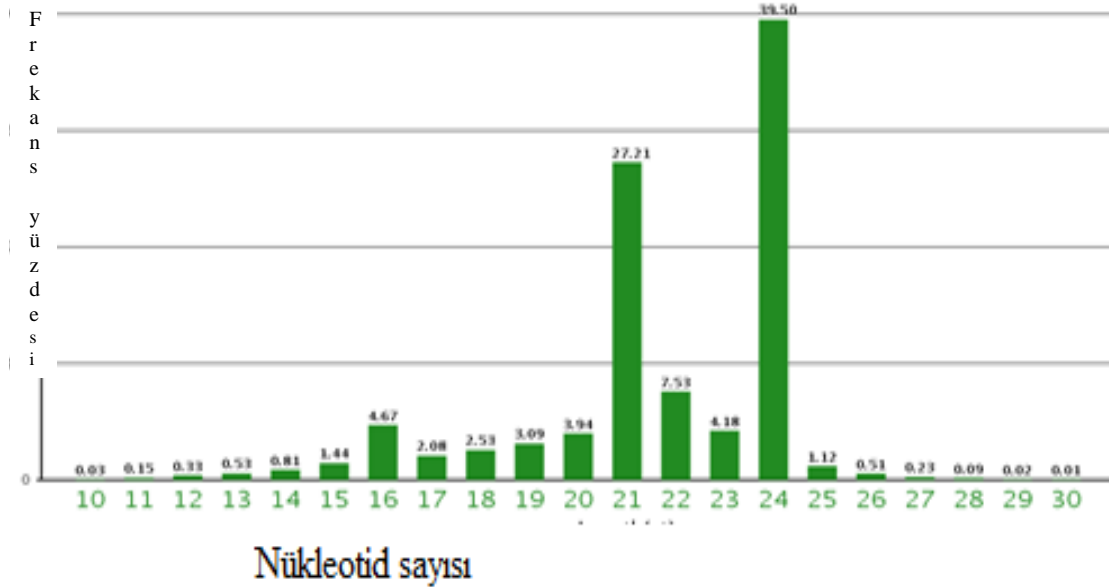
5.2. Derinlemesine Dizileme Çalışması

Derinlemesine dizileme ile toplam okunan baz sayısı 11.999.328' dir ve bunun 10.510.914 (%89,21)'i temiz okumadır (adaptörler temizlendikten sonra). Benzersiz küçük RNA dizisi okuması (unique sRNA reads) 2.999.700 olarak saptanmıştır. Bu küçük RNA okumalarının 488.373 dizi okuması yani % 4,65 lik bölümü miRNA benzeri dizi olarak bulunmuştur. Geri kalan RNA okumaları ise 150.795 tRNA, 289.634 rRNA, 2721 snRNA, 1.345 snoRNA, 1.839.895 siRNA, 31.158 ekzon-sens RNA, 1.257 ekzon-antisens RNA, 464 intron-sens RNA, 495 intron anti-sens RNA olarak bulunmuştur (Çizelge 5.2.).

Çizelge 5.2. Haşhaşa ait küçük RNA dizi okumalarının kategorilere göre dağılımı.

Kategori	Benzersiz sRNA	%	Toplam sRNA	%
Toplam	2,999,700	100%	10510914	100%
Ekzon_antisens	360	0.01%	1257	0.01%
Ekzon_sense	1395	0.05%	31158	0.30%
İntron_antisens	220	0.01%	495	0.00%
İntron_sens	116	0.00%	464	0.00%
miRNA	12550	0.42%	488373	4.65%
rRNA	20210	0.67%	289634	2.76%
Tekrar	5280	0.18%	93094	0.89%
siRNA	77732	2.59%	1839895	17.50%
snRNA	796	0.03%	2721	0.03%
snoRNA	426	0.01%	1345	0.01%
tRNA	7158	0.24%	150793	1.43%
Belirsiz	2873457	95.79%	7611685	72.42%

Solexa İllumina teknolojisi yardımıyla toplam 12.550 haşhaş miRNAsı saptanmış olup bu miRNA'ların çoğunluğunun (%39.5) 24 nükleotid boyunda olduğu tesbit edilmiştir. Haşhaş miRNA'larının boyutlarına göre dağılımı Şekil 5.3' de verilmiştir.



Şekil 5.3. Haşhaş olgun miRNA'larının uzunluklarının dağılımı. miRNA'ların büyük çoğunluğunun 24 nükleotid ve 21 nükleotid uzunluğunda olduğu saptanmıştır.

Derinlemesine dizileme sonucu bulunan miRNA'lar, miRBase veritabanında yer alan ve önceden bulunarak, doğruluğu ispatlanmış miRNA'lar ile örtüştürülmüştür. Sonuçta miRNA'larımız, 124 miRNA ailesi olarak kategorize edilmiştir. Bu miRNA ailelerinin

olgun miRNA sekansları EK-1’de verilmiştir.

Çizelge 5.3. Derinlemesine dizileme sonucu haşhaşa belirlenen miRNA aileleri

miRNA Ailesi	Okuma Sayısı
pso-miR535	112835
pso-miR156	92129
pso-miR166	82486
pso-miR167	34560
pso-miR168	29380
pso-miR157	17899
pso-miR172	10767
pso-miR164	6218
pso-miR2911	3800
pso-miR159	3757
pso-miR408	2849
pso-miR780	2572
pso-miR2916	1654
pso-miR2108	1592
pso-miR5225	1473
pso-miR6027	1113
pso-miR4351	1011
pso-miR319	972
pso-miR396	942
pso-miR1439	940
pso-miR1037	854
pso-miR390	792
pso-miR2673	775
pso-miR1851	712
pso-miR1089	706
pso-miR1310	596
pso-miR5558	469
pso-miR171	431
pso-miR530	398
pso-miR2628	354

Çizelge 5.3. devam	
pso-miR827	314
pso-miR5205	281
pso-miR1514	265
pso-miR894	258
pso-miR160	251
pso-miR1511	208
pso-miR1507	203
pso-miR395	176
pso-miR4233	176
pso-miR1850	157
pso-miR472	154
pso-miR1023	152
pso-miR165	141
pso-miR1863	139
pso-miR845	119
pso-miR393	115
pso-miR1432	114
pso-miR2948	113
pso-miR1044	111
pso-miR1312	98
pso-miR823	93
pso-miR2867	90
pso-miR1114	87
pso-miR1051	82
pso-miR397	82
pso-miR2099	79
pso-miR1852	79
pso-miR2111	78
pso-miR2643	76
pso-miR854	69
pso-miR398	68
pso-miR950	67
pso-miR1847	65
pso-miR1534	60
pso-miR1106	57

Çizelge 5.3. devam

pso-miR901	56
pso-miR4393	53
pso-miR6466	53
pso-miR844	50
pso-miR835	48
pso-miR2119	48
pso-miR1533	47
pso-miR845	47
pso-miR2055	44
pso-miR5565	44
pso-miR829	43
pso-miR1153	39
pso-miR169	39
pso-miR394	37
pso-miR1061	37
pso-miR528	33
pso-miR1862	34
pso-miR1223	31
Pso-miR1146	29
pso-miR5658	29
pso-miR1028	24
pso-miR1510	20
pso-miR1152	19
pso-miR2931	19
pso-miR1514	18
pso-miR399	15
pso-miR1881	15
pso-miR158	14
pso-miR860	14
pso-miR1150	14
pso-miR5181	11
pso-miR855	11
pso-miR2092	10
pso-miR2411	10
pso-miR2615	9

Çizelge 5.3. devam	
pso-miR1850	9
pso-miR1040	8
pso-miR1508	8
pso-miR2091	7
pso-miR2636	6
pso-miR2634	5
pso-miR161	4
pso-miR1314	4
pso-miR1867	4
pso-miR1433	4
pso-miR2097	4
pso-miR473	4
pso-miR1080	4
pso-miR912	3
pso-miR1217	3
pso-miR2275	2
pso-miR2936	2
pso-miR6434	2
pso-miR415	2
pso-miR1070	2
pso-miR162	2
pso-miR426	2
pso-miR1154	1
pso-miR820	1

Derinlemesine dizileme sonucu 124 miRNA ailesi saptanmıştır. Bunlardan 27 tanesi korunmuş 97 tanesi ise korunmamış miRNA aileleri olarak sınıflandırılmıştır.

Korunmuş miRNA aileleri; miR156, miR159/319, miR160, miR166, miR171, miR408, miR390/391, miR395, miR396, miR397, miR398, miR162, miR164, miR167, miR168, miR169, miR172, miR393, miR394, miR399, miR827, miR2111, miR472, miR2275,

miR528, miR530 ve miR535 dir. Bu korunmuş miRNA'ların bazılarının pre-miRNA dizileri EK-2'de verilmiştir.

5.3. Morfin Sentezinde Rol Oynayan Genleri Hedefleyen miRNA'lar

Yapılan analiz sonucu *7-OMT* genin 15, *4-OMT* genin 14, *6-OMT* genin 5, *SAT* genin 8, *COR* genin 3, *CNMT* genin 15 ve *TYDC* genin 47 tane küçük RNA ile komplementer olduğu belirlenmiştir (EK-3). Bu küçük RNA'lardan 3 tanesi Papaver EST'si ile örtüşmüştür (EK-3). Bu 3 küçük RNAdan sadece *7-OMT* genini hedefleyen 1 küçük RNA (t0071347)'nin pre-miRNA yapısı öngürülebilmiş (EK-3, Şekil 5.4.) ve MFEI değeri hesaplanmıştır ve yeni haşhaş miRNAsı olarak pso-miR13 olarak adlandırılmıştır (Çizelge 5.4.). Diğer 2 küçük RNA (1 adet (t0013376) *SAT*, 1 adet (t0000199) *TYDC* ve *COR* geniyle komplementer 1 küçük RNA (t0047847)'nin haşhaş bitkisinde farklı dokulardaki ifade düzeyleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. Sonuçlar 'Bölüm 5.7.' de verilmiştir.

5.4. Haşhaşta Derinlemesine Dizileme Sonucu Bulunan Yeni miRNA'lar

Tüm dokulara (kök, gövde, yaprak ve kapsül) ait RNA'ların eşit miktarda birleştirilmesi sonucu küçük RNA kütüphaneleri oluşturulmuş ve okumalar yapılmıştır. Sonuçta haşhaş bitkisine ait 7 adet yeni miRNA tespit edilmiştir (Çizelge 5.4.). Yeni olgun miRNA'lar 19-22 nükleotit uzunluğundadır. Bu miRNA'ların pre-miRNA uzunlukları 88-214 nükleotid arasında olup MFEI değerleri ise 0,72-1,23 arasındadır.

Çizelge 5.4 Derinlemesine dizileme sonucu bulunan yeni miRNA'lar

miRNA adı	Sekansı (5'-3')	OU	PU	MFEI	GC %	ΔG	Okuma	Homolog miRNA
pso-miR2	UUCCAUCUCUUGCACACU GGA	21	88	1,04	53,4	- 49,30	29	vvi-miR2950
pso-miR3.1	CGCUAUCCAUCCUGAGUU UCA	21	115	1,08	52,17	- 65,10	10	aly-miR390a- 3p
pso-miR3.2			123	1,23	39,02	- 57,80		
pso-miR3.3			123	1,08	39,02	- 52,10		
pso-miR4.1	CCCGCCUUGCAUCAACUG AAU	21	214	0,72	48,59	- 75,80	547	aly-miR168- 3p
pso-miR4.2			193	0,75	44,5	- 62,50		
pso-miR5	GCUUACUCUCUAUCUGUC ACC	20	111	1,22	45,04	- 61,30	26	aly-miR156e- 3p
pso-miR7.1	GCCUGGCUCCUGUAUGC CAU	21	98	1,14	53,06	- 59,30	26	csi-miR160
pso-miR7.2			101	0,84	54,45	- 46,40		
pso-miR7.3			101	1,023	46,53	- 48,10		
pso-miR11	GGAAUGUUGUUUGGCUCG AGG	22	135	1,23	35,55	- 57,80	73	aly-miR166a- 5p
pso-miR13	UGAUGGAGGAGAAGAGAA GA	20	165	0,77	28,8	- 34,09	31	-

OU: olgun miRNA uzunluğu PU: pre-miRNA uzunluğu MFEI: minimum katlanma

Yeni miRNA'lara pre-miRNA ikincil yapıları ise Şekil 5.4.'de; pre-miRNA dizileri EK-4'de verilmiştir.

pso-miR2

```

      10      20      30      40
UU|  UA      U      UG ACA  GGCA  GUA
   GUGG UAUUCCAUCUC UGCACAC G  GCC  GCC  \
   UACC AUAAGGUAGAG ACGUGUG C  CGG  UGG  G
GU^  GC      U      GU GA-  ----  AAG
      80      70      60      50

```

pso-miR3

```

      10      20      30      40      50
A   U  UC      G      U  U--  G  GU--|  U
GAAGAA CC  UGAAGCUCAGGA GGAUAGCGCCG UGAU  GAAG  CG  UCCG U
CUUCUU GG  ACUUUGAGUCCU CCUAUCGCGGC GCUA  CUUU  GC  GGGC U
-   -  UC      A      -  UCU  A  GGUU^  A
      110      100      90      80      70      60

```

Şekil 5.4. (devam)

pso-miR4

```

          10          20          30          40          50          60          70
UCAGUCAUCG| GC    UA    C          U    A    GU    .-UUUGUUCAUC UG    U
          GC    UCUC    AUUCG    UUGGUGCAGG    CGGGA    CU    UUCGCUU          A    AUCC
          CG    AGAG    UAAGU    AACUACGUUC    GCCCU    GG    AAGCGAG          U    UAGU
-----^ AC    CC    C          C          A    UU    \ ----- GU    U
          190          180          170          160          150          80

```

pso-miR5

```

          10          20          30          40          50
GGAAGG    GA          -|          AACU    UU    UUA
          GG    GGUGACAGA    AGAGAGUGAGCACAUAAAGGU    UUC    GCAUG    G
          CC    CCACUGUCU    UCUCUCAUUCGUGUAUUUCG    AAG    CGUAC    G
CUAAAA    AC          A^          -----    UU    UUG
          .          100          90          80          70          60

```

pso-miR7

```

          10          20          30          40
GUGU          C          CU          UA    -| G    A
          GUAUGUGC    UGGCUCC    GUAUGCCAUUUG    GA    GC    CAUCGG    \
          UAUUAUCG    ACCGAGG    UAUGCAGGUAGAC    CU    CG    GUAGCC    A
AUUC          U          AG          GC    C^ G    U
          90          80          70          60          50

```

pso-miR11

```

          10          20          30          40          50          60
GA          UU    CU          C          CA    UAU---| U          GGAU
          GGUUGAU    GGGAAUG    GUUUGG    CGAGGUU    AUUAU    AAC          AUA    CAACUUUUUU    \
          CCAACUGCCC    UAC    CGGACC    GCUCUAA    UAUUA    UUG          UGU    GUUGGGAAAA    A
AA          UU    AG          -          AA    UUAGUU^ U          AGAA
          130          120          110          100          90          80          70

```

pso-miR13

```

          70          80          90
-----          --          A    GA    AAUAAGA
          UUGAUGGA    GGAGAAGAG    AGAU    AG    U
          GAUJACUU    UCUUUUUUC    UUUA    UC    G
UUAAAAAAAAUUUUG          AG          G    G-    AAAAAAA
          140          130          120          110          100

```

Şekil 5.4. Haşhaşa bulunan yeni miRNA'ların pre-miRNA yapısı. Kırmızı işaretli dizi olgun miRNA yapısını göstermektedir.

5.5. Mikroarray Tabanlı Genom Düzeyinde miRNA İfade Analizi

Haşhaş bitkisinde bulunan miRNA'ların farklı dokulardaki (kök, gövde, yaprak, genç kapsül) ifade düzeyleri arasındaki farklılıkların ölçülmesi amacıyla mikroarray çalışmaları yapılmıştır.

Karşılaştırmalı analizler için birçok farklı kıyaslama yapılmıştır. Buna örnek olarak kapsül dokusu ifade düzeyinin kök, gövde ve yapraklardan alınan sinyallerle karşılaştırıldığı gibi ayrı ayrı kökle, gövdeyle ve yaprakla karşılaştırılması da verilebilir. Benzer şekilde gövde, yaprak ve kök içinde karşılaştırmalı analizler yapılmıştır. Ek-5'de $p < 0,01$ olan bütün örnekler karşılaştırmalı olarak analiz edilerek ANOVA sonuçları verilmiştir. Dokularda ifade olan miRNA'ların mikroarray analizi Çizelge 5.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.5. Haşhaş bitkisinde 4 farklı dokuya ait miRNA'ların mikroarray analizleri ($p < 0.01$)

Prob ismi	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
	yaprak ortalama	kapsül ortalama	gövde ortalama	Kök Ortalama
aly-miR156a	753	5,635	273	2,295
bna-miR156a	743	4,990	226	2,026
ahy-miR156a	65	88	34	62
far-miR156b	51	60	29	57
ghr-miR156c	335	4,045	97	689
smo-miR156c	238	397	42	40
smo-miR156d	25	31	20	2
vvi-miR156e	147	2,847	42	378
sbi-miR156e	543	4,229	173	1,463
gma-miR156f	56	82	31	39
aly-miR156g	743	5,473	281	2,238
gma-miR156g	101	92	40	0
aly-miR156g-3p	0	40	0	2
vvi-miR156h	77	548	29	91
aly-miR156h	204	347	45	22
ptc-miR156k	155	2,933	70	314
osa-miR156l	452	3,341	107	1,129
far-miR159	16,287	16,944	19,668	21,697
aly-miR159a	16,167	17,512	20,772	22,726
aly-miR159b	15,160	16,920	19,350	20,679
aly-miR159c	5,991	10,750	9,021	7,791
osa-miR159d	6,069	10,050	8,403	8,577
osa-miR159e	6,231	10,136	8,559	8,794

Çizelge 5.5. devamı

sof-miR159e	168	512	279	150
osa-miR159f	15,177	16,667	20,280	22,596
zma-miR159g	13	69	48	26
ppt-miR160b	30	41	68	80
osa-miR160e	42	50	65	90
ppt-miR160c	21	12	24	38
aly-miR164a	5,171	10,345	6,125	2,493
far-miR164a	2,755	12,823	6,537	477
aly-miR164c	5,237	10,567	6,303	2,536
osa-miR164c	5,685	13,080	8,504	2,700
sbi-miR164c	5,755	11,842	7,197	2,393
rco-miR164d	7,029	13,852	9,351	3,139
osa-miR164d	5,658	10,598	6,402	2,701
osa-miR164e	6,893	13,898	9,753	3,261
zma-miR164h	1,972	8,177	3,361	230
mtr-miR166b	6,611	2,733	5,297	4,896
far-miR166	912	70	235	174
aly-miR166a	4,774	1,814	4,013	2,590
crt-miR166a	6,086	2,031	4,338	3,699
crt-miR166b	6,736	2,539	5,087	4,031
sbi-miR166a	5,726	1,770	4,197	3,231
ppt-miR166m	1,217	191	415	246
ppt-miR166j	3,466	1,096	2,510	1,332
osa-miR166i	1,360	425	495	139
ptc-miR166n	4,739	2,194	4,184	2,992
osa-miR166k	3,552	1,102	2,319	1,114
osa-miR166m	6,484	2,337	5,043	3,754
osa-miR166e	2,766	955	2,329	971
sbi-miR166k	6,423	2,945	6,006	4,430
osa-miR166g	6,189	2,544	5,466	3,999
ahy-miR167-5p	5,102	8,525	671	110
ppt-miR167	4,043	7,335	390	70
aqc-miR167	1,195	3,558	90	10
aly-miR167a	4,668	7,923	684	124
bna-miR167a	3,159	5,095	238	49
aly-miR167c	2,178	5,179	181	17
vvi-miR167c	3,107	5,033	201	28
aly-miR167d	4,288	6,515	501	96
osa-miR167d	5,035	8,138	610	109
gma-miR167g	1,261	3,339	90	1
ptc-miR167h	3,838	6,741	251	20
mtr-miR168	2,463	1,544	2,259	482
aly-miR168a	6,412	3,227	5,255	4,048
aly-miR168a-3p	1,269	596	1,113	1,208
smo-miR171a	271	68	57	21
gma-miR171a	296	79	62	2
aly-miR171b	394	131	99	13
smo-miR171b	217	21	34	20
zma-miR171b	443	161	124	21
bdi-miR171c	591	372	177	1

Çizelge 5.5. devamı				
mtr-miR171c	245	100	51	7
zma-miR171c	287	153	75	4
zma-miR171f	380	97	93	13
aqc-miR171f	311	175	93	10
rco-miR172	262	79	366	405
sbi-miR172a	611	354	1,143	1,349
aly-miR172a	685	473	1,681	1,763
vvi-miR172a	202	57	234	263
zma-miR172b-3p	532	132	1,033	1,106
aly-miR172b-3p	551	136	1,206	1,368
aly-miR172c	462	214	790	937
osa-miR172c	405	207	701	801
zma-miR172c-3p	240	34	233	353
ptc-miR172i	304	90	339	549
sly-miR319	1,595	5,618	4,725	4,497
pta-miR319	168	1,735	1,492	894
gma-miR319a	341	2,653	1,992	1,695
aly-miR319a	210	1,563	1,320	1,197
aly-miR319c	798	3,700	2,844	2,585
ppt-miR319c	553	3,895	2,920	2,252
ptc-miR319e	1,011	3,609	2,824	3,103
gma-miR390a-3p	91	373	202	970
aly-miR390a	22	78	40	588
aly-miR390a-3p	98	378	199	1,111
gma-miR390b	11	19	14	71
aly-miR390b-3p	16	83	58	273
ppt-miR390c	19	67	39	397
osa-miR395a	24	75	102	15
osa-miR395b	50	64	91	13
tae-miR395b	45	69	94	7
mtr-miR395b	24	76	89	14
aly-miR395b	46	524	196	38
osa-miR395c	534	7	14	3
aly-miR395c	31	447	183	14
aly-miR395d	37	85	83	14
sbi-miR395f	87	77	96	6
mtr-miR395g	50	71	76	8
mtr-miR395h	192	62	82	4
aly-miR395i	1,290	25	37	14
osa-miR395o	791	4	27	6
osa-miR395u	14	46	81	7
far-miR396	10	3	35	96
vvi-miR396a	5,724	1,248	3,424	10,188
aly-miR396a-3P	59	508	313	5,816
zma-miR396a-3p	89	697	470	7,735
aly-miR396a	952	83	777	4,518
vvi-miR396b	6,024	1,538	4,493	12,040
gma-miR396e	9,207	3,424	8,163	20,337
sbi-miR396e	3,543	622	3,069	10,364
sbi-miR396d	2,587	343	2,135	8,730

Çizelge 5.5. devamı				
osa-miR396f	1,544	107	556	2,851
osa-miR396g	78	16	79	113
pab-miR397	41	175	4	16
sly-miR397	27	252	9	16
aly-miR397a	60	315	15	7
bna-miR397a	15	97	7	0
zma-miR397a	9	81	7	4
ptc-miR397b	41	232	10	11
ptc-miR474a	5	127	65	33
ptc-miR474b	6	133	65	36
ptc-miR474c	3	117	68	20
aqc-miR529	312	32	51	61
far-miR529	452	17	45	85
ppt-miR529a	265	21	34	47
ppt-miR529d	220	19	37	49
ppt-miR529g	166	26	28	29
osa-miR530-5p	3,932	8	722	54
csi-miR530b	550	1	44	4
csi-miR535	8,683	877	2,702	4,892
osa-miR535	19,836	4,615	10,541	20,910
aqc-miR535	14,930	3,341	7,926	15,066
ath-miR854a	69	504	64	70
cre-miR1148.1	20	73	103	7
pta-miR1310	13	17	42	26
pta-miR1314	0	924	0	0
hvu-miR1436	121	1,932	352	515
ptc-miR1450	2,228	1,920	1,589	4,939
osa-miR1858a	17	14	49	7
peu-miR2911	52,507	4,847	36,139	5,975
peu-miR2916	191	761	121	1,226
osa-miR2919	228	2,177	468	825
vvi-miR2950	45	37	45	219

Kısaltmalar: **ath:** *Arabidopsis thaliana*, **ahy:** *Arachis hypogaea*, **aly:** *Arabidopsis lyrata* **aqc:** *Aquilegia caerulea*, **bdi:** *Brachypodium distachyon*, **far:** *Festuca arundinacea* **osa:** *Oryza sativa*, **ptc:** *Populus trichocarpa*, **bna:** *Brassica napus*, **cre:** *Chlamydomonas reinhardtii*, **Gma:** *Glycine max*, **crt:** *Citrus reticulata*, **ghr:** *Gossypium hirsutum* **hvu:** *Hordeum vulgare*, **Mtr:** *Medicago truncatula*, **smo:** *Selaginella moellendorffii*, **Sof:** *Saccharum officinarum*, **sly:** *Solanum lycopersicum* **Sbi:** *Sorghum bicolor*, **Ppt:** *Physcomitrella patens*, **peu:** *Populus euphratica*, **rco:** *Ricinus communis* **Zma:** *Zea mays*, **Pta:** *Pinus taeda*, **Tae:** *Triticum aestivum*, **Vvi:** *Vitis vinifera*.

4 farklı doku için yapılan miRNA mikroarrayi sonucunda haşhaş bitkisinde miR156/157, miR159, miR160, miR164, miR166, miR167, miR168, miR171, miR172, miR319, miR390, miR395, miR396, miR397, miR474, miR529, miR530, miR535, miR854, miR1148, miR1310, miR1314, miR1436, miR1450, miR1858, miR2911, miR2916 ve miR2919 olmak üzere toplamda 28 miRNA ailesi tespit edilmiştir. Bunlardan 17 tanesi korunmuş miRNA ailesidir.

pso-miR156 haşhaşta dört dokuda da tespit edilmiştir. Fakat diğer dokulara kıyasla kapsül dokusunda en fazla, gövdede ise en az ifade edilmektedir. psomiR164 ve psomiR167 kapsülde çok, kökte az; psomiR319, psomiR474 ve psomiR2919 kapsülde çok, yaprakta az ifade edilmektedir. psomiR854, psomiR1314, psomiR1436 ve psomiR397 kapsülde daha fazla ifade olmaktadır. psomiR529, psomiR530, psomiR2911 ve psomiR166 kapsülde az, yaprakta çok; psomiR535 kapsülde az; psomiR172 ve psomiR396 ise kapsülde az, kökte çok ifade edilmektedir.

pso-miR168 yaprakta çok; psomiR171 kökte az, yaprakta çok; psomiR1148 ve psomiR1858 kökte az, gövdede çok; psomiR1310 yaprakta az gövdede çok ifade edilmektedir. psomiR1450 ve psomiR160 kökte çok ifade edilmektedir. psomiR390 kökte çok, yaprakta az; psomiR2916 kökte çok, gövdede az; psomiR395 ise kökte az ifade olmaktadır. psomiR159a-b ve psomiR159f kökte fazla yaprakta az, psomiR159c-e ve psomiR159g ise kapsülde fazla ifade olmaktadır.

5.6. Haşhaş miRNA'larının Hedef Genleri

Haşhaş bitkisine ait miRNA'lar derinlemesine dizileme ve miRNA mikroarray ile tespit edilmiştir. Korunmuş miRNA'lar ve yeni haşhaş miRNA'ların biyoenformatik olarak hedefledikleri genler/proteinlerin aksesyon numaraları ve adları Çizelge 5.6'da verilmiştir. Geriye kalan miRNA'ların hedef gen sonuçları EK-6 'de verilmiştir. Hedef genler bulunurken psRNATarget adlı veritabanı kullanılmıştır. Haşhaş genomu tüm detayları ile bilinmediğinden haşhaş bitkisine en yakın model bitki olarak *Arabidopsis thaliana* seçilip tüm analizler bu model bitki kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 5.6. Haşhaş bitkisinde tespit edilen korunmuş ve yeni miRNA'ların hedefledikleri genler

miRNA	Hedef ID	Hedef genin/proteinin adı
pso-miR535	AT5G65950.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
	AT1G63660.2	GMP synthase (glutamine-hydrolyzing), putative / glutamine amidotransferase, putative
pso-miR156	AT2G33810.1	SPL3 squamosa promoter binding protein-like 3
	AT3G57920.1	SPL15 squamosa promoter binding protein-like 15
	AT1G27360.2	SPL11 squamosa promoter-like 11
	AT5G50670.1	SPL13B, SPL13 Squamosa promoter-binding protein-like (SBP domain) transcription factor protein ailesi
	AT2G42200.1	SPL9, AtSPL9 squamosa promoter binding protein-like 9
	AT5G43270.3	SPL2 squamosa promoter binding protein-like 2
	AT1G27370.3	SPL10 squamosa promoter binding protein-like 10
	AT5G50570.2	SPL13A, SPL13 Squamosa promoter-binding protein-like (SBP domain) transcription factor family protein
	AT3G28690.1	Protein kinase superfamily protein
	AT1G53160.1	SPL4 squamosa promoter binding protein-like 4
	AT3G15270.1	SPL5 squamosa promoter binding protein-like 5
	AT1G16660.1	transposable element gene
pso-miR166	AT1G30490.1	PHV, ATHB9 Homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein
	AT2G34710.1	PHB, ATHB14, ATHB-14, PHB-1D Homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing p.
pso-miR167	AT5G41300.1	Receptor-like protein kinase-related family protein
	AT3G61310.1	AT hook motif DNA-binding family protein
	AT3G06868.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
	AT1G02800.1	ATCEL2, CEL2 cellulase 2
pso-miR168	AT1G48410.3	AGO1 Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase
	AT3G04380.2	SUVR4, SDG31 SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein
pso-miR172	AT5G60120.1	TOE2 target of early activation tagged (EAT) 2
	AT4G36920.2	AP2 Integrase-type DNA-binding superfamily protein
	AT3G54990.1	SMZ Integrase-type DNA-binding superfamily protein
	AT5G67180.1	TOE3 target of early activation tagged (EAT) 3
	AT2G28550.1	RAP2.7, TOE1 related to AP2.7
	AT2G28550.3	RAP2.7 related to AP2.7
	AT2G39250.1	SNZ Integrase-type DNA-binding superfamily protein
	AT4G29430.1	rps15ae ribosomal protein S15A E
	AT3G14770.1	SWEET2, AtSWEET2 Nodulin MtN3 family protein
	AT3G47360.1	ATHSD3, HSD3 hydroxysteroid dehydrogenase 3
	AT5G65790.1	ATMYB68, MYB68 myb domain protein 68
	AT1G32340.1	NHL8 NDR1/HIN1-like 8
	AT2G19100.1	transposable element gene
	pso-miR164	AT3G15170.1
AT5G53950.1		CUC2, ANAC098, ATCUC2 NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
AT5G07680.2		ANAC080, NAC080 NAC domain containing protein 80
AT5G61430.1		ANAC100, ATNAC5, NAC100 NAC domain containing protein 100
AT1G56010.1		NAC1, anac021 NAC domain containing protein 1
AT3G12977.1		NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator supfam pr
AT5G39610.1		ATNAC2, ORE1, ANAC092, ATNAC6, NAC2, NAC6 NAC domain c
AT1G10530.1		fonkksiyonu bilinmeyen protein

Çizelge 5.6. devam

pso-miR408	AT3G04480.1	endoribonucleases
	AT1G02880.2	TPK1 thiamin pyrophosphokinase 1
	AT2G44750.2	TPK2 thiamin pyrophosphokinase 2
	AT5G25050.1	Major facilitator superfamily protein
	AT1G11770.1	FAD-binding Berberine family protein
pso-miR159/319	AT2G26950.1	AtMYB104, MYB104 myb domain protein 104
	AT5G06100.1	MYB33, ATMYB33 myb domain protein 33
	AT5G67090.1	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein
pso-miR171	AT2G45160.1	HAM1, ATHAM1, LOM1 GRAS family transcription factor
	AT3G60630.1	HAM2, ATHAM2, LOM2 GRAS family transcription factor
	AT4G00150.1	HAM3, ATHAM3, LOM3 GRAS family transcription factor
	AT3G47170.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein
pso-miR397	AT2G29130.1	LAC2, ATLAC2 laccase 2
	AT2G38080.1	RX12, LAC4, ATLMCO4, LMCO4 Laccase/Diphenol oxidase family protein
	AT5G60020.1	LAC17, ATLAC17 laccase 17
	AT4G33230.1	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
	AT3G06470.1	GNS1/SUR4 membrane protein family
	AT1G66670.1	CLPP3, NCLPP3 CLP protease proteolytic subunit 3
	AT3G60250.1	CKB3 casein kinase II beta chain 3
	AT5G11210.1	ATGLR2.5, GLR2.5 glutamate receptor 2.5
pso-miR390	AT3G17185.2	TASIR-ARF, TAS3, ATTAS3 TAS3/TASIR-ARF (TRANS-ACTING SIRNA3); other RNA
	AT5G49615.1	TAS3b TAS3b (trans-acting siRNA 3b); other
	AT5G03640.1	Protein kinase superfamily protein
pso-miR162	AT1G01040.1	DCL1, CAF, SUS1, SIN1, ASU1, EMB76, EMB60, ATDCL1 dicer-like 1
	AT2G23180.1	CYP96A1 cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide
pso-miR169	AT1G17590.1	NF-YA8 nuclear factor Y, subunit A8
	AT1G54160.1	NFYA5, NF-YA5 nuclear factor Y, subunit A5
	AT1G17590.4	NF-YA8 nuclear factor Y, subunit A8
	AT1G17590.3	NF-YA8 nuclear factor Y, subunit A8
	AT3G20910.1	NF-YA9 nuclear factor Y, subunit A9
	AT5G12840.1	HAP2A, EMB2220, ATHAP2A, NF-YA1 nuclear factor Y, subunit A1
	AT5G12840.4	HAP2A, ATHAP2A, NF-YA1 nuclear factor Y, subunit A1
	AT5G42120.1	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
pso-miR393	AT1G72830.3	HAP2C, ATHAP2C, NF-YA3 nuclear factor Y, subunit A3
	AT1G12820.1	AFB3 auxin signaling F-box 3
	AT3G26810.1	AFB2 auxin signaling F-box 2
	AT3G62980.1	TIR1 F-box/RNI-like superfamily protein
	AT4G03190.1	GRH1, ATGRH1, AFB1 GRR1-like protein 1
	AT2G40820.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
	AT1G51050.1	pseudogene, hypothetical protein
	AT4G15215.1	PDR13, ATPDR13 pleiotropic drug resistance 13
	AT4G22066.1	Pseudogene of AT5G66830; F-box family protein
	pso-miR394	AT1G27340.1
AT5G20580.1		Fonksiyonu bilinmeyen protein
AT4G20430.2		Subtilase family protein
AT1G01320.1		Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT3G48460.1		GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT5G09670.2		loricrin-related
	AT5G09672.1	CPuORF21 conserved peptide upstream open reading frame 21

Çizelge 5.6. devam

pso-miR399	AT2G33770.1	UBC24, ATUBC24, PHO2 phosphate 2
	AT1G67230.1	LINC1 little nuclei1
	AT5G15660.1	F-box and associated interaction domains-containing protein
pso-miR827	AT1G02860.2	NLA SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein
	AT1G02860.1	NLA, BAH1 SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein
	AT4G01975.1	transposable element gene
	AT4G23030.1	MATE efflux family protein
pso-miR472	AT2G16365.3	F-box family protein
	AT1G55810.2	UKL3 uridine kinase-like 3
	AT3G46530.1	RPP13 NB-ARC domain-containing disease resistance protein
	AT1G61300.1	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein
pso-miR2275	AT1G27180.1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
	AT1G15530.1	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
	AT4G33380.2	Fonksiyonu bilinmeyen protein
	AT3G15360.1	ATHM4, TRX-M4, ATM4 thioredoxin M-type 4
	AT5G67180.1	TOE3 target of early activation tagged (EAT) 3
pso-miR528	AT5G44770.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
	AT4G38170.1	FRS9 FAR1-related sequence 9
	AT1G80370.1	CYCA2;4 Cyclin A2;4
	AT5G17710.2	EMB1241 Co-chaperone GrpE family protein
	AT2G04290.1	transposable element gene
	AT4G30160.1	VLN4, ATVLN4 villin 4
	AT5G34846.1	transposable element gene
	AT5G03560.2	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
pso-miR530	AT5G62380.1	VND6, ANAC101, NAC101 NAC-domain protein 101
	AT5G02830.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
	AT5G56760.1	ATSERAT1;1, SAT5, SAT-52, SERAT1;1 serine acetyltransferase 1;1
pso-miR529	AT5G29337.1	transposable element gene
	AT3G57920.1	SPL15 squamosa promoter binding protein-like 15
	AT3G20440.3	EMB2729 Alpha amylase family protein
	AT2G42200.1	SPL9, AtSPL9 squamosa promoter binding protein-like 9
	AT1G28070.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
	AT5G50570.1	SPL13A, SPL13 Squamosa promoter-binding protein-like (SBP domain) transcription factor family protein
	AT5G50670.1	SPL13B, SPL13 Squamosa promoter-binding protein-like (SBP domain) transcription factor family protein
	AT1G10705.1	Encodes a Maternally expressed gene (MEG) family protein [pseudogene]
pso-miR2	AT2G29760.1	OTP81 Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
	AT2G01960.1	TET14 tetraspanin14
	AT1G49990.1	F-box family protein
	AT1G30090.1	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
	AT1G01710.1	Acyl-CoA thioesterase family protein
pso-miR3	AT3G29642.1	transposable element gene
	AT3G31630.1	transposable element gene
pso-miR5	NP455428	putative retroelement pol polyprotein
	AT3G24560.2	RSY3 Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
pso-miR7	AT5G30510.1	RPS1, ARRPS1 ribosomal protein S1
	AT1G77850.1	ARF17 auxin response factor 17
	AT2G28350.1	ARF10 auxin response factor 10
pso-miR11	AT4G30080.1	ARF16 auxin response factor 16
	AT2G01210.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
	AT3G29736.1	transposable element gene
	AT5G01090.1	Concanavalin A-like lectin family protein
	AT5G13390.1	NEF1 no exine formation 1
	AT5G53460.2	GLT1 NADH-dependent glutamate synthase 1

Çizelge 5.6. devam

pso-mir13	AT1G52160.1	TRZ3 tRNase Z3
	AT5G01040.1	LAC8 laccase 8
	AT5G01050.1	Laccase/Diphenol oxidase family protein
	AT2G15920.1	transposable element gene
	AT3G16630.1	ATKINESIN-13A, KINESIN-13A P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
	AT3G51420.1	SSL4, ATSSL4 strictosidine synthase-like 4
	AT2G36330.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
	AT2G15530.3	RING/U-box superfamily protein
	AT4G00355.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
	AT2G24810.1	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
	AT2G40370.1	LAC5 laccase 5
	AT4G16180.2	Fonksiyonu bilinmeyen protein
	AT1G71220.2	EBS1 UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferases;transferases, transferring hexosyl groups;transferases, transferring glycosyl groups
	AT1G27752.2	Ubiquitin system component Cue protein
	AT1G26370.1	RNA helicase family protein
	AT5G25050.1	Major facilitator superfamily protein
	AT5G17300.1	RVE1 Homeodomain-like superfamily protein
	AT3G51440.1	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
	AT4G16350.1	CBL6, SCABP2 calcineurin B-like protein 6
FJ156103.1	7-OMT (7-O-methyltransferase)	

Haşhaşa ifade olunan tüm miRNA'ların hedef genleri Çizelge 5.6. ve EK-6'de verilmiştir. Bu genlerin ilişkili olduğu diğer genlerin bulunması için Blast2GO programı kullanılmıştır ve biyolojik proseslerde yer alan genler sınıflandırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 5.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.7. Tüm haşhaş miRNA'larının Gen ontolojisi (GO) sonuçları

miRNA Adı	GO Biyolojik Proses	Gen ID	Toplam hedef sayı
pso-miR1106 pso-miR1040 pso-miR1514 pso-miR158 pso-miR169 pso-miR145 pso-miR860 pso-miR5181 pso-miR1508 pso-miR166 pso-miR171 pso-miR426 pso-miR7	Transkripsiyon	TC390153, TC373385 TC370585 NP270 TC364258 TC403782 TC374930 TC374 TC367576 TC393398 TC362993 TC359 TC369295	13
pso-miR1514 pso-miR1439	Fotosentez	TC407049 TC376596	2
pso-miR1850	TCA Döngüsü	TC359178	1

Çizelge 5.7. devam

pso-miR13 pso-miR408	Alkaloit biyosentezi	TC364549 TC366290 TC366821 TC364549	4
pso-miR1867 , pso-miR2411	Yağ asidi metaboliz	TC375040 BX835467	2
pso-miR162 pso-miR6434 pso-miR1851 pso-mir171	Çiçek gelişimi	TC400535 TC362500 TC360624 AT4G00150.1	4
pso-miR162 pso-miR829 pso-miR854 pso-miR168	Transkripsiyon sonr gen susturması	TC400535 TC359132 TC359129 TC358800	4
pso-miR1507 pso-miR835	Apoptosiz	TC380587 NP10443957	2
pso-miR1507 pso-miR1850 pso-miR2615 pso-miR393 pso-miR172 pso-miR1850 pso-miR1858	Yan köklerin oluşumu	TC360854 TC360969 TC362714 TC390317 TC371187 TC360969 AT1G15750.3	6
pso-miR1154 pso-miR1439 pso-miR156 pso-miR169 pso-miR415 pso-miR2634 pso-miR6027 pso-miR6434 pso-miR854 pso-miR1040 pso-miR1051 pso-miR1114 pso-miR1850 pso-mir13	Protein- amino asit fosforilasyonu	NP454664 TC3600004 TC361859 TC362330 NP864162 TC373061 TC360791 TC362500 TC362689 TC375507 TC393916 TC372821 TC360969 TC373211	14
pso-miR1507 , pso-miR5225	Sürgün gelişimi	TC362119 TC359058	2
pso-miR1432 , pso-miR1439 pso-miR2931 pso-miR518 pso-miR528 pso-miR5658 pso-miR5181 pso-miR835 pso-miR7 1458	Absisik asit cevabı	TC366718 TC368324 TC374571 TC374 TC374077 TC374279 TC374877 TC370 TC369295 NM_101575.3	10
pso-miR1507	Yaşlanma	BE037967	1
pso-miR1051 , pso-miR319 pso-miR393 pso-miR415 pso-miR6434 pso-miR1051 pso-miR1508	Anter gelişimi	NP1662956 TC362211 TC390317 NP16 NP864162 TC362500 NP1662956 TC36	8
pso-miR1507 pso-miR1508 pso-miR172 pso-miR1851 pso-miR7	Yaprak gelişimi	TC360854 TC384235 TC372854 TC360624 TC369295	5

Çizelge 5.7. devam

pso-miR1106 pso-miR1312 pso-miR143 pso-miR1439 pso-miR415 pso-miR6434 pso-miR1051 pso-miR1106 pso-miR1432 pso-miR1439 pso-mir1450	Tuz stresi cevabı	TC390153 BP642718 TC366718 TC370887 TC368324 TC390153 TC403782 TC37646 TC405170 TC368324 NM_101575.3	11
pso-miR1507 , pso-miR2615 pso-miR2634 pso-miR408 pso-miR6434 pso-miR168 pso-miR7 pso-miR1450 pso-miR1858	Oksin sinyal yolağı	TC360854 TC362714 TC372926 TC383405 TC376462 TC358800 TC369295 NM_101575.3 AT1G15750.3	7
pso-miR2275 pso-miR408 pso-miR1312	Oksidatif stres cevabı	TC377543 TC366290 BP642718	3
pso-miR2634 pso-miR397	Sirkadian ritmi	TC372926 TC369581	2
pso-miR1850 pso-miR319 pso-miR827 pso-miR6434 pso-miR1106 pso-miR1850 pso-miR845 pso-miR855 pso-miR530	Salisilik asit cevabı	TC360969 TC362211 TC360969 TC377815 TC376462 TC390153 TC389008 TC372515	7
pso-miR167 pso-miR2931 pso-miR5225	Nematod cevabı	TC364720 TC374571 TC370876	3
pso-miR5225 pso-miR835 pso-miR397 pso-miR1312	Kalsiyum iyonunun taşınması	TC359058 TC369983 TC360514 TC359077	4
pso-miR1312 , pso-miR397 pso-miR1514 pso-miR5658 pso-miR1439 pso-miR168	Işık uyarana cevabı	TC378519 TC360514 TC407049 TC374279 TC364708 TC358800	6
pso-miR1106 , pso-miR397 pso-miR1106 pso-mir13	Lignin biyosentezi	TC365552 TC365081 TC365552 BP810741	4
pso-miR1432 pso-miR1507 pso-miR1514 pso-miR1850 pso-miR2673 pso-miR393 pso-miR4393 pso-miR5658 pso-miR827 pso-miR415 pso-miR835 pso-miR168 pso-miR1850	Savunma cevabı	TC382203,TC380587TC386611 TC360969 TC372924 TC377815 TC390317 TC403782 TC365582 TC358457 TC10443957 TC358800 TC360969	13
pso-miR1106	Zarlar arası taşıma	TC368978	1

Çizelge 5.7. (devam)

pso-miR1106 pso-miR415 pso-miR835	Jasmonik asit uyarısı	TC368978 TC403782 TC370505	5
pso-miR6434 pso-miR530 pso-miR1858	Cevabi/jasmonik Asit aracılı sinyal yoloğı	TC376462 TC372515 AT1G15750.3	
pso-miR1114 pso-miR2643	Terpenoid biyosentez	TC361859 DR356470	2
pso-miR1154 pso-miR473 pso-miR528	Ksilemin büyümesi	NP454664 TC362939 TC374077	3
pso-miR1507	Meyva oluşumu	TC392119	1
pso-miR1051 pso-miR1439 pso-miR6434 pso-miR169 pso-miR2948 pso-miR426 pso-miR1439 pso-miR426 pso-miR1450	Susuzluğa cevap	TC405170 TC368324 TC359182 TC3366 TC373778 TC359182 TC362500 TC368 NM_101575.3	8
pso-miR1439 pso-miR5225 pso-miR1217	Soğuk stresi cevabı	TC4322256 TC370876 TC360551	3
pso-miR1051 pso-miR2	Asetil-CoA biyosentez	TC361809 TC362344	1
pso-miR1439 pso-miR408 pso-miR528 pso-miR2634 pso-miR408	Sitokin cevabı	TC3600004 TC383405 TC374077 TC38 TC343405	5
pso-miR1507 pso-miR2916 pso-miR319	Giberellik asit cevabı	BE037967, TC399678 TC362211	3
pso-miR1514, pso-miR1852. pso-miR2643 pso-miR835 pso-miR1106	Hücre duvarı oluşur	EG478206 TC364976 TC362621 TC370505 TC365552	5
pso-miR158	Flavanoid biyosentezi	NP10641221	1
pso-miR2673 pso-miR854 pso-miR7 pso-miR13	Antosiyanin biyosentezi	TC367437 TC402709 TC369295 NP10426976	4
pso-miR2936, pso-miR393 pso-miR1106 pso-miR827 pso-miR2615 pso-miR399 pso-miR1432 pso-miR845 pso-miR855	Ubikinon Biyosentez protein ubikinasyon	TC364256 TC390317 TC367211 TC358434 TC377815 TC362714 TC370887 TC389008	8
pso-miR399	Fotomorfogenez	TC358434	1

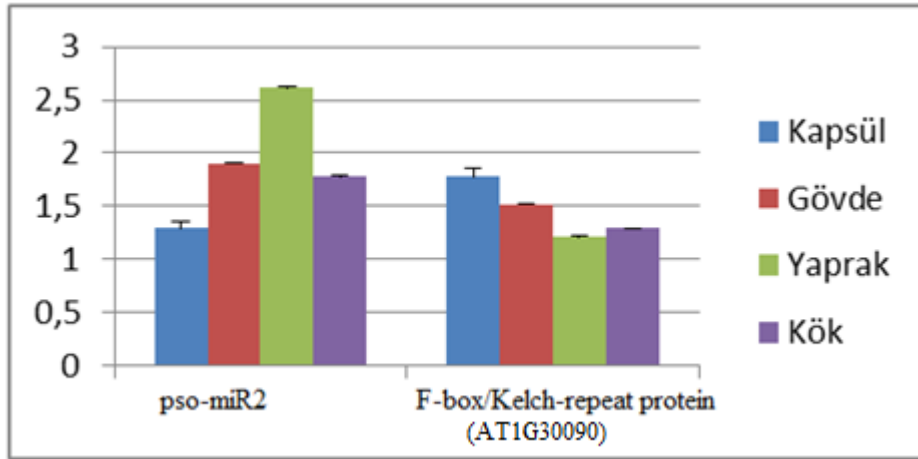
Çizelge 5.7. (devam)

pso-miR4351 pso-miR530	Yaralanma cevabı	TC374516 TC372515	2
pso-miR1514 pso-miR167 pso-miR1852	Karbonhidrat	EG478206 TC364720 TC364976	9
pso-miR2275 pso-miR2643 pso-miR5181	metabolizması	TC377543 TC362621 TC393094	
pso-miR5225 pso-miR1028 pso-miR1051		TC370876 TC406139 NP1662956	

miRNA'ların hedeflediği genler toplamda 44 biyolojik proses altında katagorize edilmiştir. Bu prosesler; Transkripsiyon, fotosentez, trikarboksilik asit döngüsü, alkaloit biyosentezi, yağ asidi metabolizması, çiçek gelişimi, posttranskripsiyonel gen susturması, apoptosis, yan köklerin oluşumu, protein- amino asit fosforilasyonu, sürgün gelişimi, absisik asit cevabı, yaşlanma anter gelişimi, yaprak gelişimi, tohum dormansisininin bitip embriyonun oluşumu, tuz stresi cevabı, oksin sinyal yolağı, oksidatif stres cevabı, sirkadian ritmi, salisilik asit cevabı, nematod cevabı, kalsiyum iyonunun taşınması, ışık uyarısına cevap, lignin biyosentezi, savunma cevabı, zarlar arası taşıma, jasmonik asit uyarısına cevap, terpenoid biyosentezi, ksilemin büyümesi, meyva oluşumu, susuzluğa cevap, soğuk stresi cevabı, Asetil-CoA biyosentezi, sitokin cevabı, giberillik asit cevabı, hücre duvarı oluşumu, flavanoid biyosentezi, antosiyanin biyosentezi, ubiquinon biyosentezi ve protein ubiquinonasyonu, fotomorfogenez, yaralanma cevabı, karbonhidrat metabolizması.

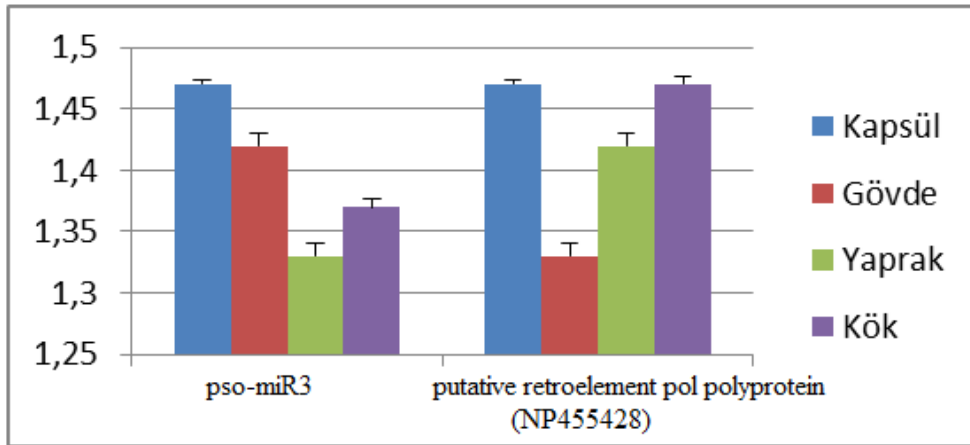
5.7. Seçilen Bazı miRNA'lar ve Hedefledikleri Genlerin qRT-PCR Analizleri

pso-miR2 derinlemesine dizilemede bulunan yeni miRNA'lardandır (Çizelge 5.4.). psomiR2'nin biyoenformatik olarak hedeflediği genlerden biri F-box/Kelch-repeat protein (AT1G30090)'dir (Çizelge 5.6). psomiR2 ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.5.'de verilmiştir. Bu sonuca göre psomiR2 en fazla yaprak, en az kapsülde; hedef gen ise en çok kapsülde en az yaprakta ifade olmuştur.



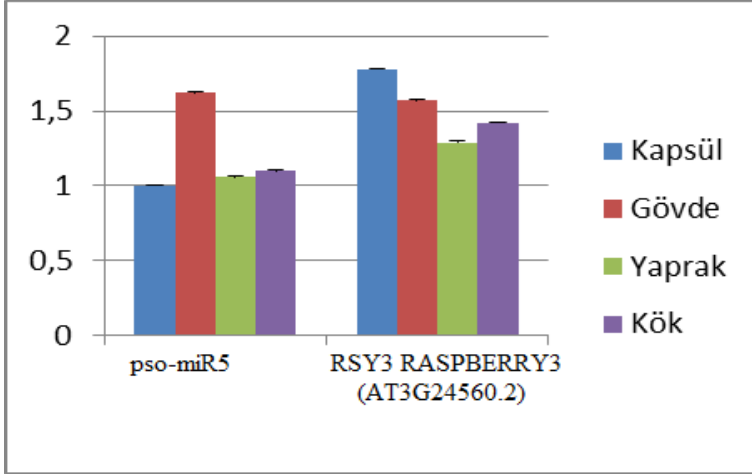
Şekil 5.5. Pso-miR2 ve hedeflediği F-box/Kelch-repeat protein (AT1G30090) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü

pso-miR3 derinlemesine dizilemede bulunan yeni miRNA'lardandır (Çizelge 5.4.). pso-miR3'ün biyoenformatik olarak putative retroelement pol polyprotein (NP455428) bir geni hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). pso-miR ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.6.'de verilmiştir. Bu sonuca göre pso-miR3 en fazla kapsül, en az yaprakta; hedef gen ise en fazla kapsül ve kök, en az gövdede ifade olmuştur.



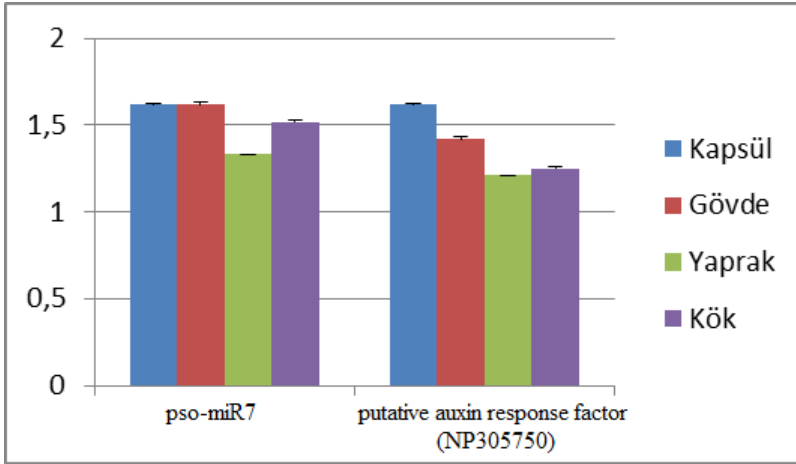
Şekil 5.6. Pso-miR3 ve hedeflediği putative retroelement pol polyprotein (NP455428) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.

pso-miR5 derinlemesine dizilemede bulunan yeni miRNA'lardandır (Çizelge 5.4.). pso-miR5'in biyoenformatik olarak RSY3 RASPBERRY3 (AT3G24560.2) hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). pso-miR5 ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.7.'de verilmiştir. Bu sonuca göre pso-miR5 en fazla gövde, en az kapsülde; hedef gen ise en fazla kapsül, en az yaprakta ifade olmuştur.



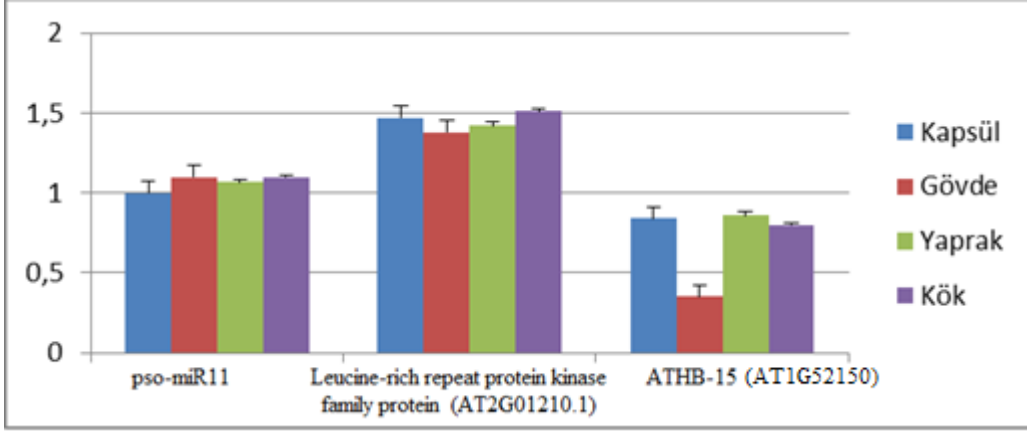
Şekil 5.7. Pso-miR5 ve hedeflediği RSY3 RASPBERRY3 (AT3G24560.2) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.

pso-miR 7 derinlemesine dizilemede bulunan yeni miRNA'lardan birisidir (Çizelge 5.4.). Bu miRNA'nın hedeflediği genlerden biri biyoenformatik olarak putative auxin response factor (NP305750) olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.6). pso-miR7 ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.8.'de verilmiştir. Bu sonuca göre pso-miR7 en fazla kapsül ve gövdede, en az yaprakta; hedef gen ise en çok kapsülde en az yaprakta ifade olmuştur



Şekil 5.8. Pso-miR7 ve hedeflediği putative auxin response factor (NP305750) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.

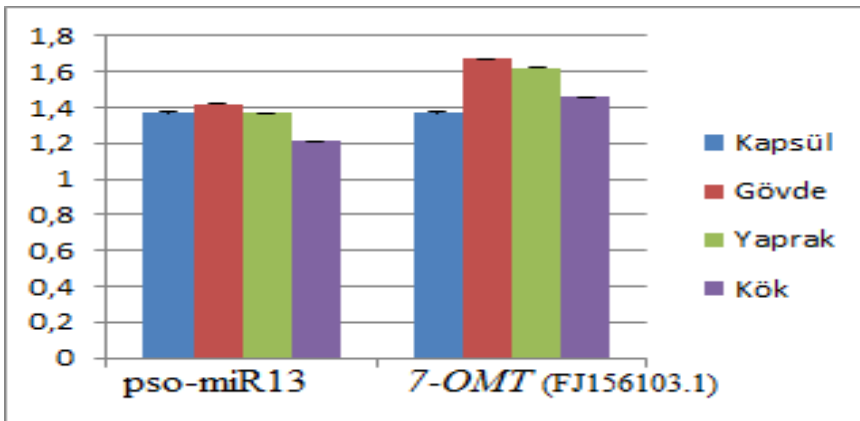
pso-miR 11 derinlemesine dizilemede bulunan yeni miRNA'lardan birisi olup miRNA aly-miR166a-5p ile homoloji göstermektedir (Çizelge 5.4.).



Şekil 5.9. Pso-miR11 ve hedeflediği Leucine-rich repeat protein kinase family protein (AT2G01210.1) ve ATHB-15 (AT1G52150) genlerinin farklı dokularda ifade düzeylerinin qRT-PCR ölçümleri.

pso-miR11'in Leucine-rich repeat protein kinase family protein (AT2G01210.1) (hedef transkript 1), homologu olan miR166 ailesinin HD-ZIP protein ATHB-15 (AT1G52150) (hedef transkript 2) biyoenformatik olarak hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). Ayrıca pso-miR11 ve hedeflediği genler ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.9.'da verilmiştir. Bu sonuca göre pso-miR11 en fazla gövde, en az kapsülde; hedef genle en fazla kökte, en az gövdede; hedef transcript 2 ise en çok yaprak ve kapsül, en az gövdede ifade olmuştur.

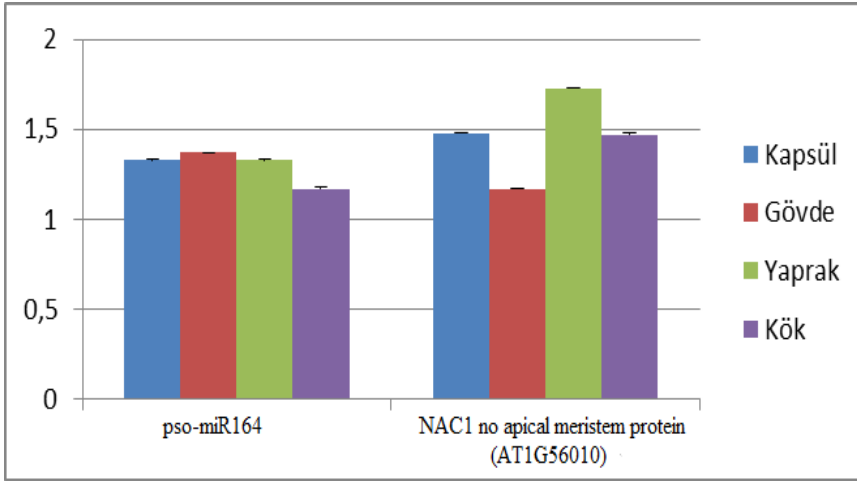
pso-miR 13 derinlemesine dizilemede bulunan yeni miRNA'lardandır. Bu miRNA herhangi bir-miRNA ile homoloji göstermemektedir (Çizelge 5.4.). pso-miR13'ün *7-O-methyltransferase (7-OMT)* (FJ156103.1) genini biyoenformatik olarak hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). Ayrıca pso-miR13 ve hedeflediği genler ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.10.'de verilmiştir.



Şekil 5.10. pso-miR13 ve hedef geni *7-O-methyltransferase (7-OMT)* (FJ156103.1) ın farklı dokularda ifade düzeylerinin qRT-PCR ölçümleri.

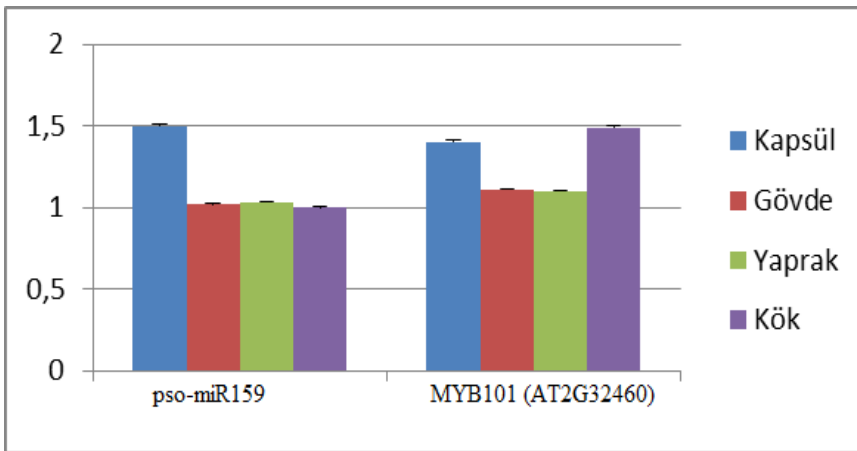
Bu sonuca göre *pso-miR13* en fazla gövde, en az kökte; *7-OMT* en fazla gövde, en az kapsülde ifade olmuştur.

pso-miR164'ün *NAC1* no apical meristem protein (*AT1G56010*)'i biyoenformatik olarak hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). Ayrıca *pso-miR164* ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.11.'de verilmiştir. Bu sonuca göre *pso-miR164* en fazla gövde, en az kökte; hedef gen en fazla yaprak, en az kökte ifade olmuştur.



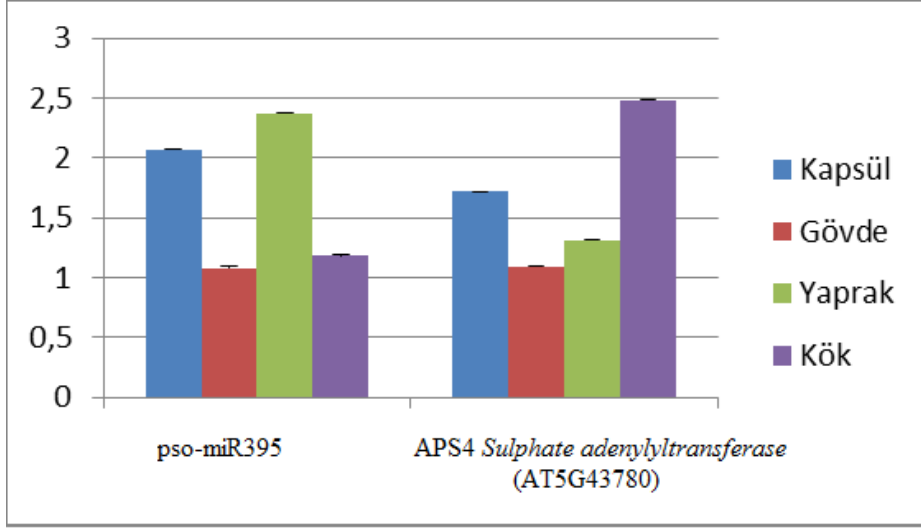
Şekil 5.11. *pso-miR164* ve hedeflediği *NAC1* no apical meristem protein (*AT1G56010*) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü.

pso-miR159'un *MYB101* (*AT2G32460*) biyoenformatik olarak hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). Ayrıca *pso-miR159* ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.12.'de verilmiştir. Bu sonuca göre *pso-miR159* en fazla kapsül, en az kökte; hedef gen en fazla kökl, en az yaprak da ifade olmuştur. (Çizelge 5.5.).



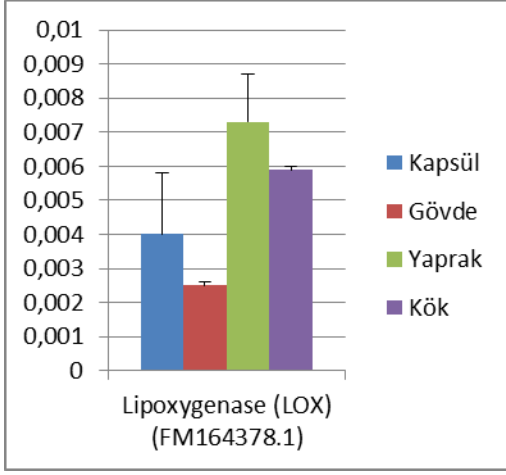
Şekil 5.12. *pso-miR159* ve hedeflediği *MYB101* (*AT2G32460*) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü

pso-miR395'ün *APS4 Sulphate adenyltransferase* (AT5G43780) genini hedeflediği biyoenformatik olarak tespit edilmiştir (Çizelge 5.6). Ayrıca pso-miR164 ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.13.'de verilmiştir. Bu sonuca göre pso-miR395 pso-miR395 en fazla yaprak, en az gövde; hedef gen en fazla kök, en az gövde de ifade olmuştur. Mikroarray sonucuna göre pso-miR395 homologları en fazla gövdede, en az kökte ifade olmuştur (Çizelge 5.5.).

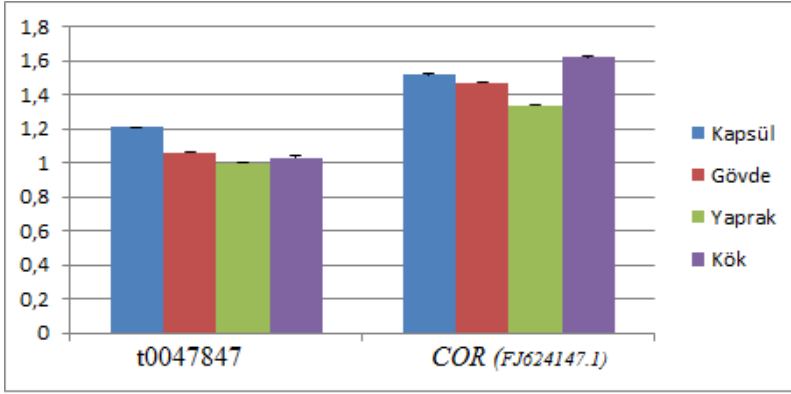


Şekil 5.13. pso-miR395 ve bu miRNAnun hedeflediği *APS4 Sulphate adenyltransferase* (AT5G43780) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü

pso-miR535'in S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) (NR1121) biyoenformatik olarak hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). Ancak yapılan RLM-RACE çalışmasında pso-miR535'in *Lipoxygenase* (LOX gene) (FM164378.1)' geninin hedeflediği tespit edilmiştir. Her iki gen içinde qRT-PCR primerleri hazırlanmasına rağmen (Çizelge 4.2.) sadece LOX geninde sonuç alınabilmiştir (Şekil 5.14.). pso-miR535'in hedef geni en fazla yaprak, en az gövdede ifade olmuştur. (Şekil 5.14.).

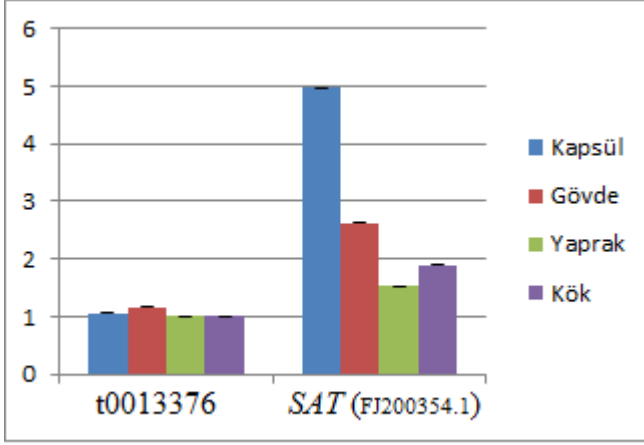


Şekil 5.14. *ps*-miR535'in hedeflediği *Lipoxygenase* (LOX gene) (FM164378.1)'e geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü



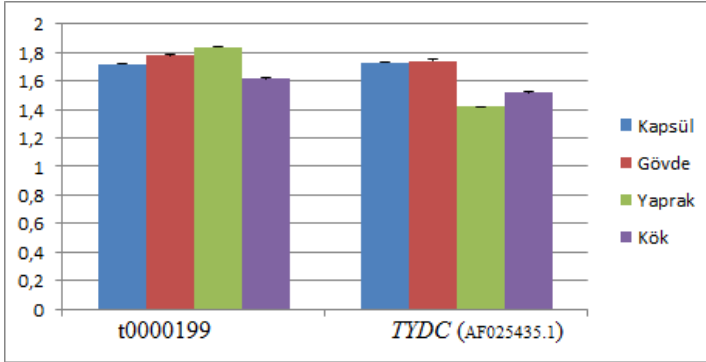
Şekil 5.15. t0047847 numaralı küçük RNA ve hedeflediği *COR* (FJ624147.1) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü

t0047847 numaralı küçük RNA'nın *COR* (FJ624147.1) genini hedeflediği biyoenformatik olarak tespit edilmiştir (EK-3). Ayrıca t0047847 numaralı küçük RNA ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.15.'de verilmiştir. Bu sonuca göre t0047847 en fazla kapsül, en az yaprak; hedef gen en fazla kök, en az yaprak da ifade olmuştur.



Şekil 5.16 t0013376 numaralı küçük RNA ve hedeflediği SAT (FJ200354.1) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü

t0013376 numaralı küçük RNA'nın SAT (FJ200354.1) genini hedeflediği biyoenformatik olarak tespit edilmiştir (EK-3). Ayrıca t0013376 numaralı küçük RNA ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.16.'de verilmiştir. Bu sonuca göre t0013376 en fazla gövde, en az yaprak ve kök; hedef gen en fazla kapsül, en az yaprak da ifade olmuştur.



Şekil 5.17 t0000199 numaralı küçük RNA ve hedeflediği TYDC (AF025435.1) geninin farklı dokularda ifade düzeyinin qRT-PCR ölçümü

T0000199 numaralı küçük RNA'nın TYDC (AF025435.1) genini hedeflediği biyoenformatik olarak tespit edilmiştir (EK-3). Ayrıca t0000199 numaralı küçük RNA ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.17.'de verilmiştir. Bu sonuca göre t0000199 en fazla yaprak, en az kök; hedef gen en fazla kapsül ve gövde, en az yaprak da ifade olmuştur.

qRT-PCR'da ölçülen miRNA ve genlere ait ortalama kantifikasyon (mean Quantification) değeri ve standart sapma değerleri EK-7' de verilmiştir.

5.8. miRNA Hedef Genlerinin Modifiye 5' RLM-RACE ile Bulunuşu

Pso-miR156, pso- miR157, pso-miR167, pso-miR535, pso-miR2, pso-miR3, pso-miR4, pso-miR5, pso-miR7, pso-mir11'in hedefledikleri genler modifiye 5' RLM-RACE ile deneysel olarak bulunmaya çalışılmıştır. Bu miRNA'ların biyoenformatik olarak bulunan olası tüm hedef genleri için primerler tasarlanmış bu primerler EK-8'de gösterilmiştir. Tasarlanan bu primerler kullanılarak yapılan bir dizi PCR sonrası elde edilen çeşitli boylardaki bantlar jelden kesilerek geri kazanılmıştır. Vektöre aktarılan cDNAların sdizi okumaları yaptırılmış, okunan diziler Viridiplantae veritabanında araştırılarak hangi genlere ait olduğu tespit edilmiştir. Toplamda 25 primer çifti kullanılmış. Fakat sadece 4 adet gen tespit edilebilmiştir. Bu genlerin ID ve isimleri Çizelge 5.8 gösterilmiştir.

Çizelge 5.8 Modifiye 5' RLM-RACE ile belirlenen miRNA'lara ait hedef genler

Sekans No	EST ID (GenBank) EST Adı	Protein ID (GenBank) Protein Adı
1	HO056196.1 0610_EST008 subtracted cDNA library of salt stress inducible ESTs in <i>P. Somniferum</i>	AJ841794.1 putative histidine-containing phosphotransfer protein 2 (hpt2 gene)
2	FG612593.1 stem_S087_G09.SEQ Opium poppy stem cDNA library	FJ156103.1 Norreticuline-7-O-methyltransferase gene
3	GO238857.1 EST0122 subtracted cDNA library of wound inducible ESTs in <i>P. somniferum</i> cDNA	GU985444.1 <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion, nad5 gene
4	FG613414.1 stem_S098_C07.SEQ Opium poppy stem cDNA library <i>Papaver somniferum</i> cDNA	FM164378.1 lipoxygenase (lox gene) <i>Capsicum annuum</i> cv. <i>Bardenas</i>

Pso-miR2 'nin hedeflediği F-box/Kelch-repeat protein (At1g30090) gen dizisi kullanılarak tasarlanan primer çiftleriyle PCR reaksiyonu yapılmıştır. RACE PCR sonucunda elde edilen bant Şekil 5.19.'da gösterilmiştir. Jelden geri kazanılarak vektöre aktarılan gen parçasının kontrolü M13 koloni PCR reaksiyonu ile yapılmıştır (Şekil 5.20.).

Koloniler içerisindeki gen parçasına ait bantlar Şekil 4.20.'de görülmektedir. Plazmidlerin dizi analizi sonucu Çizelge 5.9 verilmiştir. Bu sekans okuması BLASTn veritabanı kullanılarak hem Viridiplantae içerisinde hemde Papaver EST' verileri aranarak belirlenmiştir (Çizelge 5.8). Viridiplantae veri tabanı ile yapılan eşleşme sonucu Şekil 5.18 gösterilmiştir.

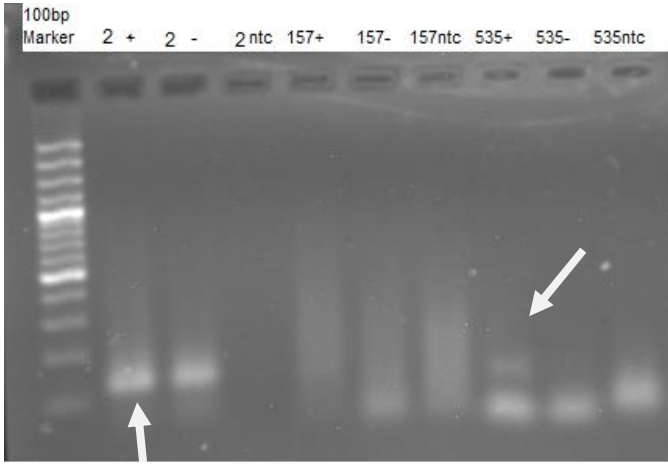
```
>|emb|AJ841794.1| Populus x canadensis mRNA for putative histidine-containing phosphotransfer
protein 2 (hpt2 gene), cultivar Dorskamp
Length=674

Score = 119 bits (64), Expect = 6e-25
Identities = 70/73 (96%), Gaps = 0/73 (0%)
Strand=Plus/Plus

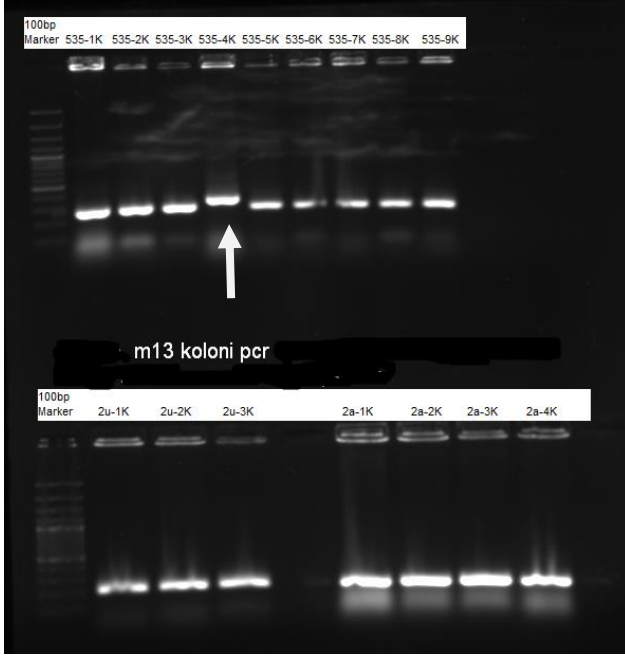
Query 53 GCGGCCGCCTGCAGGTCGACGATATGGTAGAGCTCGCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGA 112
Sbjct 511 ||||||||||||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
GCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATAITGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGA 570

Query 113 GTATTCTATAGTG 125
Sbjct 571 GTATTCTATAGTG 583
```

Şekil 5.18. pso-miR2'nin hedeflediği gene özgü primerler kullanılarak elde edilen gen parçasının BLAST sonucu



Şekil 5.19. pso-miR2, pso-miR157 ve pso-miR535in hedef genlerini bulmak için yapılan RACE PCR'in agaroz jel görüntüsü



Şekil 5.20. Plazmitler içerisinde yer alan pso-miR2 ve pso-miR535 in hedeflediği genlere ait gen parçalarının M13 koloni PCR görüntüsü

Çizelge 5.9. 5' Modifiye RLM-RACE çalışması sonucu okunan cDNA parçaları

<p>EST 1 CCTGATACCGACGTCGCTGCTCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATATCACTAGTGCGGCCGCTGCAGGTC GACGATATGGTAGAGCTCGCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATCTATAGTG</p> <p>EST2 CTGGGGCGACGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATTGCGGGATCCAACATCCTTCACGATTGGAACGATGAT GAATGCATTCAAATCTAAAGCGATGCAAAGATGTAGTATCAGCGGGAGGGAACTTATTATGGTTGAAATGGTATTGGA CGAGGATTCGTTTCATCCATATTCAAACTTAGACTCACATCTGATATAGATATGATGGTTAACAATGGAGGTAAGAGA GAACCGAAAAAGAATGGGAAAAGCTTTTGGATGCAGCAGGTTTTGCTAGTTGCAAATTTACTCAAATGTCAGTAGGTTTC GCAGCTCAATCTGTAATTGAGGTTTATTGATGATAATATATGTTGGGGAATCGGGTTTAGCCTATTTGGAGGGCGAGACTT TGTTAGCTTTAGACACTAACAAGGTGTTTCGATCCATTATTGGAACTGTTGTATCTTCAAGTAATTTTCATGGCTTCCAA AAATCTGATGTATTATGTTTGGCCCGGGCGCAATCACTAGTG</p> <p>EST3 CATAGTCAAAAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGACGCTAGCTATATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGTTGTTT TCGGGGAGTTGAAAAAGAAGGAAGATCAGCTCCTAGCTATCTCTTAGCTGATGAGTTGAGAACAAGTGGCGAAC</p> <p>EST4 GCCTGAGGCGACGTCGCATGCTCCGAGCCGCCATGGCCGCGGGATTTACTTGCACAGGCAGCAAGTGGCTTAATCTTTGA GACAAGCATATGACTACTGGCAGGATCAACCAGGTAATTCATCAAAGCCAGCAAGCGCAGTGTCATTCATCGCCATCAG CAATCACTAGTGCGGGCGCCTGCGGGTGCACCGTGTGGGAGAGGTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTAT AGTGTCACCTA</p>
--

Pso-miR535 'in hedeflediği S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) (NR1121) gen dizisi kullanarak tasarlanan primer çiftleriyle PCR reaksiyonu yapılmıştır. RACE PCR sonucunda elde edilen bant Şekil 5.19. gösterilmiştir. Jelden geri kazanılarak vektöre aktarılan gen parçalarının kontrolü M13 koloni PCR reaksiyonu ile yapılmıştır (Şekil 5.20.). Koloniler içerisindeki gen parçasına ait bantlar Şekil 5.23.'de görülmektedir.

Plazmidlerin dizi analizi sonucu Çizelge 5.9.'da verilmiştir. Bu sekans okuması BLASTn veritabanı kullanılarak hem Viridiplantae içerisinde hemde Papaver EST verileri aranarak belirlenmiştir (Çizelge 5.8.). Viridiplantae veritabanı ile yapılan eşleşme sonucu Şekil 5.21 gösterilmiştir.

```
>|emb|FM164378.1| U Capsicum annuum cv. Bardenas mRNA for lipoxygenase (lox gene)
Length=652

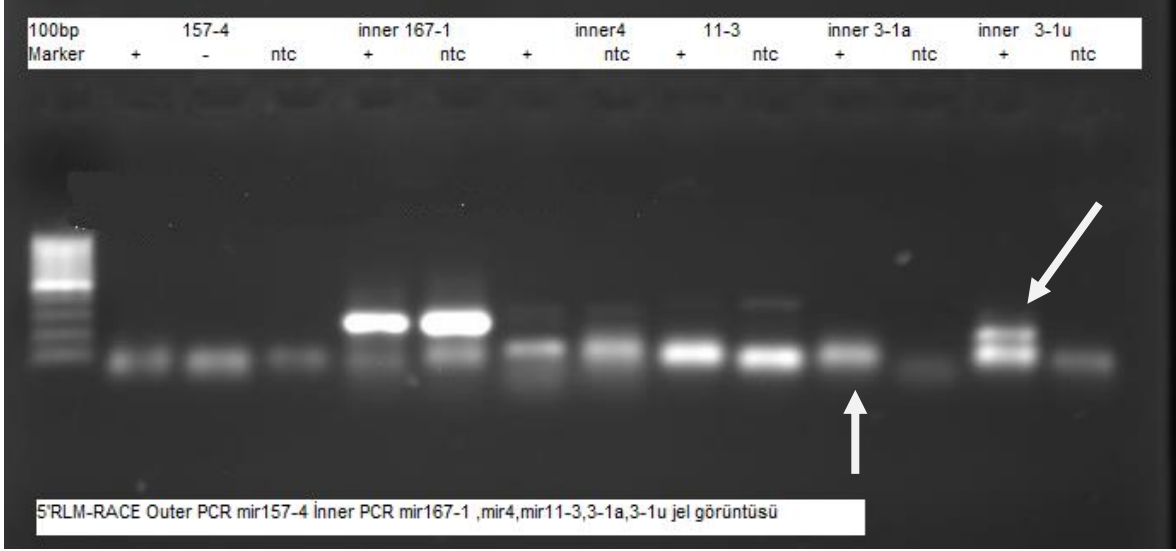
Score = 126 bits (68), Expect = 8e-27
Identities = 84/92 (91%), Gaps = 1/92 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 161 CAATCACTAGTGC GGGCGCCTGCGGGTCGACCGTGTGGGAGAGGTC CCAACGCGTTGGAT 220
          |||
Sbjct 322 CAATCACTANIGCGGGCGCCTG CAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCC CAGCGCGTTGGAT 263

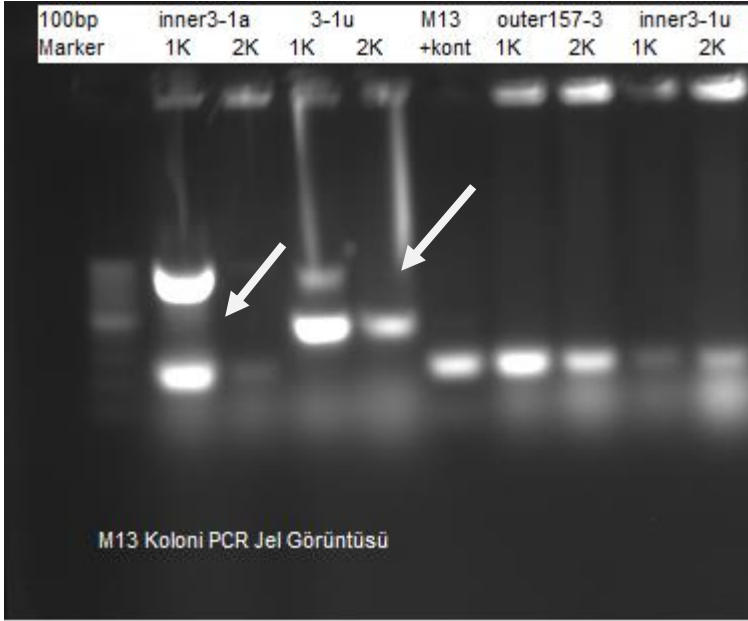
Query 221 GCATAGCTTGAGTATTCTA TAG-TGTCACCTA 251
          |||
Sbjct 262 GCATAGCTTGAGTATTCTA TAGATGTCACCTA 231
```

Şekil 5.21. pso-miR535'in hedeflediği gene özgü primerler kullanılarak elde edilen gen parçasının BLAST sonucu

Pso-miR3'ün hedeflediği putative retroelement pol polyprotein (NP455428) geni dizisikullanılarak tasarlanan primer çiftleriyle PCR reaksiyonu yapılmıştır. RACE PCR sonucunda elde edilen bant Şekil 5.22.'de gösterilmiştir. Jelden geri kazanılarak vektöre aktarılan gen parçalarının kontrolü M13 koloni PCR reaksiyonu ile yapılmıştır (Şekil 5.23.). Koloniler içerisindeki gen parçasına aitbantlar Şekil 5.23'de görülmektedir. Plazmidlerin dizi analizi sonucu Çizelge 5.9'da verilmiştir. Bu dizi okumaları BLASTn veritabanı kullanılarak hem Viridiplantae içerisinde hemde Papaver EST verileri aranarak belirlenmiştir (Çizelge 5.8.). Viridiplantae veritabanı ile yapılan eşleşme sonucu Şekil 4.24.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.22. *psa*-miR157, *psa*-miR167, *psa*-miR4, *psa*-miR11 ve *psa*-miR3'ün hedef genlerini bulmak için yapılan RACE PCR'in agaroz jel görüntüsü



Şekil 5.23. Plazmitler içerisinde yer alan *psa*-miR3 ve *psa*-miR157 nin hedeflediği genlere ait olduğu düşünülen gen parçalarının M13 koloni PCR görüntüsü

>gb|FJ156103.1| Papaver somniferum norreticuline-7-O-methyltransferase gene, complete cds
Length=2287

Score = 821 bits (444), Expect = 0.0
Identities = 448/451 (99%), Gaps = 0/451 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 54 AACATCCTTCACGATIGGAACGATGATGAATGCATTCAAATCTAAAGCGATGCAAAGAT 113
Sbjct 1658 AACATCCTTCACGATIGGAACGATGATGAATGCATTCAAATCTAAAGCGATGCAAAGAT 1717
Query 114 GTAGTATCAGCGGGAGGGAAACTTATTATGGTTGAAATGGTATTGGACGAGGATTCGTTT 173
Sbjct 1718 GTAGTATCAGCGGGAGGGAAACTTATTATGGTTGAAATGGTATTGGACGAGGATTCGTTT 1777
Query 174 CATCCATATTCAAAACCTTAGACTCACATCTGATATAGATATGATGGTTAACAAATGGAGGT 233
Sbjct 1778 CATCCATATTCAAAACCTTAGACTCACATCTGATATAGATATGATGGTTAACAAATGGAGGT 1837
Query 234 AAAGAGAGAACCAGAAAAGAATGGGAAAAGCTTTTTGATGCAGCAGGTTTTGCTAGTTGC 293
Sbjct 1838 AAAGAGAGAACCAGAAAAGAATGGGAAAAGCTTTTTGATGCAGCAGGTTTTGCTAGTTGC 1897
Query 294 AAATTTACTCAAATGTCAGTAGGTTTCGCAGCTCAATCTGTAATGAGGTTTATTGATGA 353
Sbjct 1898 AAATTTACTCAAATGTCAGTAGGTTTCGCAGCTCAATCTATAATGAGGTTTATTGATGA 1957
Query 354 TAATATATGTTGGGGAATCGGGTTTAGCCTATTGGAGGGCGAGACTTTGTTAGCTTTAG 413
Sbjct 1958 TAATATATGTTGGGGAATCGGGTTTAGCCTATTGGAGGGCGAGACTTTGTTAGCTTTAG 2017
Query 414 ACASTAACAAAGGTGTTTCGATCCCAATTATGGAAACTGTGTAICTTCAAGTAAITTCAT 473
Sbjct 2018 ACASTAACAAAGGTGTTTCGATCCCAATTATGGAAACTGTGTAICTTCRAGTAAITTCAT 2077
Query 474 GGCTTCCAAAATCTGATGTATTATGTTGG 504
Sbjct 2078 GGCTTCCAAAATCTGATGTATTATGTTGG 2108

```

A

>gb|GU985444.1| D Triticum aestivum mitochondrion, complete genome
Length=647559

Sort alignments for this subject sequence by:
E value Score Percent identity
Query start position Subject start position

Score = 154 bits (83), Expect = 2e-35
Identities = 108/120 (90%), Gaps = 2/120 (2%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1 CATAGTCAAAAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTAGCTATATGCTTAACAC 60
Sbjct 67868 CATAGTCAAAAATCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGAAGGAACGCTAGCTATATGCTTAACAC 67809
Query 61 ATGCAAGTCGAACGTTGTTTTCGGGGAGTTGGAAAAAGGAAGATCAGCTCCTAGCTA 120
Sbjct 67808 ATGCAAGTCGAACGTTGTTTTCGGGGAGCTGGGCA--GAAGGAAAAGAGGCTCCTAGCTA 67751

```

Score = 154 bits (83), Expect = 2e-35
Identities = 108/120 (90%), Gaps = 2/120 (2%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1 CATAGTCAAAAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTAGCTATATGCTTAACAC 60
Sbjct 222596 CATAGTCAAAAATCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGAAGGAACGCTAGCTATATGCTTAACAC 222537
Query 61 ATGCAAGTCGAACGTTGTTTTCGGGGAGTTGGAAAAAGGAAGATCAGCTCCTAGCTA 120
Sbjct 222536 ATGCAAGTCGAACGTTGTTTTCGGGGAGCTGGGCA--GAAGGAAAAGAGGCTCCTAGCTA 222479

```

Score = 154 bits (83), Expect = 2e-35
Identities = 108/120 (90%), Gaps = 2/120 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 CATAGTCAAAAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTAGCTATATGCTTAACAC 60
Sbjct 516573 CATAGTCAAAAATCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGAAGGAACGCTAGCTATATGCTTAACAC 516632
Query 61 ATGCAAGTCGAACGTTGTTTTCGGGGAGTTGGAAAAAGGAAGATCAGCTCCTAGCTA 120
Sbjct 516633 ATGCAAGTCGAACGTTGTTTTCGGGGAGCTGGGCA--GAAGGAAAAGAGGCTCCTAGCTA 516690

```

B

Şekil 5.24. ps0-miR3'ün hedeflediği gene özgü primerler kullanılarak elde edilen gen parçasının BLAST sonuçları. A elde edilen bantlardan üsteki, B alttaki bantın sonucu

Tespit edilen bu 4 adet genin içerisinde sadece 1 adet miRNA kesim bölgesi yakalanabilmiştir. *pso-miR535* 'in hedeflediği düşünülen S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) (NR1121) geni için tasarlanan primerle ile yakalanan gen parçasının BLAST sonucunda *lipoxigenase* (LOX gene) *Capsicum annuum* cv. *Bardenas* (FM164378.1) genine ait olduğu bulunmuştur (Şekil 5.21). Gen üzerinde miRNA ait kesim noktası ayrıca bulunarak Şekil 5.25.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.25 *pso- miR535* ve Lox geninin komplementer bölgesi. Dikey çizgiler ve sarı renkle işaretli bazlar eşleşmeyi gösteriyor.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. Derinlemesine Dizileme Sonucu Elde Edilen miRNA'lar

Hayvan miRNA'larının tam tersine bitkilerde total küçük RNA'ların sadece %1-2 lik kısmı miRNA'dır. Bitkilerde birçok türe ait miRNA tanımlama ve karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Bunlardan bazıları zeytin (73), arpa (67), şeftali (71), *Festuca* (85) ve *Brachypodium* (1) dur.

miRNA'lar 18-24 nükleotid uzunluğundadır. Hayvan miRNA'ları çoğunlukla 22 nükleotid uzunluğunda olup frekans yüzdesinde tek pik olarak kendini gösterir. Fakat bitkilerde genellikle 2 pik (biri 21 nükleotit diğeri 24 nükleotit) gözlenir (143). Derinlemesine dizileme tekniği ile miRNA profili çıkarılan yonca (144), yer fıstığı (145), pamuk (146), mısır (107), pirinç (147), salatalık (148) ve portakal (149) gibi bitkilerde de miRNA'ların çoğunluğunun 24 nükleotid uzunluğunda olduğu saptanmıştır. Bu çalışma kapsamında da elde edilen haşhaş miRNA'ları çoğunlukla 24 nükleotid uzunluğundadır (Şekil 5.3.).

Derinlemesine dizileme ile toplam 124 miRNA ailesi tespit edilmiştir (Çizelge 5.3.). Korunmuş miRNA ailelerinden miR156/157, miR159, miR160, miR166, miR171, miR408, miR390 ve miR395 yosunlar (bryophyta) dan kapalı tohumlara (angiosperm) kadar tüm bitkiler aleminde görülmektedir miR162, miR164, miR167, miR168, miR169, miR172, miR393, miR394, miR399, miR827, miR396, miR397, miR398 ve miR530 (yosunlar hariç) ise kapalı tohumlular (angiosperm) dan tek çenekli (monokotil) ve çift çenekli (eudikotil) sınıflarında bulunmaktadırlar. miR2111'e eudicot altında yer alan tüm familyalarda (Solanaceae hariç) görmekteyiz. miR472 sadece Rutaceae, Salicaceae, Brassicaceae familyalarında görülmektedir. miR482 kapalı tohumlardan (gymnosperm) başlayarak hemen hemen tüm familyalarda bulunmaktadır. miR528'e sadece tek çeneklilerde (monocotil) rastlamaktayız. miR535 eğrelti otlarından (pteridophyta) başlayarak tüm bitkiler aleminde görülmektedir (Çizelge 5.3.) (4, 150).

Haşhaştan dizilenen tüm korunmuş miRNA aileleri (pso-miR528 ve miR2275 hariç) daha önceden elde edilen verilerle paralellik göstermektedir. Pso-miR528 ve miR2275 şu anda tek çeneklilere özgü bir miRNA olarak kabul edilsede diğeri bitki türlerinde yapılacak olan miRNA tespit ve karakterizasyon çalışmaları ile bu durum değişecektir.

Korunmuş miRNA ailelerinden haşhaşa en çok ifade edilenler sırasıyla; pso-miR535, pso-miR156, pso-miR168, pso-miR167, pso-miR166, pso-miR172'dir (Çizelge 5.3.). Benzer şekilde ifade seviyesi fazla olan bu miRNA'lar diğer bitkilerde yapılan ifade seviyesi ölçme çalışmalarında yakın sonuçlar vermiştir. Genel olarak bitkilerde gelişim sürecinde ilgili genlerin ve transkripsiyon faktörlerin hedeflenerek regüle edilmesini bu miRNA'lar sağlaması sebebiyle korunmuş miRNA'ların ifade düzeylerinde fazlalık görülmektedir (74, 88, 107, 144, 146-149). Korunmamış miRNA'lar genelde türe özgü olan miRNA'lardır. Korunmuş miRNA'lara göre ifade düzeyleri azdır (150). Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar bu açıdan mevcut literatür ile uyum göstermektedir.

Yeni haşhaş miRNA'ların pre-miRNA uzunluğu 88–214 nt arasındadır (EK-4). Ayrıca pre-miRNA'ların minimum katlanma enerji indeksi 0,77-1,23 arasında olup bariz şekilde diğer RNA tiplerinin [tRNAs (0.64), rRNAs (0.59) ve mRNA (0.62–0.66)] MFEI değerinden yüksektir (151). Yeni haşhaş miRNA'larında rastlanan bu sonuçların benzerlerine *A. thaliana*, *O. sativa* (78), *P. yezoensis* (152), *C. sativus* (148) ve *A. hypogaea* (153)'de de rastlanmıştır.

Yeni haşhaş miRNA'ları miRNA veritabanında aranarak homologları bulunmuştur. Bunlar miR2 nin *V. vinifera*; miR3 *A. lyrata*; miR4'ün *A. lyrata*, *M.trunculata*, *P.trichocarta*, *A. auriculiformis*; miR5'in *A.lyrata*, *O. sativa*; miR7 nin *A.thaliana*, *O.sativa* ve miR11'in *A. lyrata*, *G.max*, *O. sativa*, *C.sinensis*. Toplam 7 yeni miRNAdan 6 sı diğer bazı türlerde de mevcuttur (Çizelge 5.5.). Ayrıca yeni miRNA'ların korunmuş miRNA'lara kıyasla daha az ifade olduğu belirlenmiştir. Yeni miRNA'ların türe, çeşitli büyüme aşamalarına veya dokuya özgü ifade olduğu bundan dolayı korunmuş miRNA'lara göre daha az ifade edildiği düşünülmektedir (153).

6.2. miRNA Mikroarrayi Sonucu Bulunan miRNA'lar ve Hedefledikleri Genler

miRNA'lar post-transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası seviyede) olarak genlerin ifadesini düzenler. Öte yandan transkripsiyon ürünü olan miRNA'larda ifade düzeyinde değişikliğe uğrar. Dolayısıyla hedeflediği genin ifade düzeyini regüle ettirmesi kendi ekspresyon seviyesindeki farklılıkla belirlenmiş olur. Bitkilerde gerek doku spesifik gerekse stress durumlarında miRNA'lara ait ifade düzeyinin genom seviyesinde tespiti için

mikroarray yaklaşımından yararlanılmaktadır (9, 20, 91). miRNA'ların bütüncül olarak farklı dokulardaki ifade düzeyinin belirlenmesi amacıyla mikroarray analizlerine başvurulmuştur. Analiz sonuçlarının yorumlanmasında miRNA'lar tarafından hedeflenen genlerin belirlenmesi ve bu genlerin katıldığı mekanizmalar, biyolojik prosesler, içinde bulunduğu yolaklar ve gen ontolojilerinden faydalanılmıştır.

Genellikle bitkilerde miRNA'lar ve bunların hedefledikleri mRNA'lar arasında 4'den daha fazla 'mismaç' uyumsuzluk bulunmaz (41, 151, 154). mRNA hedef transkriptleri büyük çoğunluğu transkripsiyonel faktörlerle bir kısmı ise bitki metabolizması ve çevresel strese yanıtla bağlantılıdır (9).

miR474, miR529, miR1148, miR1314, miR1436, miR1450, miR1858, ve miR2919 dışında mikroarrayde tespit edilen miRNA'lar derinlemesine dizileme sonuçları ile aynı olduğu tespit edilmiştir..

Haşhaşa miR535 derinleme dizileme sonucuna göre bitkinin genelinde çok sayıda ifade edildiği belirlenmiştir (Çizelge 5.3). Fakat bu miRNA'nın ifade düzeyinin kapsülde diğer dokulara oranla daha az olduğu tespit edilmiştir (Çizege 5.5.). Ayrıca miRNA535 için yapılan hedef gen taramasında miRNA535'in fonksiyonu bilinmeyen bir proteini, glutamine amidotransferaz ve S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) (*Triticum aestivum* transkriptleri içerisinde) genlerini hedeflediği biyoenformatik olarak bulunmuştur (Çizelge 5.6.). Ayrıca miR535'in hedefini bulmaya yönelik RLM-RACE çalışmasında miR535'in LOX genini hedeflediği belirlenmiştir. Hem LOX hemde SAMDC geni alkaloit üretim mekanizmasında rol almaktadır. SAMDC geni bir çeşit polyamin olan spemidin biyosentezinde rol oynar. Spermidin ise pirolizidin alkaloitlerin sentezlenmesinde öncül bileşik olarak rol alır (155-157). Lipoxygenaz enzimi linoleik asit üzerinden jasmonik asit sentezinde rol alır. Jasmonik asit oluşumu bitkide berberine ve sanguarin gibi alkaloitlerin oluşumunu etkilemektedir (33, 158-161). Ayrıca LOX geni meyvanın olgunlaşmasında da görev almaktadır (158). Ham üzüm ile yarı olgun üzüm de vvi-miR535 in ifadesinde çok ciddi bir değişiklik olmazken, olgun üzümde vvi-miR535 in çok fazla ifade edildiği belirlenmiştir (162). Yine aynı çalışmada, bu çalışmada elde edilen bulguları doğrulayarak, vvi-miR535 in en fazla kökte, sonra yaprakta, sonra da gövde ifade edildiği ispatlanmıştır. Kapsülde bu miRNA'nın az ifade edilmesi hedeflediği SAMDC ve LOX genlerinin diğer dokulara göre kapsülde daha fazla çalıştığı anlamına gelmektedir.

Diğer dokulara göre kapsülde daha az ifade olan bir diğer miRNA pso-miR530 dir. Bu miRNA'nın olası regüle ettiği genler biyoenformatik analizlerle araştırılmış ve serine asetiltransferaz 5 (SERAT1;1) ulaşılmıştır (Çizelge 5.6.). Bu genin gen ontolojisine bakıldığında ise jasmonik asit cevabı, jasmonik asit biyosentezi ve yaralanma cevabı gibi bitkinin savunma sistemini harekete geçirecek genlerle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Dolaylı yoldan alkaloid üretimini etkileyen bu miRNA'nın kapsülde düşük olması da bu sonucu teyit etmektedir.

miR172 bitkilerde gelişimsel aşamalardan olan vejetatif faz değişimi ve çiçeklenme zamanının belirlenmesi aşamalarında görev almaktadır (8, 10, 163, 164). Bu miRNA'nın hedeflediği genler *toe1*, *toe2*, *toe3*, *ids1*, *gloy15* dir. Ayrıca AP2 tipi transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek soğuk ve kuraklık stresi ne karşı cevapta da rol alır (17, 63). pso-miR172 kapsülde diğer dokulara göre az, pso-miR156 ise çok ifade olmuştur (Çizelge 5.5.). Yapılan çalışmalar miR172 ile miR156'nın birbirleriyle antagonist çalışan miRNA'lar olduğunu göstermiştir. miR156'nın miktarındaki artış miR172'nin azalmasına, bununla beraber bir fazdan diğer faza geçişde kısıtlama, gençlik fazının uzaması ve çiçeklenmenin gecikmesi ile sonuçlanırken; miR172'nin artmasıyla olgun yaprak özelliklerinin erkenden görülmesi, erken çiçeklenme ile sonuçlanmaktadır (163, 165-168). Bitki örneklerimiz genç kapsül döneminde toplanmıştır. Bu dönem itibariyle (pso-miR156'nın çok ifade edilmeside bu durumu doğrulamaktadır) bitkimiz tam olarak yetişkin faza geçmemiştir (9).

Pso-mir529 kapsülde az ifade olmaktadır (Çizelge 5.5.). Bu miRNA'nın hedeflediği genler arasında Alpha amylase family protein (Çizelge 5.6.). Bu gen post embriyonik dönemde etkinlik kazanmakta, bu gende oluşan bir mutasyon bitki için ölümcül olmaktadır (169). miR166 haşhaş bitkisinde çok fazla ifade olan miRNA'lardan biridir. 82486 okuma sayısı ile 3. sırada yer almaktadır (Çizelge 5.3). Bu miRNA mikroarrayleri analizi kapsamında aynı şekilde 166a miRNAsının homologlarının çokça ifade edildiği bulunmuştur (Çizelge 5.5.). Bir diğer husus ise bu miRNA'nın bütün homolog problemlerinde diğer dokulara göre kapsülde daha az ifade ettiği (Çizelge 5.5.). Pso-miR166 class III homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP III) genini hedeflemektedir (Çizelge 5.6). Bu gen yaprak, meristem ve tohum gelişiminde rol oynar. Bu genin gen ontolojisine bakıldığında ise döllenme sonrası embriyonik kalıbın belirlenmesi, integümentlerin gelişimi ve tohum kabuğu (testa) nun

oluşumu ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bitkinin genelinde çok ifade olan bu miRNA kapsülde az ifade olması bu miRNA'nın tohum gelişim süreci ile ilgili olduğunu ispatlamaktadır (7, 82, 83, 170).

Haşhaşa miR319 homologları (zma, aqc, gma, vb) yapılan miRNA mikroarrayleri sonucunda kapsül dokusunda diğer dokulara kıyasla çok, yaprak dokusunda az ifade edilmekte olduğu (Çizelge 5.5.) bulunmuştur. Bu miRNA daha derinlemesine dizileme çalışma kapsamında tüm haşhaş bitkisinde 972 kez okunmuştur (Çizelge 5.3.). Bu miRNA'nın yaprak morfogenezinde rol aldığı bilinmektedir (6, 80, 171).

Pso-miR474 korunmamış miRNA'larda olup biyoenformatik olarak pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein hedeflemektedir (Ek-6). Bu protein özellikle kloroplastlar ve mitokondrilerde yer alarak bu organellerin transkriplerine bağlanmaktadır (172). Bu çalışma bu miRNA'nın neden yaprakta az çalıştığını ispatlamaktadır.

Köklerde miRNA ifade düzeyleri araştırması yapılacak olursa özellikle 168 miRNA'sına ait farklı bitki miRNA homologlarının haşhaşa diğer dokulara göre daha az ifade ettirildiği görülecektir (Çizelge 5.5.). Bu miRNA'nın doğrudan doğruya köklerle ilişkisinin varlığı birçok çalışmada gösterilmiş (18, 173) olup buradaki profille tutarlılık göstermektedir.

miR164, potansiyel olarak iki lokus olan miR164a ve miR164b genlerinden ifade edilir (174) ve NAC-domain transkripsiyon faktör gen ailesindeki alt set genleri hedeflediği tahmin edilmektedir (154). *Petunia* no apical meristem (NAM), *Arabidopsis* ATAF1 ve ATAF2, *Arabidopsis* CUP-SHAPED COTYLEDON2 (CUC2) olarak isimlendirilen bu gen ailesi, bitkilerle sınırlıdır ve *Arabidopsis*'te 100'den daha fazla sayıdadır . 5 adet *Arabidopsis* NAC-domain mesajı 3 veya daha az 'mismaç'li olarak miR164'e eşlenik 'komplementer'dir (154). Bunlar NAC1, CUC1, CUC2, At5g07680 ve At5g61430'dir. CUC1 ve CUC2'nin, embriyonik ve çiçek gelişiminde rolü bulunmaktadır (7). miR164 komplementerli NAC-domain genleri, embriyonik, vejetatif ve çiçeklenme gelişiminin yani normal bitki morfolojisinin temelidir. Argonatlar (AGOs) küçük RNA'ların doğrudan düzenleyici yol ağlarında rol oynayan proteinleridir. Bir model bitkisi olan *Arabidopsis*, 3 filogenetik sınıfa ayrılan 10 AGO proteinleri bulundurur (175). AGO gen ailesi nin üyelerinden ATAGO1, ATAGO10 ve ATAGO5, pleiotropik gelişme eksikliği ortaya çıkan *Arabidopsis* mutantları üzerinden tespit edilmiştir. AGO1, miRNA yol ağında rol oynar ve

ago1 mutantları yoluyla organ polarite eksiklikleri ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. Ago1 mutantlarında miRNA birikimi azalır ve miRNA hedefli mRNA birikimi artar, dolayısıyla AGO1 miRNA yol ağlarının bütünlüğü için gereklidir (175). miR164 'ün daha az ifade olduğu bitkilerde daha fazla NAC1 mRNA ları eksprese olmuş; bu durum daha fazla lateral kök oluşumuna neden olmuştur (8, 11). Bu sonuç pso-miR164'ün neden kapsülde az ifade olduğunu açıklamaktadır (Çizelge 5.5.). Ayrıca pso-miR164 bitkinin tümünde çok ifade olmaktadır (Çizelge 5.3.) miR164'ün çok ifade olunmasıyla hedeflediği *NAC1*, *ORE1* vb. genlerin ifadelerinde azalma gözlenir. ORE1 gen ürünü genetik ve fenotipik yaşlılığın belirtisi olan klorofil yıkımı ve *SAG12* geninin ekspresyonunu artırır (80, 81). Bu miRNA hala haşhaş da fazlaca ifade ediliyor olması bitkide yaşlanmanın henüz başlamadığını ifade etmektedir.

miR160 ve miR167 aynı gen ailesini hedeflemektedirler. *AUXIN RESPONSE FACTOR* (*ARF*) transkripleri bitkide yan köklerin oluşumunun kontrol eden bir gen ailesidir. *ARF17*, (negatif düzenleyici) miR160 tarafından hedeflenirken, *ARF6* ve *ARF8*, miR167 tarafından hedeflenerek yan kök oluşumunda pozitif düzenleyiciler olarak rol almaktadırlar. Haşhaş bitkisini bütününe bakılacak olursa pso-miR167'nin daha çok ifade edildiğini rahatlıkla görebiliriz. Mikroarray sonuçlarında miR167 kökte az, miR160 ise kökte çok ifade edilmiştir. miR167 nin az ifade olması yan köklerin artması anlamına gelmektedir.

miR1450 ise haşhaşta kök dokusunda diğer dokulara göre daha fazla ifade edilmiştir (Çizelge 5.7). miR1450'nin hedeflediği genlerin gen ontolojisi yapıldığında bu miRNA'nın tuz ve susuzluk stresinde fazla ifade edildiği saptanmıştır (176). miR1450'nin kökte fazlaca ifade edilmesi de bitkinini susuzluk stresine maruz kaldığının bir göstergesi olabilir. miR396'nın diğer dokulara göre en fazla kökte ifade edildiği görülmüştür (Çizelge 5.5.). Yapılan çalışmalar miR396'nın *GROWTH-REGULATING FACTOR* (*GRF*) ü regüle ettiği ve bu sayede hücre bölünmesini ve meristemin büyüklüğünü düzenlediği bulunmuştur (177). Dolayısıyla kökte bu miRNA'nın seviyesinin fazla olması normal olarak beklenebilir.

miR390 ARF gen ilesinden ARF2, ARF3 ve ARF4 ü baskılayarak kök gelişim zamanının düzenleyen bir yolak da görev almaktadır. Fakat pso-miR390 kökte çok ifade olmuştur (Çizelge 5.5.) (12, 178, 179). Bitkinin içinde bulunduğu dönem itibariyle yan köklere ihtiyaç duymadığı sonucuna varılabilir.

miR2916 bitkiler aleminde sadece *Populus euphratica* türünde bulunmuştur. Bu miRNA'nın hedeflediği genin gen ontolojisine bakıldığında giberillik asit cevabıyla bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.7.). Giberillik asit ise özellikle boy uzamasını teşvik etmektedir (180). Mikroarray sonucunda miR2916'nın en az gövde de ifade olduğu tespit edilmişti (Çizelge 5.5.) Dolayısıyla hedeflediği genin gövdede fazla çalıştığı rahatlıkla söylenebilir.

Pso-mir1858 en az kökte en fazla gövdede ifade olmaktadır (Çizelge 5.5). Bu miRNA'nın hedef genlerinden biri transducin family protein / WD-40 repeat family protein dir (EK-6). Bu genin gen ontolojisine bakıldığında yan köklerin oluşumunu indüklediği görülmüştür (Çizelge 5.7.). Bu nedenden pso-miR1858'in kökte az ifade olduğu düşünülmüştür.

miR1314'ye şimdiye kadar sadece *Pinus* türlerinde rastlanmıştır (4). Derinlemesine dizileme sonucuna göre haşhaş bitkisinin tümünde hemen hemen hiç ifade olmamaktadır (Çizelge 5.3.). Fakat mikroarray sonucuna göre bu miRNA sadece kapsülde aşırı derecede ifade edilmektedir (Çizelge 5.5.). miR1314'ün hedef geni biyoenformatik olarak araştırıldığında Ergosterol biosynthesis ERG4/ERG24 family geniyle karşılaşmaktayız (Ek-6). Fakat lipid metabolizmasıyla ilişkili bu genin yağ üretiminin yapıldığı kapsülde az ifade olması ve hiç ifade olmaması mümkün değildir. Bu nedenle bu miRNA'nın aslında farklı genleri hedeflediği düşünülmektedir.

Bitki gelişimini düzenleyen miRNA'lardan haşhaş bitkisinde de tespit edilen miRNA171, miRNA156 ve miRNA166'nın hedef genleri bulunmaktadır. Bunların bitkilerde çiçek morfolojisinin ve çiçeklenme zamanının kontrolü, yaprak ve kök gelişimini sağladığı tespit edilmiştir (9). Transkripsiyon faktörler, gen ifadesi ve protein sentezi sürecinde rol oynayan önemli aktörlerdir. Genellikle spesifik bir DNA dizisine bağlıdır ve DNA'dan RNA'ya transfer edilen genetik bilgiyi kontrol ederler (88) ve bitki gelişimini düzenlerler (78). Scarecrow-like (SCL) ailesi, bitki gelişim sürecinde yaygın oranda kontrol sağlayan bitkiye spesifik transkripsiyon faktörlerinin bir sınıfıdır. SCL ailesinin bir üyesi olan SCL6 geni, miR171'in potansiyel hedefidir. Pso-miR171 korunmuş miRNA'lardan olup haşhaş bitkisinde hem derinlemesine dizileme (Çizelge 5.3) hem de miRNA mikroarray (Çizelge 5.5.) çalışmaları ile tanımlanmıştır. Pso- miR171 (a-f) haşhaş bitkisinde yaprakta diğer dokulara göre daha fazla ifade ettirildiği görülmüştür. Bu miRNA Scarecrow-like

transcription factor 6 (SCL6) geninin regüle etmektedir. Yapılan çalışmalarda bu miRNA'nın köklenmeyi düzenlediği bulunmuştur (107). Dolayısıyla köklerde daha az bulunup yapraklarda daha fazla ifade ettirileceği miRNA arraylerinden çıkarılabilir (Çizelge 5.5.). *Arabidopsis*'teki fonksiyonel çalışmalar, miR171'in çiçeklenme ve çiçek oluşturan dokularda SCL6 mRNA'sının baskın ekspresyonunu hedeflediğini göstermiştir (49, 181). Scarecrow transkripsiyon faktörlerinin gelişimdeki rolleri gibberellin sinyal transdüksiyonu, aksiler meristem oluşumu, gametogenez ve kök radyal oluşumu gibi bitki büyüme ve gelişimi düzeylerindedir. Kuraklık metabolizmasına yanıtta Scarecrow mRNA'sının ifade seviyesi yaprakta azalmaktadır ancak su alımını artırmak için kökte yüksek düzeyde düzenleyicidir (65, 70, 91).

Pso-miR854 korunmamış miRNA ailesinden olup, derinlemesine dizilemede (Çizelge 5.3.) ve miRNA mikroarray çalışmalarının her ikisinde de (Çizelge 5.5.) tespit edilmiştir. Bu miRNA'nın hedeflediği genlerden bir tanesinde MYB transkripsiyon faktörlerinden MYB98'dir. (EK-6). MYB98 dişi organda sinerjit hücrelerin ve polen tüpünün oluşumundan sorumludur. Bitki döllenip yeni tohumlar oluşunca; MYB98'in en yüksek ifadeye sahipken tozlaşmadan 3 gün sonra MYB98'in ifadesinde düşüş başlar (182). Bu çalışma pso-miR854'ün ve benzer şekilde MYB transkripsiyon faktörlerini hedefleyen pso-miR159c-e ve pso-miR159g nin neden kapsülde fazla ifade olduğunu ispatlamaktadır (Çizelge 5.5.). pso-miR159a-b ve pso-mir159f ise kökte fazla, yaprakta az ifade olmaktadır (Çizelge 5.5.). GAMYB-like transkripsiyon faktörü ailesi toplamda 7 adet gen içermektedir bunlardan MYB33 ve MYB65'in dışındaki 5 gen miR159a ve mir159b'nin olmadığı dokularda yüksek oranda ifade edilmektedir. MYB33'ün miR159 ile komplementer olduğu bölgede oluşturulacak bir mutasyon sonrasında morfolojik olarak yaprakta değişim gözlenmiştir (9). Bu çalışma miR159a-b, miR159f ile miR159c-e, miR159g nin neden dokularda farklı ifade düzeyleri olduğunu açıklamaktadır.

Korunmuş miRNA'lardan olan miR397 haşhaş bitkisinde gövde dokusunda daha az ifade edildiği belirlenmiştir (Çizelge 5.5). Bu miRNA'nın hedeflediği TBL14 | TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 14 geninin gen ontolojisi yapıldığında lignin sentezi ile ilişkisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.7.) (183). Gövde dokusunun kalınlaşması, pso-miR397'nin gövdede az ifadesi ile mümkündür.

miR395 bitkilerde sülfat açlığından çok kuvvetli etkilenir ve bitkide ifadesi hızla artar. Sülfat homeostazında da çok önemli bir yere sahiptir. miR395'in fazla ifade olması sülfatın köklerden hızlı bir translokasyon ile yapraklarda birikmesine neden olmaktadır (184). Haşhaşa bu miRNA bitkinin genelinde çok düşük oranda ifade olmuş (Çizelge 5.3.), miRNA mikroarray çalışması sonucunda ise kökte az ifade olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.5.).

Pso-miR2919'un kapsülde çok yaprakta az ifade olduğu miRNA mikroarrayi ile belirlenmiştir. Bu miRNA'ya sadece *Oryza sativa* bitkisinde rastlanmıştır. Biyotik ve abiyotik strese maruz bırakılan *O. sativa* bitkisinde bir çok yeni miRNA keşfedilmiştir. miR2919 ise strese maruz kalmayan kontrol bitkilerinin sürgün dokusunda tespit edilmiştir (185). Bu miRNA'nın biyoenformatik olarak hedeflediği gen bilinmemekle beraber bu miRNA'nın yaprakta az ifade olmasının, yaprakta işlevi olan bir geni hedefliyor olabileceğini düşündürmektedir.

pso-miR2911 kapsülde az, yaprakta çok ifade olmaktadır (Çizelge 5.5.) Bu miRNA *Helianthus annuus*, *Nicotiana tabacum* ve *Populus euphratica* olmak üzere toplam 3 bitkide tespit edilmiştir (4). Yaprakları yaralanarak veya budanarak strese maruz bırakılan *N.tabacum* bitkisinde miR159, miR319 ve miR2911'in budama stresine maruz kalan bitkide fazla ifade olduğu, yaralanma stresinde bu miRNA'nın az ifade olduğu veya ifadesinde bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (186). Biyoenformatik olarak da fonksiyonları bilinmeyen 3 adet geni hedeflediği bilinmektedir (EK-6). Sonuç olarak bu miRNA'nın kapsülde az ifade olması bu dokuda fazla ifade olması istenen bir geni hedeflediğini düşündürmektedir.

pso-miR1148, kökte az gövdede çok ifade olan bir miRNA olup, sadece tek hücreli bir alg olan *Chlamydomonas reinhardtii* 'de tespit edilmiştir (187). Bu miRNA'nın kökte az ifade edilmesinden kök ile ilgili bir geni hedeflediği sonucu çıkarılabilir.

pso-miR1436 özellikle monokotillere özgü bir miRNA'dır. Kapsülde çok (Çizelge 5.5.) ifade olan bu miRNA'nın *O. sativa*'da hypothetical protein hedeflediği belirlenmiştir (188). Ayrıca tuzluluk ve kuraklık stresine maruz kalan *O. sativa* bitkisinde miR1436'nın ifade düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Arpada aralarında miR1436'da olan 8 adet (Hvu-miR156, Hvu-miR159, Hvu-miR160, Hvu-miR171, Hvu-miR395, Hvu-

miR444, Hvu-miR1126) miRNA'nın bitki gelişimi, morfolojisi ve çiçeklenme zamanı ile ilgili genleri kontrol eden transkripsiyon faktörlerini hedeflediği tespit edilmiştir (65). Bu miRNA'nın kapsül dışında diğer dokularda ifade olabilen bir geni hedeflediği düşünülmektedir.

pso-miR1310 en az yaprak, en çok gövdede ifade olmuştur. *Heliantus annuus* bitkisinin miRNA profile çıkarılmış ve miR1310'da tespit edilmiştir. Bu miRNA'nın biyoenformatik olarak Myosin (hamy2) genini hedeflediği belirlenmiştir (189). Fonksiyonu tam olarak açıklanamayan bu genin bitkide hangi dokularda ne oranda ifade edildiği bilinmemektedir. Fakat yaprakta az ifade olan miR1310'nun yaprak morfogenezini veya fotosentez gibi yaprakta gerçekleşen bir olayda görev alan herhangi bir geni hedeflediği tahmin edilmektedir.

6.3. Seçilen ve qRT-PCR İle Ölçülen Bazı miRNA'lar ve Hedefledikleri Genler Arasındaki İlişki

pso-miR2'nin biyoenformatik olarak hedeflediği genlerden biri F-box/Kelch-repeat protein (At1g30090)'dir (Çizelge 5.6.). qRT-PCR sonucuna göre pso-miR 2 en fazla yaprakta, en az kapsülde; hedef gen ise en çok kapsülde en az yaprakta ifade olmuştur (Şekil 5.5.). Mikroarray sonucunda ise pso-miR2 nin homoloğu vvi-miR2950 en az kapsülde en çok kökte ifade olmuştur (EK-4). miRNA'lar ve hedefledikleri genler arasında ifade seviyesi açısından ters bir ilişki vardır. miRNA'nın ifadesi yüksekse, ilgili hedef genin ifadesi düşüktür. Pso-miR2'de bu ilişki çalışma kapsamında gösterilmiştir. Örneğin, yaprakta fazla ifade olan pso-miR2, hedef geni olan F-box/Kelch-repeat proteini baskıladığı için bu gen yaprakta az ifade olmuştur. Hedef gen F-box/Kelch-repeat proteininin hem monokot hem ökotlarda çiçeklenme zamanı ve sirkadian ritmi kontrol ettiği, yaşlanma ve savunma cevabında görev aldığıda bulunmuştur (190, 191). Kapsül dokusunda bu miRNA'nın az ifade olması çiçeklenme zamanı ve savunma cevabı nedeniyle sekonder metabolit üretiminin artması, yaprakta çok ifade olması sirkadian ritim ile ilgili olduğunu gösterebilir.

pso-miR3, aly-miR390a-3p ve ima-miR390-3p ile homoloji gösterir. pso-miR3'ün biyoenformatik olarak putative retroelement pol polyprotein (NP455428) bir geni hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). qRT-PCR sonucuna göre pso-miR3 en fazla

kapsül, en az yaprakta; hedef gen ise en fazla kapsül ve kök, en az gövdede ifade olmuştur (Şekil 5.6.). Mikroarray sonucunda ise *pso-miR3* nin homologları en az yaprakta, en çok kökte ifade olmuştur (Çizelge 5.5.). Bu miRNAda kapsül dokusun dışında diğer dokularda miRNA-hedef gen ters ilişkisi rahatlıkla görülmektedir. Kapsül dokusunun ifadesinde hiç bir değişiklik olmamıştır. Hedef gen ile ilgili yapılan gen ontolojisi çalışmasında bu genin metal veya çinko bağlanması ile dolaylı olarak ilişkisi olduğu belirlenmiştir (192). Genel olarak yaprak ve kökte *miR3*'ün ifadesi düşükken hedef genin yaprak ve kökte fazlaca ifade edilmesinin nedeni çinko veya metal bağlama süreci ile ilişkili olabileceğini düşünülmektedir.

pso-miR5'in biyoenformatik olarak *RSY3 RASPBERRY3* (AT3G24560.2) hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). *pso-miR5* ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucuna göre *pso-miR5* en fazla gövde, en az kapsülde; hedef gen ise en fazla kapsül, en az yaprakta ifade olmuştur (Şekil 5.7.). Bu miRNA *miR156e-3p* ile homoloji göstermektedir (Çizelge 5.4). Mikroarray sonucunda ise *pso-miR5*in homolog olduğu *miR156* ailesinde en çok kapsülde, en az gövdede ifade olmuştur (Çizelge 5.5.).Hedeflediği gene baktığımızda *Raspberry3* geninde meydana gelen mutasyonların kloroplast oluşumunu, dolayısıyla embriyogenezi etkilediği tespit edilmiştir (193). Ayrıca bu genin gen ontolojisine göre tohum dormansisi sonucu embriyo oluşumunda dolaylı olarak ilişkili olduğu görülmüştür (193). Bu bilgiler *pso-miR5*'in kapsülde az ifade edimesini teyit etmektedir

pso-miR 7 derinlemesine dizilemede bulunan yeni miRNA'lardandır. Bu miRNA *miR160* ailesiyle homoloji göstermektedir.

pso-miR7'nin biyoenformatik olarak hedeflediği genlerden biri putative auxin response factor (NP305750)'dir (Çizelge 5.6). *pso-miR7* ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucuna göre *pso-miR7* en fazla kapsül ve gövdede, en az yaprakta; hedef gen ise en çok kapsülde en az yaprakta ifade olmuştur (Şekil 5.8.). Mikroarray sonucunda ise *pso-miR7* nin homologu *miR160* ailesi en az yaprakta en çok kapsülde ifade olmuştur. *Pso-miR7* nin qRT-PCR verileri ile mikroarray verileri birbirlerini doğrulamaktadır. Bu sonuçlarla beraber hedef genin yaprak dokusunda daha fazla ifade edilmesini beklerdik. Derinlemesine dizileme sonuçlarına bakıldığında tüm haşhaş bitkisinde *pso-miR160*'ın 251 kere saptandığı gösterilmiştir (Çizelge 5.3.). Ayrıca mikroarray okumalarında derinlemesine dizilemedeki gibi çok düşük seyretmiştir (Çizelge 5.5.). Daha öncedebelirttiği gibi

miR160 ve mir167 aynı geni hedefleyen iki miRNAdır. Bu miRNA'ların biri bitkide fazla ifade ediliyorsa diğeri az ifade edilmektedir. Dolayısıyla pso-miR160 bitkide az ifade edilmesi sonucu bu miRNA'nın hedeflediği gen üzerindeki etkisi tespit edilememiştir.

pso-miR 11, aly-miR166a-5p ile homoloji göstermektedir (Çizelge 5.4.).pso-miR11'in Leucine-rich repeat protein kinase family protein (AT2G01210.1) (hedef gen-1) ,homoloğu olan miR166 ailesinin HD-ZIP protein ATHB-15 (At1g52150 (hedef gen-2) biyoenformatik olarak hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). pso-miR11 ve hedeflediği genler ile ilgili qRT-PCR sonucuna göre pso-miR11 en fazla gövde ve kök, en az kapsülde; hedef gen-1 en fazla kökte, en az gövdede; hedef gen-2 en çok yaprak ve kapsül, en az gövdede ifade olmuştur (Şekil 5.9.). Mikroarray sonucunda ise pso-miR11' in homologları en az kapsülde, en çok kökte ifade olmuştur (Çizelge 5.5.). Bu sonuçlara göre pso-miR11 qRT-PCR ve microarray sonuçları birbirlerini doğrulamaktadırlar. Ayrıca pso-miR11 in asıl hedef geninin . HD-ZIP protein ATHB-15 olduğu deneysel olarak da tespit edilmiştir.

pso-miR 13 derinlemesin dizilemede bulunan yeni miRNA'lardandır. pso-miR13'ün biyoenformatik olarak 7-*OMT* reticuline-7-O-methyltransferase (FJ156103.1) genini biyoenformatik olarak hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). pso-miR13 ve hedeflediği 7-*OMT* ile ilgili qRT-PCR sonucuna göre pso-miR13 sırasıyla en fazla gövde, kapsül ve yaprak en az kökte; 7-*OMT* en fazla gövde ve yaprak, en az kapsülde ifade olmuştur. (Şekil 5.10.). 7-*OMT* benzilizokinonin alkaloit sentez yolağında görev alan bir enzimdir. (S)-retikulinin (S)-laudanine dönüşümünü katalizler (194, 195). 7-*OMT* lateksinde yoğun olduğu gövde de, kapsül ve kök dokularına kıyasla daha fazla bulunmaktadır. Ayrıca eser miktarda yaprak dokusunda da 7-*OMT*'ye rastlanmıştır (194). Tüm bu veriler çalışma sonuçlarımızı teyit etmektedir. Papaverin yolağında yer alan 6 genin susturularak papaverin ve oluşan diğer alkaloitlerin miktar tayinleri yapılmıştır. 7-*OMT* geninin susturulması sonucu papaverin miktarında bir değişiklik olmazken laudanin ve laudanin miktarında azalma kaydedilmiştir. Morfin, kodein, tebain ve noskapin gibi diğer alkaloid miktarlarının ise kontrole kıyasla arttığıda bildirilmiştir (195). Tez çalışmasında kullandığımız *P. somniferum* Ofis-95 varyetesi en yüksek oranda morfin, en düşük oranda papaverin üretmektedir (196). Ayrıca miRNA'lar ve hedefledikleri genler arasında ifade seviyesi açısından ters bir ilişki vardır. Kapsül dokusu hariç diğer tüm dokularda bu ilişkiyi rahatlıkla görebilmekteyiz.

pso-miR164'ün NAC1 no apical meristem protein (AT1G56010) biyoenformatik olarak hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). pso-miR164 ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucuna göre pso-miR164 en fazla gövde, en az kökte; hedef gen en fazla yaprak, en az kökte ifade olmuştur (Şekil 5.11.). Mikroarray sonucunda ise pso-miR164 homologları en fazla kapsül, en az kökte ifade olmuştur (Çizelge 5.5.). Aslında miR164 'ün qRT-PCR sonucuna göre gövde, kapsül ve ve yaprağın ifade düzeyleri hemen hemen aynıdır. Bu sonuçlar mikroarray sonuçlarıylada desteklenmiştir. Bu sonuca paralel olarak hedef gen gövde dokusunda az ifade olmuştur. Fakat diğer göreceli tutarsızlığın sebebi ise NAC1 geni için bitkilerde miRNA regülasyonu dışında başka bir regülasyon daha olması durumudur. Bu hedef gen bir transkripsiyon faktör olup regülasyonunda miRNAdan bağımsız farklılıklar görülebilir.

pso-miR159'un MYB101 (AT2G32460) biyoenformatik olarak hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6). pso-miR159 ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucuna göre pso-miR159 en fazla kapsül, en az kökte; hedef gen en fazla kök, en az yaprak ve gövde de ifade olmuştur. (Şekil 5.12.). pso-miR159a-b ve pso-miR159f kökte fazla yaprakta az, pso-miR159c-e ve pso-miR159g ise kapsülde çok yaprakta az ifade olmuştur. pso-miR159'un qRT-PCR ve mikroarray sonuçları birbirlerini desteklemektedir. Ayrıca kökte az ifade olan bu miRNaya hedef geni kökte fazla düzeyde ifade olmaktadır. Kapsül dokusunda önemli farklılık görülmemekle birlikte yine ilgili hedef genin bir transkripsiyon faktörü olduğu ve sonuçlardaki bazı farklılıkların bundan kaynaklanabileceği göz ardı edilmemelidir.

pso-miR395'ün APS4 *Sulphate adenyltransferase* (AT5G43780) geninin hedeflediği biyoenformatik olarak bulunmuştur (Çizelge 5.6). pso-miR395 ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucuna göre pso-miR395 en fazla yaprak, en az gövde; hedef gen en fazla kök, en az gövde de ifade olmuştur (Şekil 5.13.). Mikroarray sonuçları dokular arasında değişiklik göstermektedir. Pso-miR395'in qRT-PCR sonucu mikroarray de osa-miR395c ile uyumluluk göstermiştir (Çizelge 5.5.). APS4 geni sülfat açlığı ile ilgili bir gen olup, sülfatın kök ve yapraklar arasındaki translokasyonundan sorumludur (184). Genel olarak qRT-PCR verilerine göre kök ve gövde dokularında ifade olan miRNA ve hedef gen arasındaki ifade düzeyinde belirlenen ters ilişki rahatlıkla gözlenmektedir.

pso-miR535'in *Lipoxygenase* (LOX gene) (FM164378.1) hedeflediği tespit edilmiştir (Şekil 5.14.). Mikroarray sonucunda pso-miR535 en az kapsülde, en fazla yaprak ve kök

de ifade olmuştur (Çizelge 5.5). *pso-miR535*'in hedef geni en fazla yaprak, en az kökte ifade olmuştur. (Şekil 5.14.). *LOX* geni bitkinin her dokusunda ifade olan yaşlılıktan, meyva olgunlaşmasına abiyotik stressden savunma cevabı gibi çok alanda rol oynayan bir genidir (197). Haşhaş bitkisinde *LOX* geninin ifadesinin bitkide meyve olgunlaşmasının ve yapraklarda yaşlılığın başladığını rahatlıkla ifade edebiliriz. Ayrıca *LOX* geni sekonder metabolit mekanizmasını aktive eden jasmonik asitin oluşumunda çok önemli bir yere sahiptir (158, 159, 198, 199). Alkaloitler gibi sekonder metabolitleri üreten haşhaş bitkisinde *LOX* geni ve bunu hedefleyen *pso-miR535*'in bulunuşu çalışmalarımız doğrulamaktadır.

T0047847 numaralı küçük RNA'nın *COR* (FJ624147.1) genini hedeflediği biyoenformatik olarak tespit edilmiştir (EK-3). T0047847 en fazla kapsül, en az yaprak; hedef gen en fazla kök, en az yaprak da ifade olmuştur (Şekil 5.15). *COR* (codeinone reductase) geni morfin sentez yolağında görev alır. Kodeinonun kodeine dönüşümünü gerçekleştirir. Kodeinin demetilasyonu ile morfin sentezi gerçekleştirilmiş olur (23, 27, 30, 194, 200) (Şekil 2.2.). *COR* geni hemen hemen tüm dokularda mevcuttur. Yaprak hariç diğer dokularda çok miktarda bulunur (34). Yapılan çalışmalar sonuçlarımızı desteklemektedir. Ayrıca miRNA ile hedef gen arasındaki ters ilişkiyi tüm dokularda rahatlıkla görmekteyiz.

T0013376 numaralı küçük RNA'nın *SAT* (FJ200354.1) genini hedeflediği biyoenformatik olarak tespit edilmiştir (EK-3). t0013376 en fazla gövde, en az yaprak ve kök; hedef gen en fazla kapsül, en az yaprak da ifade olmuştur (Şekil 5.16.). *SAT* [(7S)-salutaridinol-7-O acetyltransferase] morfin sentez yolağında ilk tepkimeyi katalizler. S- retikulin'den (7S)-salutaridinol oluşur. *SAT* enzimiyle (7S)-salutaridinol, salutaridinol-7-O-acetate dönüştürülür (30, 194, 200) (Şekil 2.2.). Sonuçlarımızı doğrulayacak şekilde *SAT*'ın kapsül ve gövde dokularında fazla, kök ve yaprak dokularında az ifade olduğu tespit edilmiştir (34). Morfin üretimi diğer alkaloitlere göre fazla olan Ofis-95 varyetesinin kapsülünde çok yüksek oranda *SAT* bulunmasında sonuçlarımızın anlamlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu geni hedefleyen miRNA adayı t0013376'nın tüm dokularda hedef genin aksine az ifade olduğunu görmekteyiz. Alkaloit üretiminin çok olduğu genç kapsül döneminde *SAT*'ın dokularda fazla, onu hedefleyen miRNA adayının dokularda az ifade olması miRNA- hedef gen ilişkisini doğrulamaktadır.

t0000199 numaralı küçük RNA'nın *TYDC* (AF025435.1) genini hedeflediği biyoenformatik olarak tespit edilmiştir (EK-3). t0000199 en fazla yaprak, en az kök; hedef gen en fazla kapsül ve gövde, en az yaprak da ifade olmuştur (Şekil 5.17). Benzilzokinonin alkaloidlerinin sentezi L-Tyrosin'in tyramine, L-dopa'nın dopamine tyrosine/dopa decarboxylase (*TYDC*) katalizörlüğünde dönüşümü ile başlar (Şekil 2.2.). Bu yönüyle *TYDC* sadece morfin yolağındaki alkaloidlerin oluşumu değil papaverin, berberin ve sanguarin gibi diğer alkaloidlerin oluşumu içinde önemlidir. *TYDC* 'nin yaprak dokusu dışında diğer dokulardaki ifade seviyesi (34) bulunduğu sonuçlardan farklıdır. *TYDC*, kapsül ve gövdede daha yoğun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bitki materyalimizin toplandığı dönem olan genç kapsül dönemi alkaloid sentezinin çok yoğun olduğu bir dönemdir. Her ne kadar yapılan çalışmalar *TYDC* geninin kök ve gövde de bulunduğunu belirtse, olgunlaşmamış kapsül döneminde petallerin düşmesiyle beraber hızla büyüyen kapsülün içerisine latisiferlerle dolmaktadır. Ayrıca *TYDC* dokuya spesifik ifade olmaktadır. Genç dokularda (yaprak ve aksillar tomurcuklar) ifade olan bu genin, olgun kök gibi yaşlı dokularda ifade seviyesi azalmaktadır (201). Kapsül dokusunda *TYDC*'ye rastlamamız bu dokuya hızla dolan latisiferlerden kaynaklanıyor olabilir. Kök dokusunda *TYDC*'nin az ifade olması total RNA'nın izole edildiği kökün yaşlılığın kaynaklanabilir. *TYDC*'yi hedefleyen miRNA adayı t0000199'ün dokulardaki ifadesine bakıldığında gövde dokusu dışında beklenen miRNA-hedef gen ilişkisi görülmektedir.

6.4. miRNA'lar ile Alkaloid Sentez Mekanizmasının İlişkilendirilmesi

Haşhaş tarafından da sentezlenen benzilzokinolin alkaloidleri (BIA) çok geniş ve yapısal olarak çok çeşitleri olan bitki doğal ürünleridir BIA sentezinde yolağın en başında tyrosin amino asidi yer alır. Bir dizi zorlu ve çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucu alkaloidler meydana gelir. Sekonder metabolit olarak da adlandırılan BIA, bitkide normal büyüme ve gelişim için elzem değildirler fakat patojen ve herbivor saldırılarına karşı bitkiyi korurular (32). Bitkinin savunma sistemini harekete geçiren her kimyasal veya biyolojik madde aslında bitkinin alkaloid sentez mekanizmasında harekete geçirir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda haşhaşta ifade edilen miRNA'lar ile alkaloid sentez mekanizması arasında (doğrudan veya dolaylı) ilişki tespit edilmiştir. Toplamda 23 adet miRNA'nın ve 3 adet miRNA adayının alkaloid sentezi ile ilişkisi belirlenmiştir. Bunlardan 2 adet miRNA (pso-miR13 ve ps-miR408) ve 3 adet miRNA adayı (t0000199,

t0013376, t0047847) doğrudan diğerleri (pso-miR1106, ps0-miR415, ps0-miR835 vd) dolaylı olarak alkaloid yolağına müdahale etmektedir. Bu müdahale Şekil 6.1’de şematize edilmiştir.

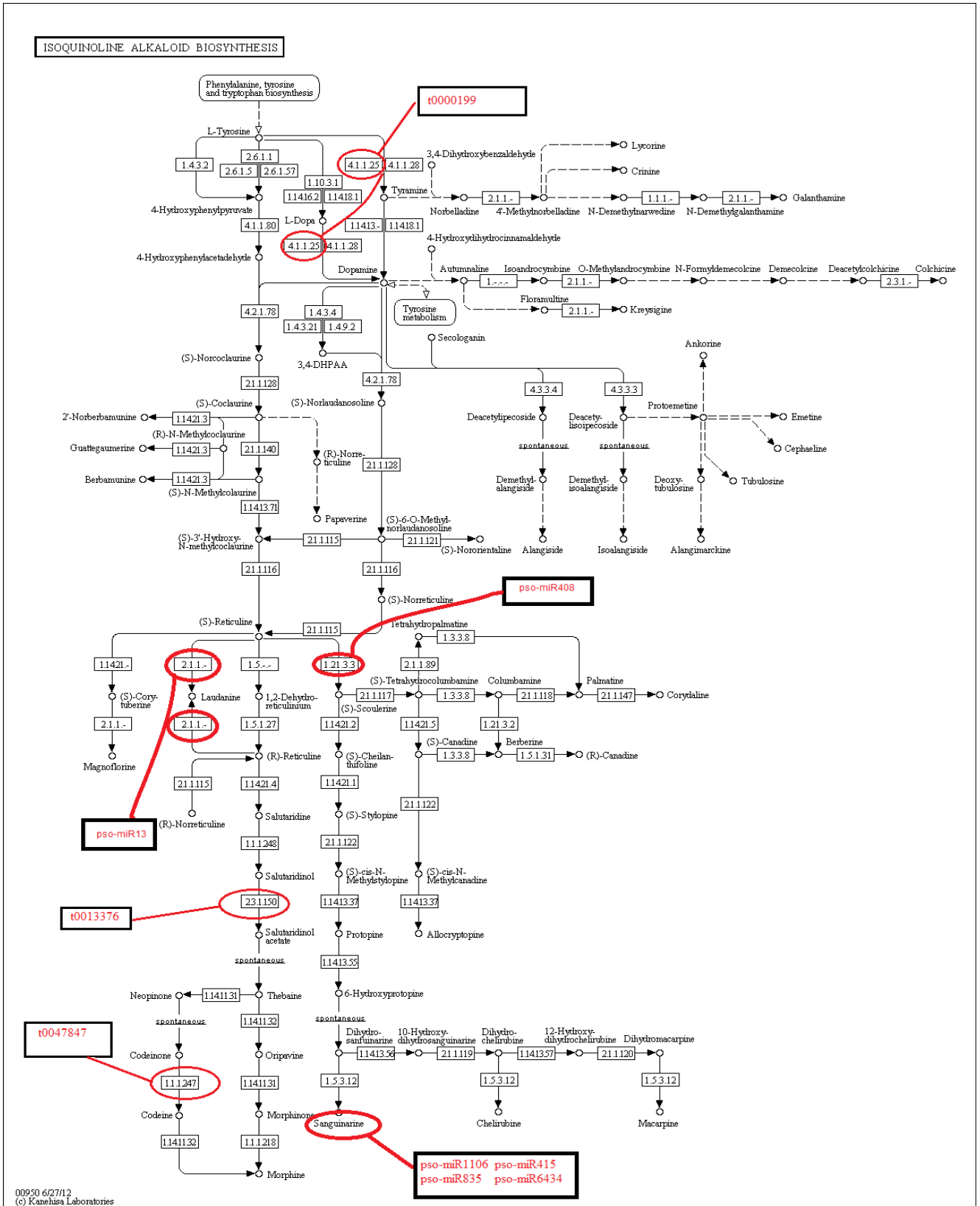
Alkaloid sentez yolağını regüle eden miRNA’lar; ps0-miR13 ve ps0-miR408’dir. **ps0-mir13** biyoenformatik olarak *7-OMT* (7-O-methyltransferase) ve *SSL4* (strictosidine synthase-like 4) gibi alkaloid sentezinde birebir görev alan genleri hedeflediği bulunmuştur (Çizelge 5.6.). Ayrıca ps0-miR13’ün *7-OMT*’yi hedeflediği yaptığımız qRT-PCR çalışmasıyla (Şekil 5.10) da deneysel olarak ispatlanmıştır.

COR, SAT ve TYDC genlerinin biyoenformatik olarak hedefleyen t0000199, t0013376, t0047847 numaralı miRNA adaylarının qRT-PCR çalışmasıyla miRNA-hedef gen ilişkisi tespit edilmiştir. Fakat eldeki Papaver ESTlerinin azlığından dolayı bu küçük RNA’ların pre-miRNA yapısı öngörülememiştir. Bu nedenle miRNA adayı olarak isimlendirilmiştir.

Pso-miR408 biyoenformatik olarak FAD-binding and BBE domain containing protein (TC366290) adlı geni hedeflemektedir (Çizelge 5.6). Bu gen, gen ontolojisinde reticuline oxidase ile ilişkilidir. Reticuline oxidase S-reticuline den (S)-scoulerine oluşturur. Dolaylı olarak reaksiyon berberin oluşumu yönünde devam eder (Şekil 2.2.). Pso-miR408 derinlemesine dizileme de 2849 defa okunmuştur ve toplamda okunan 124 miRNA aileleleri içerisinde 11. sırada yer almaktadır (Çizelge 5.3.). Bu miRNA’nın bu derece çok olması alkaloid biosentezini berberin yönünde olmadığını göstermektedir.

Dolaylı olarak alkaloid sentezine müdahale yaralanma, patojen saldırısı, stress gibi olaylar sonucunda bitkide yer alan ve savunma sistemini uyaran jasmonik asit üzerinden olmaktadır. Jasmonik asit bir çeşit bitki hormonu olup lipoxygenaz enzimlerinin de katıldığı oktadekanoit yolağında sentezlenir. Bu hormonun ana maddesi α -linoleik asittir. Jasmonik asitin en önemli görevleri büyümenin durdurulması, yaşlanma, yaralanma cevabı ve bitki savunmasıdır. (202).

Metil jasmonatın hücre kültürlerinde sanguarin adlı alkaloidi arttığı yönünde sonuçlar vardır. **ps0-miR1106, ps0-miR415, ps0-miR835, ps0-miR6434** ün hedeflediği genlerin gen ontoloji (Çizelge 5.7.) yapıldığında bu miRNA’ların dolaylı olarak jasmonik asiti stimüle ettiği belirlenmiştir.



Şekil 6.1. Haşhaştaki alkaloid sentez yolunu düzenleyen derinlemesine dizileme ve miRNA mikroarrayi ile tespit edilen miRNA ve miRNA adaylarının benzilizokinin sentez yolu haritasında (KEGG) gösterimi

Pso-miR1432, pso- mir1507, pso- miR1514, pso-miR1850, pso- miR2673, pso-miR393, pso- miR4393, pso-miR5658, pso-mir827, pso- miR415, pso- miR168 nin hedeflediği genlerin gen ontolojisi yapıldığında bu genlerin savunma sisteminde rol oynayan diğer genlerle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca **pso-miR4351** ve **pso-miR530** un hedeflediği genin gen ontolojisi yapıldığında yaralanma cevabı, **pso-miR167, pso-miR2931** ve **pso-miR5225** in hedef genlerinin nematod saldırısı cevabı ile ilgili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.7.).

pso-miR535 LOX genini hedeflediği RLM-RACE deneyi ile bulunmuştur (Şekil 5.25.) Bu gen jasmonik asit oluşumunda görev alır (158, 202). LOX genindeki artış jasmonik asitin artmasına dolayısıyla alkaloit sentezinin artışına neden olacaktır.

Terpenoid İndole alkaloitlerinden vinblastine ve vinkristini sentezleyen *Catharanthus roseus* bitkisinde yapılan bir çalışmaya göre terpenoid indol alkaloid (TIA) yolağında transkripsiyonel regülatör olarak görev yapan ORCA3 geni ile jasmonik asitin yolak üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuçta jasmonik asitin fazla ifade edilen ORCA3 genine kıyasla 5 kat daha fazla TIA yolağını aktive ettiği belirtilmiştir (203).

Tütün bitkisi alkaloit, fenolik bileşikler ve terpenoitler gibi sekonder metabolitleri üretebilmektedir. Metil jasmonat uygulaması yapılan tütünde caffeoylputrescine, nicotine ve diterpene glycosides gibi sekonder metabolitlerde 2-12,5 kat artış gözlenmiştir (204)).

Tropane alkaloitlerinden olan scopolamine ve hyoscyamine tıbda antikolinerjik olarak kullanılır. Her iki alkaloidde *Brugmansia candida* bitkisinin köklerinde sentezlenir. Alkaloitlerin aşırı miktarda sentezlenmesi için bitkiye metil jasmonat uygulaması yapılmıştır. Scopolamine üretiminde yaklaşık %1200 artış olurken, hyoscyamine de bu oran %30 olmuştur (205). Benzer bir çalışmada tütün bitkisinin yapraklarında meydana gelen yaralamanın önce sürgün dokusundaki jasmonik asit seviyesini arttırdığını daha sonra artan jasmonik asit miktarıyla beraber kökte nikotin üretiminin uyarıldığı bildirilmiştir (206). Benzilzokinolin alkaloid yolağında görev alan *CYP80B1* geninin metil jasmonat uygulaması sonucu hücre kültürü ortamında arttığı belirlenmiştir (207). Jasmonik asit sadece alkaloid sentezini değil aynı zamanda bitkide miRNA ifade profilinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (208).

Günümüze kadar yapılan bir çok çalışma jasmonik asitin bitkinin savunma sisteminde rol aldığını göstermiştir. Elisitör olarak uygulanan metil jasmonatın birçok savunma genlerini regüle ettiği ve ifade edilmesini uyardığı bilinmektedir (209). Bunun yanında abiyotik ve biyotik stress koşullarında yine jasmonik asitin sekonder metabolit mekanizmasını aktive ettiği bildirilmiştir (158, 161, 197, 202, 207, 210).

6.5. Sonuç

Günümüze kadar bitkilerde ifade olan miRNA'ların tanımlanması ve karakterizasyonu ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Morfin, kodein, tebain gibi insan sağlığı için çok önemli alkaloidlerin sentezlendiği haşhaş bitkisinde bu yönde bir çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışması bir ilk olmuştur. Ayrıca Türkiye'de tam bir bitkinin miRNA profili ilk defa çıkarılmış ve bunun için derinlemesine dizileme, miRNA mikroarrayi ve qRT-PCR çalışmaları yapılmıştır.

Haşhaş bitkisine ait kapsül, gövde, yaprak ve kök dokularının RNA'ları izole edilerek, bu RNA'lardan oluşan bir RNA miksin derinlemesine dizileme çalışması yapılmıştır. Sonuçta 124 farklı aileye ait miRNA'lar tespit edilmiştir. Ayrıca 6 adet yeni miRNA saptanmıştır. Üstelik bunlardan *pso-miR13*'ün *7-OMT* gibi alkaloid senteziyle doğrudan ilişkili bir geni hedeflediğide deneysel olarak bulunmuştur.

Haşhaştan alınan 4 farklı doku RNA'ları kullanılarak miRNA mikroarrayi yaptırılmıştır. Toplam 28 miRNA ailesi tespit edilmiştir. Dokulardaki ifade düzeyleri arasında ciddi farklılık görülen bazı miRNA'lar (*pso-miR156*, *pso-miR164*, *pso-miR167*, *pso-miR319*, *pso-miR474*, *pso-miR2919*, *pso-miR854*, *pso-miR1314*, *pso-miR1436*, *pso-miR397*, *pso-miR529*, *pso-mir530*, *pso-miR2911*, *pso-miR166*, *pso-miR535*, *pso-miR172*, *pso-miR396*, *pso-miR168*, *pso-miR171*, *pso-miR1148*, *pso-miR1858*, *pso-miR1450*, *pso-miR1310*, *pso-miR160*, *pso-miR390*, *pso-miR2916*, *pso-mir395*, *pso-mir159*) seçilerek bu miRNA'ların hedef genleri ile ifade düzeyleri ilişkilendirilmiştir.

Başta yeni bulduğumuz miRNA'lar olmak üzere toplam 10 adet miRNA'nın (*pso-miR535* hariç) hedef genlerinin dokulardaki ifade düzeylerine qRT-PCR ile ölçüm yapılmıştır (*pso-miR2*, *pso-miR3*, *pso-mir5*, *pso-miR7*, *pso-miR11*, *pso-miR13*, *pso-miR164*, *pso-miR159*,

pso-miR395). qRT-PCR ile ölçümleri yapılan miRNA'lar ve hedef genlerin ifadeleri ilişkilendirilmiştir.

miRNA'ların hedeflediği genleri modifiye 5'RLM-RACE çalışması ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Yeni tespit edilen miRNA'lar ve korunmuş psomiR535, psomiR164, psomiR156/157 için spesifik primerler tasarlanmıştır. Sonuçta psomiR535'in *LOX* genini hedeflediğini deneysel olarak bulunmuştur.

Haşhaş bitkisine farklı dokularda miRNA ifade düzeyi ölçümleri yapılarak özellikle latisfer hücrelerini barındıran kapsül ve sentezde rol alan gövde dokularında ekspresyon seviyeleri değişiklik gösteren miRNA'lar göz önüne alınmıştır. Bununla beraber, haşhaş bitkisinde küçük RNA kütüphaneleri (sRNA) kurularak dizi analizleriyle ulaşılan bazı yeni miRNA'lara ayrıntılı olarak biyoinformatik analizler yapılmıştır. Alkaloid sentezinde rol oynadığı bilinen genleri hedeflemesi in silico analizler ile tahmin edilen bazı miRNA'lar belirlenerek deneysel yaklaşımlarla desteklenmiştir. Ayrıca RLM-RACE çalışmaları kapsamında deneysel olarak *LOX* geni gibi alkaloid sentezinde rol alan bazı genlerin spesifik miRNA'lar tarafından hedeflenerek regüle ettirdiği bulunmuştur. Dolayısıyla elde edilen bu bulgular karmaşık ve birçok genin birlikte ifade edilerek katıldığı morfin sentezi mekanizmasına yeni bir yaklaşım getirmiştir. Çalışmaların bu kapsamda genişletilmesi ile alkaloid biyosentezi metabolik mühendisliği uygulamaları ile miRNA regülasyonu üzerinden yönlendirilebilir olacaktır.

Bundan sonra psomiR408, psomiR13, psomiR535 ile *COR*, *SAT* ve *TYDC* genlerini hedefleyen küçük RNA'ların alkaloid biyosentez mekanizmasıyla ilişkilerinden dolayı susturma ve/veya aşırı ifade ettirme deneyleri yapılarak, yada bu miRNA'ların regüle etmek için hedeflediği genler üzerinden manipülasyonlar yapılarak alkaloid sentezi yönlendirilebilecektir

KAYNAKLAR

- 1 Unver T, Budak H. Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*. *Planta*. 2009 2009/09/01;**230**(4):659-69.
- 2 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;**75**(5):843-54.
- 3 Carrington JC, Ambros V. Role of MicroRNAs in Plant and Animal Development. *Science*. 2003 July 18, 2003;**301**(5631):336-8.
- 4 Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2011 January 1, 2011;**39**(suppl 1):D152-D7.
- 5 Unver T N-CDM, Budak H. Review of Current Methodological Approaches for Characterizing MicroRNAs in Plants. *International Journal of Plant Genomics*. 2009 Feb 17.
- 6 Palatnik JF, Allen E, Wu X, et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*. 2003 09/18/print;**425**(6955):257-63.
- 7 Mallory AC, Bartel DP, Bartel B. MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell Online*. 2005 May 1, 2005;**17**(5):1360-75.
- 8 Yang T, Xue L, An L. Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science*. 2007 3//;**172**(3):423-32.
- 9 Eldem V OS, Unver T. Plant microRNAs: New players in functional genomics. *Turkish J Agr and Forestry*. 2013;**37**:1-21.
- 10 Chuck G, Meeley R, Hake S. Floral meristem initiation and meristem cell fate are regulated by the maize AP2 genes *ids1* and *sid1*. *Development*. 2008 September 15, 2008;**135**(18):3013-9.
- 11 Guo H-S, Xie Q, Fei J-F, Chua N-H. MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for Arabidopsis Lateral Root Development. *The Plant Cell Online*. 2005 May 1, 2005;**17**(5):1376-86.
- 12 Marin E, Jouannet V, Herz A, et al. miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and Their AUXIN RESPONSE FACTOR Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. *The Plant Cell Online*. 2010 April 1, 2010;**22**(4):1104-17.
- 13 Vaucheret H VF, Crete P, Bartel D. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & Dev*. 2004 May 6;**18**:1187-97.
- 14 Sunkar R, Zhu J-K. Novel and Stress-Regulated MicroRNAs and Other Small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell Online*. 2004 August 1, 2004;**16**(8):2001-19.
- 15 Yamasaki H, Abdel-Ghany S, Cohu C, Kobayashi Y, Pilon M, Shikanai T. The Adaptation Mechanism to Copper Deficiency via MicroRNA in Arabidopsis. In: Allen J, Gantt E, Golbeck J, Osmond B, editors. *Photosynthesis Energy from the Sun*: Springer Netherlands; 2008. p. 1355-8.
- 16 Sunkar R, Li Y-F, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in plant science*. 2012;**17**(4):196-203.
- 17 Liu HH TX, Li YJ, Wu CA, Zheng CC. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *RNA*. 2008;**14**:836-43.
- 18 Li Y ZQ, Zhang J, Wu L, Qi Y, Zhou JM. Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology*. 2010 Feb17;**152**:2222-31.

- 19 Zhou X WG, Sutoh K, Zhu JK, Zhang W. Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1779**:780-8.
- 20 Lv D-K, Bai X, Li Y, et al. Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene*. 2010 7/1//;**459**(1-2):39-47.
- 21 Lu S, Sun Y-H, Chiang VL. Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *The Plant Journal*. 2008;**55**(1):131-51.
- 22 P F. ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2001 June 2001;**52**:29-66.
- 23 Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annual Review of Plant Biology*. 2008;**59**(1):735-69.
- 24 2009 Yılı Haşhaş Raporu. 2010 ed. Ankara: Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü; 2010. p. 25.
- 25 N KUvA. Yabancı kökenli haşhaş (*Papaver somniferum* L.) çeşit ve popülasyonlarının bazı bitkisel özellikleri. *Bitkisel Araştırma Dergisi*. 2006;**1**:1-5.
- 26 Gurkok T Pİ, Boztepe G, Kaymak E. Haşhaş (*Papaver somniferum*L.) Bitkisinde Alkaloit Biyosentez Mekanizması. *Teknolojik Araştırmalar*; 2010. p. 31-45.
- 27 Ziegler J, Facchini PJ, Geißler R, et al. Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*. 2009 10//;**70**(15-16):1696-707.
- 28 Dang TTT OA, Farrow SC, Facchini PJ. Functional biochemical genomics as a gene discovery platform in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Methods in Enzymology*. 2012;**515**:231-66.
- 29 Facchini PJ, De Luca V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal*. 2008;**54**(4):763-84.
- 30 Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ. A Tale of Three Cell Types: Alkaloid Biosynthesis Is Localized to Sieve Elements in Opium Poppy. *The Plant Cell Online*. 2003 November 1, 2003;**15**(11):2626-35.
- 31 Weid M, Ziegler J, Kutchan TM. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 September 21, 2004;**101**(38):13957-62.
- 32 Liscombe DK, Facchini PJ. Evolutionary and cellular webs in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008 4//;**19**(2):173-80.
- 33 Huang F KT. Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*. 2000;**55**(1):555-64.
- 34 Facchini PJ, Park S-U. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*. 2003 9//;**64**(1):177-86.
- 35 Larkin PJ, Miller JAC, Allen RS, et al. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotechnology Journal*. 2007;**5**(1):26-37.
- 36 Allen RS, Millgate AG, Chitty JA, et al. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nat Biotech*. 2004 12//print;**22**(12):1559-66.
- 37 Frick S, Kramell R, Kutchan TM. Metabolic engineering with a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding. *Metabolic Engineering*. 2007 3//;**9**(2):169-76.
- 38 Kempe K, Higashi Y, Frick S, Sabarna K, Kutchan TM. RNAi suppression of the morphine biosynthetic gene *salAT* and evidence of association of pathway enzymes. *Phytochemistry*. 2009 3//;**70**(5):579-89.

- 39 Buckingham S. The Major World of MicroRNAs. Understanding The RNAissance. USA: Nature; 2003. p. 1-3.
- 40 Kidner CA MRA. The developmental role of microRNA in plants. Current Opinion in Plant Biology. 2005;**8**:38-44.
- 41 Unver T BH. Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*. Planta. 2009;**230**:659-69.
- 42 Saydam F Dİ, Veysi G. MikroRNA'lar ve kanser. Dicle Medical Journal. 2011;**38**(1):113-20.
- 43 Gündoğdu R ÇV. RNA İnterferans (RNAi). Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2009;**25**(1-2):34-47.
- 44 RNA İnterferaz. 2013 [cited 2011; Available from: http://tr.wikipedia.org/wiki/RNA_interferaz]
- 45 Fire A XS, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998;**19**(391):806-17.
- 46 Lee R C FRL, Ambros V C The C. elegans heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell. 1993;**75**:843-54.
- 47 Reinhart B J SFJ, Basson M. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 2000;**403**:901-6.
- 48 Lagos-Quintana M RR, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. science. 2001;**294**:853-8.
- 49 Reinhart BJ, Bartel DP. Small RNAs Correspond to Centromere Heterochromatic Repeats. Science. 2002 September 13, 2002;**297**(5588):1831.
- 50 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell. 2004;**116**(2):281-97.
- 51 Lau NC LL, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science. 2001 Oct26; **294**(5543):858-62.
- 52 Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs: At the Root of Plant Development? Plant Physiology. 2003 June 1, 2003;**132**(2):709-17.
- 53 Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Negative Feedback Regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-Guided mRNA Degradation. Current biology : CB. 2003;**13**(9):784-9.
- 54 Wijnhoven BPL, Michael MZ, Watson DI. MicroRNAs and cancer. British Journal of Surgery. 2007;**94**(1):23-30.
- 55 Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. Cell. 2009;**136**(2):215-33.
- 56 Floyd S K B JL. Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants. Nature. 2004;**428**:485-6.
- 57 Axtell MJ, Bartel DP. Antiquity of MicroRNAs and Their Targets in Land Plants. The Plant Cell Online. 2005 June 1, 2005;**17**(6):1658-73.
- 58 Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Sung G-H, Spatafora JW, Carrington JC. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. Nat Genet. 2004 12//print;**36**(12):1282-90.
- 59 Li W-X, Oono Y, Zhu J, et al. The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. The Plant Cell Online. 2008 August 1, 2008;**20**(8):2238-51.
- 60 Khraiweh B, Zhu J-K, Zhu J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms. 2012 2//;**1819**(2):137-48.

- 61 Kim JJ, Lee JH, Kim W, Jung HS, Huijser P, Ahn JH. The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 Module Regulates Ambient Temperature-Responsive Flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2012 May 1, 2012;**159**(1):461-78.
- 62 Wang J-W, Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D. Dual Effects of miR156-Targeted SPL Genes and CYP78A5/KLUH on Plastochron Length and Organ Size in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell Online*. 2008 May 1, 2008;**20**(5):1231-43.
- 63 Frazier T, Sun G, Burklew C, Zhang B. Salt and Drought Stresses Induce the Aberrant Expression of microRNA Genes in Tobacco. *Molecular Biotechnology*. 2011 2011/10/01;**49**(2):159-65.
- 64 Xin M WY, Yao Y, Song N, Hu Z, Qin D, Xie C, Peng H, Ni Z, Sun Q. Identification and characterization of wheat long non-protein coding RNAs responsive to powdery mildew infection and heat stress by using microarray analysis and SBS sequencing. *BMC plant biology*. 2011 Apr7;**11**.
- 65 Kantar M, Unver T, Budak H. Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. *Functional & Integrative Genomics*. 2010 2010/11/01;**10**(4):493-507.
- 66 Li B, Qin Y, Duan H, Yin W, Xia X. Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in Populus euphratica. *Journal of Experimental Botany*. 2011 July 1, 2011;**62**(11):3765-79.
- 67 Ozhuner E eV, Ipek A, Okay S, Sakcali S, Zhang B, Boke H, Unver T Boron Stress Responsive MicroRNAs and Their Targets in Barley. *PLoS ONE*. 2013 Mar 26;**8**(3).
- 68 Dharmasiri N EM. Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Science*. 2004;**9**:302-8.
- 69 Sorin C, Bussell JD, Camus I, et al. Auxin and Light Control of Adventitious Rooting in Arabidopsis Require ARGONAUTE1. *The Plant Cell Online*. 2005 May 1, 2005;**17**(5):1343-59.
- 70 Xue L-J, Zhang J-J, Xue H-W. Characterization and expression profiles of miRNAs in rice seeds. *Nucleic Acids Research*. 2009 February 1, 2009;**37**(3):916-30.
- 71 Eldem V AU, Ozhuner E, Bakır Y, Uranbey S, Unver T. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput sequencing. *PLoS ONE*. 2012;**7**(12):e50298.
- 72 Gutierrez L, Bussell JD, Păcurar DI, Schwambach J, Păcurar M, Bellini C. Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in Arabidopsis Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *The Plant Cell Online*. 2009 October 1, 2009;**21**(10):3119-32.
- 73 Yanik H TM, Hernandez P, Dorado G, Dundar E, Unver T. Genome-wide identification of alternate bearing-associated miRNA in the olive tree (*Olea europaea*). *BMC Plant Biology*. 2013 Jan 15;**13**(10).
- 74 Zhou M, Gu L, Li P, et al. Degradome sequencing reveals endogenous small RNA targets in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Frontiers in Biology*. 2010 2010/02/01;**5**(1):67-90.
- 75 Zhang W, Gao S, Zhou X, et al. Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Molecular Biology*. 2011 2011/01/01;**75**(1-2):93-105.
- 76 Allen RS, Li J, Stahle MI, Dubroué A, Gubler F, Millar AA. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 October 9, 2007;**104**(41):16371-6.

- 77 Alonso-Peral MM SC, Millar AA. MicroRNA159 can act as a switch or tuning microRNA independently of its abundance in Arabidopsis. PLoS ONE. 2012 Apr 12;7(4):e34751.
- 78 Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. Conservation and divergence of plant microRNA genes. The Plant Journal. 2006;46(2):243-59.
- 79 Sieber P, Wellmer F, Gheyselinck J, Riechmann JL, Meyerowitz EM. Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. Development. 2007 March 15, 2007;134(6):1051-60.
- 80 Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, et al. Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets. PLoS Biol. 2008;6(9):e230.
- 81 Rubio-Somoza I, Weigel D. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. Trends in plant science. 2011;16(5):258-64.
- 82 Kim J, Jung J-H, Reyes JL, et al. microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. The Plant Journal. 2005;42(1):84-94.
- 83 Williams L, Grigg SP, Xie M, Christensen S, Fletcher JC. Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. Development. 2005 August 15, 2005;132(16):3657-68.
- 84 Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs AND THEIR REGULATORY ROLES IN PLANTS. Annual Review of Plant Biology. 2006;57(1):19-53.
- 85 Unver T, Bakar M, Shearman R, Budak H. Genome-wide profiling and analysis of Festuca arundinacea miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate application. Molecular Genetics and Genomics. 2010 2010/04/01;283(4):397-413.
- 86 Wang X, Zhang J, Li F, et al. MicroRNA identification based on sequence and structure alignment. Bioinformatics. 2005 September 15, 2005;21(18):3610-4.
- 87 Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research. 2003 July 1, 2003;31(13):3406-15.
- 88 Zhang B, Pan X, Stellwag E. Identification of soybean microRNAs and their targets. Planta. 2008 2008/12/01;229(1):161-82.
- 89 Yin JQ, Zhao RC, Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays. Trends in biotechnology. 2008;26(2):70-6.
- 90 Jin W, Li N, Zhang B, et al. Identification and verification of microRNA in wheat (Triticum aestivum). Journal of Plant Research. 2008 2008/05/01;121(3):351-5.
- 91 Unver T, Parmaksız İ, Dündar E. Identification of conserved micro-RNAs and their target transcripts in opium poppy (Papaver somniferum L.). Plant Cell Reports. 2010 2010/07/01;29(7):757-69.
- 92 DeZulian T, Remmert M, Palatnik JF, Weigel D, Huson DH. Identification of plant microRNA homologs. Bioinformatics. 2006 February 1, 2006;22(3):359-60.
- 93 Wang M, Wang Q, Wang B. Identification and Characterization of MicroRNAs in Asiatic Cotton (<italic>Gossypium arboreum</italic> L.). PLoS ONE. 2012;7(4):e33696.
- 94 Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, Barbazuk WB, Zhu J-K, Yu O. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. BMC Genomics. 2008;9(1):160.
- 95
miRCat microRNA Cloning Kit Technical Manual. 2013 [cited 2013; Available from: <http://eu.idtdna.com/Pages/docs/user-guides-and-protocols/user-guide-mircat.pdf?sfvrsn=7>
- 96 Varkonyi-Gasic E WR, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plants Methods. 2007 Oct 12;3(12).
- 97 Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. Methods. 2010 4//;50(4):244-9.

- 98 Balcells I, Cirera S, Busk P. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnology*. 2011;**11**(1):70.
- 99 Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006 4//;**27**(2–3):95-125.
- 100 van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 0000 //print;**17**(6):1013-34.
- 101 Wang Z YB. End-Point StemLoop Real-Time RT-PCR for miRNA Quantification. *MicroRNA Expression Detection Methods*. Berlin: Springer-Verlag 2010. p. 131-40.
- 102 Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2008;**9**(1):387-402.
- 103 Malone J, Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology*. 2011;**9**(1):34.
- 104 Miran-seq-library-prep. 2013 ed: Wikipedia; 2013.
- 105 Illumina HiSeq2000. 2013 [cited; Available from: <http://www.genomics.cn/en/index>
- 106 Donaire L, Pedrola L, de la Rosa R, Llave C. High-Throughput Sequencing of RNA Silencing-Associated Small RNAs in Olive (*Olea europaea* L.). *PLoS ONE*. 2011;**6**(11):e27916.
- 107 Wang L, Liu H, Li D, Chen H. Identification and characterization of maize microRNAs involved in the very early stage of seed germination. *BMC Genomics*. 2011;**12**(1):154.
- 108 Wang C, Han J, Liu C, et al. Identification of microRNAs from Amur grape (*Vitis amurensis* Rupr.) by deep sequencing and analysis of microRNA variations with bioinformatics. *BMC Genomics*. 2012;**13**(1):122.
- 109 Bilitewski U. DNA Microarrays: An Introduction to the Technology. In: Bilitewski U, editor. *Microchip Methods in Diagnostics*: Humana Press; 2009. p. 1-14.
- 110 Nishimura I, Drake TA, Lusic AJ, Lyons KM, Nadeau JH, Zernik J. ENU Large-scale Mutagenesis and Quantitative Trait Linkage (QTL) Analysis in Mice: Novel Technologies for Searching Polygenetic Determinants of Craniofacial Abnormalities. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2003 September 1, 2003;**14**(5):320-30.
- 111 De Vries B PR, Leisink M, Koolen DA, Vissers L, Janssen IM, Van Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys E, De Leeuw N, Smeets D, Sistermans EA, Feuth T, Van Ravenswaaij-Arts CMA, Van Kessel AD, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA. Diagnostic Genome Profiling in Mental Retardation. *The American Journal of Human Genetics*. 2005 Aug 30;**77**(4):606-16.
- 112 Yoltas A Kİ. DNA Mikroarray Teknolojisi ve Uygulama Alanları *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR; 2010. p. 1-19.
- 113 Lin J-F, Wu S-H. Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*. 2004;**39**(4):612-28.
- 114 Lan L CW, Lai Y, Suo J, Kong Z, Li C, Lu Y, Zhang Y, Zhao X, Zhang X, Zhang Y, Han B Monitoring of gene expression profiles and isolation of candidate genes involved in pollination and fertilization in rice (*Oryza sativa* L.) with a 10K cDNA microarray. *Plant Mol Biol*. 2004;**54**(4):471-8.
- 115 Wang H MS, Kawai K, Deyholos M, Galbraith DW, Bohnert HJ. Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots *Plant Mol Biol*. 2003;**52**(4):873-91.
- 116 Aharoni A, Keizer LCP, Van Den Broeck HC, et al. Novel Insight into Vascular, Stress, and Auxin-Dependent and -Independent Gene Expression Programs in Strawberry, a Non-Climacteric Fruit. *Plant Physiology*. 2002 July 1, 2002;**129**(3):1019-31.

- 117 Booth SA, Drebot MA, Martin IE, Ng L-K. Design of oligonucleotide arrays to detect point mutations: molecular typing of antibiotic resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* and hantavirus infected deer mice. *Molecular and Cellular Probes*. 2003 4//;**17**(2–3):77-84.
- 118 Hiyama E, Yamaoka H, Kamimatsuse A, et al. Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients. *Journal of pediatric surgery*. 2006;**41**(12):2032-6.
- 119 Steensel B HS. Epigenomic profiling using microarrays. *BioTechniques*. 2003;**35**(346-357).
- 120 Pompeia C, Hodge DR, Plass C, et al. Microarray Analysis of Epigenetic Silencing of Gene Expression in the KAS-6/1 Multiple Myeloma Cell Line. *Cancer Research*. 2004 May 15, 2004;**64**(10):3465-73.
- 121 Davison TS, Johnson CD, Andruss BF. [2] Analyzing Micro-RNA Expression Using Microarrays. In: Alan K, Brian O, editors. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 2006. p. 14-34.
- 122 Yin JQ ZR, Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends in Biotechnology*. 2008;**26**(2):70-7.
- 123 Amiteye S, Corral J, Vogel H, Sharbel T. Analysis of conserved microRNAs in floral tissues of sexual and apomictic *Boechera* species. *BMC Genomics*. 2011;**12**(1):500.
- 124 Peng H, Chun J, Ai T-b, et al. MicroRNA profiles and their control of male gametophyte development in rice. *Plant Molecular Biology*. 2012 2012/09/01;**80**(1):85-102.
- 125 He X CY, Su Q, Yuan Y, Shi Y. MicroRNA expression profiling during upland cotton gland forming age by microarray and quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). *African Journal of Biotechnology* 2011 May 20;**10**(44):8695-702.
- 126 Jin W WF, Liang G, Guo A, Xiao L, Zhen Y, Guo Z. Microarray-based Analysis of Tomato miRNA Regulated by *Botrytis cinerea*. *J Plant Growth Regul* 2012;**31**:38-46.
- 127 Zhou J, Liu M, Jiang J, et al. Expression profile of miRNAs in *Populus cathayana* L. and *Salix matsudana* Koidz under salt stress. *Molecular Biology Reports*. 2012 2012/09/01;**39**(9):8645-54.
- 128 Sun W LY, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 2010;**12**:1-27.
- 129 Pillai RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*. 2005 December 1, 2005;**11**(12):1753-61.
- 130 Jin H, Tuo W, Lian H, Liu Q, Zhu X-Q, Gao H. Strategies to identify microRNA targets: New advances. *New Biotechnology*. 2010 12/31/;**27**(6):734-8.
- 131 Paul S KA, Pal A. Identification and validation of conserved microRNAs along with their differential expression in roots of *Vigna unguiculata* grown under salt stress. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2011;**105**(233-242).
- 132 B S. Revolution in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Analytical Biochem*. 1995;**227**:255-73.
- 133 T U. Detection and characterization of plant genes involved in various biotic and abiotic stress conditions using DDRT-PCR and isolation of interacting proteins. Ankara: Middle East Technical University; 2008.
- 134 mirVana™ miRNA Isolation Kit. 2013 [cited; Available from: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/AM1560>
- 135 Zhang Z, Yu J, Li D, et al. PMRD: plant microRNA database. *Nucleic Acids Research*. 2010 January 1, 2010;**38**(suppl 1):D806-D13.
- 136 Mikroarray Services. 2013 [cited; Available from: <http://www.lcsciences.com/services/microarray-services/>

- 137 Dai X, Zhao PX. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*. 2011 July 1, 2011;**39**(suppl 2):W155-W9.
- 138 Ozhuner E, Eldem V, Ipek A, et al. Boron Stress Responsive MicroRNAs and Their Targets in Barley. *PLoS ONE*. 2013;**8**(3):e59543.
- 139 BLAST Basic Local Alignment search Tool. 2013 [cited; Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]
- 140 Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl M. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*. 2006 2006/10/01;**28**(19):1601-13.
- 141 FirstChoice® RLM-RACE Kit AM 1700. 2013 [cited; Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_056070.pdf]
- 142 Götz S CA. Blast2go. 2013 [cited; Available from:]
- 143 L Z. Cloning and Characterization of microRNAs from Sorghum. OK, USA: Oklahoma State University,; 2010.
- 144 Szittyta G, Moxon S, Santos D, et al. High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC Genomics*. 2008;**9**(1):593.
- 145 Zhao C-Z, Xia H, Frazier T, et al. Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology*. 2010;**10**(1):3.
- 146 Ruan M-B, Zhao Y-T, Meng Z-H, Wang X-J, Yang W-C. Conserved miRNA analysis in *Gossypium hirsutum* through small RNA sequencing. *Genomics*. 2009 10//;**94**(4):263-8.
- 147 Morin RD MV, Aksay G, Mardis ER, Dolgosheina E, Sahinalp SC, Ebhardt HA, Unrau PJ ,18: 571-584. Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of *Pinus contorta* and *Oryza sativa*. *Genome Research*. 2008 APR;**18**:571-84.
- 148 Mao W, Li Z, Xia X, Li Y, Yu J. A Combined Approach of High-Throughput Sequencing and Degradome Analysis Reveals Tissue Specific Expression of MicroRNAs and Their Targets in Cucumber. *PLoS ONE*. 2012;**7**(3):e33040.
- 149 Song C, Wang C, Zhang C, et al. Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in trifoliolate orange (*Citrus trifoliata*). *BMC Genomics*. 2010;**11**(1):431.
- 150 Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC. Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. *The Plant Cell Online*. 2011 February 1, 2011;**23**(2):431-42.
- 151 Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2006 2006/01/01;**63**(2):246-54.
- 152 Liang C, Zhang X, Zou J, Xu D, Su F, Ye N. Identification of miRNA from *Porphyra yezoensis* by High-Throughput Sequencing and Bioinformatics Analysis. *PLoS ONE*. 2010;**5**(5):e10698.
- 153 Chi X YQ, Chen X, Wang J, Pan L, Chen M, Yang Z, He Y,Liang X, Yu S. Identification and characterization of microRNAs from peanut (*Arachis hypogaea* L.) by highthroughput sequencing. *PLoS One*. 2011;**6**:e27530.
- 154 Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell*. 2002;**110**(4):513-20.
- 155 Graser G, Hartmann T. Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta*. 2000 2000/07/01;**211**(2):239-45.
- 156 B G. Polyamines and plant alkaloits. *Indian J Exp Biol*. 2000;**38**(11):1086-91.
- 157 Thu-Hang P, Bassie L, Safwat G, Trung-Nghia P, Christou P, Capell T. Expression of a Heterologous S-Adenosylmethionine Decarboxylase cDNA in Plants Demonstrates That Changes in S-Adenosyl-l-Methionine Decarboxylase Activity Determine Levels of the Higher Polyamines Spermidine and Spermine. *Plant Physiology*. 2002 August 1, 2002;**129**(4):1744-54.

- 158 Blee E. Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research*. 1998 May;**37**(1):33-72.
- 159 Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in plant science*. 2001;**6**(5):212-9.
- 160 Holková I, Bezáčková L, Bilka F, Balažová A, Vanko M, Blanáriková V. Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010 10//;**48**(10–11):887-92.
- 161 Mishra S, Triptahi V, Singh S, et al. Wound Induced Transcriptional Regulation of Benzylisoquinoline Pathway and Characterization of Wound Inducible PsWRKY Transcription Factor from *Papaver somniferum*. *PLoS ONE*. 2013;**8**(1):e52784.
- 162 Mica E, Piccolo V, Delledonne M, et al. High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics*. 2009;**10**(1):558.
- 163 Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *The Plant Cell Online*. 2003 November 1, 2003;**15**(11):2730-41.
- 164 Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP. microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 June 28, 2005;**102**(26):9412-7.
- 165 Wu G, Poethig RS. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development*. 2006 September 15, 2006;**133**(18):3539-47.
- 166 Gandikota M, Birkenbihl RP, Höhmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal*. 2007;**49**(4):683-93.
- 167 Nonogaki H. MicroRNA Gene Regulation Cascades During Early Stages of Plant Development. *Plant and Cell Physiology*. 2010 November 1, 2010;**51**(11):1840-6.
- 168 Jung J-H, Seo P, Kang S, Park C-M. miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3/4/5 genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Molecular Biology*. 2011 2011/05/01;**76**(1-2):35-45.
- 169 Locus:AT3G20440. 2013 [cited; Available from: <http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT3G20440>]
- 170 Leon-Kloosterziel KM, Keijzer CJ, Koornneef M. A Seed Shape Mutant of *Arabidopsis* That Is Affected in Integument Development. *The Plant Cell Online*. 1994 March 1, 1994;**6**(3):385-92.
- 171 Matts J, Jagadeeswaran G, Roe BA, Sunkar R. Identification of microRNAs and their targets in switchgrass, a model biofuel plant species. *Journal of Plant Physiology*. 2010 7/15//;**167**(11):896-904.
- 172 Lurin C, Andrés C, Aubourg S, et al. Genome-Wide Analysis of *Arabidopsis* Pentatricopeptide Repeat Proteins Reveals Their Essential Role in Organelle Biogenesis. *The Plant Cell Online*. 2004 August 1, 2004;**16**(8):2089-103.
- 173 German MA, Pillay M, Jeong D-H, et al. Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nat Biotech*. 2008 08//print;**26**(8):941-6.
- 174 Juarez MT, Kui JS, Thomas J, Heller BA, Timmermans MCP. microRNA-mediated repression of *rolled leaf1* specifies maize leaf polarity. *Nature*. 2004 03/04/print;**428**(6978):84-8.
- 175 Zhu H, Hu F, Wang R, et al. *Arabidopsis* Argonaute10 Specifically Sequesters miR166/165 to Regulate Shoot Apical Meristem Development. *Cell*. 2011;**145**(2):242-56.

- 176 Sunkar R. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2010 10//;**21**(8):805-11.
- 177 Rodriguez RE, Mecchia MA, Debernardi JM, Schommer C, Weigel D, Palatnik JF. Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development*. 2010 January 1, 2010;**137**(1):103-12.
- 178 Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, et al. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell*. 2008;**133**(1):128-41.
- 179 Yoon EK, Yang JH, Lim J, Kim SH, Kim S-K, Lee WS. Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in *Arabidopsis* lateral root development. *Nucleic Acids Research*. 2010 March 1, 2010;**38**(4):1382-91.
- 180 Gibberellic acid. 2013 [cited; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Gibberellin>]
- 181 Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA Targets Directed by a Class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*. 2002 September 20, 2002;**297**(5589):2053-6.
- 182 Kasahara RD, Portereiko MF, Sandaklie-Nikolova L, Rabiger DS, Drews GN. MYB98 Is Required for Pollen Tube Guidance and Synergid Cell Differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*. 2005 November 1, 2005;**17**(11):2981-92.
- 183 Bischoff V, Nita S, Neumetzler L, et al. TRICHOME BIREFRINGENCE and Its Homolog AT5G01360 Encode Plant-Specific DUF231 Proteins Required for Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2010 June 1, 2010;**153**(2):590-602.
- 184 Matthewman CA, Kawashima CG, Húska D, Csorba T, Dalmay T, Kopriva S. miR395 is a general component of the sulfate assimilation regulatory network in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*. 2012 9/21//;**586**(19):3242-8.
- 185 Sanan-Mishra N, Kumar V, Sopory S, Mukherjee S. Cloning and validation of novel miRNA from basmati rice indicates cross talk between abiotic and biotic stresses. *Molecular Genetics and Genomics*. 2009 2009/11/01//;**282**(5):463-74.
- 186 Tang S, Wang Y, Li Z, et al. Identification of wounding and topping responsive small RNAs in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *BMC Plant Biology*. 2012 2012/02/22//;**12**(1):1-16.
- 187 Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*. 2007 06/28/print//;**447**(7148):1126-9.
- 188 Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, Zhang W, Zhu J-K. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC plant biology*. 2008;**8**(1):25.
- 189 Barozai MYK, Baloch IA, Din M. Identification of MicroRNAs and their targets in *Helianthus*. *Molecular biology reports*. 2012;**39**(3):2523-32.
- 190 Sun Y, Zhou X, Ma H. Genome-wide Analysis of Kelch Repeat-containing F-box Family. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007;**49**(6):940-52.
- 191 Schumann N, Navarro-Quezada A, Ullrich K, Kuhl C, Quint M. Molecular Evolution and Selection Patterns of Plant F-Box Proteins with C-Terminal Kelch Repeats. *Plant Physiology*. 2011 February 1, 2011;**155**(2):835-50.
- 192 Putative retroelement pol polyprotein. 2013 [cited; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SLL4>]
- 193 Apuya NR, Yadegari R, Fischer RL, Harada JJ, Goldberg RB. RASPBERRY3 Gene Encodes a Novel Protein Important for Embryo Development. *Plant Physiology*. 2002 June 1, 2002;**129**(2):691-705.
- 194 Ounaron A, Decker G, Schmidt J, Lottspeich F, Kutchan TM. (R,S)-Reticuline 7-O-methyltransferase and (R,S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase of *Papaver somniferum*

- cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *The Plant Journal*. 2003;**36**(6):808-19.
- 195 Desgagné-Penix I, Facchini PJ. Systematic silencing of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthetic genes reveals the major route to papaverine in opium poppy. *The Plant Journal*. 2012;**72**(2):331-44.
- 196 Gümüşçü A, Arslan N, Sarihan E. Evaluation of selected poppy (*Papaver somniferum* L.) lines by their morphine and other alkaloids contents. *European Food Research and Technology*. 2008 2008/03/01;**226**(5):1213-20.
- 197 Yang X-Y, Jiang W-J, Yu H-J. The Expression Profiling of the Lipoxygenase (LOX) Family Genes During Fruit Development, Abiotic Stress and Hormonal Treatments in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;**13**(2):2481-500.
- 198 Creelman RA, Mullet JE. BIOSYNTHESIS AND ACTION OF JASMONATES IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1997;**48**(1):355-81.
- 199 Kessler A, Halitschke R, Baldwin IT. Silencing the Jasmonate Cascade: Induced Plant Defenses and Insect Populations. *Science*. 2004 July 30, 2004;**305**(5684):665-8.
- 200 Hagel JM, Facchini PJ. Benzyloisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. *Plant and Cell Physiology*. 2013 May 1, 2013;**54**(5):647-72.
- 201 Facchini PJ, De Luca V. Phloem-Specific Expression of Tyrosine/Dopa Decarboxylase Genes and the Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids in Opium Poppy. *The Plant Cell Online*. 1995 November 1, 1995;**7**(11):1811-21.
- 202 Wasternack C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany*. 2007 October 1, 2007;**100**(4):681-97.
- 203 Peebles CAM, Hughes EH, Shanks JV, San K-Y. Transcriptional response of the terpenoid indole alkaloid pathway to the overexpression of ORCA3 along with jasmonic acid elicitation of *Catharanthus roseus* hairy roots over time. *Metabolic Engineering*. 2009 3//;**11**(2):76-86.
- 204 Keinänen M, Oldham NJ, Baldwin IT. Rapid HPLC Screening of Jasmonate-Induced Increases in Tobacco Alkaloids, Phenolics, and Diterpene Glycosides in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001 2001/08/01;**49**(8):3553-8.
- 205 SPOLLANSKY TCP-A, S. I. GIULIETTI, Ana M. . Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electron J Biotechnol [online]*; 2000. p. 31-2.
- 206 Baldwin I, Schmelz E, Ohnmeiss T. Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* *spagazzini* and *comes*. *Journal of Chemical Ecology*. 1994 1994/08/01;**20**(8):2139-57.
- 207 Pauli HH, Kutchan TM. Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*. 1998;**13**(6):793-801.
- 208 Qiu D, Pan X, Wilson IW, et al. High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*). *Gene*. 2009 5/1//;**436**(1-2):37-44.
- 209 Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE. Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 October 23, 2001;**98**(22):12837-42.

210 Bell E, Mullet JE. Characterization of an Arabidopsis Lipoxygenase Gene Responsive to Methyl Jasmonate and Wounding. *Plant Physiology*. 1993 December 1, 1993;**103**(4):1133-7.

EKLER

EK1: Derinlemesine Dizilemede Bulunan miRNA Ailelerinin Olgun miRNA Dizileri

miRNA Ailesi	Sekansı 5'-3'
miR535	TGACAACGAGAGAGAGCACGC
miR156	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
miR166	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC
miR167	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA
miR168	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA
miR157	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC
miR172	AGAATCTTGATGATGCTGCAT
miR164	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA
miR2911	GGCCGGGGGACGGATTGGGAAC
miR159	TTTGGTTTGAAGGGAGCT
miR408	ACAGGGACGAGGTTGAGCATG
miR780	TCAGCAGGAGTTGAGCAGGTA
miR2916	TGGGGGCTCGAAGACGATCAGA
miR2108	TTGAAGTGTGTGTTTGTG
miR5225	TTCGCTGGAGAGATGCTACCA
miR6027	TGTGGATAGCAGAAGGATTTT
miR4351	TGGGATGTAGTTGGTGTGAT
miR319	TTGGACTGAAGGGAGCTCCC
miR396	TTCCACAGCTTTCTTGAA
miR1439	ATTTTGAAACGGAGGGAGTAT
miR1037	ATGATTAGGATTTGATGG
miR390	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC
miR2673	TGAGGAAGATGAAGAAGCCTC
miR1851	CGTACTGAGGAGGCATTTTGG
miR1089	AGATCCTCTAGGATGGTTG
miR1310	GGCATCGGGGCGCAACGCC
miR5558	TAGGTTTAGAAATAGGAG
miR171	CGATTGAGCCGTGCCAATATC
miR530	TCTGCATTGGCACCTGCACCT
miR2628	CATGAAAGGATGATGAGG
miR827	TTAGATGATCATCAACAAACA
miR5205	CATCTAAATTGGAACGGAAGGAG
miR1514	TATTATGAAAATAGGCATG
miR894	CGTTTCACGTCAGGTTACCA
miR160	GCGTGCGAGGAGCCAAGCATA
miR1511	AACCTGGCTCTGATACCA
miR1507	TTCATTCCATAGATCATCTAG
miR395	ATGAAGTGTGTTGGAGGAA
miR4233	GGATTGGATGTGGATGAGGTAAAA
miR1850	ATTGTGGGTGAACTAGACGATGG
miR472	TTCCGAGTCCGCCCATACC
miR1023	AGGGAATTGGAAGAGTA
miR165	TCGGACCAGGCTTCCCCC
miR1863	CTGCTCTGATACCATGTTAGAAT

miR845	TCAAATGGTATCAGAGCTAG
miR393	TCCAAAGGGATCGCATTGTTT
miR1432	CCAGGAGAGATGATACAGACA
miR2948	ATGATGGGAGAAGTGGGCAAGAAT
miR1044	TGAGTGTATATTTGTATT
miR1312	TTTGGTAGAGAAAATGGCGCT
miR823	TTTGGTGATCAATTGGGA
miR2867	AAGGTGTGGGATCGGACATGGC
miR1114	AATGGGACAAAACATTGACGAAGG
miR397	TCATTGAGTGCAGCGTTGATG
miR1051	TGGCTTCAAGTGAAGTGGGAGA
miR1852	TATGGATGCAGAATGCAGAGTA
miR2099	TCGGAATATGTGTTGGCAAGCTTT
miR2111	TCTTGGTTGAAGATTACT
miR2643	TTTGGGATCAAAATGAAGACGA
miR854	GATGATGATGAGGAGGAGGAGGAG
miR398	AGGTCATGAGAACACGGG
miR950	CTAGGTCCCGGTGGTTTT
miR1847	TGAATTTTGCAGTTGTGAC
miR1534	TATTTTGGGTAAAGACGTT
miR1106	TTTAAAAGATGTTAATGGGGA
miR901	GAAAGTGACGGCTAGGTT
miR4393	TGGAGAATATGACGGCAAGAAG
miR6466	TGAGGTAAGAGCATTGTTGGTGG
miR844	TAGTAAGATTGATTATAGT
miR835	TGATGAAGAACATATGAAAAAC
miR2119	CGAAAGGGGGTGTGGAGAG
miR845	CTAGCTCTGATACCATTGATGGA
miR1533	ATAATAATAATAATAACG
miR5565	AAATGCAGGTATGTTGTT
miR2055	TTCCTGGGAAGGTGGTATG
miR829	TAGCTCTGATACCATTGATGGAT
miR169	CAGCCAAGGATGACTTGCCGA
miR1153	TGGGCCATCGTACATTCAG
miR394	TTGGCATTCTGTCCACCTCC
miR1061	GAGAGTCAATGGAAAAAG
miR1862	AAGGATGGTTTATTTTCGAGGACG
miR528	TGGAAGGGGCATGCAGAGGAG
miR1223	TTAAGATTCATGCACCTTG
miR1146	ATAGCCAATCGGGAAGCT
miR5658	CATGATGAAGATGACGATGATCAT
miR1028	TCTCACATCTGCATTGCATCTC
miR1510	GAGAATTAGGTAAAACAGC
miR2931	TTATTGATGATGTAAATGAC
miR1152	TAGAAGGTGCGCTGTGCTG
miR1514	TAGGTTTGAAAATAGTAATT
miR399	TGCCAAAGGAGACTTGCCCGG
miR1881	TGATGTTATTTGTAGGTGGTGGTG
miR158	TCCCAAATGTAGACAAAGCA
miR1150	TCGCGGCGACTGGGGCGGT
miR860	TCGAATGATTGGACTATGGA
miR855	AGGTAAAAGTAAGGAAAAGAGCAA

miR5181	TTCAGATCCATCAAAAAGTTA
miR2411	TGTATTGAGAGACCGTTAGATGCA
miR2092	CAATTGAAGTCGGAGTTAC
miR1850	TGAATGTTGGGAAATCGGTCAGAA
miR2615	TGGATTGTATTTTAAGAGGC
miR1508	TCTAAAAAGGGAAATACGTG
miR1040	TGATACGCAAATCAACATGTA
miR2091	AACATTCCCACCTAGGCTTG
miR2636	TTTGGTTAGTTTGCATGT
miR2634	TTGATTTTGAGTTTGTCTTC
miR161	TTGAAAGTGACTACATCGGGG
miR2097	AAGAGATGGGACGGGTCAGGAGAG
miR1314	TCGACCTCGAATGTTAGGAGAA
miR473	GAAGCTTCGTGGGAGAGTGA
miR1867	TTTTTTTTTTAGCAGAGGGATT
miR1080	TTCATCTGCAATCACCTCT
miR1433	GCAAGTCTCCTCGGCTAG
miR1217	TGGATCATGTTGCATATATGATGC
miR912	TGGATTGATCCCAGCCAGGCG
miR415	AGACGAGAGCAGAAACAGAAATG
miR2275	TTTGGTTTCCTCCAACGTCTCA
miR1070	ATCGGTTGTCAGTAAAACCTTGCAT
miR2936	CTTGGAGAGAAAGAACAACAACGG
miR162	TCGATAAACCTCTGCATCCAG
miR6434	TTTATTGATAATGCGTACATAGAT
miR426	TCTTTGGAAATTTCGTCCTACT
miR1154	ACTTAGTCATCCCAAGGCGTG
miR820	TCGGCCTCGTGGATGGACCAGGA

EK2: Derinlemesine Dizileme Sonucu Bulunan Bazı Korunmuş miRNA'ların Pre-miRNA Dizileri

miRNA Adı	Pre-miRNA Uzunluğu	MFE (kcal/mol)	Pre-miRNA Dizisi
pso-miR157	204	-59,1	TGATATGTTG TTGACAGAAGATAGAGAGCAC AGATGATGATATGCAAAACTCATCATCATTATCATTGTTATCAATACTATTCTTTGTTTTTAGGGTTT AGAAATTTGGAGAGACATTATCATTATTATGCATTTCACTCCATTTGTGCTCTCTATGCTTCTGTCATCACTCTTCCACCCTTCTTTTATATATATCC
	180	-56,4	CTGTGCGTGAT GTACAGAAGATAGAGAGCAC AACCCGAATCCTCGGGCGAAGTATCGGTGGTCACTGTTTCTGGTTGCCACCTCACTACCCTGAGAG ATTACATTAGGAAGTTGCTGATTGAAAGACAGCTGAGAAGAACTATTTGCTTGCTTTGTCTTTGCCATTTTTATGCAGGA
	107	-50,8	TTTTGATTGG TTGACAGAAGATAGAGAGCAC AATTTATCATGCACAAGGGAGAAGTGTGTTGAGCAGCTTTGTGCTCTTATCTCTTCTGTCAACCAC ATAAAAT
pso-miR530	214	-74	GGTCCCTTCA TCTGCATTTGCACCTGCACCT TATTCACACTTCTTTTTCTTTCTCCACCAACATAGGAAAAGGGTTTTTTCTTTACTTTGAAATAACTTAATT AGCCCTTAAAGTACTCTTTAAAGTACTCTTTCATGAATATGAAGAACGAAAAGGTGAGAGAAAAAAGGATCAATGATCAAAGGTGCTGGTGCATTTG CAGCTGAATGCCA
pso-miR156	105	-51,7	TCAAGGAAGGT GTACAGAAGAGAGGGAGCAC ACATAGTTATTTTCTTGTCATGGCCGCTTATGCTAGATATTCTGTGTGCTTTCTCTCTCTGTCCACAGT CGTAA
	137	-52,31	TTGAAAGAGC GTACAGAAGAGAGTGAGCAC ACACTAAACCTAATTGTATGAGAAATTTTCTTAAAAAAGTTGAAAGTTCATACCTTTACTTAGTATG TGCTCATTTCTTTCTGTGTCAGGCCCTTCTCTTTCTT
	113	-47,1	TTGGATAATTT GTACAGAAGAGAGTGAGCAC CCAGAGGCAGTTGCTATAAAGTGTATATCAATACTTTTGCCTGCTCACTTCTCTCTGTGTCAGATTCGTT AAACGGATCCAGT
	152	-60,4	AATTAGGGGG GTACAGAAGAGAGGGAGCAC ACATAGTTGTTTTCTTGTCATATGCAAAATATAATGTTGTGTTCACTTATTAACTTTCAATAAATGA TATCAATGCTCGAAGCTTTGTGTGCTCTATCTCTCTGTCCACCCTCTAACC
	101	-54,2	AATTAGAAGT GTACAGAAGAGAGTGAGCAC ACAGAGGCTTTTGGTATAATAATATGCCATTGCTCTTGTGTGCTCACTTCTCTTTCTGTGAGTTCCCTT

			G
	129	-69,9	GAGTAAGGGGAAGGGGGAGG TGACAGAAGAGAGTGAGCAC ATAAGGTAACCTTCTTGCATGTTAGGGTTCATGCTTGAAGCTTTATGTGCTTACTCTCTATCTGTCACCCACCAAATCTCTCTCTC
pso-miR397	92	-34,25	TGAAGATACG TCATTGAGTGCAGCGTTGATG TCAAACCTATTTCAAATTTCTAACTTTTCCCATCAGCGCTTCATTCAATCACGTTTCTTCC
pso-miR171	97	-41,4	CGTATCGTGTCTGATGTTGGAACGGTTCAATCAAATCAAATCTCCTATGAATTGGGTCTTTAATTT GATTGAGCCGTGCCAATATC GACCATTGTC
	107	-41,7	TAGTTTACTTTGATATTGGCCCGTTCACTCAGATAAATATGGTATTAGATACGTATTCATCATTTACGATATATTT GATTGAGCCGTGCCAATATC CAGTACT
	104	49,2	TTTGATTTAAACGGGATATTGGTGCAGTTCAATAAAAAGGTAATGCTCAAATAAGCGTTGGGTTTTGCTTTTT GATTGAGCCGTGCCAATATC ACGTGTCAAC
	107	-41,7	TAGTTTACTTTGATATTGGCCCGTTCACTCAGATAAATATGGTATTAGATACGTATTCATCATTTACGATATATTT GATTGAGCCGTGCCAATATC CAGTACT
	104	-49,2	TTTGATTTAAACGGGATATTGGTGCAGTTCAATAAAAAGGTAATGCTCAAATAAGCGTTGGGTTTTGCTTTTT GATTGAGCCGTGCCAATATC ACGTGTCAAC
pso-miR394	135	-50,5	ACAGAATTTA TTGGCATTCTGTCCACCTC CTCCACATATTAATTTATATTTATATATACATATATATAAATTTGTGTGTGTTTATTGTTATAATTAATGGTTGGAGGTGGGCATACTGCCAATTGAGTTCTCT
	135	-44,13	ATAGAGTTTA TTGGCATTCTGTCCACCTC CCCTCCTTCTTCAAATCTTCTATTCAAATTTTTGTTATTCTTTAAAAGAAAAAATTGATTTATAATATTGGGGAGGTGGGCATACTGCCAATTGAGTTCTGTT
pso-mir164	110	-36,7	AGAATCCTGCT TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA TGGCACATGCCATATATACACAAACACATGATACACACCCTCCACTGCACGTGCTCCCTTTCTCCAACATGCCTCTC
	124	-68	CCGATCAGGA TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA TTACTCACTCGTGAAGTCTAACACAACACCACCGGTGGCTGTGTCTGAGTGAGTGGGTTGTTGATGTGCCCTCTTCTCCATCCTGACCAC
	231	-63,15	AAGAGCAAGATGGAGAAGCAGGGCACGTGCTTACTAACTCATTCCAATTCAAATCCCATCTCTTTTTTTCTTTCTTTTTTCTTAATGTTTGTTAAGAAGTGATTTGAAATTTGGAAGAAAAAGGGTTTTTTCTTTTTCAATGTATTTTGGAGTAGTTCTTCATGTGCCCTCTTCCATCCAGACCCTG

			CACCTTAATTAATGGAAACTTTGCTTCT
pso-miR167	207	-59,6	TTTGAGAGGT TGAAGCTGCCAGCATGATCT GATTTAATTTGCTGAATTCTCTTTAATTTAGAGGTTTTTATAAAGCAATATTATTGAAATTAATAAGGC AAAAATGGGCTCTCTTTTTTTTTTTAATGGATTTTGATATTATGGTTTTCAAGGGTTTTTTATATTTGAAAATCAGGTCATTCTAGCAGCTTCAATCAC TCATT
	101	-37,5	CACCAGCAGT TGAAGCTGCCAGCATGATCT AAACTTCTTCTTGCTCTTCACACAAGCCAAGGAAAGATCAGATCATATGGTAGCTTCACCTTTTGATGGT A
	102	-45,6	TTTGAGAGGT TGAAGCTGCCAGCATGATCT GAGGAACGCTAAAACATTTGGTTAAAGATTGGTTTCTCCATCAGGTCATCTTGCAGCTTCAATCACTCA AT
	158	-55,7	AAGGAAAAGGT TGAAGCTGCCAGCATGATCT ACCTCTGGTCTGCTAGCTTGAAAAGACAAAAGCGTAAAGATAAAGAGATTGATTCATACCAATTTCTT TTTTCTTCATCCATTGGTAACCTAGTTAGGTCATGCTCTGACAGCCTCACTCCTTCTTA
	109	-47,1	CACTAGCTGT TGAAGCTGCCAGCATGATCT GAATCTGAACCTCCGCCGCCCGATCTCACGTCCGGTCCATCGGAATCGGATCATATTGGTAGCTTCATC TGCTCATGG
	101	-37,5	CACCAGCAGT TGAAGCTGCCAGCATGATCT AAACTTCTTCTTGCTCTTCACACAAGCCAAGGAAAGATCAGATCATATGGTAGCTTCACCTTTTGATGGT A
pso-miR166	277	-66,7	GGAATGGAGTTTGCTCCGAAATCTTCTTCTTTCTTTTTGTCAATCCTTTGAAAGGAGAAGAAATAAACTACATGTCAATGTCTTTTCTTTTCAT TATTTTCAAGTTTCTTCTTGCTTTCTTCAAATGTTATTCTATGTTGTTTTTCCCTAACTAAAAGTAGTCTTCTTCTTTCGATTTGAAAAGTTG TTGGTGTGATTGAACGGAAAAATGATC TCGGACCAGGCTTCATTCTC CACACGTACCT
	111	-53	GTTGAAATTGTTGAGGGGAATGCTGTCTGGTTCGAGACCGTTGTTGGATATCGTCGTTGTTCCATGATGGGAACGATC TCGGACCAGGCTTCATTCC CCCCAACTCGAA
	107	-44,94	TTTCTTTGAGGGGAATGTTGTCTGGCTCGAGGACACTTGTCTTTTTCATCCATTTCTGAATTCATTAGTGTCG TCGGACCAGGCTTCATTCCCCCAA TTGCCT
	175	-50,61	AATTTGTTTGAGGGGAATGTTGTCTGGCTCGAGGTCACTTTTTTCTTCTCAAATCAATTCCATCTTTATATATTTGGTTTTAATTTCAAACAAAT TTCGACGATCGACGAATTGATTCATTCAAACCAAAGTGTCG TCGGACCAGGCTTCATTCCCCCACA AAATTT
	275	-68,7	TTAGTGTGTC TCGGACCAGGCTTCATTCCCC CAATTAATTCTATCTCTCAACAAGAACAACAAGAACAATTACAGAAAAATACAATACCACAAAAGGT TTGATTTGTTTTTTCTTTTTTTGTTTTAAATTTGCATTCATATAATTTGTTATTTCTATTTTGGTAAATGGATTTTATGAGCAGATAATGTTGTGTG

			TGTGTGTGTGCGTTGGAAGTGAACCTATTAACATGGGGTGTGCGAGATTGGTATAATGATGAAGCTTTT
	130	-54,3	GAATAGTTGAGGGGAATGTTGTCTGGTGCAGATCTTTCATTTCTTTGAATTTTTGAAACCCTTAATTCAAATTACAACCTTTACTTTTGAATGATTTC GGACCAGGCTTCATTCCCCTCAACGCACA
pso- miR390	131	-69,6	AAGTTAAGAAGAATCCTCTGAAGCTCAGGAGGGATAGCGCCGTTGATTGAAGGCGGTTCCGTTTACGGGTTGGCGATTTCTCTATCGCGGCGCTATCC ATCCTGAGTTTCACTGGTCTTCTTGCTCTGCC
	112	-46,2	AGAGTCCGTTAAGCTCAGGAGGGATAGCGCCGTCATCGTTTCGATTACCTCCCTCGACATCATCATCTTATTATTTCTCGGCGCTATCCATCCTGAGTTT CCCGGCTTCTT
	116	-43,1	AGAATCTGTTAAGCTCAGGAGGGATAGCGCCACCGAATATAAAGAAAGATTACCGAATATTCCTTCTCGTCGCCCTGCTTCCGGGCGCTATCTATCCT GAGTTTCATGGCTTCTT
	140	-56,4	TTAGTATGGAAGAACCTGTAAAGCTCAGGAGGGATAGCGCCAATTAATAGTACAAAATAATTTTCGTTCAAAGCTTCACACTTTGCTTTTTGTTAATGGC GCTATCCATCCTGAGTTTCATAGCTTCTTCTTGCTCGGCT
pso- miR168	231	-82,7	TAACACCGGCGGTCTCTAATTCGCTTGGTGAGGTCGGGAAACCGCTTCGCTCAGCCTACGGTTTACGTTTCTCGTTGGCCGGTCTTCTTCATCTTCTTT CTTGTTCTTCTGCTTTTTGTTTTTGTCTAATTTCTTTCGCGCTGTGCGGTGTATGTTGTTGGAAAAATGTGTGGGCGAATTGGATCCCGCCTTGATC AACTGAATCGGAAACCGTGGTGAAGATT
	201	-71,7	AGTCATCGGCGCTCTCTAATTCGCTTGGTGAGGTCGGGAACTGTTTCGCTTTTTGTTTCATCATGATCTCTTGATTGTTGTTCTCTTTCAATTCCTCTG CGTTGTTAGGGGAAATATATATATATGTGTGTGTGTGTAATCGAGCGAATTGGATCCCGCCTTGATCAACTGAATCCGAGACAGCGATGAAGAT T
pso- miR172	98	-37,11	TGTTTGCTATTGCTGCATCTTCAAGATTCACAAGTTTTTTTCTTCTATTTTTGCTCCAAACCCCTTGAGAATCTTGATGATGCTGCAAGTGGCAATTA
	113	-56	GTTGTTGCTGGTGTAGCATTATCAAGATTCACATTCAAATGTGTTGGGGCTACATTATTCCTGCACATTTCTTTCGAACTGAGAATCTTGATGATGCTG CATCGGCAATCAA
	143	-51,3	TAATTTGCTTGTGCGGCATCATCAAGATTCACAACAAAATAAGAATAAGAAAAAAGGAAACCCTAATTTATTTTTGAGGATTGATTTGTTTTGAGGA TGATTTGATTGAGAATCTTGATGATGCTGCATTAGCAATAAC
pso- miR160	98	-59,3	GTGTGTATGTGCTGGCTCCCTGTATGCCATTTGTAGAGCGCATCGGAATCCGATGGGCCTCCGAGATGGCGTATGAGGAGCCATGCATATATCTTA
	123	-49	TTTATATATGCTTTCATATGCTGGCTCCCTGTATGCCATTTGTAGAGCGCTCACCGTCATACCCGATGGCCTCCGCGCATGGCGTATGAGGAGCCAAG

			CATATCCATGTCTATATTTCTA
	101	-48,1	TCATCGTAATGCTGGCTCCCTGTATGCCATTTGCAAAGCCCATCATCTAAAAATAGGTGGCCTTCTCGAATGGCATGCAAGGAGCCATGCATGTGTAAAT
pso-miR319	217	-95,01	TTGTAAGGTTTCTCGGGTTTGAGAAACAAGGGAGCTCTCTTCAGTCCAGTCCAAGGCAGTTTCTCGGTTGTTACTTAGCTGCTGACTCGTTGGCTCAATAACTGATCAACTGATATATTAGCTTGAACAATGATGTGTTTCTGAACCAACGATGCAGGAGCCAAGTTCAGCCATGGCTGTCACGTCCTGGACTGAAGGGAGCTCCCTCACCTTCCA

EK3: Derinlemesine Dizilemede Okunan Küçük RNA'ların Morfin Sentezinde Rol Oynayan Genlerle Örtüştürülmesi, Bu küçük RNA'ların Papaver EST lerinde Bulunması ve İlgili miRNA'lar ve Hedeflediği Genlerin Tüm İn Siliko Analizleri

Morfin senteziyle ilişkili genler ve derinlemesine dizilemede okunan küçük RNA'ların örtüştürülme sonuçları

miRNA_Acc. (küçük RNA ID)	Target_Acc.	Expectation	UPE	miRNA_start	miRNA_end	Target_start	Target_end	miRNA_aligned_fragment	Target_aligned_fragment	Inhibition	Target_Desc.	multiplicity
t002578	7omt	3.0	18.643	1	24	627	650	UUGGAAUUUUGAUUU AUUUAGCGG	UCCUGAAAUGAAUCAA AUUUCCAA	Cleavage		1
t0022558	7omt	3.0	7.792	1	20	2247	2266	AAGAAGAAGGAAACUA AAAC	GUCUUAGUUUCUUUC AUCUU	Cleavage		1
t0022621	7omt	3.0	8.243	1	20	1315	1334	AGCUAGAAGUAAGAC GAAUU	GAUUCGUCUUGCUUC UAAUU	Cleavage		1
t0023061	7omt	3.0	8.51	1	20	1341	1360	GAUGGAGGAGAAGAG AAGAU	UUCGUCUCUUCUCCUC UAUU	Cleavage		1
t0024040	7omt	3.0	15.603	1	21	849	869	AUUUUUGUGAUUGUU GGAUUU	AAUCCAACUAAUACA AAAGU	Cleavage		1
t0030199	7omt	3.0	13.626	1	20	673	692	AAAUGCGCUGUGGCU AAUCC	GGAUUAGUUACUUCG CAUUU	Translation		1
t0033052	7omt	3.0	17.099	1	24	1767	1790	UUGAAUAUGGAUAGG AGGAAGGCU	AGGAUUCGUUUAUC CAUAUCAA	Cleavage		1
t0034030	7omt	2.0	18.7em	1	22	630	651	AUUGGGACUUUGAUU GAUUUCG	UGAAAUGAAUCAAAU UUCCAAU	Cleavage		1

t0041534	7omt	2.0	20.25	1	21	1216	1235	UAUAGGCAGACUCCAUAACCA	UGGUUAUG-AGUCUGCCUAUA	Cleavage		1
t0049233	7omt	2.0	15.148	1	20	1108	1127	AAGAUAAUAAGAUGACUGCU	AGUAAUUAUCUUAUUAUUU	Cleavage		1
t0060840	7omt	3.0	12.687	1	20	1655	1674	UAGUCGUCAAGGAAGUUCUG	CAGAACAUCUUCACGAUUG	Cleavage		1
t0069063	7omt	3.0	15.337	1	20	904	923	UCCUUUAGAAUAUGGCGUC	GAUGCCAUAUUUAUGAAGGU	Cleavage		1
t0071347	7omt	2.0	7.578	1	20	1342	1361	UGAUGGAGGAGAAGA GAAGA	UCGUCUCUUCUCCUCUAUUA	Cleavage		1
t0075475	7omt	3.0	16.012	1	23	1776	1798	UCUGGGUUUUGAAGUUGGAUAAA	UUCAUCCAUAUUCAAAACUUAGA	Cleavage		1
t0076103	7omt	3.0	10.596	1	22	73	94	GGUGUUGAUGAUGAGGAAGGUG	UGUCUACUCAUCAUCAACAAC	Cleavage		1
t0012990	4omt	2.0	14.521	1	20	298	317	UCAGGUGGAACGAGUAUCUU	AAGAUACUUGGUACAACUGA	Translation		1
t0035119	4omt	2.0	12.538	1	24	1238	1261	AAGAAGAGAAAGGUA GAAAACUA	UUUGUUUUUCCCUUUUUUUUCUU	Cleavage		1
t0016514	4omt	3.0	11.617	1	24	1245	1268	AAGGAAAAAGAAGAA GUUGGAGAA	UUUCCCUUUUUUUUCUUUUUCCUU	Cleavage		1
t0047882	4omt	3.0	12.827	1	23	1242	1264	AGGAAGAAGAAAAAGGUGAAUGA	UUUUUCCCUUUUUUUUUUCUUUUU	Cleavage		1
t00504	4omt	2.0	8.09	1	21	1238	1258	AAAAAAGCGGAAAAA	UUUGUUUUUCCCUU	Transl		1

26			2					ACUAG	UUUUUU	ation		
t0054558	4omt	2.0	11.6 17	1	24	1245	1268	AAGGAGAAAGAGAAA GAGGGAGAG	UUUCCCUUUUUUUUC UUUUUCCUU	Cleavage		1
t0058198	4omt	3.0	12.2 81	1	21	1245	1265	GAGGAAGAAGAAAA GGUGAA	UUUCCCUUUUUUUUC UUUUUC	Cleavage		1
t0059747	4omt	2.0	15.0 51	1	21	298	318	UUCAGGUGGAACGAG UAUCUU	AAGAUACUUGGUACA CCUGAA	Translation		1
t0060589	4omt	3.0	21.N is	1	20	139	158	CAGCAAACCCUGGAU UCUG	UAUAAUCUAUGGUUU UGCUG	Translation		1
t0062959	4omt	2.0	12.4 61	1	20	1244	1263	AAAAGAAGAAGAAGU GGAAA	UUUUCCCUUUUUUUU CUUUU	Cleavage		1
t0074678	4omt	3.0	12.5 38	1	20	1242	1261	AGGAAGAAAGAGGGA GACAA	UUUUUCCCUUUUUU UUCUU	Cleavage		1
t0075045	4omt	3.0	12.2 81	1	24	1242	1265	GAGGAAGAAGAAAA GGUGAAUGA	UUUUUCCCUUUUUU UUCUUUUUC	Cleavage		1
t0076209	4omt	3.0	11.5 81	1	23	1245	1267	AGGAGAAAGAGAAAG AGGGAGAG	UUUCCCUUUUUUUUC UUUUUCCU	Cleavage		1
t0075330	4omt	3.0	12.8 27	1	23	1242	1264	GAAAGGAAACAAAAGG AAAUGA	UUUUUCCCUUUUUU UUCUUUUU	Translation		1
t0002797	6omt	3.0	08.A gu	1	20	328	347	AUUUGGAUGAGCGAG UUGAA	UUUAACUCGAUCAUC AAAAU	Translation		1
t0056358	6omt	2.0	13.6 58	1	20	373	392	AUGAAACCCGUGGUG AUGGA	UCUGUACCACUGGU UUUAU	Translation		1

t0065128	6omt	3.0	18.784	1	21	1272	1292	UCUGAAUUGUGUUGUUGGGAU	GUUCCUACAAAUAUUCAGA	Translation		1
t0075119	6omt	3.0	18.357	1	20	1274	1293	UUUUGAAAUAUGUUGUGGGA	UCCUACAAAUAUUCAGAA	Cleavage		1
t0076989	6omt	3.0	8.467	1	24	320	343	AGAUGGUUGAGUUAUAUUUGGUG	CUCUAUAUUUAACUCGAUCAUCA	Cleavage		1
t0008151	sat	3.0	7.187	1	21	107	127	AGUAUAGAGGACAACAUGGAU	AUCAAUGUUUCCUUUAUAUU	Cleavage		1
t0013376	sat	3.0	6.32	1	21	102	122	AAAGGAAAACAUGGGACGGGA	UCUCGAUCAAUGUUUUCUUU	Cleavage		1
t0020929	sat	3.0	6.32	1	21	102	122	AAAGGAAAACAUGGGACGGGA	UCUCGAUCAAUGUUUUCUUU	Cleavage		1
t0038532	sat	3.0	6.356	1	23	124	146	AGAAUGAUUGGGACA AAAGGUUG	UAUUUAUAUGUCCA AUCAUUCU	Cleavage		1
t0040704	sat	3.0	6.204	1	19	88	107	UCGAGAAUUGACAG-UUGAA	UUCAUCUGUCACUUCUCGA	Cleavage		1
t0048519	sat	3.0	Haz.31	1	20	107	126	GUAUAGAGGACAACAUGGAU	AUCAAUGUUUCCUUUAUAUU	Translation		1
t0057134	sat	2.0	16.578	1	22	1398	1419	CAAUUCAAGGACGUCGCUUAUG	CCUAAGUGAAAUCUUCAAUUG	Cleavage		1
t0059502	sat	3.0	11.189	1	21	1000	1020	UGUUUUGUAGACUGCAUUGGU	ACAAAUGCGGUACAAGACA	Translation		1
t00478	cor	3.0	14.7	1	20	219	238	CAUUGCGAGAUUUUG	UCUAAUAAAUCUCGA	Cleavage		1

47			45					UUGGA	GAUG	ge		
t00551 27	cor	3.0	19.3 48	1	22	283	304	GAAGAGCAGGUGGAG CAAGAGC	GAUCUUGUCCUCCCU GCUCUUC	Transl ation		1
t00726 48	cor	3.0	15.5 13	1	20	351	370	AGUAUACCGGAUGGA GUAUC	GAUACACCAUCCGGUA AGCU	Cleava ge		1
t00201 20	cnmt	2.0	14.0 33	1	21	35	55	UGUGGAUUUCUACGA GGAUAG	UUGUCUUCGUAGAAA UCCACU	Cleava ge		1
t00225 44	cnmt	3.0	16.2 46	1	20	1259	1278	AAUGGAGACAACAAGA AGAA	UUGUUUUUGUUGUCU GCAUU	Cleava ge		1
t00288 53	cnmt	3.0	15.5 2	1	20	8	27	AUGAAAUGCAAGUUA GGGUC	GAUUCUCUCUUGCAU UUCAU	Cleava ge		1
t00380 69	cnmt	3.0	16.4 85	1	21	326	346	AAGAAUUCUGAUGGU UAUUGA	UGAAUUACCCUCAGAA UUCUU	Cleava ge		1
t00382 40	cnmt	3.0	16.6 86	1	23	22	44	ACGAAGACAGGAUUU AUAUGGAG	UUUCAUUUUAGUCUU GUCUUCGU	Cleava ge		1
t00412 65	cnmt	3.0	15.5 2	1	20	7	26	UGGGAUGCGAGAGAG GAUCA	AGAUUCUCUCUUGCA UUUCA	Cleava ge		1
t00451 18	cnmt	3.0	09. Mar	1	21	1278	1298	AAAAGAGAAGAAGAA GUGGAA	UUCUACUUUGUUUUU UCUUUU	Cleava ge		1
t00480 73	cnmt	3.0	16.5 58	1	20	1250	1269	AACAAAGACAAGCGAA AUCG	GGGUUUGGCUUGUUU UUGUU	Cleava ge		1
t00504 21	cnmt	3.0	20.2 22	1	20	614	633	UGGCGUUGUCGUUUG UCGAG	GUUGACAAACGUCGAC GCCA	Transl ation		1

t0052960	cnmt	2.0	9.947	1	23	1274	1296	AAGAAAGAAGAAAGUAGAGAUCC	GCAUUUCUACUUUGU UUUUUCUU	Transl ation		1
t0053130	cnmt	3.0	16.558	1	21	1249	1269	AACACGAACAAGCCAA AUCUU	GGGGUUUGGCUUGUU UUUGUU	Cleava ge		1
t0066441	cnmt	3.0	16.57	1	22	326	347	GAAGAAUUCUGAUGG UUAUUGA	UGAAUUACCCUCAGAA UUCUUA	Cleava ge		1
t0066571	cnmt	3.0	9.794	1	20	1278	1297	AAAGAGAAGAAGAAG UGGAA	UUCUACUUUGUUUUU UCUUU	Transl ation		1
t0075709	cnmt	3.0	16.407	1	20	326	345	AGAAUUCUGAUGGUU AUUGA	UGAAUUACCCUCAGAA UUCU	Transl ation		1
t0077576	cnmt	2.0	10.505	1	23	35	57	UGUGUGGAUUUCUAC GAGGAUAG	UUGUCUUCGUAGAAA UCCACUUA	Cleava ge		1
t0000199	tydc	3.0	12.101	1	24	253	276	UCUUUUUUUAUGUUA UUUCGUCCU	GGCAUGGAAUAAUUU AAAAGAAGA	Transl ation		1
t0000934	tydc	3.0	12.101	1	24	253	276	UCUUUUUUUAUGUUA UUUCGUCCU	GGCAUGGAAUAAUUU AAAAGAAGA	Transl ation		1
t0006875	tydc	3.0	12.101	1	23	254	276	UCUUUUUUUAUGUUA UUUCGUCC	GCAUGGAAUAAUUUA AAAGAAGA	Transl ation		1
t0007264	tydc	3.0	10.661	1	23	2809	2831	GUGGAUUUGGAGAGA CAUAAAGA	UUUUGGUCUCUCUCC AAAUUCAC	Cleava ge		1
t0008017	tydc	3.0	10.807	1	24	2809	2832	AGUGGAUUUGGAGAG ACAUAAAGA	UUUUGGUCUCUCUCC AAAUUCACU	Cleava ge		1
t00080	tydc	3.0	9.89	1	21	1174	1194	AAGGAGAAGAAAAGA	UUAUUGUCUUUGCUU	Transl		1

63			7					UGGUAG	UUCCUU	ation		
t0008266	tydc	3.0	10.623	1	22	2809	2830	UGGAUUUGGAGAGACA AUAAGA	UUUUGGUCUCUCUCC AAAUUCA	Cleavage		1
t0015404	tydc	3.0	12.101	1	24	253	276	UCUUUUUUUAUGUUA UUUCGUCCU	GGCAUGGAAUAAUUU AAAAGAAGA	Translation		1
t0016266	tydc	3.0	18.165	1	22	1792	1813	AAGGAAGAAACAAGAA GAAGUU	AGUUUCUUCUUGUCA CUUUCUU	Translation		1
t0017669	tydc	3.0	9.955	1	20	2145	2164	UUGUGAAGACAGUGA CAUCC	GCAUGUCGUGUGUU CGCAA	Cleavage		1
t0019218	tydc	3.0	14.859	1	23	3130	3152	UUGUAGAUAAUGUUU UGACUGGU	ACUGGUCAAGGCAUU AUCAACAA	Cleavage		1
t0020944	tydc	3.0	12.101	1	21	256	276	UCUUUUUUUAUGUUA UUUCGU	AUGGAAUAAUUUAAA AGAAGA	Translation		1
t0024891	tydc	3.0	15.366	1	20	2730	2749	AGCGGUUUUCUGUUG UGCGU	GUGCACUACAGAAAGC UGCU	Cleavage		1
t0033029	tydc	2.0	7.013	1	20	1187	1206	AGGAGAUUAAAGGAG GAAGA	UUUUCUUCUUUAGU CUCUU	Cleavage		1
t0035055	tydc	3.0	17.132	1	21	1081	1101	CAGAGGAAGACACAAA UGAUU	AAGGAUUUGUGUCUU UCUUUG	Cleavage		1
t0035494	tydc	3.0	18.101	1	20	2559	2578	UGAUGAAAAGGUUGA UGAUU	AAUCAUUUCUUUUU CAUCA	Cleavage		1
t0045626	tydc	3.0	9.961	1	24	3815	3838	ACGGUGGUUAGUGGU AUGAAUAAU	AAUAUUCAUACUACUA AUCAUCAU	Cleavage		1

t0048516	tydc	3.0	16.775	1	21	2535	2555	GAAGCCUGAGCGUCU GGUCAA	UUGGCCAGAUGC UACGCUUC	Cleavage		1
t0050274	tydc	3.0	Eki.27	1	22	3420	3441	UCGACUGUUU AUUUUUAUUUC AUAAAAG	UUUUUAGGAAAA UAGUUGA	Translation		1
t0050758	tydc	3.0	14.458	1	21	1995	2015	CGUAGAUAUAAA AACGUG	UGCGUUCAUUA UCUAUA	Translation		1
t0050982	tydc	2.0	2.316	1	23	2053	2075	GAGAAAUGGU UUUUAGGG	CACUAAACUCA AAUUCUC	Cleavage		1
t0052761	tydc	2.0	19.756	1	22	2552	2573	AAAAGAGUAG UGGGAAG	CUUCCCAAUCA UCUUUU	Translation		1
t0053889	tydc	3.0	13.953	1	23	253	275	CUUUUUUAUG UUCGUCCU	GGCAUGGAAUA AAAAGAAG	Translation		1
t0056707	tydc	2.0	7.614	1	21	1187	1207	CAGGAGAUUA GGAAGA	UUUUCUUCUU CUCUUG	Cleavage		1
t0057176	tydc	3.0	12.967	1	20	2172	2191	UUUGGAUGG AUCAA	UUGAUCCAGA UCAGA	Translation		1
t0058334	tydc	3.0	10.807	1	23	2810	2832	AGUGGAUUUG ACAUAAG	UUUGGUCUCU AAUUCACU	Cleavage		1
t0059100	tydc	3.0	19.548	1	20	223	242	UCUCCAAGC UAUCU	ACAGACUUCAG GAAGG	Cleavage		1
t0059746	tydc	3.0	17.439	1	21	1497	1517	UAAACUAGG AAUGGG	CCCAUUGAUAG AUUUUA	Cleavage		1
t00607	tydc	2.0	7.05	1	22	1187	1208	ACAGGAGAU UAAAGG	UUUUCUUCUU UAGU	Cleavage		1

75			7					AGGAAGA	CUCUUGG	ge		
t00627 20	tydc	3.0	12.7 19	1	22	3405	3426	CUAAAAAUGGCAGCAG GAUGAA	UUAAACCAGCUGCCA UUUUAG	Cleava ge		1
t00638 70	tydc	3.0	19.5 48	1	20	223	242	UCUUCCAAGCUGAAG UAUCU	ACAGACUUCAGUUUG GAAGG	Cleava ge		1
t00652 81	tydc	3.0	13.9 53	1	23	253	275	CUUUUUUUUAUGUUAU UUCGUCCU	GGCAUGGAAUAAUUU AAAAGAAG	Transl ation		1
t00655 57	tydc	3.0	11.9 45	1	21	3405	3425	UAAAAAUGGCAGCAG GAUGAA	UUAAACCAGCUGCCA UUUUA	Cleava ge		1
t00662 87	tydc	2.0	10.3 75	1	20	2309	2328	GUGGAUUCACGAUUG UAAGG	CCGUACAAUCCUGAA CCA	Transl ation		1
t00712 95	tydc	3.0	6.35 2	1	24	1182	1205	AGAGAUUAAUGGAGG AAUAGGGAA	UUUGCUIUUCCUUCU UUAGUCUCU	Transl ation		1
t00721 43	tydc	3.0	16.1 78	1	21	704	724	ACAUGUGGAACAUAU GGGGAC	GUUUCCAUGUGUUGC AUAUGU	Cleava ge		1
t00734 12	tydc	3.0	18.8 17	1	20	2552	2571	AAGAGUAGAGAUUUG GGAAG	CUUCCCAAUCAUUUC UCUU	Transl ation		1
t00756 97	tydc	3.0	15.5 51	1	20	1495	1514	GAUAGAACAAUCGAU AGGGG	CCCCAUUGAUAGUUC UAUU	Transl ation		1
t00767 83	tydc	3.0	11.2 06	1	24	2811	2834	AGAGUGGAUUUGGAG AGACAUAAA	UUGGUCUCUCUCAA AUUCACUUC	Cleava ge		1
t00769 43	tydc	3.0	16.6 84	1	21	1150	1170	AGAUGGCUCAAGAAA AUCCUG	UAGGAUCAUUUUGGG CCAUCU	Cleava ge		1

t00771 97	tydc	3.0	17.5 48	1	20	1081	1100	AGAGGAAGACACAAAU GAUU	AAGGAUUUGUGUCUU UCUUU	Cleava ge		1
--------------	------	-----	------------	---	----	------	------	--------------------------	--------------------------	--------------	--	---

Morfin sentezinde rol alan gen: *7-OMT*

Bu geni hedefleyen ve derinlemesine dizilemede elde edilmiş olan miRNA için olgun ve pre miRNA dizileri :

ID: t0071347: UGAUGGAGGAGAAGAGAAGA (pso-miR13 olarak adlandırılmıştır)

Pre-mi RNA dizisi :

GAUUAUUUUUCGAAUCGCUGAUUAAUCGAAGACGAUGAAAUUUCCAGUUUUAAUGGAGGUUACAGTUGAUGGAGGAGAAGA
GAAGAUGAAGAAUAAGAUGAAAAAACUGAUUUGCUUUUCTGAUUCAUUAGGUUUUAAAAAAAAAUUGAUUUGAUUUUG

Papaver EST Sonucu

Stem_S068_F02.SEQ Opium poppy stem cDNA library Papaver somniferum cDNA, mRNA sequence

GenBank: FG611104.1

[EST GenBank](#)

>gi|189452807|gb|FG611104.1|FG611104 stem_S068_F02.SEQ Opium poppy stem cDNA library Papaver somniferum cDNA, mRNA
sequence

AAATGCTAGATACCAACCGTAACTCAGTTACGGTTGGTAAATAAAAAATGGTTGCCAACCGTAACTGAAGA

AAATTTTCAGATATAAGAACATACGGTTGGTAATTGAACTATTACCAACCGTAACAACATCAAATTCCTGC

AGTTACGGTTCGTAATAGAGTTAAAATCAACCGTAGCTCACATAAACCTAGAAATTTGAATTTCAATTTT
CACCTAAAATCCTAATTTCTGATAGAAATTAACCTTAAATCGAACAAAATAAACTAAACCTAACTGGGT
TTTCCATAATATACCTCATATAAGTTATTACAGTTGATTAATTTTCGAATCGCTGATTAATCGAAGACGA
TGAAATTTCCAGTTTTAATGGAGGTTACAGTTGATGGAGGAGAAGAGAAGATGAAGAATAAGATGAAAAA
AACTGATTTGCTTTTTTCTGATTCATTAGGTTTTAAAAAAAATTGATTTGATTTTGTTGATTTAAGGTG
AAAAGAGTAATCTAGTCAATTTACATCCCCTTTAGGACATCCCCTAACCAATTAAGGGACATTACTATC
ACAGTGCCGCCCTCTACTAAATCATGCCGCCCTATACCAAGGTTGAAAATAAAATGCATAATAAAAAAC
TGATACTCCAACTCATAGTTATTTCTGAACAATAGAGGATAAACACTAAACATGCTATTTAATTGGCATC
TAATCCCAACTCAGTCAATATATATACCTCATCGTCAAGAAAAAATCCATCTACTTAGAAAGGCTAGTG
TTTATTCTAAATGTTCCAAAATCTCTAAAAGTTGGAGTTTTGATATGCAAATATCCAAAATAAGAAAAAT
AAAGATAAAAGACTTGAGAAATAAAAAGATAGAGATAGATACACAAAATCAGTGGGTTTCCCTCCATTTA
GCGCCTGGTTTTAAAGTCGTCATCCCGACTTGCAAGACGAATCCCCATAGACCAATAGTCTGAAAAGTTG
GGGATCCACCCATAGAACATGTTTTGCAAATAGTAACTTACACAAAACATTAGTACAATAATCAAAAAGTA
GCTATAGCCCAATAGAAGTTTCCCCACGCTTAGTCTTTTATACACTGAGTGTATAAAGAACCATAAAAT
CAGGACTTCTTGGTTCCTTCTTTACAACATACAGGATGGATCAGTTTCAATGTGAATAAGGAAAACAAGT
CATTTCAACAAATATTTCTCCGAAACCAATACC

Sarı renkli bölge pre-miRNA dizisi

Yeşil renkli bölge olgun miRNA dizisi

psRNA Target sonucu bu miRNA'nın 7-OMT 'yi hedeflemesi

miRNA Acc.	Target Acc.	Expectation (E)	Target Accessibility (CPE)	Alignment	Target Description	Inhibition	Multiplicity
GAUGGAGGAGAAGAGAAGAU	7mt	3.0	7.51	miRNA 20 UAGAGAGAGAGAGAGAGUAG 1 :: : : : : : : : : : : : : : : Target 1341 UUCGUUCUUCUUCUUCUUAU 1360		Cleavage	1

Bu miRNA'nın hedeflediği diğer genler ve bu genlerin BLAST ve Gene Ontology (GO) sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

<input checked="" type="checkbox"/>	nr	sequence name	seq description	length	#hits	min. eValue	sim mean	#GOs	GO IDs	Enzyme	InterPro
<input checked="" type="checkbox"/>	1	UniRef100_Q9LF...	laccase-like protein	1884	20	0,0E0	76.7%	11	P:lignin catabolic process; C:endomembrane system; P:oxidation reduction; C:apoplast; F:laccase activity; F:oxidoreductase activity; F:copper ion binding; P:response to copper ion; P:vegetative to reproductive phase transition of meristem; F:metal ion binding; F:L-ascorbate oxidase activity	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	2	TC391734	kinesin family member 2 24	3049	20	0,0E0	81.35%	8	F:ATP binding; P:trichome morphogenesis; C:Golgi stack; F:microtubule motor activity; C:microtubule; C:plasma membrane; F:nucleotide binding; P:microtubule-based movement	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	3	TC361518	laccase 8	4780	20	0,0E0	80.95%	14	F:molecular_function; P:biological_process; C:cellular_component; C:endomembrane system; P:response to copper ion; C:apoplast; P:vegetative to reproductive phase transition of meristem; F:laccase activity; P:lignin catabolic process; P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; F:copper ion binding; F:metal ion binding; F:L-ascorbate oxidase activity	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	4	TC364549	laccase 5	1782	20	0,0E0	86.7%	10	C:endomembrane system; P:response to copper ion; C:apoplast; F:laccase activity; F:metal ion binding; P:lignin catabolic process; P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; F:copper ion binding; F:L-ascorbate oxidase activity	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	5	TC373211	casp-like protein at2g36330-like	1110	20	3,0E-116	85.95%	4	F:molecular_function; C:membrane; C:plasma membrane; P:biological_process	-	-

Morfin sentezinde rol alan gen: *TYDC*

Bu geni hedefleyen derinlemesine dizileme ile elde edilmiş olan miRNA için olgun dizisi :

ID: t0015404: UCUUUUUUAUGUUAUUUCGUCCU

psRNA Target sonucu bu miRNA'nın TYDC genini hedeflemesi

[Batch Download](#)

[Prev Page](#) [Next Page](#) Page No. 1 / Total 1 Pages , 1 Records

miRNA Acc.	Target Acc.	Expectation (E)	Target Accessibility (UPE)	Alignment	Target Description	Inhibition	Multiplicity
0015404	tydc	3.0	12.101	miRNA 24 UCCUGCUUUAUGUAUUUUUUUCU 1 .. : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 253 GGCAUGGARUAUUUAARAGAAGA 276		Translation	1

PAPAVER EST Sonucu

PF_T3_32R_D11_07AUG2003_089 Opium poppy root cDNA library Papaver somniferum cDNA, mRNA sequence

GenBank: FG602059.1

[EST GenBank](#)

>gi|189446551|gb|FG602059.1|FG602059 PF_T3_32R_D11_07AUG2003_089 Opium poppy root cDNA library Papaver somniferum cDNA, mRNA sequence

CGCTGCATCAATCGGGGATACACAATAGAAGGAATTGTTCTATTTCCAAACTTCACCTTCAAGAAGCGTA
 GATTTTTTTTAAAGTTTATTTCAATAAACGCCTTCGTTTATACCGAATCCAACCCGCGTGCCTTTACT
 CGTAAGACAGAGAACAATAAGGAATCAAATCACACCATCTCTATAATAGGTAAATGCCTCTTTTTTCTC
 CGGAAGTTGTGGGAATTATGCGTAATAAGATATTGGCCACAATTGAAGAGGTCTTATCAATAAAATTTCC
 ATTTATCCGTGATCTAGGCATAGTTTCGAATCCATTTCTATAATTCTTCTCATTACCTCGCATGGGAAAAG
 AATCCCACAAACAAAGGAATTGTAC **AGGACGAAATAACATAAAAAAAGA**CTCGTTCTAAACATGAAATTA
 ATATTTCTACAGATTATGATAACTCGAGAAGTTTTTATTTGGATTATGATTCAAAGAAGGAAAAAGAAT
 AGAATAATCGTCTATGATCAAAAATACCACCCCATCCGTTTTTCATATTTCGAATTGTTAGAATCGGTTGG
 TCGTACCTATACTGCAAAAATAAATATGAATGGCTCGCTATTGACCCGATTTCTGGGTCATAATCATAAA

ATTTTGTAGGAGAGATGGCCGAGTGGTTGAAGGCGTAGCATTGGAACTGCTATGTAGGCTTTTGTTTACC
GAGGGTTCGAATCCCTCTCTTTCCCTTACCTTTGCCTAATTCAAGAGCGTTATTGACCACAATGGATCAAA
TAACAAACAACAAGGAATAGGATTATTCCAAGAGGTAGACCTTTCTTGAAATGA

Bu miRNA'nın hedeflediği diğer genler ve bu genlerin BLAST ve GO sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

<input checked="" type="checkbox"/>	nr	sequence name	seq description	length	#hits	min. eValue	sim mean	#GOs	GO IDs	Enzyme	InterPro
<input checked="" type="checkbox"/>	1	TC402551	fact complex subunit ssrp1	2237	20	0,0E0	88.3%	15	C:FACT complex; F:vegetative to reproductive phase transition of meristem; C:nuclear euchromatin; C:nucleus; F:transcription factor activity; F:DNA binding; F:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; F:2-alkenal reductase activity; F:regulation of transcription, DNA-dependent; F:DNA replication; C:chromosome; F:response to DNA damage stimulus; F:DNA repair; F:transcription, DNA-dependent	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	2	AV823334	---NA---	576	0	-	-	0	-	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	3	TC377517	cyclin-dependent kinase inhibitor protein	950	5	1,6E-55	96.0%	13	F:protein binding; F:positive regulation of DNA replication; F:cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity; F:negative regulation of cyclin-dependent protein kinase activity; F:lateral root development; C:nucleus; F:response to abscisic acid stimulus; F:shoot development; F:leaf development; F:lateral root morphogenesis; F:G1/S transition of mitotic cell cycle; F:lateral root formation; F:cell cycle arrest	-	-

Morfin sentezinde rol alan gen: SAT

Bu geni hedefleyen derinlemesine dizileme ile elde edilmiş olan miRNA için olgun dizisi : ID: t0013376: AAAGGAAAACAUGGGACGGGA

psRNA Target sonucu bu miRNA'nın SAT genini hedeflemesi

Batch Download						Prev Page	Next Page	Page No. 1 / Total 1 Pages , 1 Records
miRNA Acc.	Target Acc.	Expectation (E)	Target Accessibility (TAE)	Alignment	Target Description	Inhibition	Multiplicity	
t0013376	SAT	3.0	632	miRNA 21 AGGGCAGGGUACAAAGGAAA 1 : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 102 UCUCGACAAAGGUUUCCUUG 122		Cleavage	1	

PAPAVER EST Sonucu

PF_T3_77R_A11_04SEP2003_095 Opium poppy root cDNA library Papaver somniferum cDNA, mRNA sequence

GenBank: FG605330.1

[EST GenBank](#)

>gi|189449717|gb|FG605330.1|FG605330 PF_T3_77R_A11_04SEP2003_095 Opium poppy root cDNA library Papaver somniferum cDNA, mRNA sequence

TGCGCGGCGAACGGCAAGCCCGATTACCTCTTCCGTCCCGTCCCATGTTTTTCCTTTGGGAAACACCCGTT
TGGTTCCTGTGTTGCCTACCTATCGAGAAGGTATCGATTTTGTCCCTCGCTTCTATTGCCTCTCGCCCGC
TCTTGGGTGTCGCGAGATGGTACTCGACAAGGGTCTCGTGTCCCATTTGTTTGGTGATATTTATTATCCC
GTTCTCATGGAGCACGAGATCTTTTTGTTCTCTTGGATGCCGATGATGCCATTGGGAGCTCGGAGTATTT
TCCGATCCCCAGAAAAACGATTTTCCAAAATCGACTGCTATCTTCTCCCTCCTGTTGTACGGTGAAATCC
CGACGACGGTCTGGGCCAGAAGATGGCGTCATTGAGGAATGCTACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATA
TGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATGAACTAATTCAGACTGTGAAACTGCGAATGGC
TCATTAATCAGTTATAGTTTGTGTTGATGGTACTTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCAGAGCTAAT
ACGTGCAACAAACCCCGACTTCTGGAAGGGATGCATTTATTAGATAAAAGGTCGACGCGGGCTTTGCCCG
TTGCTCAGATGATTCATGATAACTTGACGGATCGCACGGCCTTTGTGCTGGCGACGCATCATTCAAATTT
CTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA

✓	nr	sequence name	seq description	length	#hits	min. eValue	sim mean	#GOs	GO IDs	Enzyme	InterPro
✓	1	BE039512	phospholipase-like (pearl4) family protein cer1 protein	705	20	1,6E-21	75.6%	5	F:molecular_function; P:biological_process; C:plasma membrane; ; C:cellular_component	-	-
✓	2	TC402034	cer1 protein	2173	20	0,0E0	82.1%	17	F:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; C:endoplasmic reticulum; F:iron ion binding; F:catalytic activity; F:fatty acid biosynthetic process; F:iron ion binding; F:catalytic activity; F:fatty acid biosynthetic process; C:integral to membrane; C:membrane; P:cuticle development; F:wax biosynthetic process; P:response to water deprivation; P:alkane biosynthetic process; P:defense response to fungus; P:defense response to bacterium; F:aldehyde decarboxylase activity; C:endomembrane system; F:aldehyde catabolic process	-	-
✓	3	NP041482	cer1 protein	1815	20	0,0E0	79.7%	17	F:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; C:endoplasmic reticulum; F:iron ion binding; F:catalytic activity; F:fatty acid biosynthetic process; C:integral to membrane; C:membrane; P:cuticle development; F:wax biosynthetic process; P:response to water deprivation; P:alkane biosynthetic process; P:defense response to fungus; P:defense response to bacterium; F:aldehyde decarboxylase activity; C:endomembrane system; F:aldehyde catabolic process	-	-
✓	4	TC362996	cer1 protein	2165	20	0,0E0	81.8%	17	F:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity; C:endoplasmic reticulum; F:iron ion binding; F:catalytic activity; F:fatty acid biosynthetic process; C:integral to membrane; C:membrane; P:cuticle development; F:wax biosynthetic process; P:response to water deprivation; P:alkane biosynthetic process; P:defense response to fungus; P:defense response to bacterium; F:aldehyde decarboxylase activity; C:endomembrane system; F:aldehyde catabolic process	-	-
✓	5	TC381730	qlg3-1	691	20	5,1E-27	87.55%	4	C:endomembrane system; F:lipid binding; P:lipid transport; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle	-	-
✓	6	ES206689	--NA--	131	0	-	-	0	-	-	-
✓	7	TC394380	protein agamous-like 42	1782	20	1,8E-87	86.8%	10	P:regulation of transcription, DNA-dependent; C:chloroplast; C:nucleus; F:transcription factor activity; F:transcription, DNA-dependent; F:sequence-specific DNA binding; F:DNA binding; F:2-alkenal reductase activity; P:oxidation reduction; F:oxidoreductase activity	-	-
✓	8	TC369012	hypothetical protein ARALYDRAFT_909033 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	1396	2	4,6E-11	99.0%	3	C:endomembrane system; F:molecular_function; P:biological_process	-	-
✓	9	TC367404	uncharacterized vacuolar membrane protein	1591	20	0,0E0	85.4%	4	F:molecular_function; P:biological_process; C:membrane; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle	-	-
✓	10	EL975423	--NA--	125	0	-	-	0	-	-	-
✓	11	TC386224	spc97 spc98 family of spindle pole body component	1166	20	1,5E-56	80.9%	23	F:molecular_function; C:spindle pole; P:microtubule cytoskeleton organization; C:microtubule organizing center; F:protein histidine kinase binding; P:GTP catabolic process; F:protein binding; C:chloroplast thylakoid membrane; F:clathrin binding; C:cell plate; F:cytokinesis by cell plate formation; C:vacuolar membrane; C:vacuole; F:trichome branching; C:microtubule; F:GTP binding; P:cell plate formation involved in plant-type cell wall biogenesis; P:embryonic development ending in seed dormancy; P:xylem and phloem pattern formation; F:synaptic vesicle endocytosis; F:GTPase activity; C:plasma membrane; F:nucleotide binding	-	-
✓	12	TC368477	core-2 l-branching beta-n-acetylglucosaminyltransferase family protein	1478	20	0,0E0	77.65%	6	F:molecular_function; P:biological_process; C:membrane; F:acetylglucosaminyltransferase activity; C:cellular_component; C:mitochondrion	-	-

Morfin sentezinde rol alan gen: COR

Bu geni hedefleyen derinlemesine dizileme ile elde edilmiş olan miRNA için olgun dizileri :

ID: t0047847 CAUGCGAGAUUUUGUUGGA

ID : t0055127 GAAGAGCAGGUGGAGCAAGAGC

ID: t0072648 AGUAUACCGGAUGGAGUAUC

psRNA Target sonucu bu mi RNA'ların COR genini hedeflemesi

Batch Download Prev Page Next Page Page No. 1 / Total 1 Pages , 3 Records

miRNA Acc.	Target Acc.	Expectation (E)	Target Accessibility (UPF)	Alignment	Target Description	Inhibition	Multiplicity
mi047847	COR	3.0	14.745	miRNA 20 AGGUGUUUUAGAGCGUAC 1 219 UCUAUAATAAAUCCUGAGAGG 238 Target		Clearance	1
mi055127	COR	3.0	19.348	miRNA 22 CGAGAACGAGUGGACAGAAAG 1 289 GAUCUGGUCUCCUCCUCUCUC 304 Target		Translation	1
mi072458	COR	3.0	15.513	miRNA 20 CUATGAGGUGGCCAUAAGA 1 281 GAUACCAACUCCGUAAGCU 270 Target		Clearance	1

Bu miRNA'ların hedeflediği diğer genler ve bu genlerin BLAST ve GO sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

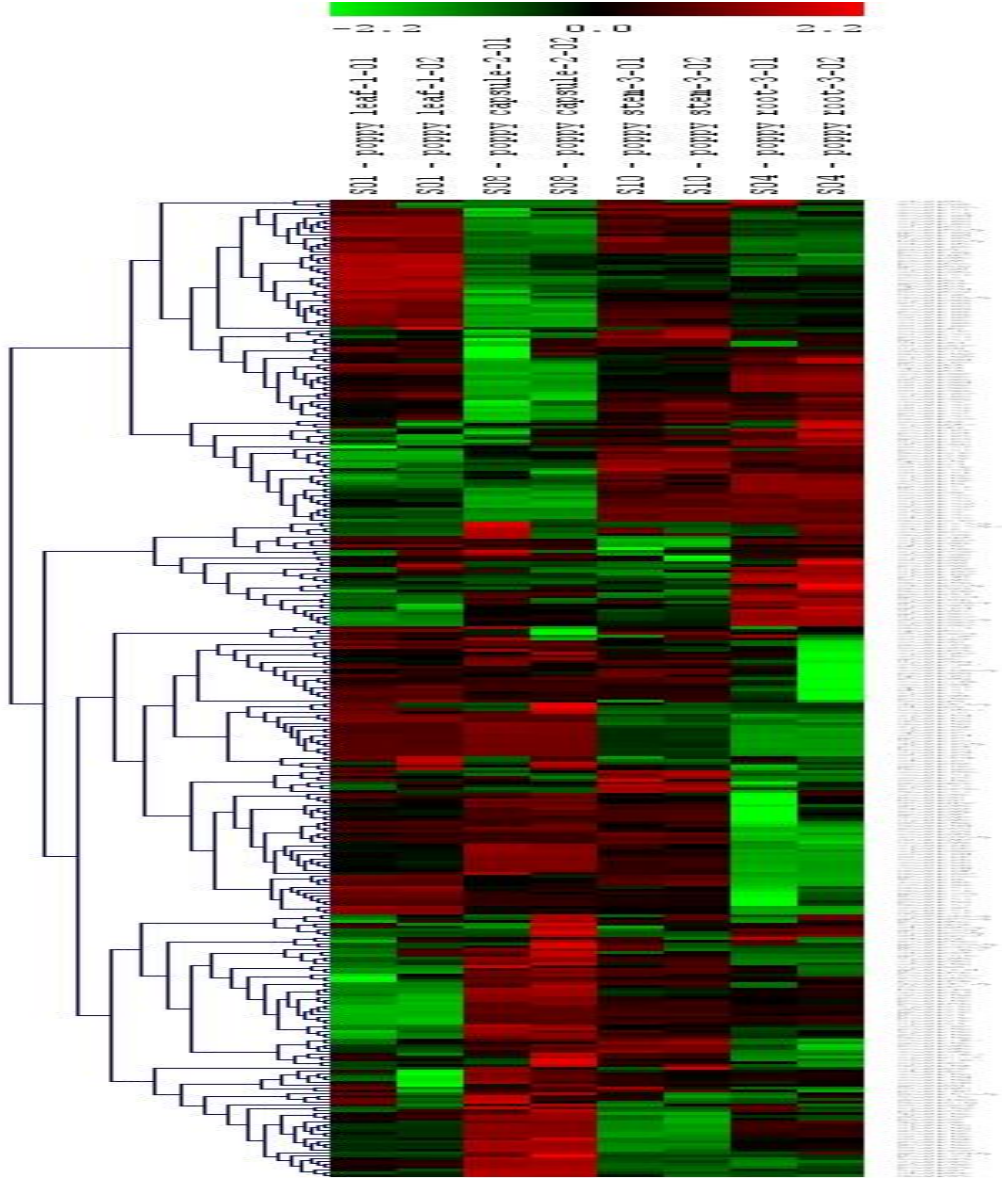
nr	sequence name	seq description	length	#hits	min. eValue	sim mean	#GOs	GO IDs	Enzyme	InterPro
1	TC381095	trnbs-ltr class disease resistance protein	1044	20	2.3E-149	78.65%	12	P: defense response; P: transmembrane receptor activity; P: apoptosis; F: nucleotide binding; F: nucleoside-triphosphatase activity; F: ATP binding; C: intrinsic to membrane; P: signal transduction; P: innate immune response; C: chloroplast; P: defense response to fungus; F: phosphoinositide binding		
2	TC374234	zinc ion binding protein	2929	20	0.0E0	71.25%	9	P: regulation of transcription, DNA-dependent; P: transcription initiation; F: zinc ion binding; F: transcription regulator activity; F: transcription factor activity; C: nucleus; F: DNA binding; P: transcription, DNA-dependent; F: sequence-specific DNA binding		
3	TC394800	defensin-like protein 181	369	20	1.0E-93	65.35%	3	C: endomembrane system; P: defense response; F: molecular_function		
4	NP456897	non-ltr retroelement reverse transcriptase	4344	20	0.0E0	62.35%	4	F: RNA-directed DNA polymerase activity; F: RNA binding; P: RNA-dependent DNA replication; F: endonuclease activity		
5	TC374133	restricted tev movement 1	1072	20	1.8E-145	63.1%	5	F: molecular_function; P: biological_process; C: cellular_component; P: response to virus; F: sugar binding		
6	TC363660	fad-binding and bbe domain-containing protein	1884	20	0.0E0	84.7%	10	C: endomembrane system; F: oxidoreductase activity; F: electron carrier activity; F: catalytic activity; F: FAD binding; P: oxidation reduction; C: cell wall; P: polar nucleus fusion; P: embryonic development ending in seed dormancy; F: ferritin oxidase activity		
7	TC398059	alanine-2-oxoglutarate aminotransferase 2	1358	20	2.6E-55	62.45%	26	F: molecular_function; P: biological_process; C: cellular_component; C: peroxisome; C: plant-type cell wall; P: photorespiration; P: response to oxidative stress; F: gamma-glutamyltransferase activity; C: membrane; C: vacuole; F: glycine-2-oxoglutarate aminotransferase activity; F: glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase activity; F: alanine-glyoxylate transaminase activity; C: apoplast; P: glutathione catabolic process; F: L-alanine-2-oxoglutarate aminotransferase activity; C: chloroplast; P: biosynthetic process; F: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity; F: transferase activity; F: catalytic activity; P: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate biosynthetic process; F: pyridoxal phosphate binding; F: transaminase activity; F: transferase activity; transferring nitrogenous groups; C: chloroplast stroma		
8	TC360114	nak-like ser thr protein kinase	2737	20	0.0E0	81.75%	9	F: kinase activity; P: protein amino acid phosphorylation; C: plasma membrane; F: ATP binding; F: protein kinase activity; P: phosphorylation; F: nucleotide binding; F: protein serine/threonine kinase activity; C: mitochondrion		
9	TC378421	heat stress transcription factor c-1	1745	20	3.6E-120	73.9%	6	P: regulation of transcription, DNA-dependent; C: nucleus; F: transcription factor activity; F: DNA binding; P: transcription, DNA-dependent; F: sequence-specific DNA binding		
		heat stress transcription						P: regulation of transcription, DNA-dependent; C: nucleus; F: transcription		

EK

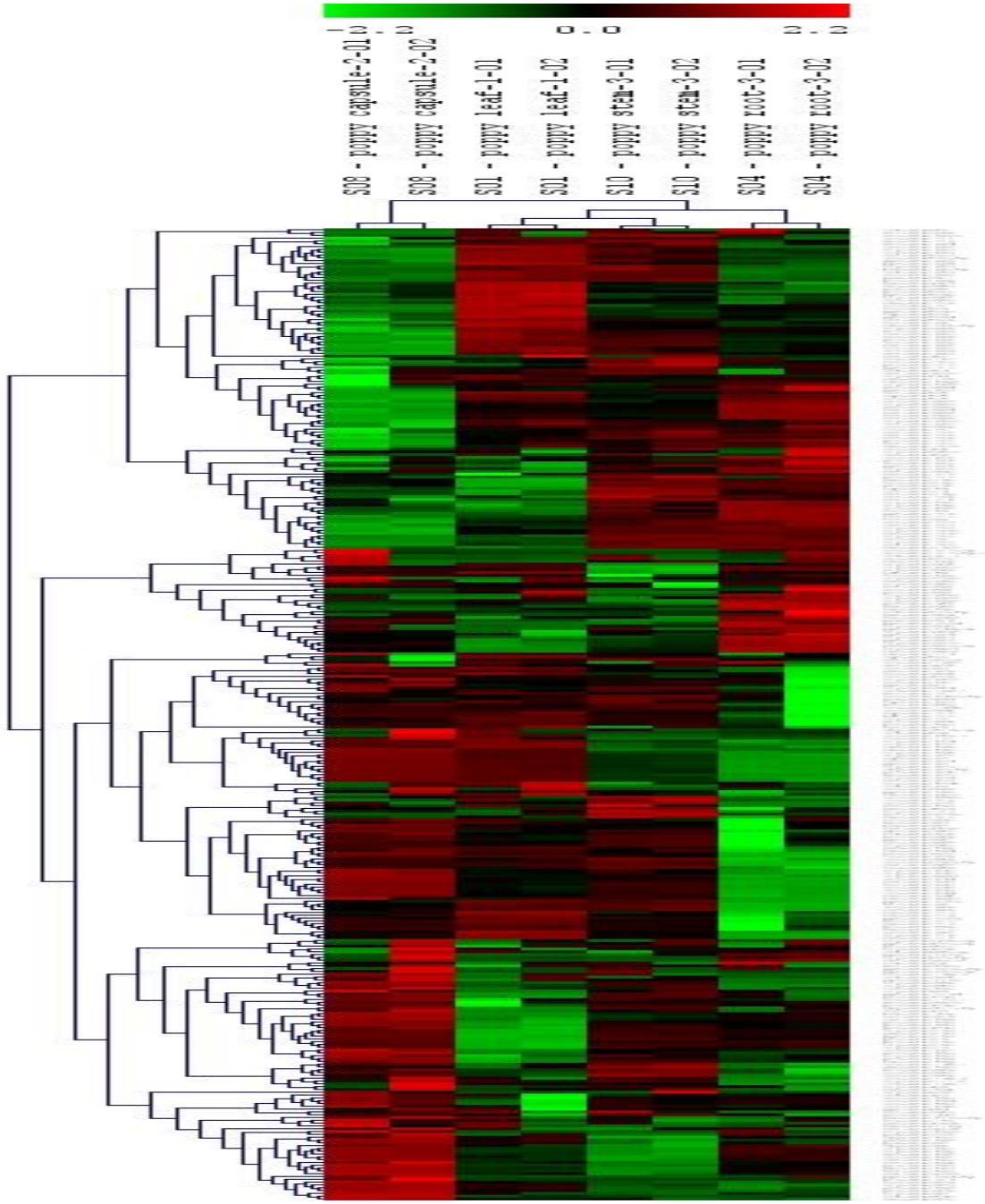
EK4 Derinlemesine Dizileme Sonucu Bulunan Yeni miRNA'ların Pre-miRNA Dizileri.
Sarı işaretli bölgeler olgun miRNA sekansları

miRNA	pre-miRNA sekansı
pso-miR2	UUGUGGUAUAU <u>UCCAUCUCUUGCACACUGGA</u> CAGCCGGCAGCCGUAGGAAGGUGGC AGCUGGUGUGCAUGAGAUGGAAUACGCCAUUG
pso-miR3	AGAAGAAUCCUCUGAAGCUCAGGAGGGAUAGCGCCGUUGAUUGAAGGCGGUUCCG UUUACGGGUUGGCGAUUUCUCUAUCGCGG <u>CGCUAUCCAUCCUGAGUUUCA</u> CUGGUU CUUC GGAAGAACCUGUAAAGCUCAGGAGGGAUAGCGCCAAUUAUAGUACAAAAUAAU UUCGUUCAAGCUUCACACUUUGCUUUUUGUAAUAGG <u>CGCUAUCCAUCCUGAGUUU</u> <u>CA</u> UAGCUUCUUC GGAAGAACCUGUAAAGCUCAGGAGGGAUAGCGCCAAUUAUAGUACAAAAUAAU UUCGUUCAAGCUUCACACUUUGCUUUUUGUAAUAGG <u>CGCUAUCCAUCCUGAGUUU</u> <u>CA</u> UAGCUUCUUC
pso-miR4	UCAGUCAUCGGCGCUCUCUAAUUCGCUUGGUGCAGGUCGGGAACUGUUUCGCUUUU UGUUCAUCAUGAUCUCUUGAUUGUUGUUCUCUCUUUCAAUUCCUCUGCGUUGUUC AGGGGAAAUAUAUAUAUUGUGUGUGUGUAAUCGAGCGAAUUGGAU <u>CCCGC</u> <u>CUUGCAUCAACUGAAU</u> CCGAGACAGC GGCGGUCUCUAAUUCGCUUGGUGCAGGUCGGGAACCGCUUCGCUCAGCCUACGGUU UACGUUUUCUGUUGGCCGGUCCUUCUUAUCUUCUUCUUGUUCUUCUCUGCUUU UGUUUUUUGCUUAAUUCUUUGCCGCUGUGCGGUGUUAUGUUGUUGGAAAAAUG UGUGGGCGAAUUGGAU <u>CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU</u> CGGAAACCGU
pso-miR5	GGAAGGGGGAGGUGACAGAAGAGAGUGAGCACAUAGGUAACUUCUUGCAUGUU AGGGUUCAUGCUUGAAGCUUAUGU <u>GCUUACUCUCUAUCUGUCACC</u> CACCAAAAUC
pso-miR7	GUGUGUAUGU <u>GCCUGGCUCCUGUAUGCCAU</u> UUGUAGAGCGCAUCGGAAUCCGAUG GGCCUCCGCAGAUGGCGUAUGAGGAGCCAUGCAUAUAUCUUA CUUUCAUAU <u>GCCUGGCUCCUGUAUGCCAU</u> UUGUAGAGCGCUCACCGUCAUACCC GAUGGCCUCCGCGAUGGCGUAUGAGGAGCCAAGCAUAUCCAUGU UCAUCGUAU <u>GCCUGGCUCCUGUAUGCCAU</u> UUGCAAAGCCCAUCAUCUAAAAUA GGUGGCCUUCGAAUGGCAUGCAAGGAGCCAUGCAUGUGUAAA
pso-miR11	GAGGUUGAUG <u>GGAUUGUUGUUGGCUCGAGG</u> UUCAUAUAUCAAAUAUAUAUCA CUUUUUGGAUAAAGAAAAAGGUUGUUGUUGAUUGUAAAAUAUAUAUCUCGG ACCAGGCUUCAUCCCGUCAACCAA
pso-miR13	GATTAATTTTCGAATCGCTGATTAATCGAAGACGATGAAATTTCCAGTTTTAATGGAG GTTACAGT <u>TGATGGAGGAGAAGAGAAGAT</u> GAAGAATAAGATGAAAAAACTGATTTG CTTTTTCTGATTCATTAGGTTTTAAAAAAAATTGATTTGATTTG

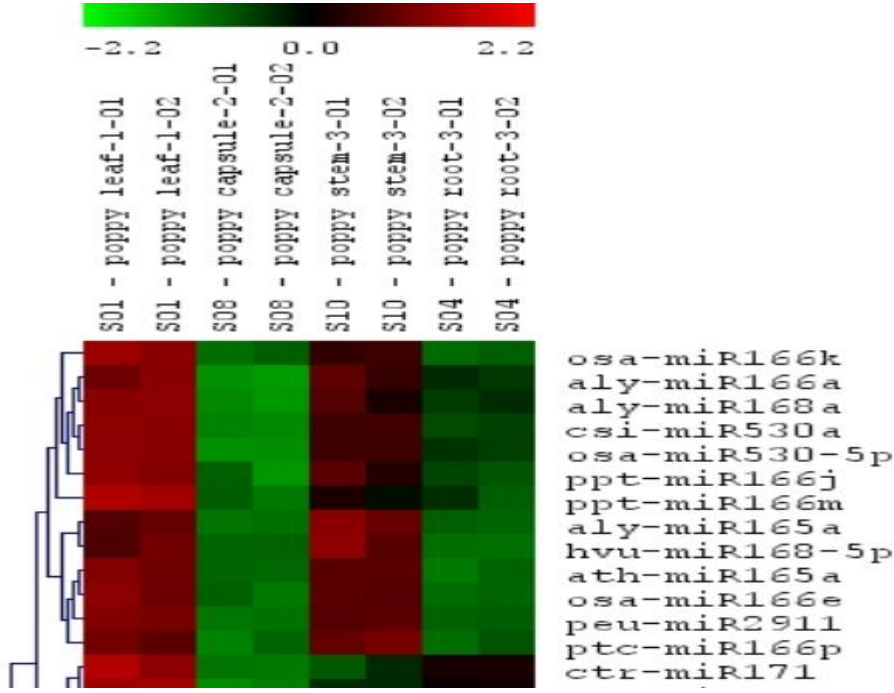
EK5: Tüm Haşhaş miRNA Mikroarray Sonuçları



$p < 0,01$ olan bütün örneklerin karşılaştırmalı olarak analiz edildiği ANOVA sonuçları verilmiştir.



Şekil 1 Sinyal gücü 32 den büyük olan bütün miRNA'lar üzerinde yapılan klaster analizi. Haşhaş bitkisinde 4 farklı dokuya ait miRNA'ların mikroarray analizleri ($p < 0.01$). Sağdaki şekil yakınlaştırmış görüntü.



Şekil 2. Bütün miRNA'ların farklı doku örneklerinde ifade düzeyleri dağılımının klaster analizi. Bu farklı dokulardaki miRNA ifade profilleri arasındaki benzerlikler verilmiştir

Çizelge 1. Haşhaş bitkisi 4 farklı dokuda miRNA mikroarray sonuçları

			Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
			yaprak	kapsül	Gövde	Kök
No.	Prob ismi	p-value	ortalama	ortalama	ortalama	Ortalama
194	aly-miR396a*	1.30E-07	59	508	313	5,816
643	ghr-miR156c	4.14E-07	335	4,045	97	689
637	far-miR164a	4.39E-07	2,755	12,823	6,537	477
1797	vvi-miR396a	5.13E-07	5,724	1,248	3,424	10,188
1553	ptc-miR167h	7.84E-07	3,838	6,741	251	20
1039	osa-miR167d	8.41E-07	5,035	8,138	610	109
728	gma-miR319a	8.74E-07	341	2,653	1,992	1,695
5	ahy-miR167-5p	1.03E-06	5,102	8,525	671	110
342	aqc-miR167	1.08E-06	1,195	3,558	90	10

629	csi-miR535	1.15E-06	8,683	877	2,702	4,892
499	bna-miR167a	1.34E-06	3,159	5,095	238	49
87	aly-miR167d	1.36E-06	4,288	6,515	501	96
184	aly-miR395b	1.75E-06	46	524	196	38
1524	pta-miR319	2.20E-06	168	1,735	1,492	894
1257	osa-miR530-5p	2.38E-06	3,932	8	722	54
85	aly-miR167c	2.73E-06	2,178	5,179	181	17
839	hvu-miR1436	2.74E-06	121	1,932	352	515
1547	ptc-miR156k	2.88E-06	155	<u>2,933</u>	70	314
627	csi-miR530a	3.01E-06	4,169	14	871	53
1315	peu-miR2911	3.03E-06	52,507	4,847	36,139	5,975
1318	peu-miR2916	3.23E-06	191	761	121	1,226
82	aly-miR167a	3.35E-06	4,668	7,923	684	124
859	mtr-miR168	3.66E-06	2,463	1,544	2,259	482
1204	osa-miR319a	4.11E-06	46	243	863	581
1732	vvi-miR156e	4.79E-06	147	<u>2,847</u>	42	378
1260	osa-miR535	4.94E-06	19,836	4,615	10,541	20,910
132	aly-miR319c	5.70E-06	798	3,700	2,844	2,585
1930	zma-miR396a*	6.56E-06	89	697	470	7,735
1441	ppt-miR167	6.94E-06	4,043	7,335	390	70
81	aly-miR166g*	7.81E-06	1,758	1,014	544	3,382
193	aly-miR396a	1.33E-05	952	83	777	4,518
1026	osa-miR159f	1.36E-05	15,177	16,667	20,280	22,596
1040	osa-miR168b	1.56E-05	2,174	1,428	2,320	582
1569	ptc-miR319e	1.58E-05	1,011	3,609	2,824	3,103
1032	osa-miR164e	1.77E-05	6,893	13,898	9,753	3,261
113	aly-miR172a	1.82E-05	685	473	1,681	1,763
1190	osa-miR2919	1.88E-05	228	2,177	468	825
129	aly-miR319a	1.88E-05	210	1,563	1,320	1,197
1035	osa-miR166i	1.96E-05	1,360	425	495	139
1454	ppt-miR319c	2.11E-05	553	3,895	2,920	2,252

497	bna-miR156a	2.20E-05	743	4,990	226	2,026
1737	vvi-miR167c	2.26E-05	3,107	5,033	201	28
1522	pta-miR159c	2.26E-05	251	2,199	1,107	803
1551	ptc-miR166n	2.47E-05	4,739	2,194	4,184	2,992
1030	osa-miR164c	2.77E-05	5,685	13,080	8,504	2,700
1897	zma-miR172b*	3.34E-05	532	132	1,033	1,106
356	aqc-miR535	3.44E-05	14,930	3,341	7,926	15,066
1620	sbi-miR156e	3.47E-05	543	4,229	173	1,463
1613	rco-miR164d	3.48E-05	7,029	13,852	9,351	3,139
34	aly-miR156g	3.49E-05	743	5,473	281	2,238
115	aly-miR172b*	3.63E-05	551	136	1,206	1,368
1036	osa-miR166k	3.80E-05	3,552	1,102	2,319	1,114
27	aly-miR156a	4.16E-05	753	5,635	273	2,295
1846	zma-miR164h	4.30E-05	1,972	8,177	3,361	230
362	ath-miR165a	4.46E-05	2,714	907	2,315	878
1798	vvi-miR396b	4.95E-05	6,024	1,538	4,493	12,040
38	aly-miR157a	5.22E-05	613	506	228	180
1622	sbi-miR164c	5.35E-05	5,755	11,842	7,197	2,393
1031	osa-miR164d	5.62E-05	5,658	10,598	6,402	2,701
1021	osa-miR156l	6.79E-05	452	3,341	107	1,129
1606	ptc-miR530a	7.27E-05	1,199	33	77	9
1548	ptc-miR159e	7.29E-05	119	672	289	167
735	gma-miR396e	8.23E-05	9,207	3,424	8,163	20,337
487	bdi-miR156	8.76E-05	6,650	3,407	784	2,690
73	aly-miR165a	8.98E-05	3,688	1,679	4,132	1,782
1736	vvi-miR166a	9.83E-05	7,894	3,433	7,292	5,792
1037	osa-miR166m	1.12E-04	6,484	2,337	5,043	3,754
119	aly-miR172e	1.16E-04	840	689	2,312	2,083
358	ata-miR172	1.18E-04	1,110	800	2,828	2,795
42	aly-miR157d	1.19E-04	529	483	226	142
174	aly-miR390a*	1.29E-04	98	378	199	1,111

730	gma-miR390a-3p	1.67E-04	91	373	202	970
1033	osa-miR166e	1.84E-04	2,766	955	2,329	971
1633	sbi-miR396e	1.97E-04	3,543	622	3,069	10,364
1771	vvi-miR3630*	2.01E-04	101	729	37	106
1624	sbi-miR166k	2.06E-04	6,423	2,945	6,006	4,430
1645	sly-miR319	2.09E-04	1,595	5,618	4,725	4,497
1034	osa-miR166g	2.14E-04	6,189	2,544	5,466	3,999
364	ath-miR172e	2.39E-04	547	355	1,128	1,126
340	aqc-miR159	3.07E-04	162	237	670	495
1552	ptc-miR166p	3.65E-04	3,062	1,348	3,147	1,455
857	mtr-miR166b	4.14E-04	6,611	2,733	5,297	4,896
638	far-miR166	4.45E-04	912	70	235	174
461	ath-miR854a	4.50E-04	69	504	64	70
76	aly-miR166a	4.60E-04	4,774	1,814	4,013	2,590
1632	sbi-miR396d	4.76E-04	2,587	343	2,135	8,730
1704	sof-miR168b	4.81E-04	980	682	1,112	182
1048	osa-miR172c	4.90E-04	405	207	701	801
1520	pta-miR159a	5.52E-04	938	3,380	2,048	2,053
71	aly-miR164c	6.09E-04	5,237	10,567	6,303	2,536
116	aly-miR172c	6.16E-04	462	214	790	937
89	aly-miR168a	6.61E-04	6,412	3,227	5,255	4,048
68	aly-miR164a	7.16E-04	5,171	10,345	6,125	2,493
1568	ptc-miR172i	7.18E-04	304	90	339	549
173	aly-miR390a	7.21E-04	22	78	40	588
1306	pab-miR395	7.65E-04	1,693	42	71	22
1693	smo-miR156b	7.81E-04	608	473	212	163
1521	pta-miR159b	7.95E-04	91	842	389	226
1549	ptc-miR159f	8.00E-04	1,877	2,950	1,082	1,010
594	crt-miR166a	8.54E-04	6,086	2,031	4,338	3,699
1621	sbi-miR159b	8.82E-04	6,042	9,445	7,206	7,840
631	ctr-miR171	9.03E-04	513	270	306	376

1629	sbi-miR172b	9.05E-04	393	152	656	629
595	crt-miR166b	9.75E-04	6,736	2,539	5,087	4,031
1623	sbi-miR166a	1.03E-03	5,726	1,770	4,197	3,231
1211	osa-miR395o	1.05E-03	791	4	27	6
1628	sbi-miR172a	1.07E-03	611	354	1,143	1,349
841	hvu-miR168-5p	1.21E-03	4,229	2,720	4,423	2,649
90	aly-miR168a*	1.28E-03	1,269	596	1,113	1,208
1755	vvi-miR319g	1.35E-03	28	50	749	204
1440	ppt-miR166m	1.44E-03	1,217	191	415	246
1217	osa-miR396f	1.52E-03	1,544	107	556	2,851
1546	ptc-miR1450	1.80E-03	2,228	1,920	1,589	4,939
1209	osa-miR395c	1.98E-03	534	7	14	3
192	aly-miR395i	2.43E-03	1,290	25	37	14
1439	ppt-miR166j	2.48E-03	3,466	1,096	2,510	1,332
1826	zma-miR159e	4.14E-03	15,901	14,038	15,428	24,363
636	far-miR159	4.43E-03	16,287	16,944	19,668	21,697
48	aly-miR159a	6.63E-03	16,167	17,512	20,772	22,726
1733	vvi-miR156h	7.64E-03	77	548	29	91
715	gma-miR167g	1.23E-02	1,261	3,339	90	1
490	bdi-miR171c	1.68E-02	591	372	177	1
1025	osa-miR159e	1.86E-02	6,231	10,136	8,559	8,794
628	csi-miR530b	1.97E-02	550	1	44	4
50	aly-miR159b	2.20E-02	15,160	16,920	19,350	20,679
1515	pta-miR1314	2.43E-02	0	924	0	0
1024	osa-miR159d	2.53E-02	6,069	10,050	8,403	8,577
52	aly-miR159c	3.07E-02	5,991	10,750	9,021	7,791
1703	sof-miR159e	4.37E-02	168	512	279	150

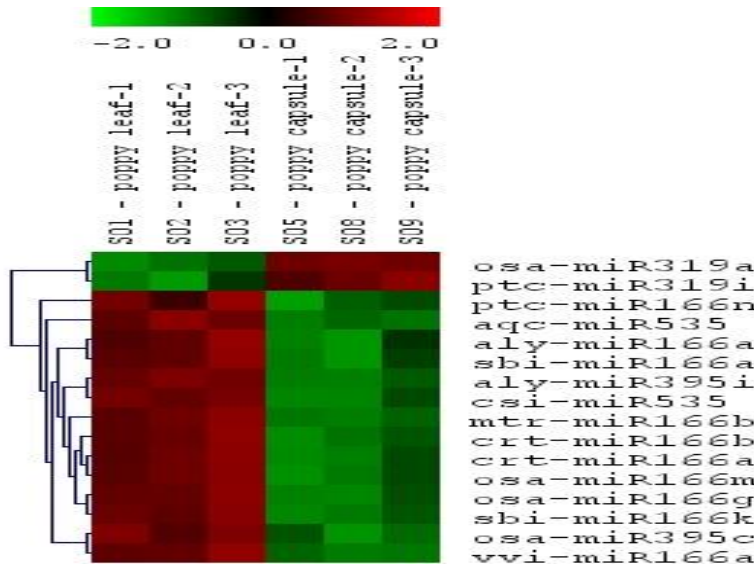
Çizelge 2 Haşhaş bitkisinde 4 farklı dokuya ait miRNA'ların mikroarray analizleri (p<0.01). İstatistiksel olarak anlamlı fakat sinyal seviyeleri düşük olan miRNA'lar.

			Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
			yaprak	kapsül	gövde	Kök
No.	Prob ismi	p-value	ortalama	ortalama	ortalama	Ortalama
1888	zma-miR171f	1.99E-07	380	97	93	13
505	bnna-miR397a	4.52E-07	15	97	7	0
77	aly-miR166a*	7.23E-07	416	303	56	466
1631	sbi-miR395f	4.06E-06	87	77	96	6
641	far-miR529	5.94E-06	452	17	45	85
1694	sma-miR156c	7.38E-06	238	397	42	40
1130	osa-miR2097-5p	9.42E-06	17	24	46	0
110	aly-miR171b	9.74E-06	394	131	99	13
36	aly-miR156h	1.30E-05	204	347	45	22
197	aly-miR397a	1.37E-05	60	315	15	7
1729	tae-miR167b	2.71E-05	68	90	18	0
639	far-miR396	3.72E-05	10	3	35	96
1469	ppt-miR529a	4.15E-05	265	21	34	47
186	aly-miR395c	8.15E-05	31	447	183	14
1338	ppt-miR1030a	1.34E-04	48	2	25	0
601	csi-miR171a	1.75E-04	111	70	245	411
196	aly-miR396b*	2.03E-04	31	131	47	9
1829	zma-miR159g	2.08E-04	13	69	48	26
1570	ptc-miR319i	2.53E-04	30	135	399	348
1443	ppt-miR171b	2.60E-04	48	44	213	413
1753	vvi-miR2950	3.74E-04	45	37	45	216
729	gma-miR319c	4.99E-04	24	101	203	191
1574	ptc-miR397b	5.51E-04	41	232	10	11
1095	osa-miR1867	5.59E-04	7	226	35	23
1909	zma-miR319a*	6.09E-04	8	10	279	258

202	aly-miR398b	6.40E-04	34	39	7	50
1457	ppt-miR390c	7.29E-04	19	67	39	397
1584	ptc-miR474a	9.58E-04	5	127	65	33
710	gma-miR156f	1.24E-03	56	82	31	39
354	aqc-miR529	1.36E-03	312	32	51	61
25	ahy-miR398	1.53E-03	20	78	7	53
1	ahy-miR156a	1.63E-03	65	88	34	62
1220	osa-miR397b	1.84E-03	19	141	8	8
195	aly-miR396b	2.06E-03	459	25	137	171
1208	osa-miR395b	2.33E-03	50	64	91	13
1470	ppt-miR529d	2.90E-03	220	19	37	49
1750	vvi-miR172b	3.14E-03	57	16	99	78
605	csi-miR319	3.51E-03	9	24	378	121
1935	zma-miR397a	3.53E-03	9	81	7	4
1307	pab-miR397	4.03E-03	41	175	4	16
1213	osa-miR395u	4.33E-03	14	46	81	7
503	bna-miR171g	4.96E-03	71	33	88	53
1730	tae-miR395b	5.54E-03	45	69	94	7
1697	smo-miR171b	5.98E-03	217	21	34	20
1426	ppt-miR1222d	6.20E-03	0	5	0	48
1566	ptc-miR171k	7.11E-03	54	46	111	69
1659	smo-miR1088-5p	7.49E-03	273	14	44	27
175	aly-miR390b*	7.99E-03	16	83	58	273
1647	sly-miR397	8.59E-03	27	252	9	16
1883	zma-miR171b	8.80E-03	443	161	124	21
599	csi-miR166a	8.97E-03	53	11	42	35
1472	ppt-miR529g	9.08E-03	166	26	28	29
604	csi-miR172c	9.26E-03	74	38	160	98
1749	vvi-miR172a	9.37E-03	202	57	234	263
1695	smo-miR156d	9.42E-03	25	31	20	2
711	gma-miR156g	1.11E-02	101	92	40	0

1434	ppt-miR160b	1.34E-02	30	41	68	80
606	csi-miR393	1.36E-02	65	49	18	5
1207	osa-miR395a	1.37E-02	24	75	102	15
1219	osa-miR396g	1.44E-02	78	16	79	113
1586	ptc-miR474c	1.54E-02	3	117	68	20
648	ghr-miR2950	1.69E-02	9	53	25	1
713	gma-miR159c	1.73E-02	7	12	36	3
813	gma-miR4403	1.89E-02	43	5	8	5
521	cre-miR1148.1	1.96E-02	20	73	103	7
11	ahy-miR3511-5p	2.41E-02	0	29	7	1
1696	smo-miR171a	2.56E-02	271	68	57	21
1072	osa-miR1858a	2.59E-02	17	14	49	7
1898	zma-miR172c*	2.62E-02	240	34	233	353
979	mtr-miR2679a	2.63E-02	1	0	58	0
1710	tae-miR1121	2.66E-02	5	35	0	0
603	csi-miR172b	2.66E-02	12	9	78	40
1795	vvi-miR394a	2.83E-02	22	47	52	134
1435	ppt-miR160c	2.87E-02	21	12	24	38
1856	zma-miR166n*	2.89E-02	5	86	6	0
1630	sbi-miR172f	2.93E-02	46	14	113	74
982	mtr-miR395g	2.94E-02	50	71	76	8
981	mtr-miR395b	3.00E-02	24	76	89	14
109	aly-miR171a	3.06E-02	79	83	123	75
1615	rco-miR172	3.11E-02	262	79	366	405
187	aly-miR395d	3.26E-02	37	85	83	14
1585	ptc-miR474b	3.29E-02	6	133	65	36
1614	rco-miR171g	3.35E-02	104	74	136	76
985	mtr-miR399d	3.40E-02	21	12	19	38
870	mtr-miR171c	3.64E-02	245	100	51	7
1420	ppt-miR1219d	3.74E-02	0	27	9	1
181	aly-miR394a	3.81E-02	28	38	37	83

1341	ppt-miR1030j	3.83E-02	35	8	12	1
719	gma-miR171a	4.68E-02	296	79	62	2
858	mtr-miR166d	5.37E-02	43	9	51	14
346	aqc-miR171f	5.51E-02	311	175	93	10
1388	ppt-miR1064-5p	5.77E-02	0	57	0	3
35	aly-miR156g*	6.69E-02	0	40	0	2
1748	vvi-miR171h	7.00E-02	14	14	66	40
731	gma-miR390b	7.38E-02	11	19	14	71
1512	pta-miR1310	7.54E-02	13	17	42	26
635	far-miR156b	7.63E-02	51	60	29	57
1885	zma-miR171c	7.71E-02	287	153	75	4
1101	osa-miR1872	7.75E-02	2	4	51	0
338	aly-miR869	8.02E-02	0	224	4	1
107	aly-miR170	8.28E-02	44	12	14	1
1027	osa-miR160e	8.30E-02	42	50	65	90
640	far-miR437	9.62E-02	0	69	2	2
983	mtr-miR395h	9.72E-02	192	62	82	4



Şekil 3. Üç farklı bitki dokusunun Kapsüllere ait miRNA profillerinin yaprakla karşılaştırılması p<0.01.

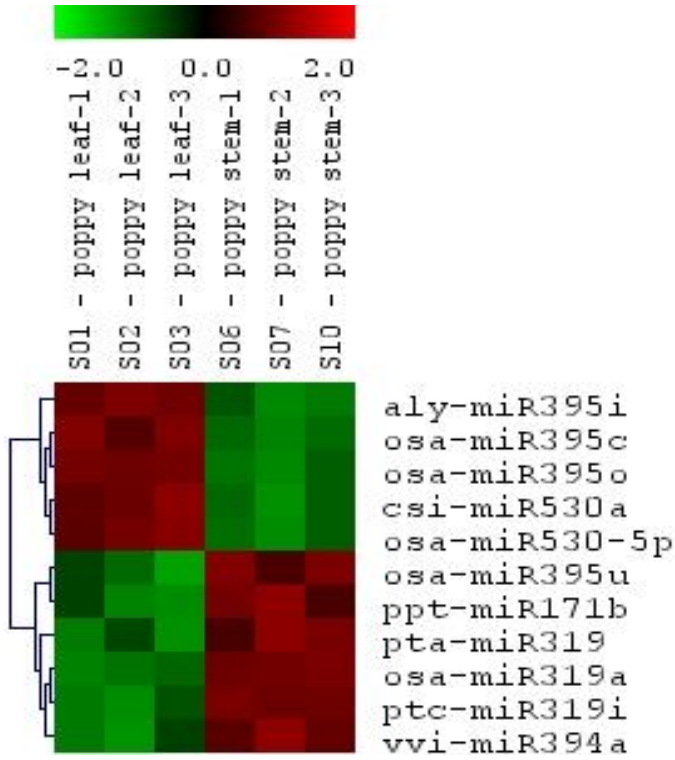
Çizelge 3 Kapsül ve yaprak arasındaki miRNA ifade profilleri farklılığı

			Grup 1	Grup 2	
			yaprak	kapsül	Log2 (G2/G1)
No.	Prop ismi	p-value	ortalama	ortalama	
192	aly-miR395i	4.44E-04	1,569	33	-5.59
857	mtr-miR166b	8.30E-04	7,269	2,860	-1.35
1624	sbi-miR166k	1.33E-03	6,566	3,028	-1.12
595	crt-miR166b	1.98E-03	7,538	2,569	-1.55
1034	osa-miR166g	2.13E-03	6,555	2,767	-1.24
1209	osa-miR395c	2.46E-03	439	14	-4.97
1037	osa-miR166m	2.85E-03	7,292	2,452	-1.57
594	crt-miR166a	2.86E-03	6,995	2,210	-1.66
356	aqc-miR535	4.74E-03	17,883	3,041	-2.56
1623	sbi-miR166a	5.52E-03	6,379	2,166	-1.56
1736	vvi-miR166a	6.47E-03	8,487	3,575	-1.25
629	csi-miR535	8.60E-03	8,287	1,083	-2.94
1551	ptc-miR166n	8.99E-03	4,664	2,100	-1.15
76	aly-miR166a	9.73E-03	5,446	2,187	-1.32
1846	zma-miR164h	1.00E-02	1,261	10,187	3.01
1606	ptc-miR530a	1.09E-02	989	48	-4.35
1306	pab-miR395	1.09E-02	2,329	85	-4.77
1524	pta-miR319	1.31E-02	194	1,245	2.68
627	csi-miR530a	1.50E-02	4,973	45	-6.78
1211	osa-miR395o	1.55E-02	760	13	-5.82
1257	osa-miR530-5p	1.62E-02	4,973	36	-7.11
1260	osa-miR535	1.62E-02	27,791	4,385	-2.66
1628	sbi-miR172a	1.62E-02	757	380	-0.99
1030	osa-miR164c	1.95E-02	5,897	14,519	1.30
1622	sbi-miR164c	2.01E-02	5,712	13,513	1.24
1032	osa-miR164e	2.14E-02	7,170	15,170	1.08

1315	peu-miR2911	2.21E-02	75,719	9,080	-3.06
1930	zma-miR396a*	2.34E-02	118	1,156	3.29
355	aqc-miR530	2.40E-02	335	12	-4.81
129	aly-miR319a	2.58E-02	286	1,194	2.06
1190	osa-miR2919	2.60E-02	455	2,175	2.26
1613	rco-miR164d	2.83E-02	7,212	15,302	1.09
1033	osa-miR166e	2.94E-02	2,551	907	-1.49
637	far-miR164a	3.06E-02	1,874	14,942	3.00
52	aly-miR159c	3.09E-02	5,219	9,248	0.83
1031	osa-miR164d	3.23E-02	5,799	12,483	1.11
71	aly-miR164c	3.37E-02	5,639	12,640	1.16
68	aly-miR164a	3.38E-02	5,582	12,433	1.16
628	csi-miR530b	3.47E-02	342	7	-5.57
34	aly-miR156g	3.80E-02	1,373	4,744	1.79
1522	pta-miR159c	3.96E-02	400	1,632	2.03
116	aly-miR172c	4.08E-02	514	159	-1.69
27	aly-miR156a	4.68E-02	1,453	4,852	1.74
497	bna-miR156a	4.72E-02	1,327	4,256	1.68
1621	sbi-miR159b	4.98E-02	5,056	8,260	0.71
1454	ppt-miR319c	5.23E-02	819	3,070	1.91
362	ath-miR165a	5.79E-02	2,375	1,032	-1.20
1023	osa-miR159c	5.80E-02	4,940	8,198	0.73
38	aly-miR157a	5.94E-02	822	434	-0.92
113	aly-miR172a	6.00E-02	823	563	-0.55
184	aly-miR395b	6.06E-02	43	509	3.58
1025	osa-miR159e	6.08E-02	5,481	8,632	0.66
839	hvu-miR1436	6.40E-02	378	2,459	2.70
194	aly-miR396a*	6.54E-02	80	748	3.22
728	gma-miR319a	6.79E-02	582	2,217	1.93
1024	osa-miR159d	7.23E-02	5,337	8,490	0.67
461	ath-miR854a	7.24E-02	138	436	1.66

1569	ptc-miR319e	7.43E-02	1,232	3,115	1.34
1520	pta-miR159a	7.46E-02	1,045	2,655	1.34
1645	sly-miR319	7.71E-02	2,006	4,749	1.24
132	aly-miR319c	7.82E-02	1,078	3,047	1.50
1548	ptc-miR159e	8.03E-02	56	360	2.67
364	ath-miR172e	8.24E-02	588	362	-0.70
490	bdi-miR171c	8.92E-02	601	199	-1.59
1036	osa-miR166k	9.09E-02	2,877	974	-1.56
42	aly-miR157d	9.52E-02	732	430	-0.77

Göreceli olarak miRNA'ların bir dokudaki ifade düzeyinin diğerine göre azalması (-) ile gösterilmiştir.



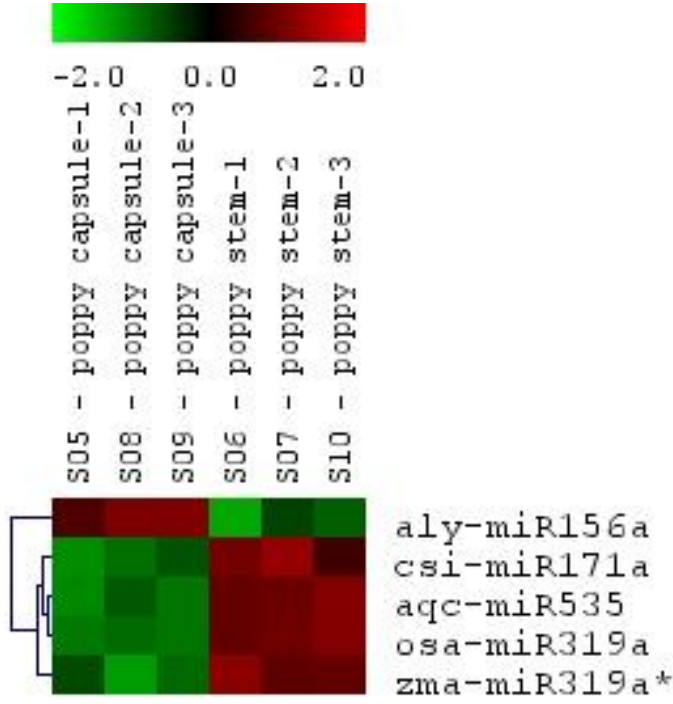
Şekil 4. Üç farklı bitki dokusunun gövdeye ait miRNA profillerinin yaprakla karşılaştırılması p<0.01.

Çizelge 4 Gövde ve yaprak arasındaki miRNA ifade profilleri farklılığı

			Grup 1	Grup 2	
			yaprak	gövde	Log2 (G2/G1)
No.	Prop ismi	p-value	ortalama	ortalama	
1204	osa-miR319a	1.15E-04	55	790	3.86
1209	osa-miR395c	8.60E-04	439	13	-5.12
1257	osa-miR530-5p	1.17E-03	4,973	601	-3.05
627	csi-miR530a	1.53E-03	4,973	748	-2.73
1211	osa-miR395o	2.86E-03	760	20	-5.23
1524	pta-miR319	4.89E-03	194	1,416	2.86
192	aly-miR395i	5.34E-03	1,569	44	-5.17
629	csi-miR535	1.23E-02	8,287	2,066	-2.00
113	aly-miR172a	1.29E-02	823	2,431	1.56
356	aqc-miR535	1.72E-02	17,883	7,327	-1.29
1306	pab-miR395	1.77E-02	2,329	109	-4.42
81	aly-miR166g*	2.25E-02	2,679	439	-2.61
595	crt-miR166b	2.78E-02	7,538	4,034	-0.90
364	ath-miR172e	2.93E-02	588	1,688	1.52
1606	ptc-miR530a	2.93E-02	989	58	-4.10
129	aly-miR319a	3.14E-02	286	1,380	2.27
1454	ppt-miR319c	4.11E-02	819	3,316	2.02
27	aly-miR156a	4.23E-02	1,453	259	-2.49
119	aly-miR172e	4.23E-02	1,251	3,473	1.47
628	csi-miR530b	4.24E-02	342	26	-3.71
497	bna-miR156a	4.50E-02	1,327	223	-2.57
490	bdi-miR171c	4.56E-02	601	89	-2.75
76	aly-miR166a	4.80E-02	5,446	3,055	-0.83
34	aly-miR156g	4.87E-02	1,373	258	-2.41
594	crt-miR166a	5.07E-02	6,995	3,361	-1.06
1026	osa-miR159f	5.23E-02	15,774	22,928	0.54

87	aly-miR167d	5.33E-02	4,572	183	-4.64
1039	osa-miR167d	5.67E-02	5,209	220	-4.56
487	bdi-miR156	5.72E-02	5,097	738	-2.79
85	aly-miR167c	5.79E-02	1,709	66	-4.69
358	ata-miR172	5.79E-02	1,683	4,269	1.34
1645	sly-miR319	5.90E-02	2,006	5,302	1.40
1737	vvi-miR167c	5.95E-02	2,440	71	-5.11
5	ahy-miR167-5p	6.01E-02	5,592	241	-4.54
82	aly-miR167a	6.08E-02	5,447	246	-4.47
728	gma-miR319a	6.09E-02	582	2,446	2.07
1620	sbi-miR156e	6.10E-02	1,072	151	-2.82
499	bna-miR167a	6.53E-02	2,725	83	-5.04
1441	ppt-miR167	6.62E-02	3,700	136	-4.77
715	gma-miR167g	6.66E-02	750	33	-4.51
355	aqc-miR530	6.96E-02	335	31	-3.43
1623	sbi-miR166a	7.14E-02	6,379	2,934	-1.12
132	aly-miR319c	7.33E-02	1,078	2,997	1.48
1260	osa-miR535	7.34E-02	27,791	11,256	-1.30
1037	osa-miR166m	7.34E-02	7,292	3,777	-0.95
1569	ptc-miR319e	7.83E-02	1,232	3,016	1.29
857	mtr-miR166b	8.20E-02	7,269	4,483	-0.70
342	aqc-miR167	8.21E-02	798	32	-4.64
1755	vvi-miR319g	9.06E-02	81	714	3.13
48	aly-miR159a	9.15E-02	15,936	23,751	0.58
1732	vvi-miR156e	9.53E-02	410	41	-3.32
1021	osa-miR156l	9.54E-02	709	94	-2.91
1048	osa-miR172c	9.59E-02	397	1,006	1.34
1553	ptc-miR167h	9.62E-02	2,775	86	-5.02
636	far-miR159	9.68E-02	15,125	22,811	0.59

Göreceli olarak miRNA'ların bir dokudaki ifade düzeyinin diğerine göre azalması (-) ile gösterilmiştir.



Şekil 5 Üç farklı bitki dokusunun gövdeye ait miRNA profillerinin kapsülle karşılaştırılması $p < 0.01$.

Çizelge 5 Gövde ve kapsül arasındaki miRNA ifade profilleri farklılığı

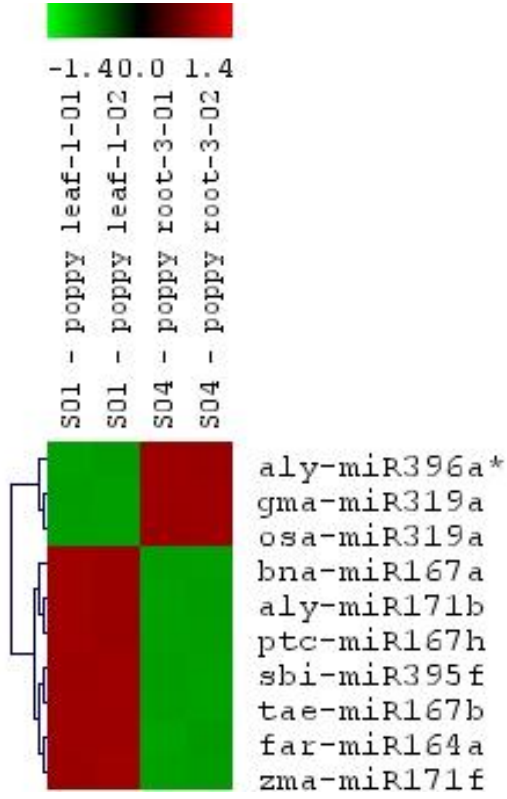
			Grup 1	Grup 2	
			kapsül	gövde	Log2 (G2/G1)
No.	Reporter Name	p-value	Mean	Mean	
356	aqc-miR535	9.46E-04	3,041	7,327	1.27
1204	osa-miR319a	1.90E-03	234	790	1.76
27	aly-miR156a	7.08E-03	4,852	259	-4.23
1260	osa-miR535	1.16E-02	4,385	11,256	1.36
116	aly-miR172c	1.17E-02	159	1,039	2.71
839	hvu-miR1436	1.18E-02	2,459	362	-2.76
461	ath-miR854a	1.58E-02	436	86	-2.34
1846	zma-miR164h	1.59E-02	10,187	2,387	-2.09

1620	sbi-miR156e	1.73E-02	3,292	151	-4.44
113	aly-miR172a	1.79E-02	563	2,431	2.11
637	far-miR164a	1.83E-02	14,942	4,909	-1.61
1629	sbi-miR172b	2.19E-02	197	1,020	2.37
358	ata-miR172	2.22E-02	946	4,269	2.17
1732	vvi-miR156e	2.25E-02	1,692	41	-5.36
364	ath-miR172e	2.25E-02	362	1,688	2.22
1547	ptc-miR156k	2.30E-02	1,917	83	-4.52
119	aly-miR172e	2.35E-02	819	3,473	2.08
1048	osa-miR172c	2.45E-02	154	1,006	2.70
34	aly-miR156g	2.52E-02	4,744	258	-4.20
1615	rco-miR172	2.53E-02	57	512	3.16
497	bna-miR156a	2.74E-02	4,256	223	-4.25
1755	vvi-miR319g	2.89E-02	107	714	2.74
85	aly-miR167c	3.12E-02	2,973	66	-5.49
1021	osa-miR156l	3.21E-02	2,356	94	-4.65
1628	sbi-miR172a	3.42E-02	380	1,745	2.20
627	csi-miR530a	3.72E-02	45	748	4.05
715	gma-miR167g	3.97E-02	1,624	33	-5.63
1190	osa-miR2919	4.13E-02	2,175	652	-1.74
68	aly-miR164a	4.21E-02	12,433	5,792	-1.10
342	aqc-miR167	4.22E-02	1,845	32	-5.85
1257	osa-miR530-5p	4.23E-02	36	601	4.07
71	aly-miR164c	4.35E-02	12,640	6,085	-1.05
1031	osa-miR164d	4.44E-02	12,483	5,869	-1.09
1622	sbi-miR164c	4.44E-02	13,513	6,771	-1.00
604	csi-miR172c	4.45E-02	14	280	4.30
81	aly-miR166g*	4.89E-02	2,095	439	-2.25
1749	vvi-miR172a	5.10E-02	48	379	2.97
1315	peu-miR2911	5.87E-02	9,080	55,542	2.61
87	aly-miR167d	5.90E-02	5,076	183	-4.79

1039	osa-miR167d	6.10E-02	6,005	220	-4.77
1736	vvi-miR166a	6.16E-02	3,575	6,651	0.90
82	aly-miR167a	6.23E-02	6,418	246	-4.71
1568	ptc-miR172i	6.42E-02	77	586	2.93
1026	osa-miR159f	6.44E-02	15,509	22,928	0.56
5	ahy-miR167-5p	6.48E-02	6,396	241	-4.73
1737	vvi-miR167c	6.52E-02	2,898	71	-5.36
629	csi-miR535	6.67E-02	1,083	2,066	0.93
1930	zma-miR396a*	7.12E-02	1,156	281	-2.04
1441	ppt-miR167	7.15E-02	4,678	136	-5.11
595	crt-miR166b	7.17E-02	2,569	4,034	0.65
499	bnm-miR167a	7.75E-02	3,053	83	-5.20
1030	osa-miR164c	7.90E-02	14,519	8,145	-0.83
194	aly-miR396a*	8.42E-02	748	180	-2.06
48	aly-miR159a	9.06E-02	16,038	23,751	0.57
1032	osa-miR164e	9.34E-02	15,170	9,315	-0.70
857	mtr-miR166b	9.67E-02	2,860	4,483	0.65
487	bdi-miR156	9.70E-02	2,589	738	-1.81
1624	sbi-miR166k	9.88E-02	3,028	4,881	0.69

Göreceli olarak miRNA'ların bir dokudaki ifade düzeyinin diğerine göre azalması (-) ile gösterilmiştir.

Kök ve yaprak arasındaki miRNA profil farklılığı aşağıda verilmiştir.



Şekil 6 Üç farklı bitki dokusunun gövdeye ait miRNA profillerinin kapsülle karşılaştırılması $p < 0.01$ (sapma gösteren örnekler analizde göz önünde bulundurulmuştur).

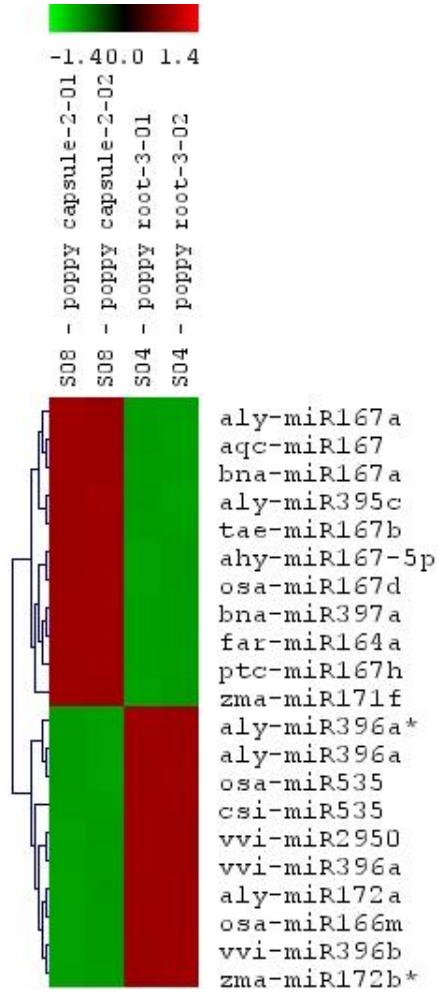
Çizelge 6 Yaprak ve kök arasındaki miRNA ifade profilleri farklılığı

			Grup 1	Grup 2	
			yaprak	kök	Log2 (G2/G1)
No.	Prop ismi	p-value	ortalama	ortalama	
1204	osa-miR319a	2.52E-03	46	581	3.64
728	gma-miR319a	4.43E-03	341	1,695	2.31
194	aly-miR396a*	6.87E-03	59	5,816	6.63
499	bna-miR167a	7.09E-03	3,159	49	-6.02
637	far-miR164a	7.25E-03	2,755	477	-2.53
1553	ptc-miR167h	8.03E-03	3,838	20	-7.56
1039	osa-miR167d	1.01E-02	5,035	109	-5.53
1606	ptc-miR530a	1.04E-02	1,199	9	-7.04
342	aqc-miR167	1.17E-02	1,195	10	-6.84

87	aly-miR167d	1.19E-02	4,288	96	-5.48
5	ahy-miR167-5p	1.23E-02	5,102	110	-5.54
132	aly-miR319c	1.30E-02	798	2,585	1.69
1318	peu-miR2916	1.52E-02	191	1,226	2.68
1026	osa-miR159f	1.59E-02	15,177	22,596	0.57
1930	zma-miR396a*	1.61E-02	89	7,735	6.44
1633	sbi-miR396e	1.63E-02	3,543	10,364	1.55
82	aly-miR167a	1.63E-02	4,668	124	-5.24
1315	peu-miR2911	1.69E-02	52,507	5,975	-3.14
627	csi-miR530a	1.82E-02	4,169	53	-6.30
629	csi-miR535	1.83E-02	8,683	4,892	-0.83
1040	osa-miR168b	1.84E-02	2,174	582	-1.90
636	far-miR159	1.87E-02	16,287	21,697	0.41
1441	ppt-miR167	1.89E-02	4,043	70	-5.84
859	mtr-miR168	1.89E-02	2,463	482	-2.35
38	aly-miR157a	1.95E-02	613	180	-1.77
85	aly-miR167c	2.01E-02	2,178	17	-7.02
174	aly-miR390a*	2.15E-02	98	1,111	3.50
113	aly-miR172a	2.18E-02	685	1,763	1.36
1524	pta-miR319	2.20E-02	168	894	2.41
1035	osa-miR166i	2.28E-02	1,360	139	-3.29
1257	osa-miR530-5p	2.36E-02	3,932	54	-6.18
1569	ptc-miR319e	2.56E-02	1,011	3,103	1.62
839	hvu-miR1436	2.56E-02	121	515	2.09
81	aly-miR166g*	2.70E-02	1,758	3,382	0.94
89	aly-miR168a	2.76E-02	6,412	4,048	-0.66
115	aly-miR172b*	2.81E-02	551	1,368	1.31
1036	osa-miR166k	2.90E-02	3,552	1,114	-1.67
1704	sof-miR168b	2.90E-02	980	182	-2.43
73	aly-miR165a	3.01E-02	3,688	1,782	-1.05
1454	ppt-miR319c	3.04E-02	553	2,252	2.03

1439	ppt-miR166j	3.08E-02	3,466	1,332	-1.38
340	aqc-miR159	3.19E-02	162	495	1.61
129	aly-miR319a	3.22E-02	210	1,197	2.51
193	aly-miR396a	3.25E-02	952	4,518	2.25
1737	vvi-miR167c	3.33E-02	3,107	28	-6.81
1797	vvi-miR396a	3.44E-02	5,724	10,188	0.83
497	bnm-miR156a	3.48E-02	743	2,026	1.45
643	ghr-miR156c	3.63E-02	335	689	1.04
730	gma-miR390a-3p	3.64E-02	91	970	3.42
1190	osa-miR2919	3.69E-02	228	825	1.86
1551	ptc-miR166n	3.79E-02	4,739	2,992	-0.66
1632	sbi-miR396d	4.03E-02	2,587	8,730	1.75
362	ath-miR165a	4.08E-02	2,714	878	-1.63
1209	osa-miR395c	4.08E-02	534	3	-7.34
68	aly-miR164a	4.12E-02	5,171	2,493	-1.05
42	aly-miR157d	4.28E-02	529	142	-1.90
1032	osa-miR164e	4.47E-02	6,893	3,261	-1.08
48	aly-miR159a	4.53E-02	16,167	22,726	0.49
1306	pab-miR395	4.56E-02	1,693	22	-6.29
1645	sly-miR319	4.59E-02	1,595	4,497	1.50
1033	osa-miR166e	4.72E-02	2,766	971	-1.51
1522	pta-miR159c	4.79E-02	251	803	1.68
1846	zma-miR164h	4.86E-02	1,972	230	-3.10
71	aly-miR164c	5.17E-02	5,237	2,536	-1.05
173	aly-miR390a	5.29E-02	22	588	4.73
1034	osa-miR166g	5.32E-02	6,189	3,999	-0.63
1613	rco-miR164d	5.38E-02	7,029	3,139	-1.16
1030	osa-miR164c	5.55E-02	5,685	2,700	-1.07
358	ata-miR172	5.65E-02	1,110	2,795	1.33
76	aly-miR166a	5.75E-02	4,774	2,590	-0.88
119	aly-miR172e	5.77E-02	840	2,083	1.31

1552	ptc-miR166p	5.82E-02	3,062	1,455	-1.07
841	hvu-miR168-5p	6.01E-02	4,229	2,649	-0.67
1622	sbi-miR164c	6.11E-02	5,755	2,393	-1.27
1031	osa-miR164d	6.23E-02	5,658	2,701	-1.07
1693	smo-miR156b	6.34E-02	608	163	-1.90
1620	sbi-miR156e	6.50E-02	543	1,463	1.43
27	aly-miR156a	6.57E-02	753	2,295	1.61
628	csi-miR530b	6.60E-02	550	4	-6.96
1440	ppt-miR166m	6.64E-02	1,217	246	-2.30
192	aly-miR395i	6.72E-02	1,290	14	-6.52
34	aly-miR156g	6.77E-02	743	2,238	1.59
364	ath-miR172e	6.78E-02	547	1,126	1.04
1798	vvi-miR396b	6.96E-02	6,024	12,040	1.00
487	bdi-miR156	7.36E-02	6,650	2,690	-1.31
1520	pta-miR159a	7.44E-02	938	2,053	1.13
1037	osa-miR166m	7.45E-02	6,484	3,754	-0.79
1897	zma-miR172b*	7.46E-02	532	1,106	1.05
1211	osa-miR395o	7.65E-02	791	6	-7.12
1546	ptc-miR1450	7.67E-02	2,228	4,939	1.15
1736	vvi-miR166a	7.77E-02	7,894	5,792	-0.45
1048	osa-miR172c	8.10E-02	405	801	0.98
735	gma-miR396e	8.13E-02	9,207	20,337	1.14
1826	zma-miR159e	8.28E-02	15,901	24,363	0.62
638	far-miR166	8.40E-02	912	174	-2.39
1628	sbi-miR172a	8.64E-02	611	1,349	1.14
1629	sbi-miR172b	8.88E-02	393	629	0.68
857	mtr-miR166b	8.92E-02	6,611	4,896	-0.43
50	aly-miR159b	9.02E-02	15,160	20,679	0.45
631	ctr-miR171	9.36E-02	513	376	-0.45
1623	sbi-miR166a	9.89E-02	5,726	3,231	-0.83



Şekil 7 Üç farklı bitki dokusunun köke ait miRNA profillerinin kapsülle karşılaştırılması $p < 0.01$ (sapma gösteren örnekler analizde göz önünde bulundurulmuştur).

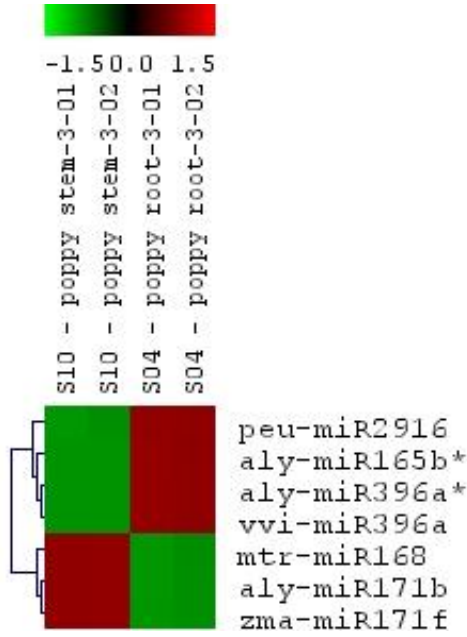
Çizelge 7 Kapsül ve kök arasındaki miRNA ifade profilleri farklılığı

			Grup 1	Grup 2	
			kapsül	kök	Log2 (G2/G1)
No.	Prop ismi	p-value	ortalama	ortalama	
629	csi-miR535	9.11E-04	877	4,892	2.48
1553	ptc-miR167h	3.33E-03	6,741	20	-8.37
637	far-miR164a	3.89E-03	12,823	477	-4.75
499	bna-miR167a	4.37E-03	5,095	49	-6.71

1797	vvi-miR396a	5.75E-03	1,248	10,188	3.03
193	aly-miR396a	6.60E-03	83	4,518	5.77
1897	zma-miR172b*	6.72E-03	132	1,106	3.07
342	aqc-miR167	6.89E-03	3,558	10	-8.41
194	aly-miR396a*	7.11E-03	508	5,816	3.52
1037	osa-miR166m	8.25E-03	2,337	3,754	0.68
5	ahy-miR167-5p	8.30E-03	8,525	110	-6.28
82	aly-miR167a	8.31E-03	7,923	124	-6.00
1798	vvi-miR396b	8.63E-03	1,538	12,040	2.97
1260	osa-miR535	8.90E-03	4,615	20,910	2.18
1039	osa-miR167d	9.05E-03	8,138	109	-6.22
113	aly-miR172a	9.94E-03	473	1,763	1.90
1030	osa-miR164c	1.04E-02	13,080	2,700	-2.28
1031	osa-miR164d	1.07E-02	10,598	2,701	-1.97
87	aly-miR167d	1.20E-02	6,515	96	-6.08
735	gma-miR396e	1.22E-02	3,424	20,337	2.57
1026	osa-miR159f	1.26E-02	16,667	22,596	0.44
1622	sbi-miR164c	1.27E-02	11,842	2,393	-2.31
859	mtr-miR168	1.30E-02	1,544	482	-1.68
1771	vvi-miR3630*	1.36E-02	729	106	-2.79
116	aly-miR172c	1.42E-02	214	937	2.13
184	aly-miR395b	1.51E-02	524	38	-3.78
85	aly-miR167c	1.59E-02	5,179	17	-8.27
1032	osa-miR164e	1.62E-02	13,898	3,261	-2.09
1441	ppt-miR167	1.63E-02	7,335	70	-6.70
643	ghr-miR156c	1.75E-02	4,045	689	-2.55
1732	vvi-miR156e	1.86E-02	2,847	378	-2.91
38	aly-miR157a	1.89E-02	506	180	-1.49
356	aqc-miR535	2.13E-02	3,341	15,066	2.17
1547	ptc-miR156k	2.31E-02	2,933	314	-3.22
1548	ptc-miR159e	2.32E-02	672	167	-2.01

1613	rco-miR164d	2.34E-02	13,852	3,139	-2.14
81	aly-miR166g*	2.40E-02	1,014	3,382	1.74
636	far-miR159	2.52E-02	16,944	21,697	0.36
1736	vvi-miR166a	2.55E-02	3,433	5,792	0.75
364	ath-miR172e	2.55E-02	355	1,126	1.66
839	hvu-miR1436	2.60E-02	1,932	515	-1.91
68	aly-miR164a	2.65E-02	10,345	2,493	-2.05
1633	sbi-miR396e	2.75E-02	622	10,364	4.06
1846	zma-miR164h	2.81E-02	8,177	230	-5.15
1040	osa-miR168b	2.94E-02	1,428	582	-1.29
1737	vvi-miR167c	3.04E-02	5,033	28	-7.51
1930	zma-miR396a*	3.06E-02	697	7,735	3.47
173	aly-miR390a	3.12E-02	78	588	2.91
1204	osa-miR319a	3.31E-02	243	581	1.26
115	aly-miR172b*	3.32E-02	136	1,368	3.33
1546	ptc-miR1450	3.37E-02	1,920	4,939	1.36
119	aly-miR172e	3.43E-02	689	2,083	1.60
728	gma-miR319a	3.57E-02	2,653	1,695	-0.65
71	aly-miR164c	3.74E-02	10,567	2,536	-2.06
358	ata-miR172	3.89E-02	800	2,795	1.80
497	bna-miR156a	4.18E-02	4,990	2,026	-1.30
1190	osa-miR2919	4.27E-02	2,177	825	-1.40
1021	osa-miR156l	4.53E-02	3,341	1,129	-1.57
461	ath-miR854a	4.55E-02	504	70	-2.84
1826	zma-miR159e	4.63E-02	14,038	24,363	0.80
1568	ptc-miR172i	4.64E-02	90	549	2.61
1632	sbi-miR396d	4.74E-02	343	8,730	4.67
1522	pta-miR159c	4.94E-02	2,199	803	-1.45
1048	osa-miR172c	4.99E-02	207	801	1.95
1551	ptc-miR166n	5.03E-02	2,194	2,992	0.45
1629	sbi-miR172b	5.50E-02	152	629	2.05

1524	pta-miR319	5.58E-02	1,735	894	-0.96
76	aly-miR166a	5.66E-02	1,814	2,590	0.51
1217	osa-miR396f	5.87E-02	107	2,851	4.74
1520	pta-miR159a	5.91E-02	3,380	2,053	-0.72
1318	peu-miR2916	5.94E-02	761	1,226	0.69
1620	sbi-miR156e	6.34E-02	4,229	1,463	-1.53
1454	ppt-miR319c	6.52E-02	3,895	2,252	-0.79
1704	sof-miR168b	6.53E-02	682	182	-1.91
1624	sbi-miR166k	6.75E-02	2,945	4,430	0.59
1549	ptc-miR159f	6.78E-02	2,950	1,010	-1.55
1628	sbi-miR172a	6.84E-02	354	1,349	1.93
730	gma-miR390a-3p	6.97E-02	373	970	1.38
1621	sbi-miR159b	7.08E-02	9,445	7,840	-0.27
89	aly-miR168a	7.35E-02	3,227	4,048	0.33
857	mtr-miR166b	7.37E-02	2,733	4,896	0.84
1521	pta-miR159b	7.37E-02	842	226	-1.90
340	aqc-miR159	7.62E-02	237	495	1.06
174	aly-miR390a*	7.65E-02	378	1,111	1.56
841	hvu-miR168-5p	7.71E-02	2,720	2,649	-0.04
34	aly-miR156g	7.88E-02	5,473	2,238	-1.29
90	aly-miR168a*	8.01E-02	596	1,208	1.02
129	aly-miR319a	8.07E-02	1,563	1,197	-0.39
1034	osa-miR166g	8.62E-02	2,544	3,999	0.65
132	aly-miR319c	8.68E-02	3,700	2,585	-0.52
27	aly-miR156a	8.80E-02	5,635	2,295	-1.30
595	crt-miR166b	9.87E-02	2,539	4,031	0.67
594	crt-miR166a	9.98E-02	2,031	3,699	0.86



Şekil 8 Üç farklı bitki dokusunun köke ait miRNA profillerinin gövde karşılaştırılması $p < 0.01$ (sapma gösteren örnekler analizde göz önünde bulundurulmuştur).

Çizelge 8 Gövde ve kök arasındaki miRNA ifade profilleri farklılığı

No.	Prop ismi	p-value	Grup 1	Grup 2	Log2 (G2/G1)
			gövde	kök	
			ortalama	ortalama	
194	aly-miR396a*	4.09E-03	313	5,816	4.22
1797	vvi-miR396a	5.88E-03	3,424	10,188	1.57
1318	peu-miR2916	9.50E-03	121	1,226	3.34
859	mtr-miR168	9.88E-03	2,259	482	-2.23
1551	ptc-miR166n	1.21E-02	4,184	2,992	-0.48
81	aly-miR166g*	1.30E-02	544	3,382	2.64
637	far-miR164a	1.32E-02	6,537	477	-3.78
643	ghr-miR156c	1.41E-02	97	689	2.83
1260	osa-miR535	1.42E-02	10,541	20,910	0.99
87	aly-miR167d	1.60E-02	501	96	-2.38

1031	osa-miR164d	1.65E-02	6,402	2,701	-1.25
1021	osa-miR156l	1.70E-02	107	1,129	3.40
1622	sbi-miR164c	1.75E-02	7,197	2,393	-1.59
1033	osa-miR166e	1.76E-02	2,329	971	-1.26
1315	peu-miR2911	1.78E-02	36,139	5,975	-2.60
1930	zma-miR396a*	2.13E-02	470	7,735	4.04
1030	osa-miR164c	2.26E-02	8,504	2,700	-1.66
82	aly-miR167a	2.30E-02	684	124	-2.47
1755	vvi-miR319g	2.41E-02	749	204	-1.87
735	gma-miR396e	2.58E-02	8,163	20,337	1.32
1040	osa-miR168b	2.61E-02	2,320	582	-1.99
1032	osa-miR164e	2.61E-02	9,753	3,261	-1.58
1034	osa-miR166g	2.71E-02	5,466	3,999	-0.45
5	ahy-miR167-5p	2.74E-02	671	110	-2.61
1039	osa-miR167d	2.97E-02	610	109	-2.48
174	aly-miR390a*	3.01E-02	199	1,111	2.48
627	csi-miR530a	3.06E-02	871	53	-4.04
1613	rco-miR164d	3.06E-02	9,351	3,139	-1.57
1036	osa-miR166k	3.19E-02	2,319	1,114	-1.06
362	ath-miR165a	3.59E-02	2,315	878	-1.40
497	bna-miR156a	3.75E-02	226	2,026	3.17
1257	osa-miR530-5p	3.83E-02	722	54	-3.73
1037	osa-miR166m	4.07E-02	5,043	3,754	-0.43
1846	zma-miR164h	4.09E-02	3,361	230	-3.87
34	aly-miR156g	4.09E-02	281	2,238	2.99
1620	sbi-miR156e	4.19E-02	173	1,463	3.08
193	aly-miR396a	4.21E-02	777	4,518	2.54
27	aly-miR156a	4.40E-02	273	2,295	3.07
73	aly-miR165a	4.57E-02	4,132	1,782	-1.21
730	gma-miR390a-3p	4.58E-02	202	970	2.26
1798	vvi-miR396b	4.59E-02	4,493	12,040	1.42

629	csi-miR535	4.77E-02	2,702	4,892	0.86
173	aly-miR390a	5.02E-02	40	588	3.89
1704	sof-miR168b	5.05E-02	1,112	182	-2.61
1552	ptc-miR166p	5.19E-02	3,147	1,455	-1.11
487	bdi-miR156	6.58E-02	784	2,690	1.78
1623	sbi-miR166a	6.67E-02	4,197	3,231	-0.38
1546	ptc-miR1450	6.70E-02	1,589	4,939	1.64
356	aqc-miR535	6.85E-02	7,926	15,066	0.93
1524	pta-miR319	6.89E-02	1,492	894	-0.74
841	hvu-miR168-5p	7.84E-02	4,423	2,649	-0.74
1026	osa-miR159f	8.29E-02	20,280	22,596	0.16
1632	sbi-miR396d	8.30E-02	2,135	8,730	2.03
1633	sbi-miR396e	8.49E-02	3,069	10,364	1.76
71	aly-miR164c	8.69E-02	6,303	2,536	-1.31
1624	sbi-miR166k	8.86E-02	6,006	4,430	-0.44
857	mtr-miR166b	9.12E-02	5,297	4,896	-0.11
1190	osa-miR2919	9.46E-02	468	825	0.82
68	aly-miR164a	9.65E-02	6,125	2,493	-1.30
1217	osa-miR396f	9.87E-02	556	2,851	2.36

EK6: Tüm Haşhaş miRNA'larının Biyoformatik Olarak Bulunan Hedef Genleri

psomiRNA Adı.	Hedef gen ID	Hedef genin adı
psomiR2911	AT5G67460.1	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein chr5:26921584-26923274 REVERSE LENGTH=1543
psomiR2911	AT5G21160.1	LA RNA-binding protein chr5:7198741-7204090 REVERSE LENGTH=3142
psomiR2911	AT4G08685.1	SAH7 Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein chr4:5550429-5551370 FORWARD LENGTH=725
psomiR780	AT4G06487.1	transposable element gene chr4:3099364-3105303 FORWARD LENGTH=5940
psomiR780	AT2G16018.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
psomiR2916	AT1G23850.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
psomiR2916	AT5G38365.1	transposable element gene chr5:15334173-15339896 FORWARD LENGTH=5724
psomiR5225	AT5G61410.2	RPE D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase chr5:24683606-24686083 REVERSE LENGTH=1380
psomiR5225	AT5G61410.1	RPE, EMB2728 D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase chr5:24683606-24686105 REVERSE LENGTH=1408
psomiR5225	AT4G12820.1	F-box family protein with a domain of unknown function (DUF295) chr4:7527048-7529356 REVERSE LENGTH=1552
psomiR6027	AT3G20530.1	Protein kinase superfamily protein chr3:7166047-7167929 FORWARD LENGTH=1555
psomiR6027	AT5G17240.1	SDG40 SET domain group 40 chr5:5666852-5668907 FORWARD LENGTH=1536
psomiR6027	AT5G37000.1	Exostosin family protein chr5:14618107-14620282 FORWARD LENGTH=1644
psomiR6027	AT5G06820.1	SRF2 STRUBBELIG-receptor family 2 chr5:2112869-2116754 FORWARD LENGTH=2424
psomiR6027	AT3G08530.1	Clathrin, heavy chain chr3:2586806-2595572 REVERSE LENGTH=5638
psomiR6027	AT3G05350.1	Metallopeptidase M24 family protein chr3:1526963-1533867 REVERSE LENGTH=2297
psomiR4351	AT4G06547.1	transposable element gene chr4:3404979-3407879 FORWARD LENGTH=2901
psomiR4351	AT4G03940.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
psomiR4351	AT4G08170.2	Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase family protein chr4:5163399-5167179 REVERSE LENGTH=1549
psomiR4351	AT2G04680.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein chr2:1640140-1642209 FORWARD LENGTH=2070
psomiR4351	AT5G19790.1	RAP2.11 related to AP2 11 chr5:6689108-6690040 REVERSE LENGTH=933
psomiR4351	AT5G37550.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
psomiR4351	AT1G17480.1	IQD7 IQ-domain 7 chr1:6006461-6008266 REVERSE LENGTH=1464
psomiR4351	AT1G01280.1	CYP703A2, CYP703 cytochrome P450, family 703, subfamily A, polypeptide 2 chr1:112263-113947 FORWARD LENGTH=1602
psomiR4351	AT5G51160.1	Ankyrin repeat family protein chr5:20792211-20793841 FORWARD LENGTH=1558
psomiR1439	AT1G75920.2	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein chr1:28505272-28507168 FORWARD LENGTH=1481
psomiR1439	AT1G33360.1	ATP-dependent Clp protease chr1:12091877-12096025 FORWARD LENGTH=2441
psomiR1439	AT4G22690.1	CYP706A1 cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 1 chr4:11929359-11931693 FORWARD LENGTH=2335
psomiR1439	AT2G38220.1	RING/U-box superfamily protein chr2:16007891-16010932 FORWARD LENGTH=1728
psomiR1439	AT4G16110.1	ARR2, RR2 response regulator 2 chr4:9112686-9116164 FORWARD LENGTH=2666
psomiR1439	AT3G53500.1	RSZ32, RS2Z32, At-RS2Z RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein with retrovirus zinc finger-like domain chr3:19834343-19837082 REVERSE LENGTH=1444
psomiR1439	AT1G68720.1	TADA, ATTADA tRNA arginine adenosine deaminase chr1:25804418-25808982 FORWARD LENGTH=4215
psomiR1439	AT5G42910.1	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein chr5:17203742-17205380 FORWARD LENGTH=1448
psomiR1439	AT5G55770.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein chr5:22571645-22573732 FORWARD LENGTH=2088
psomiR1439	AT3G59060.1	PIL6, PIF5 phytochrome interacting factor 3-like 6 chr3:21828005-21830507 REVERSE LENGTH=1846
psomiR1439	AT4G36390.1	Methylthiotransferase chr4:17194588-17197131 REVERSE LENGTH=2158
psomiR1439	AT5G25265.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein

pso-miR1439	AT4G23290.1	CRK21 cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 21 chr4:12177738-12180784 REVERSE LENGTH=2090
pso-miR2673	AT1G69550.1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) chr1:26148021-26153555 REVERSE LENGTH=5199
pso-miR2673	AT1G73760.1	RING/U-box superfamily protein chr1:27739168-27741207 REVERSE LENGTH=1348
pso-miR2673	AT4G26800.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein chr4:13489835-13492054 FORWARD LENGTH=1842
pso-miR2673	AT4G39630.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR2673	AT3G47940.1	DNAJ heat shock family protein chr3:17687956-17689549 REVERSE LENGTH=1476
pso-miR2673	AT5G46520.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family chr5:18867767-18872415 FORWARD LENGTH=4019
pso-miR2673	AT5G39090.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein chr5:15643603-15645116 FORWARD LENGTH=1514
pso-miR2673	AT4G30090.1	emb1353 embryo defective 1353 chr4:14708712-14711612 REVERSE LENGTH=1498
pso-miR2673	AT5G46490.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family chr5:18850776-18852862 FORWARD LENGTH=1467
pso-miR2673	AT3G22480.1	PDF2 prefoldin 2 chr3:7968078-7969705 FORWARD LENGTH=780
pso-miR2673	AT1G56510.1	WRR4, ADR2 Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) chr1:21167589-21173632 FORWARD LENGTH=3657
pso-miR2673	AT5G54870.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR2673	AT5G42950.1	GYF domain-containing protein chr5:17224436-17231355 FORWARD LENGTH=5456
pso-miR2673	AT5G54830.1	DOMON domain-containing protein / dopamine beta-monoxygenase N-terminal domain-containing protein chr5:22273070-22276301 FORWARD LENGTH=3136
pso-miR2673	AT1G27660.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein chr1:9621570-9626004 FORWARD LENGTH=1831
pso-miR2673	AT5G52060.1	ATBAG1, BAG1 BCL-2-associated athanogene 1 chr5:21152214-21154244 REVERSE LENGTH=1767
pso-miR2673	AT1G33260.1	Protein kinase superfamily protein chr1:12064509-12066376 FORWARD LENGTH=1599
pso-miR1851	AT3G49051.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR1851	AT5G16780.1	DOT2, MDF SART-1 family chr5:5517490-5522258 REVERSE LENGTH=3061
pso-miR1851	AT1G15002.1	Potential natural antisense gene, locus overlaps with AT1G15000 chr1:5169940-5170435 REVERSE LENGTH=496
pso-miR1851	AT2G25730.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR1851	AT2G25730.2	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR1310	AT1G36680.1	transposable element gene chr1:13871080-13872202 FORWARD LENGTH=1123
pso-miR5205	AT3G59790.1	ATMPK10, MPK10 MAP kinase 10 chr3:22092448-22094240 FORWARD LENGTH=1182
pso-miR894	AT1G03280.1	Transcription factor TFIIe, alpha subunit chr1:803035-807066 FORWARD LENGTH=1901
pso-miR894	AT3G19323.1	pseudogene of poly(A) binding protein chr3:6698514-6699154 FORWARD LENGTH=342
pso-miR1507	AT1G78350.1	transposable element gene chr1:29474914-29478272 FORWARD LENGTH=3359
pso-miR1507	AT1G15890.1	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family chr1:5461317-5464223 FORWARD LENGTH=2907
pso-miR1507	AT4G24590.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR1507	AT4G06600.1	pseudogene, hypothetical protein chr4:3668044-3668724 REVERSE LENGTH=681
pso-miR1507	AT2G11720.1	transposable element gene chr2:4699172-4703974 REVERSE LENGTH=4803
pso-miR1507	AT2G46530.3	ARF11 auxin response factor 11 chr2:19105112-19108331 FORWARD LENGTH=2171
pso-miR1507	AT4G36890.1	IRX14 Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein chr4:17379175-17381780 REVERSE LENGTH=2187
pso-miR1507	AT2G46530.1	ARF11 auxin response factor 11 chr2:19104665-19108331 FORWARD LENGTH=2436
pso-miR1507	AT1G17275.1	transposable element gene chr1:5912053-5915313 FORWARD LENGTH=3261
pso-miR1507	AT1G07680.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR4233	ATMG00840.1	ORF121B hypothetical protein chrM:234538-234903 REVERSE LENGTH=366
pso-miR4233	AT4G24310.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR4233	AT1G52610.1	transposable element gene chr1:19596595-19599402 REVERSE LENGTH=2808
pso-miR4233	AT1G29900.1	CARB carbamoyl phosphate synthetase B chr1:10468054-10472211 FORWARD LENGTH=3909
pso-miR1850	AT1G27020.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR1863	AT5G42645.1	transposable element gene chr5:17090938-17095801 REVERSE LENGTH=4864

pso-miR845	AT1G14490.1	Predicted AT-hook DNA-binding family protein chr1:4958514-4959325 REVERSE LENGTH=812
pso-miR845	AT2G09870.1	transposable element gene chr2:3733172-3738079 FORWARD LENGTH=4908
pso-miR1432	AT5G22290.1	anac089, NAC089 NAC domain containing protein 89 chr5:7375923-7377644 REVERSE LENGTH=1290
pso-miR1432	AT3G20930.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein chr3:7331721-7334029 FORWARD LENGTH=1423
pso-miR1432	AT5G30450.1	transposable element gene chr5:11559203-11561951 FORWARD LENGTH=2749
pso-miR1432	AT1G18230.1	pseudogene, putative protein kinase chr1:6272666-6273307 REVERSE LENGTH=642
pso-miR1432	AT3G20610.1	non-race specific disease resistance protein, putative chr3:7196723-7197391 FORWARD LENGTH=669
pso-miR1432	AT4G08980.2	FBW2 F-BOX WITH WD-40 2 chr4:5758404-5760558 FORWARD LENGTH=1993
pso-miR2948	AT3G24460.1	Serinc-domain containing serine and sphingolipid biosynthesis protein chr3:8885818-8893050 REVERSE LENGTH=1976
pso-miR2948	AT1G33240.1	AT-GTL1, AT-GTL2, GTL1 GT-2-like 1 chr1:12051471-12054546 REVERSE LENGTH=2624
pso-miR2948	AT1G60020.1	transposable element gene chr1:22100744-22105125 REVERSE LENGTH=4382
pso-miR2948	AT2G01070.1	Lung seven transmembrane receptor family protein chr2:75520-77865 FORWARD LENGTH=1807
pso-miR1312	AT2G05935.1	transposable element gene chr2:2278835-2282788 FORWARD LENGTH=3954
pso-miR1312	AT3G09770.2	RING/U-box superfamily protein chr3:2996278-2998190 REVERSE LENGTH=1732
pso-miR1312	AT1G08840.2	emb2411 DNA replication helicase, putative chr1:2829105-2838469 REVERSE LENGTH=4340
pso-miR1312	AT2G19100.1	transposable element gene chr2:8269781-8274895 REVERSE LENGTH=5115
pso-miR1312	AT1G44960.1	SNARE associated Golgi protein family chr1:16999538-17001729 FORWARD LENGTH=1106
pso-miR1312	AT4G06682.1	transposable element gene chr4:3908146-3912063 FORWARD LENGTH=3918
pso-miR1312	AT4G35840.1	RING/U-box superfamily protein chr4:16980961-16982365 FORWARD LENGTH=932
pso-miR1312	AT4G16748.1	chr4:9417058-9420649 REVERSE LENGTH=3592
pso-miR1114	AT5G43380.1	TOPP6 type one serine/threonine protein phosphatase 6 chr5:17420048-17421982 REVERSE LENGTH=1401
pso-miR1114	AT5G03930.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR1051	AT1G07340.1	ATSTP2, STP2 sugar transporter 2 chr1:2254822-2256850 FORWARD LENGTH=1686
pso-miR1051	AT4G15510.2	PhotosyGövde II reaction center PsbP family protein chr4:8860616-8862566 FORWARD LENGTH=1547
pso-miR1051	AT1G26640.1	Amino acid kinase family protein chr1:9207388-9209902 REVERSE LENGTH=1367
pso-miR1051	AT3G59820.1	LETM1-like protein chr3:22098028-22102164 REVERSE LENGTH=2951
pso-miR1051	AT5G49460.1	ACLB-2 ATP citrate lyase subunit B 2 chr5:20054523-20058464 FORWARD LENGTH=2336
pso-miR1051	AT1G72700.1	ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein chr1:27365896-27371733 FORWARD LENGTH=4404
pso-miR1852	AT4G39080.1	VHA-A3 vacuolar proton ATPase A3 chr4:18209399-18215056 FORWARD LENGTH=2884
pso-miR1852	AT2G07720.1	transposable element gene chr2:3557475-3558188 FORWARD LENGTH=714
pso-miR1852	AT1G19170.1	Pectin lyase-like superfamily protein chr1:6616643-6618986 FORWARD LENGTH=1766
pso-miR1852	AT3G45750.1	Nucleotidyltransferase family protein chr3:16793611-16797933 REVERSE LENGTH=2488
pso-miR2643	AT2G15740.1	C2H2-like zinc finger protein chr2:6856746-6857735 REVERSE LENGTH=990
pso-miR2643	AT3G12690.2	AGC1.5 AGC kinase 1.5 chr3:4030455-4032825 REVERSE LENGTH=2213
pso-miR2643	AT4G29130.1	ATHXK1, GIN2, HXK1 hexokinase 1 chr4:14352037-14355103 REVERSE LENGTH=2030
pso-miR2643	AT1G78480.1	Prenyltransferase family protein chr1:29525501-29526363 REVERSE LENGTH=609
pso-miR2643	AT4G06546.1	transposable element gene chr4:3396231-3403881 REVERSE LENGTH=7651
pso-miR2643	AT2G19390.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR2643	AT4G29790.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR2643	AT5G11530.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR2643	AT1G72270.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR2643	AT4G27010.2	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR854	AT1G80620.1	S15/NS1, RNA-binding protein chr1:30305362-30307417 FORWARD LENGTH=1522
pso-miR854	AT1G49290.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein

pso-miR854	AT4G29980.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR854	AT1G52160.1	TRZ3 tRNase Z3 chr1:19420715-19424439 REVERSE LENGTH=2889
pso-miR854	AT3G45190.1	SIT4 phosphatase-associated family protein chr3:16541673-16548278 REVERSE LENGTH=2808
pso-miR854	AT1G67840.2	CSK chloroplast sensor kinase chr1:25434102-25437075 FORWARD LENGTH=2130
pso-miR854	AT1G66090.1	Disease resistance protein (TIR-NBS class) chr1:24602146-24604763 FORWARD LENGTH=1555
pso-miR854	AT3G52510.1	F-box associated ubiquitination effector family protein chr3:19469652-19470378 REVERSE LENGTH=651
pso-miR854	AT1G72710.1	CKL2 casein kinase 1-like protein 2 chr1:27372271-27376584 FORWARD LENGTH=2086
pso-miR854	AT4G18770.1	MYB98, AtMYB98 myb domain protein 98 chr4:10311030-10313104 FORWARD LENGTH=1869
pso-miR854	AT5G51690.1	ACS12 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 12 chr5:20997413-21001046 REVERSE LENGTH=3179
pso-miR854	AT1G69440.1	AGO7, ZIP Argonaute family protein chr1:26101527-26105166 REVERSE LENGTH=3161
pso-miR854	AT5G61350.1	Protein kinase superfamily protein chr5:24667973-24670501 FORWARD LENGTH=2529
pso-miR854	AT5G06839.3	TGA10, bZIP65 bZIP transcription factor family protein chr5:2120527-2126455 FORWARD LENGTH=2005
pso-miR854	AT1G67770.1	TEL2 terminal EAR1-like 2 chr1:25408043-25410153 FORWARD LENGTH=1584
pso-miR854	AT5G39080.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein chr5:15641658-15643161 FORWARD LENGTH=1504
pso-miR854	AT5G22550.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR854	AT3G60720.1	PDLP8 plasmodesmata-located protein 8 chr3:22441771-22443771 FORWARD LENGTH=1267
pso-miR854	AT5G42780.1	AtHB27, HB27, ZHD13 homeobox protein 27 chr5:17154776-17155757 FORWARD LENGTH=982
pso-miR1106	AT3G06820.2	BRCC36B, AtBRCC36B Mov34/MPN/PAD-1 family protein chr3:2150847-2153440 REVERSE LENGTH=1574
pso-miR1106	AT1G64960.1	ARM repeat superfamily protein chr1:24129918-24134204 FORWARD LENGTH=3767
pso-miR1106	AT3G53940.1	Mitochondrial substrate carrier family protein chr3:19971019-19973769 REVERSE LENGTH=1542
pso-miR1106	AT2G23100.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein chr2:9837120-9839736 REVERSE LENGTH=2617
pso-miR1106	AT2G44200.1	CBF1-interacting co-repressor CIR, N-terminal;Pre-mRNA splicing factor chr2:18276210-18278627 FORWARD LENGTH=1961
pso-miR1106	AT1G35516.1	myb-like transcription factor family protein chr1:13078618-13079773 FORWARD LENGTH=781
pso-miR1106	AT1G55675.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR1106	AT5G01190.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR4393	AT3G46000.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR4393	AT4G15860.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR4393	AT1G22480.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR4393	AT1G18486.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR4393	AT1G56550.1	RXGT1 RhamnoGalacturonan speciﬁc Xylosyltransferase 1 chr1:21185662-21188369 REVERSE LENGTH=1625
pso-miR4393	AT4G23850.1	LACS4 AMP-dependent synthetase and ligase family protein chr4:12403454-12408335 REVERSE LENGTH=2339
pso-miR6466	AT3G24360.2	ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein chr3:8839728-8842831 REVERSE LENGTH=1381
pso-miR6466	AT1G61980.1	Mitochondrial transcription termination factor family protein chr1:22908045-22909588 FORWARD LENGTH=1544
pso-miR6466	AT5G38520.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein chr5:15421573-15423431 FORWARD LENGTH=1318
pso-miR6466	AT5G38520.2	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein chr5:15421573-15423431 FORWARD LENGTH=1354
pso-miR6466	AT3G27530.1	GC6, MAG4 golgin candidate 6 chr3:10193569-10200013 REVERSE LENGTH=3148
pso-miR6466	AT2G19572.1	Potential natural antisense gene, locus overlaps with AT2G19570 chr2:8470620-8471735 FORWARD LENGTH=1116
pso-miR6466	AT1G51270.1	structural molecules;transmembrane receptors;structural molecules chr1:19007510-19010411 FORWARD LENGTH=1783
pso-miR6466	AT5G55896.1	transposable element gene chr5:22628017-22633342 REVERSE LENGTH=3650
pso-miR6466	AT1G79400.1	ATCHX2, CHX2 cation/H+ exchanger 2 chr1:29864992-29867840 FORWARD LENGTH=2352
pso-miR6466	AT2G28140.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR6466	AT5G02460.1	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein chr5:539249-541112 REVERSE LENGTH=1554
pso-miR6466	AT1G73810.1	Core-2/l-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein chr1:27752400-27755297

		REVERSE LENGTH=1452
pso-miR835	AT5G34623.1	transposable element gene chr5:12928508-12933349 REVERSE LENGTH=4842
pso-miR835	AT2G39570.1	ACT domain-containing protein chr2:16507896-16510198 FORWARD LENGTH=1760
pso-miR835	AT2G24270.1	ALDH11A3 aldehyde dehydrogenase 11A3 chr2:10327050-10329941 REVERSE LENGTH=2106
pso-miR835	AT5G57270.2	Core-2/l-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein chr5:23200614-23203792 REVERSE LENGTH=1922
pso-miR835	AT5G04170.1	Calcium-binding EF-hand family protein chr5:1145431-1147781 FORWARD LENGTH=1475
pso-miR835	AT2G02190.1	transposable element gene chr2:567873-569698 FORWARD LENGTH=1826
pso-miR835	AT2G44930.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR835	AT3G29792.1	transposable element gene chr3:11697578-11702083 FORWARD LENGTH=4506
pso-miR835	AT1G16370.1	ATOCT6, OCT6 organic cation/carnitine transporter 6 chr1:5596694-5598447 FORWARD LENGTH=1754
pso-miR835	AT5G21430.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein chr5:7222226-7223621 FORWARD LENGTH=946
pso-miR829	AT3G14090.1	ATEXO70D3, EXO70D3 exocyst subunit exo70 family protein D3 chr3:4669253-4671575 REVERSE LENGTH=2238
pso-miR829	AT2G27040.2	AGO4 Argonaute family protein chr2:11536534-11542357 REVERSE LENGTH=3189
pso-miR829	AT5G38035.1	transposable element gene chr5:15176231-15180696 FORWARD LENGTH=4466
pso-miR1862	AT4G01925.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein chr4:833173-834340 REVERSE LENGTH=881
pso-miR528	AT4G38170.1	FRS9 FAR1-related sequence 9 chr4:17904558-17906821 FORWARD LENGTH=2075
pso-miR528	AT1G80370.1	CYCA2;4 Cyclin A2;4 chr1:30213705-30216861 FORWARD LENGTH=1588
pso-miR528	AT5G17710.2	EMB1241 Co-chaperone GrpE family protein chr5:5839343-5841728 REVERSE LENGTH=1287
pso-miR5658	AT3G19820.2	DWF1, DIM, EVE1, DIM1, CBB1 cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO (DIM) chr3:6879617-6882315 REVERSE LENGTH=2020
pso-miR5658	AT3G19820.3	DWF1 cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO (DIM) chr3:6879617-6882121 REVERSE LENGTH=1942
pso-miR5658	AT3G19820.1	DWF1, DIM, EVE1, DIM1, CBB1 cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO (DIM) chr3:6879617-6881652 REVERSE LENGTH=1940
pso-miR5658	AT5G14740.2	CA2, CA18, BETA CA2 carbonic anhydrase 2 chr5:4757972-4762615 FORWARD LENGTH=1519
pso-miR5658	AT2G02540.1	ATHB21, ZFH4, HB21, ZHD3 homeobox protein 21 chr2:683647-685309 FORWARD LENGTH=1205
pso-miR5658	AT1G54740.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR5658	AT2G25110.1	SDF2, ATSDL, AtSDF2 stromal cell-derived factor 2-like protein precursor chr2:10684135-10686085 FORWARD LENGTH=1197
pso-miR5658	AT3G59220.1	PRN, PRN1, ATPIRIN1 pirin chr3:21894134-21895623 FORWARD LENGTH=1057
pso-miR5658	AT2G03630.2	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR5658	AT2G03630.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR5658	AT1G67195.2	PSO-MiR414 PSO-MiR414 (MICRORNA 414) chr1:25137111-25137915 REVERSE LENGTH=624
pso-miR5658	AT1G67195.1	PSO-MiR414 PSO-MiR414 (MICRORNA 414) chr1:25137111-25137937 REVERSE LENGTH=596
pso-miR5658	AT4G11100.2	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR5658	AT4G11100.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR5658	AT2G44790.1	UCC2 uclacyanin 2 chr2:18461906-18463309 REVERSE LENGTH=962
pso-miR5658	AT3G61360.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein chr3:22704304-22706138 REVERSE LENGTH=1835
pso-miR5658	AT1G12760.1	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger) family protein chr1:4348498-4350867 FORWARD LENGTH=1812
pso-miR5658	AT5G03060.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR1028	AT1G62500.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein chr1:23132045-23133502 FORWARD LENGTH=1458
pso-miR1028	AT5G67630.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein chr5:26967381-26969394 REVERSE LENGTH=1652
pso-miR1028	AT3G26380.1	Melibiase family protein chr3:9660065-9663298 FORWARD LENGTH=2172
pso-miR1028	AT2G48160.1	Tudor/PWWP/MBT domain-containing protein chr2:19689409-19696821 REVERSE LENGTH=4713
pso-miR2931	AT1G60070.1	Adaptor protein complex AP-1, gamma subunit chr1:22142605-22149526 REVERSE LENGTH=3158
pso-miR2931	AT1G12530.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR2931	AT2G29350.3	SAG13 senescence-associated gene 13 chr2:12601033-12602556 FORWARD LENGTH=1146

pso-miR2931	AT3G06810.1	IBR3 acyl-CoA dehydrogenase-related chr3:2146335-2150831 FORWARD LENGTH=2851
pso-miR2931	AT5G16600.1	MYB43, AtMYB43 myb domain protein 43 chr5:5438291-5440245 FORWARD LENGTH=1015
pso-miR2931	AT4G22820.2	A20/AN1-like zinc finger family protein chr4:11987709-11988949 REVERSE LENGTH=1241
pso-miR1514	AT1G61070.1	LCR66, PDF2.4 low-molecular-weight cysteine-rich 66 chr1:22491733-22492542 REVERSE LENGTH=590
pso-miR1514	AT4G06528.1	transposable element gene chr4:3327079-3330294 FORWARD LENGTH=3216
pso-miR1514	AT1G08000.1	GATA10 GATA transcription factor 10 chr1:2483240-2485109 REVERSE LENGTH=1373
pso-miR1514	AT1G08010.1	GATA11 GATA transcription factor 11 chr1:2485906-2488027 REVERSE LENGTH=1391
pso-miR1514	AT2G41580.1	transposable element gene chr2:17339804-17343088 FORWARD LENGTH=3285
pso-miR1514	AT3G62360.1	Carbohydrate-binding-like fold chr3:23072786-23080563 REVERSE LENGTH=4026
pso-miR399	AT2G33770.1	UBC24, ATUBC24, PHO2 phosphate 2 chr2:14277558-14283040 REVERSE LENGTH=4103
pso-miR399	AT1G67230.1	LINC1 little nuclei1 chr1:25151270-25156323 REVERSE LENGTH=3981
pso-miR399	AT5G15660.1	F-box and associated interaction domains-containing protein chr5:5095652-5097041 FORWARD LENGTH=1317
pso-miR1881	AT1G09790.1	COBL6 COBRA-like protein 6 precursor chr1:3168482-3170819 REVERSE LENGTH=1451
pso-miR158	AT1G62860.1	pseudogene of pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein chr1:23274676-23277017 REVERSE LENGTH=2342
pso-miR158	AT3G03580.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein chr3:860512-863352 REVERSE LENGTH=2841
pso-miR158	AT1G49910.1	BUB3.2 Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein chr1:18479025-18481475 FORWARD LENGTH=1224
pso-miR158	AT1G64100.1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein chr1:23791585-23793641 FORWARD LENGTH=2001
pso-miR158	AT1G64100.2	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein chr1:23791585-23795563 FORWARD LENGTH=2421
pso-miR158	AT4G17565.1	F-box family protein with a domain of unknown function (DUF295) chr4:9782508-9783644 REVERSE LENGTH=1137
pso-miR860	AT1G02730.1	ATCSLD5, CSLD5, SOS6 cellulose synthase-like D5 chr1:594573-598657 REVERSE LENGTH=3854
pso-miR860	AT3G50930.1	BCS1 cytochrome BC1 synthesis chr3:18929526-18931839 FORWARD LENGTH=2314
pso-miR860	AT1G59780.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein chr1:21993581-21997691 REVERSE LENGTH=2721
pso-miR860	AT5G43260.1	chaperone protein dnaJ-related chr5:17357377-17358082 REVERSE LENGTH=706
pso-miR860	AT5G46220.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR860	AT1G08320.3	TGA9, bZIP21 bZIP transcription factor family protein chr1:2621904-2627721 REVERSE LENGTH=1925
pso-miR855	AT4G06556.1	transposable element gene chr4:3469500-3475244 FORWARD LENGTH=5745
pso-miR855	AT3G60530.1	GATA4 GATA transcription factor 4 chr3:22373215-22374387 FORWARD LENGTH=1096
pso-miR855	AT5G57735.1	TASIR-ARF tasIR-ARF; other RNA chr5:23394005-23394500 FORWARD LENGTH=496
pso-miR855	AT3G06880.2	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein chr3:2170355-2175686 REVERSE LENGTH=3956
pso-miR855	AT1G79500.5	AtkdsA1 Aldolase-type TIM barrel family protein chr1:29903420-29909437 FORWARD LENGTH=2194
pso-miR855	AT4G37580.1	HLS1, COP3, UNS2 Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein chr4:17658612-17660878 FORWARD LENGTH=1846
pso-miR855	AT2G10120.1	transposable element gene chr2:3834912-3835855 REVERSE LENGTH=944
pso-miR855	AT4G30350.1	Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein chr4:14847740-14851143 FORWARD LENGTH=3236
pso-miR855	AT2G29690.1	ASA2, ATHANSYNAB anthranilate synthase 2 chr2:12693871-12696975 FORWARD LENGTH=2078
pso-miR5181	AT4G01960.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
pso-miR5181	AT1G26990.1	transposable element gene chr1:9368531-9373180 REVERSE LENGTH=4650
pso-miR5181	AT5G39970.1	catalytics chr5:15998025-16000813 FORWARD LENGTH=2265
pso-miR5181	AT1G74990.1	RING/U-box superfamily protein chr1:28159715-28160487 REVERSE LENGTH=608
pso-miR5181	AT1G66230.1	MYB20, AtMYB20 myb domain protein 20 chr1:24677154-24678415 FORWARD LENGTH=1186
pso-miR5181	AT2G16900.3	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARLI 4) family chr2:7323707-7325659 REVERSE LENGTH=1714
pso-miR5181	AT4G07742.1	transposable element gene chr4:4541189-4542994 REVERSE LENGTH=1806
pso-miR5181	AT3G49725.1	GTP-binding protein, HflX chr3:18442275-18445457 REVERSE LENGTH=2096
pso-miR5181	AT4G22120.1	ERD (early-responsive to dehydration stress) family protein chr4:11715824-11719792 REVERSE LENGTH=2819

ps0-miR1850	AT4G33760.1	tRNA synthetase class II (D, K and N) family protein chr4:16189144-16193269 REVERSE LENGTH=2145
ps0-miR1850	AT5G01542.1	Potential natural antisense gene, locus overlaps with AT5G01540 chr5:211257-213471 FORWARD LENGTH=2215
ps0-miR1850	AT3G09930.1	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein chr3:3053260-3055410 FORWARD LENGTH=1368
ps0-miR1850	AT3G42628.1	phosphoenolpyruvate carboxylase-related / PEP carboxylase-related chr3:14720735-14720872 REVERSE LENGTH=138
ps0-miR1850	AT2G42600.2	ATPPC2, PPC2 phosphoenolpyruvate carboxylase 2 chr2:17734369-17738973 REVERSE LENGTH=3160
ps0-miR2615	AT1G47800.1	F-box and associated interaction domains-containing protein chr1:17601513-17602676 FORWARD LENGTH=1164
ps0-miR2615	AT4G38730.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
ps0-miR2615	AT5G57740.1	XBAT32 XB3 ortholog 2 in <i>Arabidopsis thaliana</i> chr5:23394585-23397650 REVERSE LENGTH=2236
ps0-miR2615	AT3G07180.2	GPI transamidase component PIG-S-related chr3:2282237-2285513 REVERSE LENGTH=1621
ps0-miR1508	AT3G19810.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
ps0-miR1040	AT3G11100.1	sequence-specific DNA binding transcription factors chr3:3476187-3477405 REVERSE LENGTH=1138
ps0-miR1040	AT5G45085.1	transposable element gene chr5:18197690-18201523 REVERSE LENGTH=3834
ps0-miR1040	AT4G05150.1	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein chr4:2660338-2662908 FORWARD LENGTH=1668
ps0-miR2091	AT5G28935.1	transposable element gene chr5:10974472-10979625 REVERSE LENGTH=5154
ps0-miR2634	AT4G01780.1	XH/XS domain-containing protein chr4:767310-769246 FORWARD LENGTH=1419
ps0-miR2634	AT3G54430.1	SRS6 SHI-related sequence 6 chr3:20147101-20148127 REVERSE LENGTH=951
ps0-miR2634	AT5G17300.1	RVE1 Homeodomain-like superfamily protein chr5:5690227-5692902 REVERSE LENGTH=1839
ps0-miR2634	AT3G48670.2	IDN2, RDM12 XH/XS domain-containing protein chr3:18030868-18034065 FORWARD LENGTH=2353
ps0-miR2634	AT3G48670.1	IDN2, RDM12 XH/XS domain-containing protein chr3:18030781-18034065 FORWARD LENGTH=2447
ps0-miR2634	AT1G59750.2	ARF1 auxin response factor 1 chr1:21979384-21984410 FORWARD LENGTH=2472
ps0-miR2634	AT1G26330.1	DNA binding chr1:9107519-9113724 FORWARD LENGTH=3880
ps0-miR2634	AT4G17660.1	Protein kinase superfamily protein chr4:9831359-9833006 FORWARD LENGTH=1209
ps0-miR2634	AT1G08820.2	VAP27-2 vamp/synaptobrevin-associated protein 27-2 chr1:2821552-2825275 REVERSE LENGTH=1592
ps0-miR2634	AT1G51960.1	IQD27 IQ-domain 27 chr1:19310355-19311683 FORWARD LENGTH=1056
ps0-miR2634	AT2G20510.1	ATTIM44-1, TIM44-1 translocase inner membrane subunit 44-1 chr2:8836018-8838598 REVERSE LENGTH=1419
ps0-miR2634	AT5G25220.1	KNAT3 KNOTTED1-like homeobox gene 3 chr5:8736074-8738584 FORWARD LENGTH=1899
ps0-miR2634	AT3G06450.2	HCO3- transporter family chr3:1975959-1979588 REVERSE LENGTH=2434
ps0-miR2634	AT5G27000.1	ATK4, KATD kinesin 4 chr5:9498052-9503134 FORWARD LENGTH=3194
ps0-miR2634	AT2G22125.1	CSI1 binding chr2:9406263-9414518 FORWARD LENGTH=6941
ps0-miR2634	AT1G29220.1	transcriptional regulator family protein chr1:10210520-10212722 REVERSE LENGTH=1365
ps0-miR161	AT1G62670.1	RPF2 rna processing factor 2 chr1:23204773-23206665 REVERSE LENGTH=1893
ps0-miR161	AT5G16640.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein chr5:5460976-5463017 FORWARD LENGTH=2042
ps0-miR161	AT1G64583.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein chr1:23987051-23988740 REVERSE LENGTH=1690
ps0-miR161	AT1G62860.1	pseudogene of pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein chr1:23274676-23277017 REVERSE LENGTH=2342
ps0-miR161	AT1G62720.1	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein chr1:23227532-23229150 FORWARD LENGTH=1619
ps0-miR161	AT1G63150.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein chr1:23419396-23421579 FORWARD LENGTH=2049
ps0-miR161	AT5G21222.1	protein kinase family protein chr5:7208643-7213894 FORWARD LENGTH=3010
ps0-miR161	AT4G17915.1	pseudogene of pentatricopeptide (PPR) repeat-containing/C3HC4-type RING finger containing protein chr4:9959013-9960404 REVERSE LENGTH=1392
ps0-miR2097	AT5G13450.1	ATP5 delta subunit of Mt ATP synthase chr5:4310314-4312048 REVERSE LENGTH=1068
ps0-miR2097	AT1G05190.1	emb2394 Ribosomal protein L6 family chr1:1502344-1503830 REVERSE LENGTH=935
ps0-miR1314	AT3G52940.1	: FK, HYD2, ELL1 Ergosterol biosynthesis ERG4/ERG24 family chr3:19630198-19633296 REVERSE LENGTH=1465
ps0-miR473	AT4G37700.1	Fonksiyonu bilinmiyen protein
ps0-miR473	AT5G17710.1	EMB1241 Co-chaperone GrpE family protein chr5:5839343-5841690 REVERSE LENGTH=1243

pso-miR473	AT5G39020.1	Malectin/receptor-like protein kinase family protein chr5:15616917-15619358 FORWARD LENGTH=2442
pso-miR473	AT1G76440.3	HSP20-like chaperones superfamily protein chr1:28682129-28683750 REVERSE LENGTH=762
pso-miR473	AT3G11240.1	ATE2, ATATE2 arginine-tRNA protein transferase 2 chr3:3518484-3521115 REVERSE LENGTH=2022
pso-miR473	AT5G53460.2	GLT1 NADH-dependent glutamate synthase 1 chr5:21700202-21709736 FORWARD LENGTH=6971
pso-miR473	AT5G53460.3	GLT1 NADH-dependent glutamate synthase 1 chr5:21700202-21709736 FORWARD LENGTH=6982
pso-miR473	AT5G02040.2	PRA1.A1 prenylated RAB acceptor 1.A1 chr5:400899-402876 FORWARD LENGTH=1211
pso-miR473	AT4G36910.1	LEJ2, CDCP2 Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein chr4:17390626-17393339 REVERSE LENGTH=1222
pso-miR473	AT5G02040.1	PRA1.A1 prenylated RAB acceptor 1.A1 chr5:400899-402951 FORWARD LENGTH=1296
pso-miR473	AT2G41660.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR1867	AT5G66780.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR1867	AT4G03780.1	transposable element gene chr4:1683483-1685576 REVERSE LENGTH=2094
pso-miR1867	AT5G53400.1	BOB1 HSP20-like chaperones superfamily protein chr5:21661445-21663572 FORWARD LENGTH=1247
pso-miR1867	AT1G37867.1	transposable element gene chr1:14266731-14272193 REVERSE LENGTH=5463
pso-miR1867	AT3G23200.1	Uncharacterised protein family (UPF0497) chr3:8281363-8282778 FORWARD LENGTH=930
pso-miR1867	AT3G59990.3	MAP2B methionine aminopeptidase 2B chr3:22155719-22158725 REVERSE LENGTH=1594
pso-miR1867	AT3G42621.1	transposable element gene chr3:14701782-14703452 FORWARD LENGTH=1671
pso-miR1867	AT3G59990.2	MAP2B methionine aminopeptidase 2B chr3:22155719-22158715 REVERSE LENGTH=1686
pso-miR1867	AT4G23850.1	LACS4 AMP-dependent synthetase and ligase family protein chr4:12403454-12408335 REVERSE LENGTH=2339
pso-miR1867	AT4G07620.1	transposable element gene chr4:4418650-4421820 FORWARD LENGTH=3171
pso-miR1867	AT5G52415.1	pseudogene, hypothetical protein chr5:21279904-21281298 FORWARD LENGTH=1395
pso-miR1867	AT3G20110.1	CYP705A20 cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 20 chr3:7021332-7023279 FORWARD LENGTH=1862
pso-miR1867	AT5G64160.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR1217	AT3G30587.1	transposable element gene chr3:12177593-12180256 REVERSE LENGTH=2664
pso-miR1217	AT4G28570.1	Long-chain fatty alcohol dehydrogenase family protein chr4:14119425-14122616 FORWARD LENGTH=2747
pso-miR912	AT4G35500.2	Protein kinase superfamily protein chr4:16857353-16859603 FORWARD LENGTH=1638
pso-miR415	AT2G03060.1	AGL30 AGAMOUS-like 30 chr2:901143-904149 FORWARD LENGTH=1699
pso-miR415	AT1G75520.1	SRS5 SHI-related sequence 5 chr1:28351562-28353495 REVERSE LENGTH=1574
pso-miR415	AT3G59890.2	Dihydrodipicolinate reductase, bacterial/plant chr3:22124198-22126484 REVERSE LENGTH=1446
pso-miR415	AT1G10590.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein chr1:3502004-3503457 REVERSE LENGTH=837
pso-miR415	AT5G28415.1	transposable element gene chr5:10359592-10364018 REVERSE LENGTH=4427
pso-miR415	AT3G17420.1	GPK1 glyoxysomal protein kinase 1 chr3:5959212-5962179 REVERSE LENGTH=1915
pso-miR415	AT4G31900.2	PKR2 chromatin remodeling factor, putative chr4:15431350-15438678 FORWARD LENGTH=3770
pso-miR415	AT2G34170.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR1070	AT5G13000.2	ATGSL12, gsl12 glucan synthase-like 12 chr5:4110295-4121427 REVERSE LENGTH=6037
pso-miR2936	AT4G23660.1	AtPPT1, PPT1 polyprenyltransferase 1 chr4:12327694-12331653 REVERSE LENGTH=1910
pso-miR2936	AT5G50230.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein chr5:20448370-20450881 REVERSE LENGTH=1818
pso-miR2936	AT5G61960.1	AML1, ML1 MEI2-like protein 1 chr5:24878521-24884720 REVERSE LENGTH=3886
pso-miR2936	AT2G44930.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR6434	AT1G49950.1	TRB1, ATTRB1 telomere repeat binding factor 1 chr1:18494115-18497172 REVERSE LENGTH=1353
pso-miR6434	AT1G08840.1	emb2411 DNA replication helicase, putative chr1:2829579-2838369 REVERSE LENGTH=3891
pso-miR6434	AT3G23920.1	BAM1, BMY7, TR-BAMY beta-amylase 1 chr3:8641569-8644449 FORWARD LENGTH=2131
pso-miR6434	AT4G13830.1	J20 DNAJ-like 20 chr4:8011424-8012163 FORWARD LENGTH=740
pso-miR6434	AT5G14310.1	AtCXE16, CXE16 carboxyesterase 16 chr5:4615318-4617615 FORWARD LENGTH=1808
pso-miR426	AT1G77130.1	PGSIP2, GUX3 plant glycogenin-like starch initiation protein 2 chr1:28978894-28981345 REVERSE

		LENGTH=2146
pso-miR426	AT3G29320.1	Glycosyl transferase, family 35 chr3:11252807-11257814 FORWARD LENGTH=3180
pso-miR426	AT1G36970.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR426	AT1G29220.1	transcriptional regulator family protein chr1:10210520-10212722 REVERSE LENGTH=1365
pso-miR1154	AT2G28250.2	NCRK Protein kinase superfamily protein chr2:12043482-12046537 FORWARD LENGTH=2007
pso-miR474	AT2G39620.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein chr2:16518968-16521478 REVERSE LENGTH=2511
pso-miR474	AT4G38010.1	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein chr4:17859582-17861261 REVERSE LENGTH=1680
pso-miR474	AT4G21680.1	NRT1.8 NITRATE TRANSPORTER 1.8 chr4:11517353-11519765 REVERSE LENGTH=2146
pso-miR474	AT5G35460.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR474	AT5G22770.2	alpha-ADR alpha-adaptin chr5:7579263-7588249 REVERSE LENGTH=3433
pso-miR1030	AT2G03430.1	Ankyrin repeat family protein chr2:1036008-1037632 REVERSE LENGTH=1003
pso-miR1030	AT1G76550.1	Phosphofruktokinase family protein chr1:28722702-28727006 REVERSE LENGTH=2129
pso-miR1030	AT1G31630.1	AGL86 AGAMOUS-like 86 chr1:11318528-11319547 REVERSE LENGTH=1020
pso-miR1030	AT4G00330.1	CRCK2 calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 2 chr4:142601-144523 REVERSE LENGTH=1518
pso-miR1030	AT5G55640.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein; Fungi - 3422; Plants - 5037; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 2996 (source: NCBI BLink). chr5:22533159-22534117 REVERSE LENGTH=729
pso-miR1450	AT5G27902.1	transposable element gene chr5:9921056-9923736 REVERSE LENGTH=2681
pso-miR1450	AT3G49830.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein chr3:18482383-18483940 FORWARD LENGTH=1422
pso-miR1450	AT5G20885.1	RING/U-box superfamily protein chr5:7083965-7084734 REVERSE LENGTH=770
pso-miR1450	AT1G23170.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR1450	AT2G32940.1	AGO6 Argonaute family protein chr2:13971997-13977476 REVERSE LENGTH=2997
pso-miR1858	AT3G57200.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR1858	AT5G64860.1	DPE1 disproportionating enzyme chr5:25925173-25928848 REVERSE LENGTH=1991
pso-miR1858	AT1G73810.1	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein chr1:27752400-27755297 REVERSE LENGTH=1452
pso-miR1858	AT3G15390.1	SDE5 silencing defective 5 chr3:5196607-5200337 REVERSE LENGTH=1739
pso-miR1858	AT5G65320.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein chr5:26107169-26108726 REVERSE LENGTH=1176
pso-miR1858	AT5G66090.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
pso-miR1858	AT4G15415.1	ATB' GAMMA Protein phosphatase 2A regulatory B subunit family protein chr4:8817187-8819693 FORWARD LENGTH=2433
pso-miR1858	AT5G28280.1	pseudogene, sterol desaturase domain-containing protein, CER1-like, A.thaliana, ATCER1L19; blastp match of 55% identity and 8.9e-22 P-value to GP 4769012 gb AAD29719.1 AF143746_1 AF143746 CER1 Oryza sativa chr5:10261017-10263283 FORWARD LENGTH=2267
pso-miR1858	AT1G55860.2	UPL1 ubiquitin-protein ligase 1 chr1:20879466-20893268 REVERSE LENGTH=11745
pso-miR1858	AT1G76590.1	PLATZ transcription factor family protein chr1:28740691-28742207 FORWARD LENGTH=1235
pso-miR1858	AT1G10880.1	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein chr1:3624035-3627082 REVERSE LENGTH=2017
pso-miR1858	AT4G24330.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
Pso-miR1858	AT3G21540.1	transducin family protein / WD-40 repeat family protein chr3:7585946-7590856 REVERSE LENGTH=3022
Pso-miR1858	AT1G62870.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
Pso-miR1858	AT5G16720.1	Fonksiyonu bilinmeyen protein
Pso-miR1858	AT1G51940.1	protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein chr1:19295904-19299118 REVERSE LENGTH=2321
Pso-miR1872	AT5G13520.1	peptidase M1 family protein chr5:4341948-4344671 REVERSE LENGTH=2120
Pso-miR1872	AT4G10760.1	EMB1706, MTA mRNAadenosine methylase chr4:6619817-6623351 REVERSE LENGTH=2227
Pso-miR1872	AT5G40820.1	ATRAD3, ATR, ATATR Ataxia telangiectasia-mutated and RAD3-related chr5:16342745-16353898 REVERSE LENGTH=9189

EK7: qRT-PCR’da Ölçülen miRNA ve Genlere Ait Ct Değerleri ve Standart Sapma Değerleri

miRNA Adı		miRNA	STDEV
		Ct Değerleri	
Pso-miR2	Kapsül	31,56	0
		31,17	
		31,83	
	Gövde	19,32	0
		19,71	
		19,23	
	Yaprak	18,6	0,31
		18,78	
		18,82	
	Kök	21,73	0,063
		21,49	
		21,6	
Pso-miR3	Kapsül	27,62	0,004
		27,22	
		28,06	
	Gövde	29,61	0,01
		29,41	
		28,7	
	Yaprak	31,34	0,01
		31,88	
		30,14	
	Kök	30,06	0,004
		30,49	
		29,89	
Pso-miR5	Kapsül	40,13	1
		39,9	
		40,06	
	Gövde	36,77	1,62

		0	
		36,87	
	Yaprak	38,05	1,06
		38,64	
		38,53	
	Kök	37,02	1
		37,36	
		37,01	
Pso-miR7	Kapsül	25,17	0,004
		24,51	
		24,26	
	Gövde	24,32	0,01
		25,27	
		25,71	
	Yaprak	31,24	0,0018
		31,35	
		31	
	Kök	27,27	0,01
		0	
		26,54	
Pso-miR11	Kapsül	28,16	0
		29,14	
		28,01	
	Gövde	30,8	0
		30,06	
		29,85	
	Yaprak	27,81	0,002
		29,47	
		28,55	
	Kök	26	0
		26,84	

		27,96	
Pso-miR159	Kapsül	33,94	0,0014
		33,3	
		33,42	
	Gövde	27,61	0,0018
		27,62	
		27,58	
	Yaprak	31,91	0,01
		31,93	
		31,86	
	Kök	40	0,01
		40	
		40	
Pso-miR395	Kapsül	34,59	0,0014
		34,58	
		35,72	
	Gövde	38,56	0,01
		38,44	
		0	
	Yaprak	35,93	0,0018
		36,54	
		37,28	
	Kök	33,93	0,01
		33,83	
		33,67	
Pso-miR164	Kapsül	31,31	0,0018
		31,56	
		30,6	
	Gövde	29,88	0,0014
		29,66	
		29,82	
	Yaprak	30,35	0,0001
		30,92	
		0	
	Kök	35,56	0,0001
		35,29	
		0	

Pso-miR13	Kapsül	29,96	0,01
		29,79	
		29,88	
	Gövde	29,21	0,01
		29,01	
		29,16	
	Yaprak	29,62	0,002
		29,57	
		0	
	Kök	34,3	0,01
		33,93	
		0	
T0000199	Kapsül	23,09	0,0014
		23,03	
		0	
	Gövde	21,6	0,01
		21,32	
		21,57	
	Yaprak	20,7	0,0018
		20,57	
		20,67	
	Kök	25,29	0,01
		0	
		25,27	
T0013376	Kapsül	37,75	0,0014
		38,04	
		0	
	Gövde	34,96	0,0018
		34,58	
		0	
	Yaprak	40	0

		40	
		0	
	Kök	39,14	0
		41,09	
		0	
T0047847	Kapsül	33,85	0,0014
		33,32	
		0	
	Gövde	38,25	0,01
		38,49	
		0	
	Yaprak	40	0,0018
		40	
		0	
	Kök	39,31	0,01
		38,28	
		0	

Hedef Gen Adı		Hedef gen	
		Ct Değerleri	STD EV
F-box/Kelch-repeat protein	Kapsül	21,85	0,07
		22,04	
		22,58	
	Gövde	26,65	0,002
		27,27	
		27,36	
	Yaprak	34,06	0,01
		34,04	
		34,17	
	Kök	30,69	0,004
		32,93	
		32,27	

retroelement pol polyprotein	Kapsül	0	0,01
		27,79	
		28,94	
	Gövde	30,59	0,01
		31,2	
		30,49	
	Yaprak	28,73	0,01
		28,54	
		29,07	
	Kök	28,86	0,007
		28,18	
		27,97	
RSY3	Kapsül	21,04	0,004
		21,82	
		21,95	
	Gövde	26,06	0,004
		26,06	
		25,29	
	Yaprak	32,65	0,01
		32,03	
		31,92	
	Kök	27,62	0,004
		28,67	
		29,49	
auxin response factor	Kapsül	25,72	0,007
		24,08	
		24,41	
	Gövde	28,46	0
		29,15	
		29,93	
	Yaprak	0	0

		33,47	
		33,53	
	Kök	0	0
		33,2	
		33,03	
Leucine-rich repeat protein kinase	Kapsül	28,16	0,07
		29,14	
		28,01	
	Gövde	30,8	0,07
		30,06	
		29,85	
	Yaprak	27,81	0
		29,47	
		28,55	
	Kök	26	0,012
		26,84	
		27,96	
ATHB-15	Kapsül	27,62	0
		26,96	
		27,5	
	Gövde	34,85	0
		35,28	
		33,7	
	Yaprak	22,13	0,0014
		22,53	
		23,25	
	Kök	27,68	0,0018
		27,54	
		27,68	
7-OMT	Kapsül	29,86	0,07
		30,12	

		30,72	
	Gövde	24,19	0,07
		24,01	
		23,68	
	Yaprak	25,24	0,01
		25,32	
		25,09	
	Kök	27,67	0,012
		28,46	
		28,56	
MYB101	Kapsül	18,29	0,01
		18,54	
		18,82	
	Gövde	25,6	0,001 4
		25,77	
		25,77	
	Yaprak	33,56	0,001 4
		33,42	
		33,71	
	Kök	0	0,01
		32,51	
		31,87	
APS4	Kapsül	26,12	0,2
		25,47	
		26,32	
	Gövde	34,78	0,018
		34,68	
		34,62	
	Yaprak	22,58	0,001 4
		23,01	
		23,16	

	Kök	25,74	0,04
		27,16	
		26,78	
NAC1	Kapsül	27,41	0,004
		27,51	
		27,68	
	Gövde	35,77	0,001 4
		34,15	
		35,66	
	Yaprak	22,98	0,001 8
		23,07	
		23,2	
	Kök	27,97	0,01
		28,12	
		27,76	
LOX	Kapsül	31,38	0,004
		31,19	
		0	
	Gövde	33,1	0,001 4
		31,51	
		0	
	Yaprak	30,47	0,001 8
		0	
		0	
	Kök	29,43	0,000 01
		32,18	
		0	
SAT	Kapsül	17.72	0,001 8
		17.37	
		17.77	

	Gövde	18.13	0,01
		18.71	
		19.04	
	Yaprak	27.94	0,001 8
		24.82	
		26.99	
	Kök	18.14	0,01
		20.55	
		20.11	
COR	Kapsül	26.62	0,001 4
		27.24	
		26.43	
	Gövde	27.16	0,001
		27.87	
		28.93	
	Yaprak	30.81	0,001
		30.87	
		30.07	
	Kök	24.69	0,001 8
		22.92	
		25.71	
TYDC	Kapsül	23.77	0,001 4
		22.96	
		22.02	
	Gövde	22.96	0,01

		23.34	
		24.06	
	Yaprak	31.43	0,0018
		28.26	
		29.88	
	Kök	22.95	0,01
		26.94	
		26.10	
18S rRNA	Kapsül	23,77	0,0014
		22,96	
		22,02	
	Gövde	22,35	0,01
		22,14	
		22,18	
	Yaprak	23,2	0,0018
		22,45	
		22,79	
	Kök	21,89	0,01
		22,97	
		22,22	

EK8: 5' Modifiye RLM-RACE Primerleri

pso-miR2	
mir2-1 gsF	CGTGGCTGTTTCGTTGTCGGG
mir2-1 gsNR	TCGCGAGGCATCGAAACCGA
mir2-1 gsR	AGCATTTCACCTGCCGCGT
mir2-2 gsF	CGAGAACATTGCCACAGTGCCTCT
mir2-2 gsNR	GCCTTGTGAAAGCCGGGTGCA
mir2-2 gsR	ACAGGGTGTAGAATCAGCCCAAGA
pso-miR3	
mir3-1 gsF	AGCTTGAGTTTGAGGTTGGGGACA
mir3-1 gsNR	TTCGGACCTCGCAACATGGCC
mir3-1 gsR	CTGTATGCCACTGGTCCCACCC
pso-miR5	
mir5-1 gsF	CAAGGAGAACTCTCAAACAGCGGC
Mir5-1 gsNR	CCGCGAATCAGTGGTTAGCAGT
Mir5-1 gsR	CCTGCAACAGATTTCTTAAGTGGG
Mir5-2 gsF	ATCCGCGCAATTCCGTGCAG
Mir5-2 gsNR	ACCCTTCGACCCTGGAGCAG
Mir5-2 gsR	GCTGGTTGGAGCCACATGGTCA
Mir5-3 gsF	CCTGCTCCAGGGTCGAAGGGT
Mir5-3 gsNR	CCCTTCGACCCTGGAGCAGGA
Mir5-3 gsR	GCTGGTTGGAGCCACATGGTCA
pso-miR7	
Mir7-1 gsF	ACTTTGGCAGTCCGCCATCAGA
Mir7-1 gsNR	GGGGGCCTCGGTTTCCAACC
Mir7-1 gsR	CCAGACTCTGCAGGACCGCT
Mir7-2 gsR	GGGGGCCTCGGTTTCCAACC
Mir 7-3 gsF	ACTCTTCGGATCACCATCTCCGT
Mir7-3 gsNR	TGATGCCTCGGGTTGAAACTCGA

Mir7-3 gsR	CGGTTGACCGAACAAACACGAACTG
Mir7-4 gsF	TGACAATGGGAACAACACCATGCA
Mir7-4 gsNR	TGTTTGCGGTATCCGTTGAGCCTT
Mir7-4 gsR	AAACTCCCTTCCCCGCAACGCC
pso-miR11	
Mir11-1 gsF	GGCGAGTATGCCCTGCACCA
Mir11-1 gsNR	GCAGCTAACCCAGCCGGTCC
Mir11-1 gsR	GTCCGAGCGCTCATAACGGT
Mir11-2gsF	GGTGCATTGGTTTTGGGGGCG
Mir11-2 gsR	TCGTCAGCACATTCTCGGGAAC
Mir11-3 gsF	ACAGCCGCAAGAGAGGCAACA
Mir11-3 gsNR	TGTTGCCTCTCTTGCGGCTGT
Mir11-3 gs R	CTGCGGGAGACCTACCCGCT
pso-miR156	
Mir156-1 gsF	TCGGATCCCCTGGCCCAACC
Mir156-1 gsR	GCCGAAAGTTTGGCATTTAACGGG
Mir156-2gsF	CCTCCAACCCGTAGCTCACCG
Mir156-2 gsR	ATGCAGAGCGGTCGGGCCTT
Mir156-3 gsF	CACTCCCGTGGCCGAACCAC
Mir156-3 gsR	TCCATCGGATGATGCAACCCGA
Mir156-4 gsF	CACTGGCTGTGCGGAGAGCG
Mir156-4 gsNR	TCCAAACCCACCTCACCGA
Mir156-4 gsR	AGCCAGCCACTCCTTGACCT
pso-miR157	
Mir157-1 gsF	TCCCCTGGCCCAACCACATGT
Mir157-1 gsR	GGCATTTAACGGGATCTAGGACGAG
Mir157-2 gsF	TAGCTCACCGGTCTGCGGCT
Mir157-2 gsR	TATGCAGAGCGGTCGGGCCT
Mir157-3 gsF	CACTCCCGTGGCCGAACCAC
Mir157-3 gsR	TCCATCGGATGATGCAACCCGA

Mir157-4 gsF	CACCACCTGCACCTAGCCAGC
Mir157-4 gsNR	TGTCCTTGAATACCCAAGCGGGT
Mir157-4 gsR	CTCACCCATTGCCGTGCCACT
Mir157-5 gsF	CCTCCTCGTCGTCAGTCCCTCATT
mir157-5 gsR	CTGCGGAAGACGGACAGCCTC
Mir157-7 gsF	CCTGGCAAGACCAATTCTGCTGG
MIR157-7 gsNR	ACCAGTGTAATTCCTCTGTTGCTCG
Mir157-7 gsR	GCAGGCTTGCTTGTCTTCTGC
pso-miR167	
mir167-1 gsF	CGCCTCCGCTCCATCGCAAA
mir167-1 gs NR	GGTCGGGTGGACTGCAACGG
mir167-1 gs R	CCGGACCACCGACTACTGCAC
Mir167-2 gs F	TTGGGCAATTCGAAAGGGAAGATT
Mir167-2 gs R	GGAGGTGACGTTGCTGCTGTGT
pso-miR535	
miR535-1gsF	CCATTGTATCTGAGCTCTCCA
miR 535-1gsNR	CCTCAGCAAGCTCAAGAACCC
miR 535-1gsR	TACTTCACAGCAGCAAGTGGC
Mir535-2 gsF	GGTCCTCACTCTGTTACGCGC
Mir535-2 gs NR	ACCCCTCGGGGAAACTCGGC
Mir535-2 gsR	ACCGTTCGACTCTGCCCATTCG

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hatice Böke
Doğum Yeri: Emirdağ
Doğum Tarihi: 24 Mart 1980
Medeni Hali: Evli
Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Özel Çağrı Lisesi
Lisans: Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Biyoteknoloji

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

Ozhuner E, Eldem V, Ipek A, Okay S, Sakcali S, Zhang B, Boke H, Unver T (2013). Boron Stress Responsive Micrnas And Their Targets In Barley Plos One. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0059543
Böke H, Aslım B, Alp G (2010). The Role Of Resistance To Bile Salts And Acid Tolerance Of Exopolysaccharides (Epps) Produced By Yogurt Starter Bacteria. Archives Of Biological Sciences, 62(2): 323-328.
Beyatlı Y, Aslım B, Onal D, Bozkurt H (2007) Determination Of Some Characteristic Properties Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Hand-Made Yogurts, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 103 (11): 517-521.
Şengül N, Aslım B, Uçar G, Yücel N, Işık S, Bozkurt H, Sakaoğulları Z, Atalay F (2006) Effects Of Exopolysaccharide-Producing Probiotic Strains On Experimental Colitis In Rats. Diseases Of Colon And Rectum, 49 (2), 250-258

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Bozkurt H, Aslım B (2004) İmmobilizasyonun Probiyotik Kültürlerde Kullanımı. Orlab Online Mikrobiyoloji Dergisi, 2 (7), 1-14.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Odabasi M, Wilke AM, Boke H, Kleinow LA, Kumar E, Trosko JE and Upham BL. (2010) Mechanisms Of Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication by Potential Tumor Promoters, XII International Congress of Toxicology, 19-23 July, Barcelona.

Beyatlı Y, Aslım B, Önal D and Bozkurt H (2007) Determination of some characteristic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional hand-made Turkish yogurts. 2nd International Congress on Food and Nutrition, p.202-203, 24-26 October, Istanbul, Turkey, (Poster Presentation).

Bozkurt H, Aslım B (2004). Role of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* sub.sp. bulgaricus strains on the bile salts and acid tolerance. International Dairy Symposium, May 24-28, Isparta-Turkey.

Cete S, Disli A, Bozkurt H, Yasar A (2003). Synthesis Of Some Organic Compounds.Antimicrobial Effect On Bacterial Anaerobic Yeast Cells And Comparison Of These compounds with some antibiotics. 10th Biomedical Science and Technology Symposium ,October 10-12, METU Campus of Northern Cyprus, Cyprus

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Böke H, Erkıılıç EG, Ünver T (2012) Haşhaş (Papaver somniferum L.) Bitkisinde İfade Olunan miRNA'ların Alkaloid Sentez Mekanizmasıyla İlişkilendirilmesi. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi Antalya

Ünver T, Erkıılıç EG, Özhüner E, Yanık H, Böke H, Hajyzadeh M, İnal B, Eldem V, Parmaksız İ, İpek A, Özcan S (2012) İşlevsel Genomiğin Yeni Oyuncusu; Bitki MikroRNA'ları. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi Antalya

Yanık H, İnal B, Böke H, Dünder E, Akgün Ş, Ünver T (2012) Zeytinde Periyodisite ile ilişkili miRNA ların Yüksek Verimli Dizileme Metodu İle Ortaya Konulması. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi Antalya

Sovadinova I, Wilke A, Boke H, Babica P, Kleinow LA, Kumar E, Park JS, Upham BL (2007). Mechanisms of inhibition of junction intercellular communication by different molecular pathways. Presented at the biannual conference of the Michigan Society of Toxicology, March 18, Brookslodge, MI.

Boke H, Aslım B, Önal D (2007) Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Streptococcus thermophilus Suşlarının İmmobilize ve Serbest Hücrelerinin L-Laktat Üretimleri Ve L-Ldh Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Dedeman Resort Otel, Syf. 49, 28-31 Ekim, Antalya, (Poster Sunum).

Wilke AM, Boke H, Kleinow LA, Kumar E, Trosko JE and Upham BL (2006). Mechanisms of inhibition of gap junctional intercellular communication by potential tumor promoters. Presented at the biannual conference of the Michigan Society of Toxicology, November 3, East Lansing, MI.