

T.C.

**İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KURAKLIK STRESİNE miRNA CEVAPLARININ
DOMATESTE ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK
LİSANS TEZİ**

**Aybüke
EKŞİOĞLU
(1309241002)**

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özge ÇELİK

**TEMMUZ
2016**

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

**KURAKLIK STRESİNE miRNA CEVAPLARININ
DOMATESTE ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK
LİSANS TEZİ**

**Aybüke
EKŞİOĞLU
(1309241002)**

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özge ÇELİK
Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Çimen ATAK
Doç. Dr. Özge ÇELİK
Doç. Dr. Ali KARAGÖZ**

**TEMMUZ
2016**

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapmış olduğum bu yüksek lisans tezinin seçilmesi ve hazırlanmasında bilgi ve tecrübesi ile bana yardımcı olan her zaman sevgiyle hatırlayacağım tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Özge ÇELİK'e

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, ihtiyacım olduğunda desteğini esirgemeyen, her zaman bana yardımcı olan, kendime örnek edindiğim kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Çimen ATAK'a

Laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirdiğim süreç içerisinde bilgi ve deneyimleriyle, tezim sırasında kullandığım yöntemlerin uygulanmasında bana yardımcı olan, beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım Bilgin CANDAR ÇAKIR'a

Laboratuvar uygulamalarımın gerçekleştirilmesinde benden desteğini esirgemeyen her fırsatta bana yardımcı olan, deneylerimde büyük katkısı olan Enes Yağız AKTAŞ'a

Tezimin hazırlanması sırasında beni cesaretlendiren, yardımlarını ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşlarım Songül Pınar BARUT ve Derya ERDOĞAN 'a

Tüm hayatım boyunca duydukları sevgi ve güveni bana hissettiren, ne olursa olsun desteklerini benden esirgemeyen ve yanımda olan, sonsuz yardımları ve sabırları için anneme, babama ve kardeşime en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2016

Aybüke EKŞİOĞLU

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TÜRKÇE ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Domates.....	2
2.2. Stres.....	4
2.2.1. Abiyotik Stres Çeşitleri.....	5
2.2.1.1. Yüksek Sıcaklık Stresi	5
2.2.1.2. Düşük Sıcaklık Stresi	6
2.2.1.3. Tuzluluk Stresi	6
2.2.1.4. Besin Stresi	7
2.2.1.5. Ağır Metal Stresi.....	8
2.2.1.6. Oksidatif Stres.....	8
2.2.1.7. Kuraklık Stresi	9
2.2.2. Abiyotik Stres Toleransı	10
2.2.2.1. Transkripsiyon Faktörleri.....	13
2.2.2.2. Osmolitler.....	14
2.2.2.3. Antioksidanlar ve Detoksifikasyon Genleri	15
2.2.2.4. İyon Taşınması	17
2.2.2.5. Stresle İlişkili Proteinler	17
2.2.2.5.1. Isı Şoku Proteinleri.....	18
2.2.2.5.2. Geç Embriyogenez Bağımlı Proteinleri.....	18
2.3. MikroRNA'lar.....	19
2.3.1. miRNA Biyogenezi	19

2.3.2. miRNA Tanımlama Yaklaşımları.....	21
2.3.3. Hayvan ve Bitki miRNA'larının Farklılıkları.....	23
2.3.4. Bitkilerde miRNA Fonksiyonları	24
2.4.miRNA ve Stres İlişkisi.....	24
2.4.1. miRNA ve Oksidatif Stres İlişkisi	25
2.4.2. miRNA ve Besin Stresi İlişkisi	26
2.4.3. miRNA ve Yüksek-Düşük Sıcaklık Stresi İlişkisi	26
2.4.4. miRNA ve Ağır Metal Stresi İlişkisi	26
2.4.5. miRNA ve Tuz Stresi İlişkisi	27
2.4.6. miRNA ve Kuraklık Stresi İlişkisi	27
3. MATERYAL METOD.....	29
3.1. Tohumların Eldesi	29
3.2. miRNA'ların ve mRNA'ların Dizilerinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı	29
3.3. Bitkilerin Bitki Doku Kültürü ile Yetiştirilmesi ve Stres Uygulaması.....	31
3.4. Küçük RNA'ların İzolasyonu.....	31
3.5. RNA İzolasyonunun Nitel ve Nicel Ölçümleri	32
3.6. cDNA Sentezi	33
3.6.1. PoliA Kuyruğu Taşıyan mRNA'lar İçin cDNA Sentezi	33
3.6.2.miRNA'lar İçin cDNA Sentezi	33
3.7. qRT-PCR.....	34
3.8. qRT-PCR Analiz Metodu	35
4. SONUÇLAR.....	36
4.1. Kuraklık Stresi Uygulamasının Sonuçları.....	36
4.2 .miRNA Gen İfadesi Analiz Sonuçları.....	37
4.3. miRNA Gen İfadesi Analiz Grafikleri	39
4.3.1. İçsel Kontrol Uzama Faktörü 1 Alfa Analiz Sonucu.....	39
4.3.2. miR157b Analiz Sonucu	40

4.3.3. miR170a Analiz Sonucu	41
4.3.4. miR170b Analiz Sonucu	42
4.3.5. miR170c Analiz Sonucu	43
4.3.6. miR398 Analiz Sonucu	44
4.3.7. miR473 Analiz Sonucu	45
4.3.8. miR479 Analiz Sonucu	46
4.3.9. miR828 Analiz Sonucu	47
4.3.10. miR830 Analiz Sonucu	48
4.3.11 miR1446 Analiz Sonucu	49
4.3.12. miR2111 Analiz Sonucu	50
4.3.13 miR2118a Analiz Sonucu	51
4.3.14. miR2118b Analiz Sonucu	52
4.4. Hedef Genlerin Gen İfadesi Analiz Sonuçları	53
4.5. Hedef Genlerin Gen İfadesi Analiz Grafikleri	54
4.5.1. İçsel Kontrol Uzama Faktörü 1 Alfa Analiz Sonucu.....	54
4.5.2. Squamosa Promotör Bağlanma Benzeri Protein Analiz Sonucu.....	55
4.5.3. Scarecrow Benzeri Protein Analiz Sonucu.....	56
4.5.4. Cu/Zn Süperoksit Dismutaz Analiz Sonucu.....	57
4.5.5. MYB Transkripsiyon Faktörü Analiz Sonucu.....	58
4.5.6. F-box Protein Analiz Sonucu.....	59
4.5.7. Pektat Liyaz Analiz Sonucu.....	60
4.6. miRNA'lara Ait Rölatif Gen İfade Seviyesi	61
4.6.1. miR157b Rölatif Gen İfade Seviyesi	61
4.6.2. miR170a Rölatif Gen İfade Seviyesi	61
4.6.3. miR170b Rölatif Gen İfade Seviyesi	62
4.6.4. miR170c Rölatif Gen İfade Seviyesi	63
4.6.5. miR398 Rölatif Gen İfade Seviyesi	63
4.6.6. miR473 Rölatif Gen İfade Seviyesi	64

4.6.7. miR479 Rölaf Gen İfade Seviyesi	65
4.6.8. miR828 Rölaf Gen İfade Seviyesi	65
4.6.9. miR830 Rölaf Gen İfade Seviyesi	66
4.6.10 miR1446 Rölaf Gen İfade Seviyesi	67
4.6.11. miR2111 Rölaf Gen İfade Seviyesi	67
4.6.12 miR2118a Rölaf Gen İfade Seviyesi	68
4.6.13 miR2118b Rölaf Gen İfade Seviyesi	68
4.7. Hedef Genlere Ait Rölaf Gen İfade Seviyesi	69
4.7.1. Squamosa Promötör Bağlanma Benzeri Protein Rölaf Gen İfade Seviyesi	69
4.7.2. Scarecrow Benzeri Protein Rölaf Gen İfade Seviyesi.....	70
4.7.3. Cu/Zn Süperoksit Dismutaz Rölaf Gen İfade Seviyesi.....	71
4.7.4. MYB Transkripsiyon Faktörü Rölaf Gen İfade Seviyesi.....	71
4.7.5. F-box Protein Rölaf Gen İfade Seviyesi.....	72
4.7.6. Pektat Liyaz Rölaf Gen İfade Seviyesi.....	73
5. TARTIŞMA	74
6. KAYNAKÇA	79

KISALTMALAR

3' UTR: 3' Çevrilmemiş Bölge

ABA: Absisik Asit

ABRE: Absisik Asit -duyarlı Element

AGO1: Argonaute-1

APX: Askorbat Peroksidaz

BADH: Betain Aldehit Dehidrogenaz

CBF: C-tekrarlı Bağlanma Faktörleri

cDNA: Komplementer Deoksiribonükleik Asit

CGN: Center for Genetic Resources Netherlands

CMO: Kolin Monooksijenaz

CO₂: Karbondioksit

CSD: Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz

DCL1: Dicer Benzeri 1 Enzimi

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DREB: Dehidrasyona Duyarlı Transkripsiyon Faktörleri

eEF1a1: Elongation faktör 1 alpha

ESTs: Eksprese Olmuş Sekans Etiketleri

GSA: Glutamik- γ -Semialdehit

H-PPaz: Hidrojen Pompalayan Pirofosfotaz Pompası

Hsps: Isı Şoku Proteinleri

LEA: Geç Embriyogenez Bağımlı Proteinleri

miRNA: Mikro Ribonükleik Asit

mRNA: Mesajcı Ribonükleik Asit

NFYA5: Nüklear Faktör YA5

P5C: Δ^1 -pirolin-5-karboksilat

P5CR: Δ^1 -pirolin-5-karboksilat Redüktaz

P5CS: Δ^1 -pirolin-5-karboksilat Sentaz

PCR: Polimeaz Zincir Reaksiyonu
PEG 6000: Polietilenglikol 6000
PM H-ATPaz: Plazma Membran Hidrojez Adenozin Trifosfaz Pompaı
PM V-ATPaz: Plazma Membran Vakuolar Tipli Adenozin Trifosfaz Pompaı
pre-miRNA: Öncü Mikro Ribonükleik Asit
pri-miRNA: Primer Mikro Ribonükleik Asit
PTGS: Post-transkripsiyonel Gen Susturulması
qRT-PCR: Kantitatif Reverse Transkriptaz Polimeaz Zincir Reaksiyonu
RGL1/RGL2: Giberellin Cevabı Modülatörü Benzeri Protein
RISC: Ribonükleik Asit ile Uyarılmış Susturma Kompleksi
RNA: Ribonükleik Asit
RNAi: Ribonükleik Asit İnterferansı
ROT: Reaktif Oksijen Türleri
SCLp: Scarecrow-benzeri proteinler
SOD: Süperoksit Dismutaz
SPL: Squamosa Promotör Bağlanma Protein Benzeri
SWI/SNF: Switç/Sükroz Fermente Olmayan Protein Kompleksi
TAE: Tris Edta Asetat
TF: Transkripsiyon Faktörleri
TIR1: Transport İnhibitör Cevabı 1
UBC24: E2 Ubiquitin Konjugasyon Enzimi
UV: Ultraviyole, Mor ötesi

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1.	Dört farklı miRNA tanımlama yaklaşımının karşılaştırılması.....	22
Tablo 3.1.	Olgun miRNA dizileri, stem-loop primerler ve qRT-PCR'da kullanılacak olan forward primerler.....	30
Tablo 3.2.	miRNA'ların hedef genleri ve hedef genlere ait forward ve reverse primerler	31
Tablo 3.3.	PoliA taşıyan mRNA'ların cDNA sentezi için gereken reaksiyon bileşenleri	33
Tablo 3.4.	PoliA taşıyan mRNA'ların cDNA sentezi için gereken sentez koşulu	33
Tablo 3.5.	miRNA'ların cDNA sentezi için gereken reaksiyon bileşenleri	34
Tablo 3.6.	miRNA'ların cDNA sentezi için gereken sentez koşulu.....	34
Tablo 3.7.	qRT-PCR için gereken reaksiyon bileşenleri	35
Tablo 3.8.	qRT-PCR koşulu.....	35
Tablo 4.1.	miRNA ve uzama faktörü 1 alfa cTdeğerleri.....	38
Tablo 4.2.	Hedef genler ve Uzama faktörü 1 alfa cT değerleri	53

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	1990 ve 2010 yılları arasında farklı kıtalardaki domates üretiminin ağırlıklarının karşılaştırılması.....	3
Şekil 2.2.	Stres çeşitleri.....	5
Şekil 2.3.	ROS oluşumu ve önlenmesi	8
Şekil 2.4.	Bitkililerin abiyotik strese cevap mekanizmaları	12
Şekil 2.5.	Stresle ilişkili genler ve metabolitler.....	13
Şekil 2.6.	Abiyotik stres-ROS ilişkisi.....	16
Şekil 2.7.	Bitkilerde miRNA biyogenezi ve fonksiyonu.....	20
Şekil 2.8.	miR398'in oksidatif stres toleransındaki rolü.....	25
Şekil 4.1.	<i>In vitro</i> kuraklık stresine ait sonuçlar.....	36
Şekil 4.2.	Uzama faktörü 1 alfa erime piki.....	39
Şekil 4.3.	Uzama faktörü 1 alfa amplifikasyon eğrisi.....	39
Şekil 4.4.	miR157b erime piki.....	40
Şekil 4.5.	miR157b amplifikasyon eğrisi.....	40
Şekil 4.6.	miR170a erime piki.....	41
Şekil 4.7.	miR170a amplifikasyon eğrisi.....	41
Şekil 4.8.	miR170b erime piki.....	42
Şekil 4.9.	miR170b amplifikasyon eğrisi.....	42
Şekil 4.10.	miR170c erime piki.....	43
Şekil 4.11.	miR170c amplifikasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.12.	miR398 erime piki.....	44
Şekil 4.13.	miR398 amplifikasyon eğrisi.....	44
Şekil 4.14.	miR473 erime piki.....	45
Şekil 4.15.	miR473 amplifikasyon eğrisi.....	45
Şekil 4.16.	miR479 erime piki.....	46
Şekil 4.17.	miR479 amplifikasyon eğrisi.....	46
Şekil 4.18.	miR828 erime piki.....	47
Şekil 4.19.	miR828 amplifikasyon eğrisi.....	47
Şekil 4.20.	miR830 erime piki.....	48
Şekil 4.21.	miR830 amplifikasyon eğrisi.....	48
Şekil 4.22.	miR1446 erime piki.....	49
Şekil 4.23.	miR1446 amplifikasyon eğrisi.....	49
Şekil 4.24.	miR2111 erime piki.....	50
Şekil 4.25.	miR2111 amplifikasyon eğrisi.....	50
Şekil 4.26.	miR2118a erime piki.....	51
Şekil 4.27.	miR2118a amplifikasyon eğrisi.....	51
Şekil 4.28.	miR2118b erime piki.....	52
Şekil 4.29.	miR2118b amplifikasyon eğrisi.....	52
Şekil 4.30.	Uzama faktörü 1 alfa erime piki.....	54
Şekil 4.31.	Uzama faktörü 1 alfa amplifikasyon eğrisi	54

Şekil 4.32.	Squamosa promotör bağlanma benzeri protein erime piki.....	55
Şekil 4.33.	Squamosa promotör bağlanma benzeri protein amplifikasyon eğrisi	55
Şekil 4.34.	Scarecrow benzeri protein erime piki.....	56
Şekil 4.35.	Scarerow benzeri protein amplifikasyon eğrisi.....	56
Şekil 4.36.	Cu/Zn süperoksit dismutaz erime piki.....	57
Şekil 4.37.	Cu/Zn süperoksit dismutaz amplifikasyon eğrisi.....	57
Şekil 4.38.	MYB transkripsiyon faktörleri erime piki.....	58
Şekil 4.39.	MYB transkripsiyon faktörleri amplifikasyon eğrisi.....	58
Şekil 4.40.	F-box protein erime piki.....	59
Şekil 4.41.	F-box protein amplifikasyon eğrisi.....	59
Şekil 4.42.	Pektat liyaz erime piki.....	60
Şekil 4.43.	Pektat liyaz amplifikasyon eğrisi.....	60
Şekil 4.44.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR157b gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	61
Şekil 4.45.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR170a gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	62
Şekil 4.46.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR170b gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	62
Şekil 4.47.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR170c gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	63
Şekil 4.48.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR398 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	64
Şekil 4.49.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR473 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	64
Şekil 4.50.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR479 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	65
Şekil 4.51.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR828 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	66
Şekil 4.52.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR830 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	66
Şekil 4.53.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR1446 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	67
Şekil 4.54.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR2111 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği.....	67

	grafığı.....	
Şekil 4.55.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR2118a gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar	68
Şekil 4.56.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR2118b gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar	69
Şekil 4.57.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde squamosa promotör bağlanma benzeri protein gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar	70
Şekil 4.58.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde scarecrow benzeri protein gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar	70
Şekil 4.59.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde Cu/Zn süperoksit dismutaz gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar	71
Şekil 4.60.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde MYB transkripsiyon faktörü gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar	72
Şekil 4.61.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde f-box protein gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar	72
Şekil 4.62.	Yabani tip <i>Solanum pennellii</i> , mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde pektat liyaz gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar	73

Üniversite : İstanbul Kültür Üniversitesi
Enstitü : Fen Bilimleri Enstitüsü
Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Özge Çelik
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek lisans - Temmuz 2016

KISA ÖZET

KURAKLIK STRESİNDE miRNA CEVAPLARININ DOMATESTE ARAŞTIRILMASI

Aybüke Ekşioğlu

Bu tezin konusu kuraklık stresinde domateste miRNA cevaplarının araştırılmasıdır. Sonuçta miRNA'ların kuraklık stresi toleransında nasıl rol oynadıkları ve hedef genler üzerindeki etkilerinin gösterilebilmesi amaçlanmıştır.

Stres; bitkilerde potansiyel bir hasarın oluşmasını sağlayan çevresel bir değişiktir. Kuraklık; yağış miktarındaki azalmadan ya da düzensizlikten dolayı meydana gelen bir durumdur. Belli bir bölgedeki yağış ve buharlaşma arasındaki dengenin bozulması sonucunda kuraklıktan bahsedilir ve bu kuraklığın bitkilerde hasar oluşturması durumuna kuraklık stresi denir.

miRNA'lar yeni keşfedilmiş protein kodlamayan endojen küçük RNA'lardır. miRNA'lar ilk olarak 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* nematodunda larval gelişimin zamanlanmasının düzenlenmesi araştırmaları sırasında tanımlanmıştır. miRNA'lar küçük moleküller olsa da gen ekspresyonunda çok önemli rollere sahiptirler. miRNA'lar hayvanlarda ve bitkilerde en önemli post transkripsiyonel gen düzenleyicilerinden biridir.

Domates, Solanaceae familyasına ait bir bitkidir. *Solanum* cinsinin türleri tüm sıcaklıklarda ve kıtalarda bulunmalarıyla, morfolojik çeşitlilikleri ve ekonomik önemleriyle dikkat çekmektedirler. Ekonomik olarak önemi her geçen gün artan domates, yıllar içerisinde araştırma programlarında model organizma olarak kullanılmasıyla bilim adamları için de önemli bir bitki haline gelmiştir.

Çalışma sırasında miRNA cevaplarının araştırılabilmesi için iki mutant domates hattı ve yabancı tip kuraklığa toleranslı *Solanum pennellii* kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mutant hatlar X5671R varyetesine ait mutant domates hatlarıdır. 4.5 ve 3.409 kodlu mutant bitkiler kuraklığa toleranslılıkları farklı olduğu için seçilmiştir. Çalışmada kuraklığa karşı cevapta görev aldığı düşünülen on üç miRNA'nın ve hedef genlerinin ifade seviyeleri qRT-PCR ile gösterilmiştir.

Sonuçta seçilen miRNA'larla kuraklığa karşı toleranslı olan mutant 4.5 hattının çalışmada kullanılan miRNA'lar açısından gen ifade seviyelerinin yabancı tip domatese yakın seviyelerde ve benzer profil gösterdiği belirlenmiştir. miR2118a hem yabancı tip *S. pennellii*'de hem de mutant 4.5'de %80 oranında artış göstermiştir. Bununla birlikte mutant 3.409 hattının ise mutant 4.5 kadar toleranslı olmadığı gen ifade seviyelerinde de gözlenmiştir. miR2118a mutant 4.5'de %80 oranında artarken, mutant 3.409'da kontrol grubuna göre %7 oranında bir artış göstermektedir.

Anahtar Sözcükler : Abiyotik stres, kuraklık stresi, domates, miRNA, qRT-PCR



University : Istanbul Kültür University
Institute : Institute of Science
Department : Molecular Biology and Genetics
Programme : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assoc. Prof. Özge Çelik
Degree Awarded and Date : MA - July 2016

ABSTRACT

INVESTIGATION of miRNA RESPONSES of TOMATO UNDER DROUGHT STRESS

Aybüke Ekşioğlu

Main topic of this thesis study is investigating miRNA responses of tomato plants under drought stress. It is aimed to present drought stress tolerance of tomatoes and effects of drought to target genes.

Stress is an environmental change which potentially causes damage on plants. Drought occurs because of the decrease or lack of order in the rainfall regime. Inbalance on the equilibrium between rainfall and evaporation in a specific location causes drought and the fact that drought causing damage on plants is called drought stress.

miRNAs are recently discovered small endogene RNAs that do not code protein. miRNAs are firstly identified during the studies on larval development timing of *Caenorhabditis elegans* nematode in 1993. Even though the miRNAs are small molecules, they play very important roles on gene expression. miRNAs are one of the most important transcriptional gene regulators in animals and plants.

Tomato is a member of Solanaceae family. Species of *Solanum* genus can be found in all continent and different climate conditions, also attract attention by their morphological diversity and economical importance. Tomato became important model organism in years after scientist started research programmes on tomato which increases its economical importance with every passing day.

In this study, three different tomato varieties were used to investigate miRNA responses. *Solanum pennelli* is wild type drought tolerant variety. Other two varieties are mutants of X5671R variety which were obtained from previous studies. Plants that coded as 4.5 and 3.409 were selected for this study because of their drought tolerance. Gene expressions of thirteen miRNAs which were thought to play role on drought response were presented by qRT-PCR technique.

As a result, the salt tolerance capacities of the mutant plants were evaluated due to the miRNA expression profiles in comparison with *S. pennellii*. Mutant 4.5 was found more salt tolerant than mutant 3.409.

Key word : Abiotic stress, drought stress, tomato, miRNA, qRT-PCR



1. GİRİŞ

Domates, Solanaceae familyasına ait bir bitkidir. Ekonomik olarak önemi her geçen gün artan domates, yıllar içerisinde araştırma programlarında model organizma olarak kullanılmasıyla bilim adamları için de önemli bir bitki haline gelmiştir. Doğadaki çeşitli biyotik ve abiyotik çevre etmenleri bitkilerde strese neden olurlar. Stres; bitkilerde potansiyel bir hasarın oluşmasını sağlayan çevresel bir değişiklik olarak tanımlanabilir. Bitkilerde abiyotik strese fiziksel ve kimyasal çevre etmenleri neden olurken, biyotik strese ise doğada yaşayan organizmalar neden olmaktadır. Bitkilerde abiyotik stres, bitkinin büyümesini ve verimliliğini etkileyen çeşitli morfolojik, fizyolojik biyokimyasal ve moleküler değişikliklere sebep olurlar. Kuraklık; yağış miktarındaki azalmadan ya da düzensizlikten dolayı meydana gelen bir durumdur. Belli bir bölgedeki yağış ve buharlaşma arasındaki dengenin bozulması sonucunda kuraklıktan bahsedilir. Kuraklık, bitkiyi farklı seviyelerde, fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda olumsuz yönde etkiler. Bitkiler abiyotik stres koşulları altında yaşamalarını sürdürebilmek için abiyotik stres çeşitlerine karşı tolerans ve adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. MikroRNA'lar (miRNA) yeni keşfedilmiş 20-24 nükleotidlik, tek dizili protein kodlamayan RNA'lardır endojen küçük RNA'lardır. Bu yeni keşfedilmiş küçük RNA'ların bitki büyüme ve gelişmesinde çok önemli rolleri vardır. Aynı zamanda miRNA'lar bitkilerde abiyotik strese cevap mekanizmasında da çok önemlidir. Çalışma sırasında miRNA cevaplarının araştırılabilmesi için iki mutant domates hattı ve yabancı tip kuraklığa toleranslı *Solanum pennellii* kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mutant hatlar X5671R varyetesine ait mutant domates hatlarıdır. 4.5 ve 3.409 kodlu bitkiler kuraklığa toleranslı olmaları sebebiyle seçilmiştir. Çalışmada iki mutant domates hattında ve kuraklığa toleranslı yabancı tip domatesteki çalışılmak üzere kuraklıkla ilişkili olduğu düşünülen on üç miRNA seçilmiştir. Seçilen bu 13 miRNA'nın ve hedef genlerinin gen ekspresyonları qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Analizlerin nasıl gerçekleştirildiği materyal metod kısmında anlatılırken, sonuçları ve sonuçların tartışılması ise sonuçlar ve tartışma kısımlarında gösterilmiştir.

Yapılan çalışma, ekonomik öneme sahip sanayi tip domates çeşitlerinden geliştirilen kuraklığa toleranslı mutant domates hatlarının daha önce kuraklıkla ilişkisi olduğu gösterilmiş on üç miRNA'nın ve hedeflerinin bu mutant hatlarda da gösterilmesi ve mutant hatların kuraklığa toleranslı bir yabancı tip domatesle karşılaştırılarak, çalışılan miRNA'lar ve hedef genler açısından toleranslılık mekanizmalarının karşılaştırılması sebebiyle özgündür.

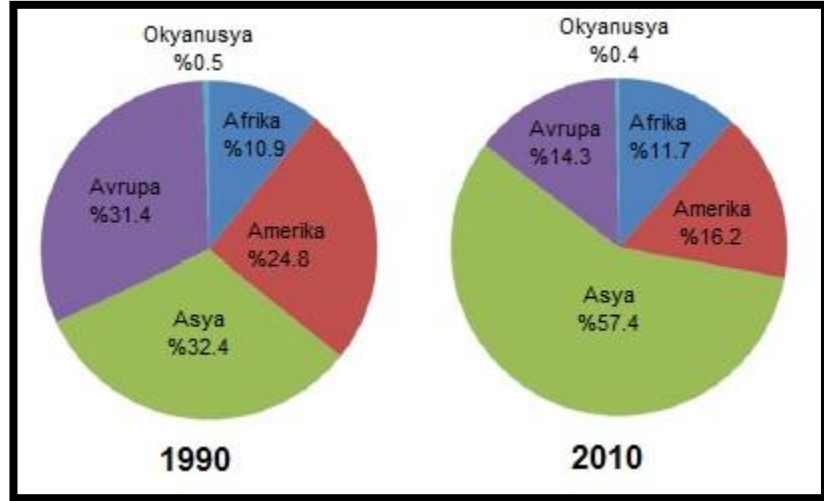
2. GENEL BİLGİLER

2.1. DOMATES

Domates; patates, patlıcan, tütün, petunya ve biber gibi ekonomik olarak önemli bitkilerin de bulunduğu 3000'den fazla türü içerisinde barındıran Solanaceae familyasına ait bir bitkidir. *Solanum*; Solanaceae familyasında 1250-1700 türü bulunan en büyük cinstir. *Solanum* cinsinin türleri tüm sıcaklıklarda ve kıtalarda bulunmalarıyla, morfolojik çeşitlilikleri ve ekonomik önemleriyle dikkat çekmektedirler. *Solanum* cinsi içerisinde barındırdığı mahsul ürünleriyle ve medikal bileşiklerin yapımında kullanılan diğer türleriyle ekonomik değeri en yüksek olan türdür (Wesse v.d., 2007).

Yabani domates türleri, Güney Amerika'nın batısından, Ekvator'a, Peru'ya ve kuzey Şili'ye oradan Galapagos Adaları'na uzanan büyük bir alana özgüdür. Bu yüzden deniz seviyesinden yüksek bölgelere, yağmurlu iklimlerden kurak iklimlere ve çeşitli toprak türlerine kadar birçok farklı habitatta yetişebilmektedir. Toplumların Avrupa'ya göçüyle birlikte domates de Avrupa'ya ulaşmıştır ve zaten farklı habitatlarda yetişmeye uygun olan domates burada da yetişmiş ve çeşitliliğini arttırmıştır (Bergougnoux, 2014).

Likopen, β -karoten ve C vitamini gibi insan sağlığına yararlı besin kaynaklarınca zengin olan domates besleyici ve lezzetli özelliğinden dolayı dünyanın birçok ülkesinde en çok üretilen bitkilerdendir. Turfanda olarak yetiştirilebilmesi nedeniyle her mevsimde tüketilebilmektedir. Günümüzde domates taze olarak tüketilmesinin yanında salça, sos, meyve suyu, toz, konserve, kurutulmuş ve püre haline getirilmiş çeşitleriyle endüstriyel ürünler olarak da tüketilmektedir (Sahlin v.d., 2004, Navarro-Gonzales v.d., 2011). 2011 yılı itibariyle domates dünya çapında 160 milyon tonluk üretime ulaşmıştır ve mısır, pirinç, buğday, patates, soya ve manyoktan sonraki en önemli mahsul türü haline gelmiştir. Son 20 yılda dünyadaki domates üretimi iki katına çıkmıştır. 20 yıl önce Avrupa ve Amerika en önemli üreticiler iken günümüzde Asya, Çin sayesinde domates pazarını elinde tutmaktadır (Şekil 2.1). Çin'den sonraki önemli üreticiler ise azalan sırayla Hindistan, ABD, Türkiye, Mısır, İran, İtalya, Brezilya, İspanya ve Özbekistan şeklindedir (Bergougnoux, 2014).



Şekil 2.1: 1990 ve 2010 yılları arasında farklı kıtalardaki domates üretiminin ağırlıklarının karşılaştırılması (Bergougnoux, 2014)

Ekonomik olarak önemi her geçen gün artan domates, yıllar içerisinde araştırma programlarında model organizma olarak kullanılmasıyla bilim adamları için de önemli bir bitki haline gelmiştir. Model organizma olmasında; domatesin farklı koşullarda yetişebilmesi ve bunun farklı abiyotik stres koşullarında domatesin adaptasyonunun anlaşılması için önemli olması, kısa yaşam döngüsü, fotoperiyod duyarsızlığı, yüksek kendini dölleme yeteneği ve homozigotizesi, tozlaşmasının ve hibridizasyonun kolayca kontrol edilebiliyor olması, nispeten küçük olan genomuyla genetik basitliği ve gen dublikasyonunun olmaması, aşılama ile aseksüel olarak çoğalabilme yeteneği ve bitkinin farklı bir bölgesinden tüm bitkinin rejenere olabilmesi gibi özellikleri önemli rol oynamıştır. Arabidopsis, mısır, çeltik gibi model organizmalar da bilim adamları için önemlidir. Fakat domatesin filogenetik olarak bu bitkilerden daha uzak olması ve diğer model bitkilerde olmayan spesifik morfolojik özelliklere sahip olması domatesi önemli hale getirmiştir. Örneğin spontan olarak veya kimyasallarla ya da ışınla uyarılmasıyla oluşan büyük mutant çeşitliliğinin sunduğu havuz bilim adamları için oldukça önemlidir. Bu sayede gelişimini ve büyümesini regüle eden genlerin izolasyonu ve anlaşılması daha kolay hale gelmiştir (Lozano v.d., 2009, Bergougnoux, 2014).

2.2. STRES

Doğadaki çeşitli biyotik ve abiyotik çevre etmenleri bitkilerde strese neden olurlar. Stres; bitkilerde potansiyel bir hasarın oluşmasını sağlayan çevresel bir değişiklik olarak tanımlanabilir. Bitkilerde abiyotik strese fiziksel ve kimyasal çevre etmenleri neden olurken, biyotik strese ise doğada yaşayan organizmalar neden olmaktadır (Mittler, 2006, Khraiwesh v.d., 2012, Maheswari v.d., 2012). Bitkilerde biyotik ve abiyotik strese neden olan etmenler Şekil 2.2'de gösterilmektedir (Maheswari ve ark., 2012).

Dünya çapında mahsulden elde edilecek verimin düşmesine neden olan en önemli etmen abiyotik strestir. Abiyotik stresin, verimi yaklaşık olarak %50 oranında düşürdüğü belirlenmiştir (Wang v.d., 2003, Grigorova v.d., 2011). Verimin düşmesine neden olan bu stres etmenlerinin gelecek yıllarda küresel mevsim değişiklikleri nedeniyle daha da artacağı düşünülmektedir. (Hirayama ve ark., 2010)

Bitkilerde abiyotik stres, bitkinin büyümesini ve verimliliğini etkileyen çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere sebep olurlar. Örneğin; kuraklık ve/veya tuz stresi bitkide öncelikle osmotik stresin ortaya çıkmasına bunun sonucunda da hücrenin homeostasının ve iyon dengesinin bozulmasına neden olur. Yüksek sıcaklık, tuzluluk veya kuraklık stresiyle birlikte ortaya çıkan oksidatif stres yapısal ve fonksiyonel proteinlerin denatürasyonuna neden olur (Wang v.d., 2003). Bu değişiklikler bitkiyi ölüme kadar götürebilir. Ancak bitkiler stres karşısında benzersiz ve kompleks bir mekanizma geliştirmişlerdir. Fakat bu mekanizmanın bitkiyi koruma derecesi bitkiden bitkiye değişiklik göstermektedir (Redondo-Gomez, 2013).

Yaşayan organizmalar çevresel ortam koşullarında meydana gelen değişiklikleri kontrol edemedikleri için bu değişiklikler karşısında hayatta kalabilmek için iki önemli strateji geliştirmişlerdir. Bu iki strateji; stresten kaçınma ve stres toleransıdır. Bitkilerin hareket etme yetenekleri olmadığı için stresten kaçınma stratejisini kullanamazlar. Bunun yerine hayat döngülerini değiştirmek gibi karışık mekanizmalar geliştirmişlerdir. Ancak bitkiler stresten korunmak için daha çok tolerans mekanizmasını kullanırlar (Maheswari v.d., 2012). Bitkilerin geliştirdiği bu mekanizma genelde benzer hücrenel sinyal yollarını ve cevaplarını ortaya çıkarır. Stres proteinlerinin ortaya çıkması ve antioksidanların gen ifadelerinde artış olması bunlara örnek olarak verilebilir (Wang v.d., 2003).



Şekil 2.2: Stres çeşitleri (Maheswari ve ark.; 2012)

2.2.1. Abiyotik Stres Çeşitleri

2.2.1.1. Yüksek Sıcaklık Stresi

Yüksek sıcaklık stresi bitkilerin çoğunluğunun iyi geliştiği 15-45°C sınırının üstündeki sıcaklıklarda ortaya çıkar. Dünya popülasyonunun 2050 yılına kadar 9.2 milyara ulaşması beklenmektedir. Bu artışla birlikte küresel ısınmanın da gittikçe artacağı düşünülmektedir. 2100 yılına kadar CO₂ miktarının ve diğer sera gazlarının miktarının yükselmesi sonucunda küresel hava sıcaklığının ortalama 1.4-4.5°C artacağı düşünülmektedir (Bahuguna v.d.,2014). Beklenen bu hava sıcaklığı artışı sonucunda bitkilerin yüksek sıcaklık stresine bağlı sorunlarının da gün geçtikçe artacağı ve bu stres çeşidinin çok daha önemli bir sorun haline gelmesi kaçınılmaz olacaktır.

Yüksek sıcaklık stresinde, bitkilerin büyümeleri, metabolizmaları ve ürünlerin kalite ve miktarları ciddi şekilde etkilenir. Yüksek sıcaklık sonucunda moleküllerin

hareketleri hızlanır, büyük organik moleküller arasındaki bağlar gevşer ve biyolojik zarlar daha akışkan hale gelir. Ayrıca yüksek sıcaklık proteinlerin denatüre olmasına, enzim aktivitesinin azalmasına ve bununla birlikte hücre yapısının ve fonksiyonlarının değişmesine neden olmaktadır. Diğer stres çeşitlerinde görüldüğü gibi yüksek sıcaklık stresiyle de fotosentez oldukça etkilenmektedir. Yüksek sıcaklıklara maruz kalınması proteinlerin ve hem tilakoid hem de plazma membranların oldukça etkilenmesine neden olmaktadır. Çünkü yüksek sıcaklıkla birlikte lipitler arasındaki hidrojen bağları ve membran proteinlerinin polar grupları arasındaki elektrostatik etkileşim zayıflar (Sharp v.d., 2004, Yasuda v.d., 2008, Redondo-Gomez, 2013).

Bitkiler yüksek sıcaklığa kompleks bir cevap gösterirler. Bu cevap uzun dönemde kendini gösteren evrimsel fenolojik ve morfolojik adaptasyonları içerirken aynı zamanda kısa dönemde görülen yaprak oryantasyonunun değişimi, transpirasyonun, membran lipid kompozisyonunun değişimi gibi tekrar kaçınma ve aklimatizasyon mekanizmalarını içerir (Redondo-Gomez, 2013).

2.2.1.2. Düşük Sıcaklık Stresi

Soğuk stresi normalde 15-25°C'de yaşayan bitkilerde sıcaklık 0°C ve üstündeyse görülen bir stres iken donma stresi ise sıcaklık 0°C altında iken görülen bir strestir. Düşük sıcaklık sonucunda bitkide bazı değişiklikler görülür. Bunlar; dokulardan elektrolit kaçağı olması sonucunda membran akışkanlığının azalması, kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonların yavaşlaması, su dengesinin ve mevcudiyetinin azalmasıdır (Redondo-Gomez, 2013).

Bitkilerde intraselüler buz kristalleri plazma membranına nüfuz ettiği takdirde direk ölümlerle sonuçlanır. Bitkiler sadece ekstraselüler donmayı tolere ederler ki bu da hücre dehidrasyonu ve hücre hacminin azalmasıyla ilişkilidir (Redondo-Gomez, 2013).

2.2.1.3. Tuzluluk Stresi

Dünyadaki ekim alanlarının %50'sinin ve tarımsal alanların %20'sinin tuz stresinde olduğu düşünülürken, her yıl bir milyon hektardan fazla arazinin de tuzluluğa maruz kaldığı tahmin edilmektedir (Yıldız v.d., 2010). Bu topraklarda büyümekte olan bitkiler ise tuz stresine gösterdikleri toleransa göre ikiye ayrılmaktadır. Tuzluluk oranı %20 olan topraklarda yetişebilenler yani halofit bitkiler ve tuz stresine sınırlı bir tolerans gösterebilen (tuzluluk oranı %0.01 olan topraklarda yaşayanlar) glikofit bitkilerdir (Redondo-Gomez, 2013).

Toprakta biriken tuz hem bitki fonksiyonunu hem de toprak yapısını bozmaktadır. Topraktaki yüksek tuz miktarı direkt olarak bitkilere zarar vermekte ve su geçirgenliğini azaltarak toprağın yapısını da bozmaktadır. Tuzluluk; iyon toksisitesi, bitki büyümesindeki değişimler, mineral bozukluklar, membran kararsızlığı, membran geçirgenliği, azalan fotosentez etkinliği gibi fizyolojik süreçleri etkilemektedir. Bunlarla birlikte tüm bitki seviyesinde gözlenen bodurluk, yaprakların küçülmesi ve hücre ölümleriyle birlikte görülen nekroz sonucunda büyüme uçlarında, yapraklarda ve tomurcuklarda gözlenen sarı lekeler gibi etkileri de mevcuttur (Flowers v.d., 2008, Yıldız v.d., 2010, Zhu, 2002).

Bitkiler tuz stresine 2 farklı yolla tolerans gösterirler. Bitkiye giren tuz miktarının azaltılması ya da fotosentetik dokularda birikiminin azaltılması ve sitoplazmadaki tuz konsantrasyonunun azaltılmasıdır. Bitkiler bu yolları temel alan tuzun atılması, tuzun hariç tutulması ve intraselüler iyon bölünmesi gibi ana tolerans mekanizmalarını geliştirmişlerdir (Redondo-Gomez, 2013).

2.2.1.4. Besin Stresi

Bitkilerin besin ihtiyaçları 16 elementle karşılanmaktadır. Bunlar; karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), kükürt (S), demir (Fe), mangan (Mn), çinko (Zn), bakır (Cu), Bor (B), Molibden (Mo), klordur(Cl). C, O, N, P, K, Ca, Mg, ve S makro besinler, Fe, Zn, Mn, Cu, B, Mo ve Cl ise mikro besinlerdir. Makro ve mikro besin dengeleri bitkiler açısından oldukça önemlidir (Chiou, 2007, McCauley, 2009).

Bitkilerin besin ihtiyaçlarını karşılamak ve gelişmelerini sağlamak için gerekli besin aralıkları vardır. Bu besin aralıkları bitkiden bitkiye değişiklik gösterir. Besin aralıklarının değişmesi sonucunda bitkinin gelişmesinde sorunlar ortaya çıkar ve fazla besin alınması durumunda ise toksisite görülür (Fujii v.d., 2005).

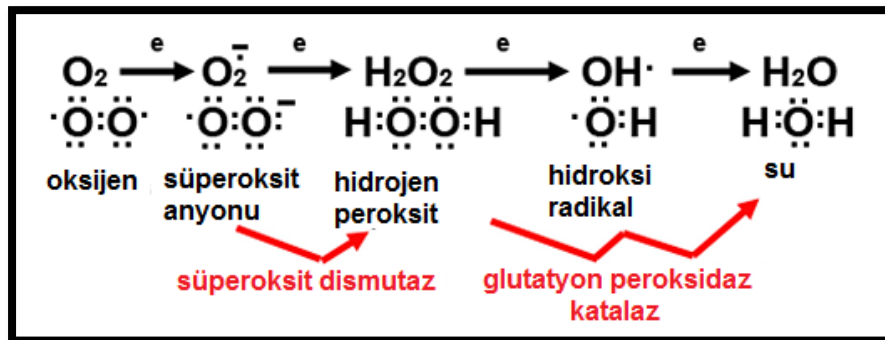
Bitkilerdeki zararlanmalar element eksikliğine göre farklılıklar gösterir. Örneğin; azot eksikliğinde yaprakların büyümesi yavaşlar ve nekroz görülürken, fosfat eksikliğinde yapraklar koyu yeşil renkte gözlenirler ve köklerinde çürüme gözlenir. Potasyum hayati yollarda görev aldığı için etkileri hemen gözle görülme de uzun vadede yapraklarda nekrozlar görülür (McCauley, 2009).

2.2.1.5. Ağır Metal Stresi

Ağır metal stresi gün geçtikçe daha önemli hale gelmektedir çünkü sanayi ve tarımsal aktiviteler sonucunda topraklar, yer altı ve yer üstü suları her geçen gün daha da kirlenmektedir. Ağır metaller içerisinde gösterilen demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), ve kobalt (Co) gibi elementler eser miktarda bitkinin büyüme ortamında bulunması gereken elementlerdir. Çünkü bitkilerin gelişiminde bu elementler hayati öneme sahiptir. Ancak gerekenden fazla olmaları durumunda bitkide zamanla birikerek ciddi zararlara neden olurlar. Bu elementler hayati öneme sahip olan enzimlerin çalışmalarını inhibe ederler, elektron aktarımında devreye girerek solunumu ve fotosentezi olumsuz yönde etkileyerek bitkiye ciddi zarar verirler. Bitkiler ağır metal stresinden kaçınmak için bazı önlemler geliştirmişlerdir. Bunlardan bazıları; metale daha az dirençli bitki dokularından bu ağır metallerin ayrılması, metallerin tuz kristalleri içerisinde boşaltılması gibi mekanizmalardır (Maksymiec, 2007, Redondo-Gomez, 2013).

2.2.1.6. Oksidatif Stres

Hücrelere zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) bitki hücrelerinde oluşması hücrede oksidatif strese sebep olur. Oksidatif stres; kuraklık, tuzluluk, UV ışınları, sıcak, soğuk, ağır metaller, besin eksikliği, yaralanma, hava kirliliği, patojen enfeksiyonu ve herbisitler gibi çevresel koşullarda meydana gelir. Güçlü oksidantlar membran sistemlerinde ve DNA'da önemli hasarlar oluştururlar. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikaller reaktif oksijen türleridir (Şekil 2.3). Oksidatif hasarın önlenmesinde ve dengelenmesinde hem enzimatik olan hem de enzimatik olmayan antioksidatif sistemler önemli rol oynarlar. Enzimatik sistemde süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, fenol oksidaz ve askorbik asit oksidaz enzimleri rol alır. Enzimatik olmayan sistemde ise glutatyon, fenoller, flavonoidler ve poliaminler gibi güçlü redüktanlar rol alırlar (Mittler, 2002, Apel v.d., 2004, Gill v.d., 2010).



Şekil 2.3: ROS oluşumu ve önlenmesi (Apel v.d., 2004).

2.2.1.7. Kuraklık Stresi

Kuraklık, dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında %26'lık oranla en fazla görülen doğal stres faktörü olarak gözlenmiştir (Kalefetoğlu v.d., 2005). Son yıllarda nüfus artışı ve küresel ısınmayla birlikte daha da önemli bir meteorolojik olay haline gelmektedir. Kuraklık; yağış miktarındaki azalmadan ya da düzensizlikten dolayı meydana gelen bir durumdur. Belli bir bölgedeki yağış ve buharlaşma arasındaki dengenin bozulması sonucunda kuraklıktan bahsedilir. Yüksek sıcaklık, yağış yoğunluklarındaki değişiklikler, yağış mevsiminin gecikmesi, şiddetli rüzgar ve düşük nem miktarı kuraklığın oluşmasında rol alan önemli etkenler arasında sayılabilir. Kuraklığın oluşması oldukça yavaş olup etkinliği uzun süre devam eder. Tarımsal kuraklık, toprakta bitkinin ihtiyacının karşılanacağı miktarda su bulunmaması olarak tanımlanır. Bitkilerin gelişiminde yavaşlamaya ve ürün miktarında azalmaya neden olur (Miyashita v.d., 2005; Çırak ve Esendal, 2006).

Kuraklık, bitkiyi farklı seviyelerde, fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda olumsuz yönde etkiler. Öncelikle kuraklık başladığında hücre genişlemesi ve büyümesinde azalmalar görülür. Kuraklıkta ilerleme devam ettiği takdirde bitkideki zararlanmalar da artar. Özellikle fotosentez bundan oldukça fazla etkilenir. Transpirasyon oranı düşer; dokularda ozmotik potansiyel ve solunum aktivasyonu azalır. Hücresel seviyede ise membranlar ve proteinler hidrasyonun azalmasıyla ve ROS artışıyla zarar görecektir (Redondo-Gomez, 2013, Verma v.d., 2013).

Kuraklık stresi altında turgor kaybı nedeniyle hücre büyümesi olumsuz olarak etkilenmekte ve hücreler küçük kalmaktadırlar. Kuraklık stresi ile tohumların çimlenme yeteneklerini de kaybettikleri görülmektedir. Yeterli miktarda suyun olmaması ksilem ve floem aktivitelerini olumsuz olarak etkilediğinden meyvelerin küçük kalmasına ve ürün kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Kuraklık boyunca fotosentez ve solunum yavaşlamakta, hatta durabilmektedir (Kalefetoğlu v.d., 2005).

Stomaların kapanması ise kuraklığa karşı verilen en erken tepkilerden biridir. Stomaların kapanmasıyla, kloroplastlara CO₂ girişi kısıtlanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla stoma kapanmasının yapraktaki su potansiyelinden çok, toprağın su potansiyeline bağlı olduğu görülmüştür (Mullet v.d., 1996, Kalefetoğlu v.d., 2005).

Bitkiler kuraklık stresinin üstesinden gelmek için bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir. Öncelikle su kaybının azaltılması için stomalar kapatılır (Mullet v.d., 1996, Kalefetoğlu v.d., 2005, Redondo-Gomez, 2013, Verma v.d., 2013). Stomaların kapanması absisik asit (ABA) tarafından indüklenir. Bitki hormonu olan ABA, kuraklık stresinde stomal davranışın ve metabolizmanın regüle edilmesiyle görevlendirilmiştir. Kökte sentezlenen ABA ksilem aracılığıyla serbest formuyla ya da glikozla konjuge halde yapraklara taşınır (Sauter v.d., 2002).

Kuraklık devam ettiği takdirde yapraklar su kaybetmeye devam eder. Böylece yaprak dokularındaki turgor basıncı düşer ve yapraklar solmaya başlar. Bu durumla karşılaşıldığında bitki güneş ışınlarından korunabilmek için ilk olarak fotosentetik mekanizmayı koruma altına alır. Kloroplastlarla yapılan çalışmalar sonucunda iki fotosistemin özellikle de fotosistem II'nin kuraklık stresinden oldukça fazla etkilendiği görülmüştür. Fotosistem II'nin reaksiyon merkezinde yer alan ve fotoinhibisyonun en etkili olduğu bölgeler olan D1 ve D2 proteinlerinin güçlü stres altında degradasyonları gerçekleşmekte ve bunun sonucunda tüm fotosistem II parçalanmaktadır. Bunun olmaması için stomal koruma gerçekleştirilir, stomalar kapatılır ve CO₂ akışı sınırlandırılır (Giardi v.d., 1996, Lu v.d., 1999, Redondo-Gomez, 2013).

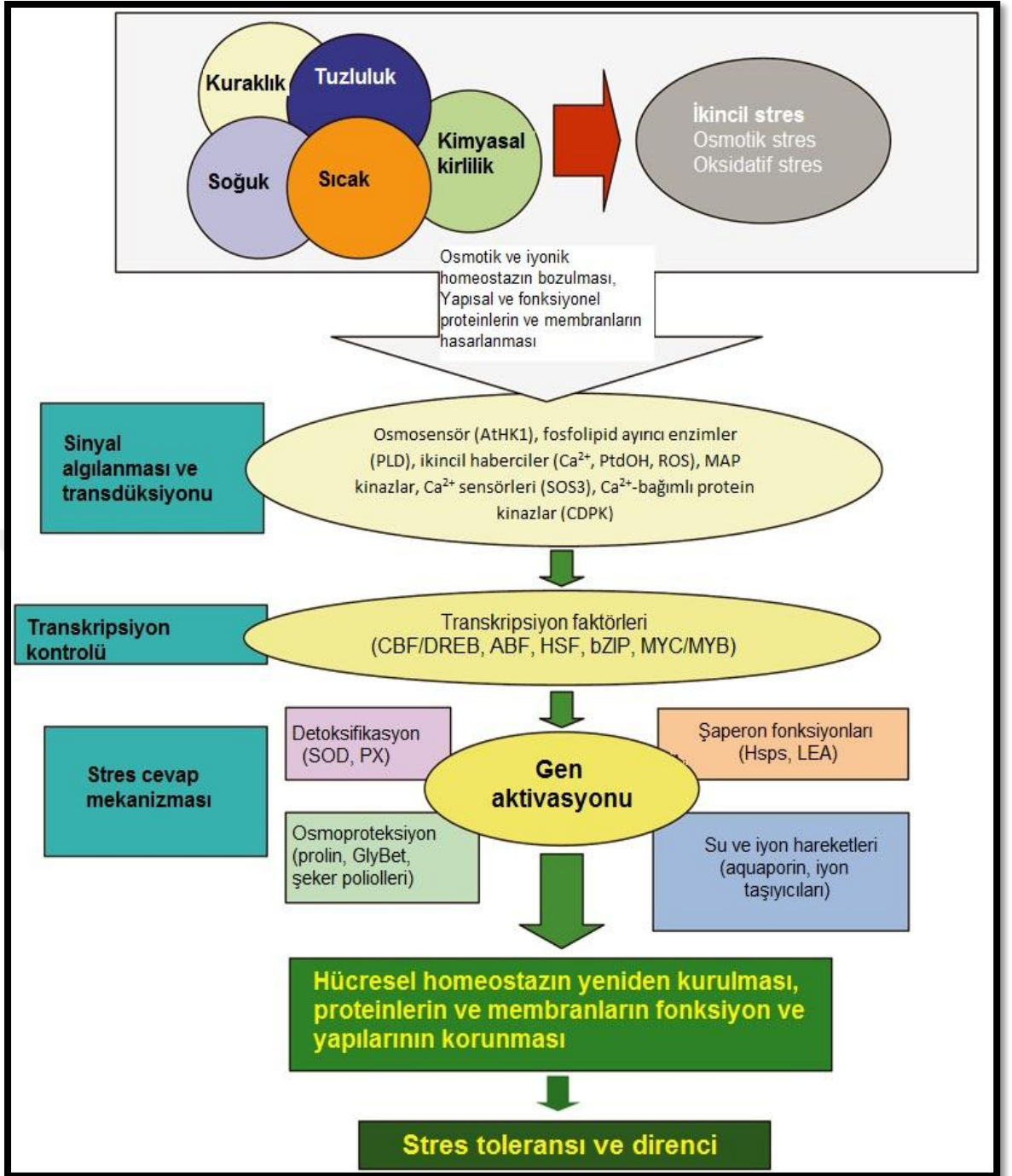
Ayrıca kuraklık stresinin üstesinden gelebilmek için bazı genlerin kodladığı düzenleyici proteinler de mevcuttur. Bu proteinler, stres sinyalinin transdüksiyonunu regüle ederler ve gen ekspresyonunu ayarlarlar. Kodlanan proteinlerin bazıları hücreleri kurumunun etkilerinden korurular. Bu durum, çözünen maddelerin birikiminin yönetilmesini, membranlar arasındaki pasif taşınmayı, su taşınma sisteminde gerekli enerji ihtiyacının düzenlenmesini ve hücre yapısının kuruma ve ROS hasarından korunmasını içermektedir (Redondo-Gomez, 2013).

2.2.2. Abiyotik Stres Toleransı

Abiyotik stres; bitkilerin gelişimini ve verimliliğini morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklerle oldukça fazla etkileyen çevresel değişikliklerdir. Çevresel faktörler üretim verimliliğini %70 oranında engellemektedir. Dünya genelinde çevresel değişikliklerden etkilenmemiş ekilebilen alanların oranı sadece %3.5'tir. Bu oranın dünya popülasyonunun artmasıyla ve küresel ısınmayla gün geçtikçe daha da azalması beklenmektedir (Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008, Hirayama v.d., 2010, Cramer v.d., 2011).

Bitkiler bu şartlar altında yaşamalarını sürdürebilmek için abiyotik stres çeşitlerine karşı tolerans ve adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Çevresel streslere karşı geliştirdikleri adaptasyon mekanizmaları moleküler ağ kaskatlarıyla kontrol edilirler. Bu durum stres cevap mekanizmalarını aktifleştirir; böylece homeostaz yeniden sağlanır ve hasar gören proteinlerin ve membranların tamiri ve korunması sağlanır. Ancak bu durumun kontrolü oldukça zordur. Çünkü bitkilerde abiyotik stres cevapları oldukça karmaşık mekanizmalardır ve multigeniktir. Birçok genin, biyokimyasal ve moleküler mekanizmanın bulunduğu bitkilerin abiyotik strese cevap mekanizmaları şekil 2.4'te şematize edilmiştir (Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008, Hirayama v.d., 2010, Cramer v.d., 2011).

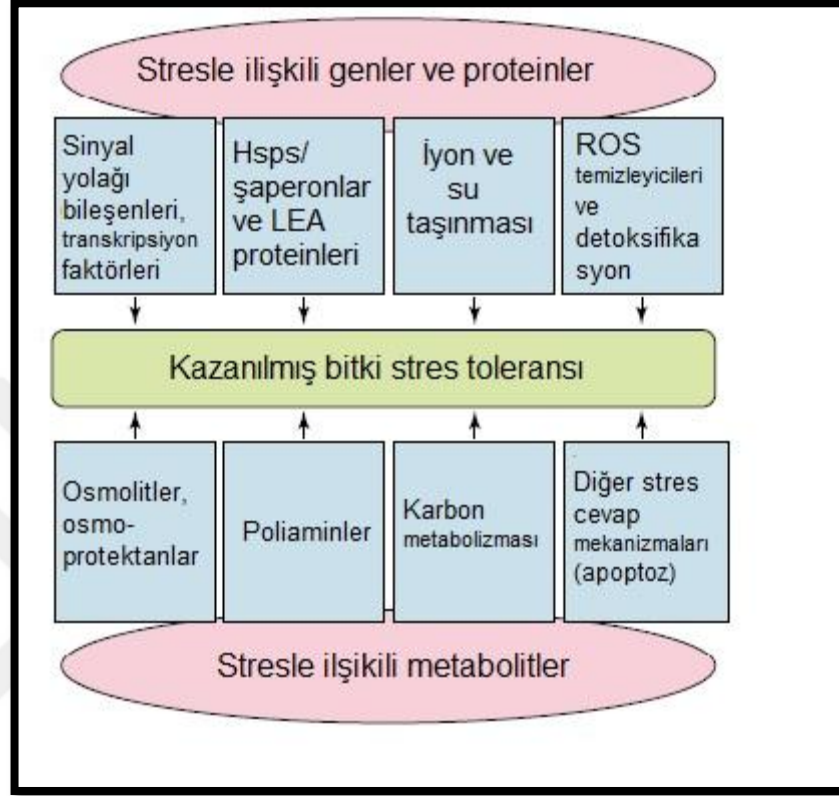




Şekil 2.4: Bitkilerin abiyotik strese cevap mekanizmaları (Wang v.d., 2003)

Bitkilerde abiyotik stres toleransının moleküler mekanizması; spesifik olarak stresle ilişkili genlerin ekspresyonlarıyla ilgilidir. Bu genler 3 ana grupta incelenebilir. Bunlar; sinyal ve düzenleyici yollarda görevli genler (MAP kinazlar, fosfolipazlar ve transkripsiyon faktörleri), stres toleransı ile ilgili proteinleri kodlayan genler (ısı şoku proteinleri (Hsps) ve şaperonlar, geç embriyogenez bağımlı (LEA) proteinleri ve serbest radikal tutucuları) ve fonksiyonel ve yapısal metabolitlerin sentezlenmesinde görevli yollarda bulunan enzimlerdir (iyon taşıyıcıları) (Wang

v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008, Hirayama v.d., 2010, Cramer v.d., 2011). Stresle ilişkili genler ve proteinler ana gruplar halinde şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5: Stresle ilişkili genler ve metabolitler (Vinocur ve ark., 2005)

2.2.2.1. Transkripsiyon Faktörleri

Bitkilerin strese cevapları çoklu sinyal yollarını regüle ederler, bu durumda da gen transkripsiyonu ve onun downstream mekanizması aktive olur. Bitki genomu çok sayıda transkripsiyon faktörü (TF) içerir. Örneğin; *Arabidopsis* genomunun %5.9'u 1500'den fazla transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu TF'lerinin çoğu MYB, MYC, AP2/EREBP, bZIP, WRKY gibi birkaç büyük multigen ailesine aittir. Aynı aileye mensup olan TF'leri genelde farklı olan çeşitli stres uyarılarına cevap verirken, bazı stres baskılayıcı genler de aynı TF'lerini kullanabilirler (Singh v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008, Hirayama v.d., 2010).

Dehidrasyona duyarlı transkripsiyon faktörleri (DREB) ve C-tekrarlı bağlanma faktörleri (CBF); DRE ve CRT'nin *cis*-aktif edici elementlerine bağlanırlar ki bunlar aynı motifi (CCGAC) içerirler. CBF1, CBF2, CBF3 ya da DREB1B, DREB1C ve DREB1A gibi CBF/DREB1 ailesinin üyeleri stresle uyarılırlar. DREB/CBF proteinleri AP2/EREBF multigen ailesi tarafından kodlanır ve *kin1*, *kin2*, *erd10*, *rd17*, *cor15a* gibi soğuk ve su stresıyla ilişkili bazı genlerin transkripsiyonlarıyla ilgilidir (Singh v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Agarwal v.d., 2006, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

Absisik asit (ABA) sinyali bitki stres cevabında çok önemli bir role sahiptir. Kuraklıkla uyarılan genlerin çalışmalarında bu genlerin ABA tarafından uyarıldığı gösterilmiştir. TF aileleri olan bZIP ve MYB; ABA sinyalinde ve onun gen aktivasyonunda görevlidir. ABA ile uyarılan genlerin çoğu; ABA-duyarlı elementin (ABRE) promotorünün *cis*-aktif edici bölgesindeki (C/T) ACGTGGC motifini paylaşırlar (Singh v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Agarwal v.d., 2006, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

Suyun sınırlı olduğu hücrel dehidrasyon koşullarında endojen ABA seviyesinin yükselmesi indüklenir. Bu durumda sinyal faktörlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin kodlandığı genlerin downstream hedefleri uyarılır. ABA ile ilişkili bitki stres toleransının kazanılması dehidrasyon stresi haricinde kuraklık stresinde de etkilidir. ABF3 ve ABF4 ekspresyonu; *Arabidopsis*'de *rab18*, *ABI1* ve *ABI2* gibi ABA/stres-duyarlı genlerin ekspresyonlarının değişimiyle kuraklık toleransını artırmıştır (Wang v.d., 2003, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

2.2.2.2. Osmolitler

Osmolitler; osmotik strese cevap olarak organizmalarda birikirler. Osmolitler; düşük moleküler ağırlığı olan oldukça fazla çözünebilir bileşiklerdir ve genellikle yüksek hücrel konsantrasyonlarda bile toksik değildirler. Genelde bitkileri; hücrel osmotik düzenlemenin ayarlanmasıyla, ROS detoksifikasyonu, membran bütünlüğünün korunmasıyla, kimyasal şaperon olarak görev almalarıyla ve enzimlerin/proteinlerin stabilizasyonunun sağlanmasıyla stresten korurlar. Aynı zamanda çoğu çözünen; bitkileri, hücrel bileşikleri dehidrasyon hasarından korudukları için osmoprotektanlar olarak da adlandırılırlar. Osmolitler; üç ana gruba ayrılırlar. Bunlar; amino asitler (prolin), kuaterner aminler (glisin betain, poliaminler) ve çeşitli şekerler ve şeker alkolleridir (mannitol) (Chen v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Ashraf ve Foolad, 2007, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

Prolin; glutamik- γ -semialdehit (GSA) ve Δ^1 -pirolin-5-karboksilat (P5C) tarafından glutamattan sentezlenir. P5C sentaz (P5CS) glutamatın P5C'ye dönüşümünü katalizler, bunu P5C'nin P5C redüktaz (P5CR) tarafından proline dönüştürülmesi izler. Bitkide tuz stresi altında prolin birikiminin olduğu görülmüştür. Bu durum, prolin dehidrogenaz enziminin upregülasyonu ile sonuçlanır ve prolin seviyesi düşer. Prolin dehidrogenaz enziminin antisens veya duyarsız olduğu *Arabidopsis* bitkisinde serbest prolin miktarı artar ve bitki tuz stresi altında daha iyi bir tolerans gösterir (Chen v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Ashraf ve Foolad, 2007, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

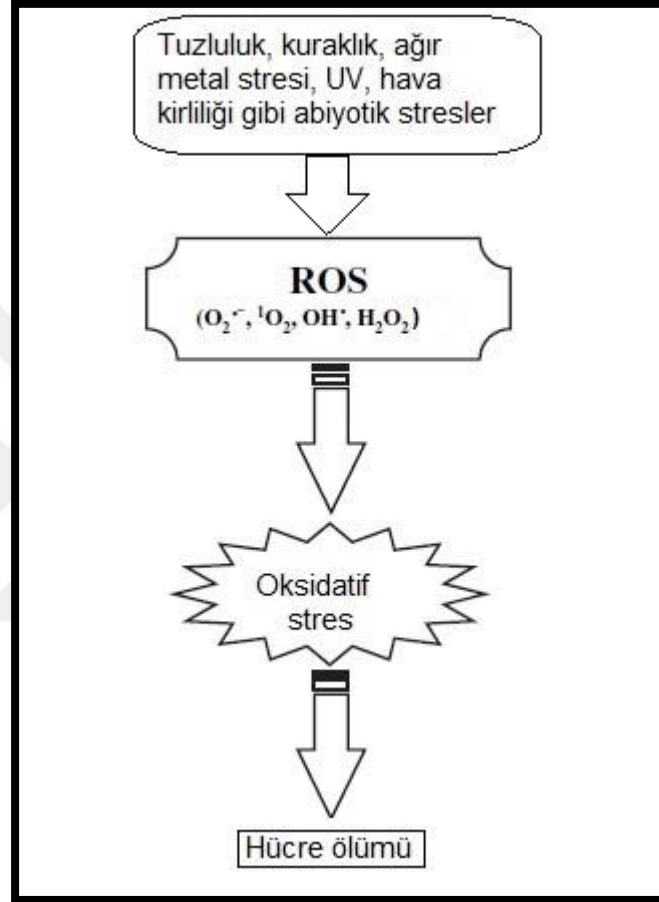
Bitkilerde glisin betain oldukça fazla çalışılan bir osmoprotektandır. Glisin betain kloroplastlarda kolinden iki adımlı bir süreçle sentezlenir. İlk adımda kolin betain aldehide kolin monooksijenaz (CMO) enzimiyle dönüştürülür ve bu adım kuraklık ve tuzlulukla indüklenir. İkinci adımda ise betain aldehit glisin betaine dönüştürülür ve bunu betain aldehit dehidrogenaz (BADH) enzimi katalizler. Pirinç, patates ve domates gibi birçok önemli bitki glisin betain birikimini gerçekleştirmez. Bu sebeple glisin betain birikimini gerçekleştiremeyen bitkilerde glisin betain biyosentezinin genetik mühendisliğiyle bitkilerin daha toleranslı hale getirilmesi son dönemlerde tercih edilen bir yaklaşımdır (Chen v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Ashraf ve Foolad, 2007, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

Şeker alkolleride de bitkilerin tolerans mekanizmalarında önemlidir. Mannitol; tuz ve su stresi altında bitkide birikimi gerçekleşen bir şeker alkolüdür. Tarczyński ve ark.(1993) tütünde mannitol 1-fosfat dehidrogenaz kodlayan bakteriyel bir gen bulmuşlardır. Bu enzim sayesinde mannitol birikiminin gerçekleştiğini ve bu birikimle birlikte bitkinin tuzluluğa toleransının arttığını rapor etmişlerdir. Trehalozun biyomoleküllerinin çevresel stresten koruduğu da düşünülmektedir (Chen v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

2.2.2.3. Antioksidanlar ve Detoksifikasyon Genleri

Bitkilerde abiyotik strese karşı verilen ilk cevaplardan biri ROS üretiminin gerçekleşmesidir. Özellikle tuz, kuraklık, sıcaklık ve bu gibi birincil stresler sonucunda oluşan ikincil bir stres olan oksidatif stres sebebiyle meydana gelen ROS membranlara ve makromoleküllere ciddi hasarlar verir hatta hücreyi ölüme bile götürebilirler (Şekil 2.6). Bitkiler; ROS seviyesini kontrol altında tutabilmek ve ROS sonucunda oluşacak oksidatif hasarlanmadan kendilerini koruyabilmek amacıyla oldukça kompleks bir antioksidan savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bitkilerin geliştirdikleri bu mekanizma önemli bir tolerans mekanizmasıdır. Antioksidanlar yani

ROS temizleyicileri; katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz gibi enzimatik olabildikleri gibi askorbat, glutatyon, karotenoidler ve anthosiyeninler gibi enzimatik olmayan moleküller de olabilir. Bu moleküllere ek olarak ROS temizleyicileri arasında osmolitler, bazı proteinler ve amfifilik moleküller de sayılabilir (Bhatnagar-Mathur v.d., 2008, Cramer v.d., 2011, Gill v.d., 2010, Mittler v.d., 2004, Vinocur v.d., 2005, Wang v.d., 2003).



Şekil 2.6: Abiyotik stres-ROS ilişkisi (Gill ve ark., 2010)

Transgenik tütün bitkilerinde over-eksprese olan Cu/Zn-SOD ile birlikte oksidatif strese karşı artan bir dayanıklılık elde edilmiştir. Başka bir çalışmada kuraklık şartlarındaki transgenik alfalafa (*Medicago sativa*) bitkilerinin Mn-SOD eksprese ettikleri ve sonuçta hasarın azaldığı kanıtlanmıştır (Wang v.d., 2003, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

2.2.2.4. İyon Taşınması

Osmotik stres, topraktaki ve sulama suyundaki iyon toksisitesi ve tuzluluk özellikle de Na^+ ve Cl^- iyonlarının dengesizliği bitkilerin gelişmesini yavaşlatan ve hasar veren durumlardır. Bitkiler bunun gibi durumlarda iyonik ve osmotik homeostazı sağlamak amacıyla iyon taşıyıcılarına seçici bir iyon taşınmasının oluşmasını sağlarlar. Hücresel iyon homeostazının sağlanmasında Na^+/H^+ antiporterları çok önemli bir rol oynar. Na^+/H^+ antiporterları; membranda Na^+ ve H^+ değişimini katalizler ve böylece sitoplazmik pH'ın, sodyum seviyesinin ve hücre turgorunun dengelenmesi görevlerini de yerine getirirler (Wang v.d., 2003, Zhu, 2003, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

Arabidopsis'te vakuolar Na^+/H^+ antiporter geni olan *AtNHX1* geninin ifadesinin artmasıyla tuzluluk durumunda büyümenin ve gelişmenin gerçekleştiği gösterilmiştir. Tuzlu toprakta yetiştirilen transgenik domates bitkisinde yine aynı genin gen ifadesinin artmış olması durumunda büyümenin, çiçek ve meyve üretiminin normal koşullardaki gibi gerçekleştiği gösterilmiştir (Wang v.d., 2003, Zhu, 2003, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

Bitkiler iyon dengesinin bozulmaması için bir yol daha geliştirmişlerdir. Bitkilerde protonlar, iyon taşınması sisteminde iyonlara eşlik ederler. Bu durum hücre membranında bulunan proton pompaları sayesinde proton gradientinin oluşturulmasıyla sağlanır. Proton elektrokimyasal gradientinin oluşmasından 3 proton pompası sorumludur. Bunlar; plazma membran H-ATPaz pompası (PM H-ATPaz), vakuolar tipli H-ATPaz pompası (V-ATPaz) ve vakuolar H pompalayan pirofosfataz pompasıdır (H-PPaz). PM H-ATPaz; H^+ 'nin hücreden geçirilmesini sağlayarak proton harekete geçirme kuvvetini oluştururken V-ATPaz ve H-PPaz; vakuolar lümenin ve endo-membran bileşenlerini asitleştirirler (Zhu, 2002, Wang v.d., 2003, Zhu, 2003).

2.2.2.5. Stresle İlişkili Proteinler

Bitkiler stres koşulları altında yaşayabilmek için stresle ilişkili olan proteinleri kodlayan genleri aktif hale getirirler. Kuraklık, tuzluluk ve yüksek sıcaklık çoğu proteinin denatürasyonuna ve fonksiyonlarının kaybına neden olur. Isı şoku proteinleri (Hsps) ve geç embriyogenez bağımlı (LEA) proteinleri stres koşulları altında biriken stresle ilişkili iki önemli protein türüdür. Bu proteinler stres koşulları altında hücresel korunmada görev alırlar (Sun v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Wahid v.d., 2007, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

2.2.2.5.1. Isı Şoku Proteinleri

Bitkiler stres altında iken proteinler ve enzimler fonksiyonlarını yerine getiremezler. Stres altında hücrelerin sağ kalımı için proteinlerin fonksiyonlarını devam ettirebiliyor olması oldukça önemlidir. Stresle ilişkili birçok protein vardır. Fakat bunlardan en önemlisi Hsps'dir. Hsps kodlayan genlerin aktivasyonu yüksek sıcaklık altında organizmaların moleküler seviyede gösterdikleri en belirgin cevaptır. Hsps'ler; normal hücresel süreçte protein sentezinden, hedeflenmesinden, olgunlaşmasından ve degradasyonundan sorumlu olan moleküler şaperonlar gibi davranırlar. Bununla birlikte moleküler şaperonlar; proteinlerin ve membranların stabilizasyonunda ve proteinlerin stres şartları altında yeniden katlanmasında da fonksiyoneldirler (Sun v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Wahid v.d., 2007, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

Bitkilerde 5 korunmuş Hsps ailesi vardır. Bunlar; Hsp100, Hsp90, Hsp70 Hsp60 ve küçük Hsps'lerdir (sHsps). Bununla birlikte bitkilerde en etkili olan Hsps de sHsps'dir. Ayrıca birçok çalışmada da bitkilerde sHsps'nin sadece yüksek sıcaklık altında değil aynı zamanda kuraklık, tuzluluk, oksidatif stres ve düşük sıcaklıkta da eksprese edildiğini göstermiştir. Domates sHsps olan *tom66* ve *tom111* düşük sıcaklık altında eksprese edilmiştir (Sun v.d., 2002, Wang v.d., 2003, Vinocur v.d., 2005, Wahid v.d., 2007, Bhatnagar-Mathur v.d., 2008).

2.2.2.5.2. Geç Embriyogenez Bağımlı Proteinleri

Geç embriyogenez bağımlı (LEA) proteinleri de stresle ilişkili olan proteinlere örnektir. LEA proteinleri birçok bitkide kuraklığa, soğuğa ve osmotik strese cevap olarak bulunur. LEA proteinlerinin görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte embriyogenezin geç evresi sırasında sentezleniyor olmaları, stresle uyarılmaları ve yapısal karakteristikleri (hidrofilik olmaları ve tekrar eden motifleri) bize fonksiyonu hakkında tahminde bulunma fırsatı verir. LEA proteinlerinin iyon ayrılmasında su bağlayıcı moleküller gibi bir fonksiyonunun olduğu ve membran stabilizasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Grup II tip LEA proteini olan COR85'in soğuk stresinde etkili olduğu gösterilmiştir. Grup III tip LEA proteini olan HVA1'in ise kuraklık ve tuz stresinde etkili olduğu gösterilmiştir (Bhatnagar-Mathur v.d., 2008, Tunnacliffe v.d., 2007, Vinocur v.d., 2005, Wang v.d., 2003).

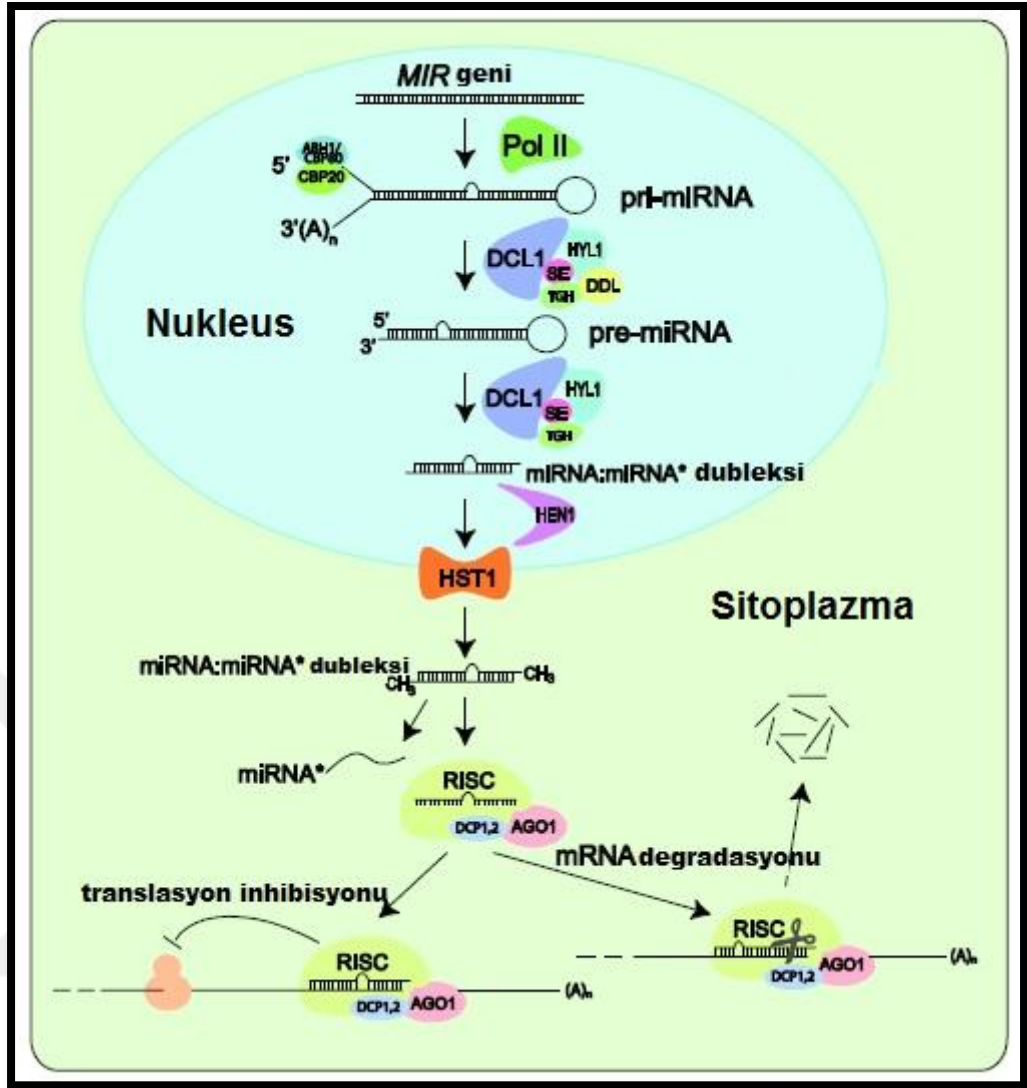
2.3. MİKRORNA'LAR

MikroRNA'lar (miRNA) yeni keşfedilmiş protein kodlamayan endojen küçük RNA'lardır. Bu yeni keşfedilmiş küçük RNA'ların bitki büyüme ve gelişmesinde çok önemli rolleri vardır (Zhang v.d., 2006, Phillips v.d., 2007, Lu v.d., 2008a, Khraiweh v.d., 2012, Kumar, 2014). miRNA'lar ilk olarak 1993 yılında *C. elegans* nematodunda larval gelişimin zamanlanmasının düzenlenmesi araştırmaları sırasında tanımlanmıştır (Lee v.d.,1993). Bununla birlikte miRNA'ların bitkilerde keşfedilmesi birkaç farklı grubun *Arabidopsis*'te yaptığı çalışmalarla 2002 yılında gerçekleşmiştir (Llave v.d., 2002, Park v.d., 2002, Reinhart v.d., 2002).

miRNA'ların bazı karakteristik özellikleri vardır. miRNA'lar 20-24 nükleotidlik, tek dizili protein kodlamayan RNA'lardır. Tüm miRNA öncüleri iyi tahmin edilmiş stem loop saç tokası yapısına sahiptirler ve bu geriye katlanan saç tokası yapısı düşük serbest enerjiye sahiptir. Olgun miRNA'ların 5' terminal fosfat ve 3' terminal hidroksil yapıları miRNA'ları diğer oligonükleotidlerden farklı hale getirir. Tüm bunlara ilaveten miRNA'lar korunmuş, dokuya spesifik ve geçicidirler. Şimdiye kadar tahmin edilmiş ve tanımlanmış tüm miRNA'lar bu kuralları doğrular niteliktedir (Zhang v.d., 2006, Lu v.d., 2008a).

2.3.1. miRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi; miRNA geninden, 20-24 nükleotidlik olgun miRNA oluşması için çeşitli enzimlere ihtiyaç duyulan çok adımlı karışık bir süreçtir (Şekil 2.7). Öncelikle miRNA geni, birkaç yüz nükleotidden oluşan uzun bir diziye sahip primer miRNA'ya (pri-miRNA) transkribe olur. Bu adım Pol II enzimi ile kontrol edilir. İkinci adımda pri-miRNA, stem loop ara ürününe dönüşür ve buna miRNA öncüsü (pre-miRNA) denir. Bu adım Dicer benzeri 1 enzimi (DCL1) tarafından kontrol edilir. Üçüncü adımda DCL1 enzimiyle pre-miRNA, miRNA:miRNA* dubleksi halini alır. Tüm bu adımlar nukleusta gerçekleşir. Daha sonra miRNA:miRNA* dubleksi, eksportin 5'in bitki ortoloğu olan HASTY (HST1) tarafından sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada miRNA:miRNA* dubleksinden helikaz sayesinde tek iplikli olgun miRNA meydana gelir (Bartel, 2004, Zhang v.d., 2006, Lu v.d., 2008a, Yang v.d., 2012).



Şekil 2.7: Bitkilerde miRNA biyogenez ve fonksiyonu (Yang ve ark., 2012)

Biyogenez sırasında adımları kontrol eden enzimlere ilaveten bazı protein komplekslerine de ihtiyaç duyulur. Örneğin protein kompleksinde yer alan nuklear protein olan HYL1 çift iplikli RNA'nın bağlanmasında görev almaktadır. Bitkiye spesifik metiltransferaz olan HEN1 ise miRNA dubleksinin 3' ucuna metil grupları ekleyerek miRNA dubleksinin stabil kalmasında görevlidir (Lu v.d., 2008a, Yang v.d., 2012).

Sonuçta meydana gelen olgun miRNA, RNA ile uyarılmış susturma kompleksi (RISC) adı verilen ribonukleoprotein kompleksine giriş yapar. RISC proteinine giriş yapan miRNA:miRNA* dubleksindeki miRNA'dır. Dublexteki miRNA* ise ayrılır ve degrade olur. RISC'in Argonaute-1 (AGO1) proteini denilen temel bir bileşeni vardır. AGO1 proteini iki domainden oluşur; PAZ ve PIWI domainleri. ~20 kDA büyüklüğündeki N-terminal PAZ domainindeki hidrofilik boşluk

tek iplikli RNA molekülünün 3' ucundan bağlanmasını sağlar. ~40 kDA büyüklüğündeki C-terminal PIWI domaini ise RNase H benzeri bir yapıya sahiptir. Bu iki domainden oluşan AGO1 proteini ise RISC'in fonksiyonel olmasını sağlar (Lu v.d., 2008a, Khraiweh v.d., 2012, Yang v.d., 2012, Kumar, 2014).

RISC'de miRNA'lar hedef mRNA'ya bağlanırlar ve gen ekspresyonunu iki farklı post-transkripsiyonel mekanizmayla regüle ederler (Şekil 2.6). mRNA'ya bağlanarak ribozomal hareketin engellenmesiyle translasyonu inhibe ederler ya da yine mRNA'ya bağlanarak mRNA'nın degrade olmasını sağlarlar ve her iki yolla da gen susturulmuş olur (Lu v.d., 2008a, Zhang v.d., 2006, Yang v.d., 2012). miRNA'lar aracılığıyla bu şekilde gen susturulması olayına hayvanlarda RNA interferansı (RNAi) adı verilirken, bitkilerde bu olaya post-transkripsiyonel gen susturulması (PTGS) adı verilmektedir (Zhang v.d., 2006).

2.3.2. miRNA Tanımlama Yaklaşımları

miRNA'ları tanımlayabilmek için 4 farklı yaklaşım kullanılmaktadır. Bunlar; genetik görüntüleme, küçük RNA'ların izolasyonundan sonra direkt klonlama, hesaplamalı strateji ve eksprese olmuş sekans etiketleri (ESTs) analizidir (Zhang v.d., 2006). Bu 4 yaklaşımın farklı avantajları ve dezavantajları vardır (Tablo 2.1).

Genetik görüntüleme metodu diğer geleneksel gen tanımlama metodlarına benzer bir methodur. Bu methodla bazı miRNA'lar tanımlanmış olsa da pek kullanılmaz çünkü bu yaklaşım oldukça pahalı, zaman alan ve şans eseri sonuç veren bir yöntemdir (Zhang v.d., 2006).

Küçük RNA'ların izolasyonundan sonra direkt klonlama methodunda öncelikle küçük RNA molekülleri boyutlarına göre ayrılarak izole edilirler. Daha sonra bu RNA'lar 5' ve 3' uçlarından RNA adaptörlerine bağlanırlar ve cDNA'ya çevrilirler. cDNA'ya çevrildikten sonra amplifiye olur ve sekanslanırlar. Bu methodla hem bitkilerde hem de hayvanlarda yeni miRNA'lar tanımlamak mümkündür (Zhang v.d., 2006).

Tablo 2.1: Dört farklı miRNA tanımlama yaklaşımının karşılaştırılması (Zhang ve ark., 2006)

	Genetik görüntüleme	Küçük RNA izolasyonundan sonra direk klonlama	Hesaplamalı metod	EST analizi
Spesifik yazılım	Yok	Yok	Var	Yok
Genom ihtiyacı	Yok	Yok	Var	Yok
Maliyet	Yüksek	Genetik görüntülemeden daha az	Orta	Düşük
Verimlilik	Düşük	Yüksek	Düşük	Yüksek
Yanlış pozitiflik olasılığı	Düşük	Düşük	Yüksek	Orta
Deneysel doğrulama ihtiyacı	Yok	Yok	Var	Değişken
Yeni miRNA olasılığı	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Fazla çeşitlilikte türe uygunluğu	Var	Var	Yok	Var
Geniş kapsamlılığı	Var	Var	Değişken	Var
miRNA kantitatif bilgisi	Yok	Var	Yok	Biraz

Üçüncü yaklaşım ise geleneksel hesaplamalı stratejidir. Bu yaklaşım, genom sekanslama yöntemine dayanır. Çeşitli laboratuvarlar MIRscan ve MiRAlign gibi hesaplamalı programlar dizayn etmişlerdir ve bu sayede insanda, *C. elegans*'ta çeltikte ve Arabidopsis'te miRNA'lar başarıyla bulunmuştur. Şu anda miRNA veritabanlarında bulunan miRNA'ların büyük çoğunluğu hesaplamalı stratejiyle

tanımlanmıştır. Fakat hesaplamalı yaklaşım kısmen verimsiz ve tam olarak geniş kapsamlı değildir. Tahmin edilen miRNA'nın klonlama veya northern blot yöntemleriyle doğrulanması gerekmektedir (Zhang v.d., 2006).

Bazı miRNA'ların evrimsel süreçte türden türe korunduğu bilinmektedir. EST analizi, daha önceden bilinen miRNA'ların homologilerini ve ortologlarını tahmin etmede oldukça güçlü bir methodur. Bununla birlikte daha da önemlisi özellikle genomları henüz bilinmeyen çoğu türde miRNA'ların tahmin edilmesinde oldukça kullanışlıdır. Fakat bu yöntemin en büyük dezavantajı sadece korunmuş miRNA'ları analiz edebilmesidir (Zhang v.d., 2006).

2.3.3. Hayvan ve Bitki miRNA'larının Farklılıkları

Hayvanlardaki ve bitkilerdeki miRNA'lar birbirlerinden farklılıklar gösterebilirler. Öncelikle hayvan miRNA'ları genelde ~20-22 nükleotidlik bir diziden oluşurken bitki miRNA'ları ~ 20-24 nükleotidden oluşmaktadır. Bitki miRNA'ları hayvanlardakinden daha az korunmuşlardır. Bitkilerde genelde sadece olgun miRNA'lar korunurken hayvanlarda miRNA öncülerinin de korunduğu görülmüştür. Hayvanlarda pri-miRNA DICER aile üyesi olan Dicer tarafından 60-70 nükleotidlik pre-miRNA'ya dönüşürken bitkilerde pri-miRNA DCL1 tarafından 60-300 nükleotidlik pre-miRNA'ya dönüşmektedir. Bitkilerde miRNA:miRNA* dubleksinin DCL1 tarafından nukleusda oluşturulduğu düşünülmektedir. Fakat hayvanlarda miRNA:miRNA* dubleks ve olgun miRNA oluşumu Dicer tarafından sitoplazmada kontrol edilmektedir. Hayvanlarda miRNA:miRNA* dubleksi sitoplazmaya Exportin-5 tarafından taşınmaktadır. Bitkilerde ise bu işlem Exportin-5 homologu olan HASTY (HST1) tarafından gerçekleştirilmektedir. Hayvan miRNA'ları genelde hedef mRNA'ya hatalı komplementerlikle 3' çevrilmemiş bölgedeki (3'UTR) birçok alandan bağlanır ve gen ekspresyonunu baskılar. Fakat bitkilerde çoğu hedef mRNA açık okuma penceresinde sadece bir miRNA komplementer bölgesine sahiptir ve ilgili miRNA mükemmel bir komplementerlikle bu bölgeye bağlanarak mRNA'yı baskılar (Bartel, 2004, Millar v.d., 2005, Lu v.d., 2008a, Yang v.d., 2012). Tüm bunlara ek olarak hayvanlarda miRNA'lar protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ını regüle ederken bitki miRNA'ları protein kodlayan genlerin %1'inden azını regüle edebilmektedir (Sunkar v.d., 2012, Kumar, 2014).

2.3.4. Bitkilerde miRNA Fonksiyonları

miRNA'lar küçük moleküller olsa da gen ekspresyonunda çok önemli rollere sahiptirler. miRNA'lar hayvanlarda ve bitkilerde en önemli post-transkripsiyonel gen düzenleyicilerinden biridir. Hayvanlarda miRNA'ların gelişim, stres cevabı ve karsinogenez gibi birçok fonksiyonel süreçte rol aldıkları bulunmuştur. Bununla birlikte bitkilerde de miRNA'ların çok yönlü rollere sahip olduğu bilinmektedir. Bitkilerde miRNA'lar; bitki gelişiminin regülasyonunda, yaprak gelişiminde, çiçek gelişiminde, vejetatif faz değişiminde, sürgün ve kök oluşumunda, vasküler gelişimde, miRNA ve siRNA biyogenezinin ve fonksiyonunun regüle edilmesinde, sinyal iletiminde, bitki hastalıklarında ve abiyotik strese cevapta önemli rollere sahiptirler (Bartel. 2004, Lu v.d., 2008, Yang v.d., 2012).

2.4. miRNA VE STRES İLİŞKİSİ

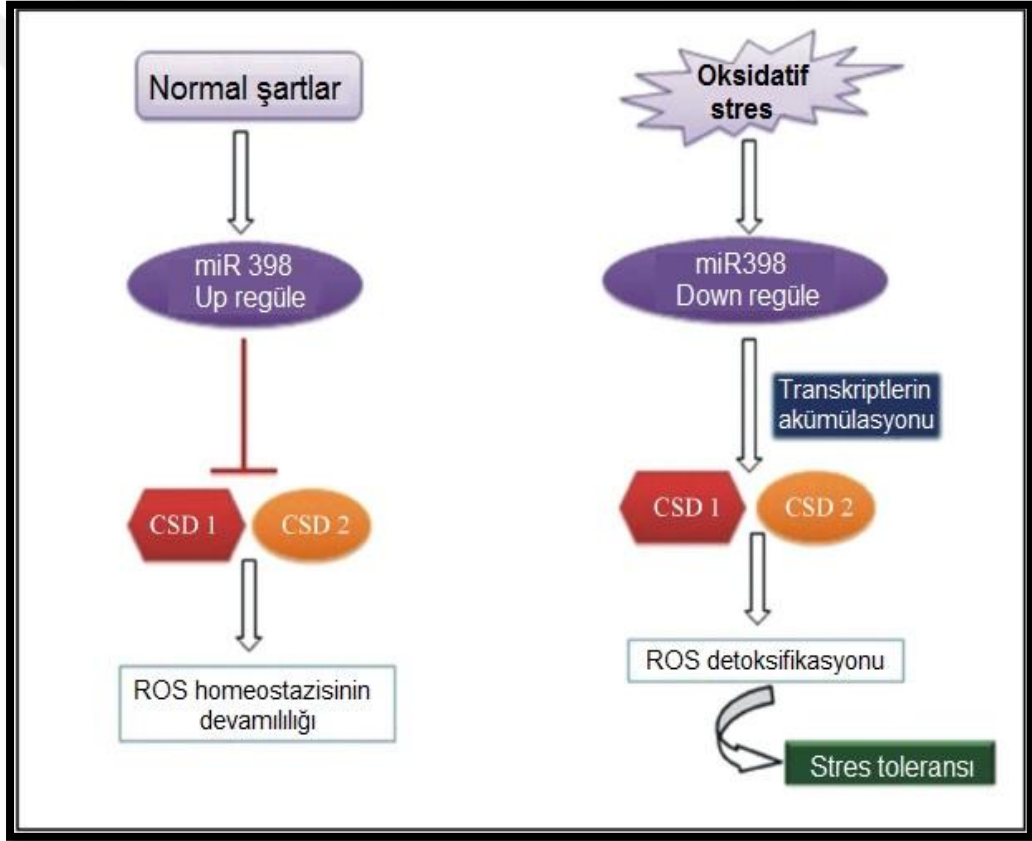
Bitkiler çeşitli çevresel streslerin üstesinden gelebilmek için çok karışık mekanizmalar geliştirmişlerdir. Besin stresi, kuraklık, soğuk, tuzluluk, ağır metal, oksidatif stres gibi abiyotik streslerin bitkilerde transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeylerde yüzlerce genin ekspresyonunu regüle ettiği ortaya çıkmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla miRNA'ların da bu mekanizmalarda rol aldıkları ortaya çıkmaktadır (Zhang v.d., 2006, Phillips v.d., 2007, Lu v.d., 2008b, Khraiweh v.d., 2012, Sunkar v.d., 2012, Kumar, 2014).

Bitkilerde miRNA'lar protein kodlayan genlerin %1'inden azını regüle ederler. Bununla birlikte bitkilerde miRNA'ların transkripsiyon faktörleri gibi düzenleyici proteinleri hedefledikleri görülmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri bitkinin gelişimsel sürecinde rol almalarının yanında strese geliştirilen cevapta da görev aldıkları görülmüştür (Phillips v.d., 2007, Sunkar v.d., 2012, Kumar, 2014).

Son yapılan çalışmalarla fonksiyonel olgun miRNA'nın komplementeri olan miRNA*'nın da bitkilerin strese olan toleransında etkili olabileceği gösterilmiştir. miRNA*'nın hızla yıkıldığı ya da sadece çok az miktarda biriktiği düşünülmekteydi; fakat bazı koşullarda bitkilerde miRNA*'nın yüksek seviyelerde akümüle olduğu gösterilmiştir. Örneğin; *Arabidopsis*'de fosfat yoksunluğu sırasında miR399*'un yüksek seviyelerde biriktiği gösterilmiştir. Bu konudaki çalışmalar artmış olsa da hedeflerinin ne olduğu, fonksiyonel olan olgun miRNA ile biyokimyasal yollarının aynı olup olmadığı gibi sorular hala aydınlatılmadığı için bu konu gizemini korumaktadır (Hsieh v.d., 2009, Sunkar v.d., 2012).

2.4.1. miRNA ve Oksidatif Stres İlişkisi

miRNA'lar ve oksidatif strese cevap arasındaki ilişki ilk olarak miR398'in tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır (Şekil 2.8). Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi oldukça toksik süperoksit anyonunu daha az toksik olan hidrojen perokside çevirerek bitki hücrelerini süperoksit radikallerinden korurlar. Cu/Zn süperoksit dismutaz (CSD) genlerinin artan regülasyonunun miR398'le ilişkili olduğu görülmüştür. Sitosolik CSD1 ve plastidik CSD2'nin her ikisi de miR398'in hedefidir. Oksidatif stres durumunda miR398'in ekspresyon seviyesi azalır; böylece CSD1 ve CSD2 mRNA'larının akümüasyonu artar. Sonuçta da süperoksit radikallerinin akümüasyonu azalmış olur ve bitki oksidatif strese tolerans göstermiş olur (Sunkar v.d., 2006, Bej v.d., 2014, Kumar, 2014).



Şekil 2.8: miR398'in oksidatif stres toleransındaki rolü (Bej ve ark., 2014)

2.4.2. miRNA ve Besin Stresi İlişkisi

Bitkiler yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan besinleri topraktan alırlar. Toprakta sık sık besin değişimleri meydana gelmektedir; böyle durumlarda bitkiler ihtiyaçları olan elementleri topraktan temin edemedikleri için strese girerler. Besin stresi ve miRNA'lar arasındaki ilişki miR399'un keşfiyle ortaya çıkmıştır. Normal şartlar altında miR399 daha çok köklerde eksprese edilmektedir. *Arabidopsis*'te inorganik fosfat eksikliğinde miR399 ekspresyonu artar ve E2 ubikuitin konjugasyon enzimini (UBC24) repress eder. Böylece inorganik fosfat alımı baskılanır (Fujii v.d., 2005, Bari v.d., 2006). Bitkide sülfat eksikliği olduğunda ise fonksiyonel olan miRNA miR395'dir. miR395; birikimi olan sülfürü ATP sülfataz ve sülfat taşıyıcısı AST68'e paylaşarak görevlidir. Bitkide sülfat eksikliği olduğu takdirde miR395 ekspresyonunun upregüle olduğu gözlenmiştir (Liang v.d., 2010).

2.4.3. miRNA ve Yüksek-Düşük Sıcaklık Stresi İlişkisi

Soğuk stresi ve miRNA arasındaki ilişki birçok bitkide gösterilmiştir. Soğuk stresi sırasında miR397 ve miR169'un *Arabidopsis* ve *Populus*'da upregüle olduğu, miR172'nin ise *Arabidopsis* ve *Brachypodium*'da upregüle olduğu gösterilmektedir (Sunkar v.d., 2004, Liu v.d., 2008, Lu v.d., 2008b, Zhang v.d., 2009). miR168 seviyesi *Arabidopsis*'te soğuk stresiyle artarken, çeltikte azaldığı rapor edilmiştir (Liu v.d., 2008, Lu v.d., 2008b).

Son yıllarda küresel ısınmayla birlikte yüksek sıcaklık bitkiler için oldukça önemli bir hale gelmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda saptanan 32 miRNA ailesinden korunmuş 9 miRNA'nın buğdayda yüksek sıcaklıkla ilgili olduğu görülmüştür. miR172 seviyesi önemli derecede düşerken miR159, miR160, miR166, miR169, miR393'ün seviyelerinin arttığı gözlenmiştir (Xin v.d., 2010).

2.4.4. miRNA ve Ağır Metal Stresi İlişkisi

Ağır metal stresi gün geçtikçe daha önemli hale gelmektedir. Çünkü sanayi ve tarımsal aktiviteler sonucunda topraklar, yer altı ve yer üstü suları her geçen gün daha da kirlenmektedir. Bitkiler ağır metal stresinden kaçınmak için bazı önlemler geliştirmişlerdir; miRNA aktiviteleri de bunlardan biridir. CSD1 ve CSD2 enzimleri, Cu^{+2} homeostazisini ve kloroplasttaki tilakoid lümeninde, Cu^{+2} 'nin plastosiyanin proteinine hareketini regüle ederler. Cu^{+2} 'nin sınırlı olduğu durumlarda miR398 overeksprese edildiği görülmüştür (Sunkar v.d., 2004, Yamasaki v.d., 2007).

2.4.5. miRNA ve Tuz Stresi İlişkisi

Dünyadaki ekim alanlarının %50'sinin ve tarımsal alanların %20'sinin tuz stresinde olduğu düşünülürken, her yıl bir milyon hektardan fazla arazinin de tuzluluğa maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Toprakta bulunan aşırı tuz konsantrasyonu bitkilerin su emilimini etkilemektedir. Bu sebeple tuz stresi ve kuraklık stresi benzer hücresel ve metabolik süreçleri paylaşmaktadır (Yıldız v.d., 2010). *Arabidopsis*'te tuz stresi altında farklı olarak regüle edilen miRNA'lar tanımlanmıştır. miR156, miR158, miR159, miR165, miR167, miR168, miR169, miR171, miR319, miR393, miR394, miR396 ve miR397 upregüle olurken, miR398'in birikiminin düştüğü gözlenmiştir (Liu v.d., 2008). Tuza duyarlı ve tuza toleranslı olan iki mısır hattıyla yapılan mikroarray çalışmaları sonucunda 27 miRNA ailesinin tuz stresiyile birlikte ekspresyonlarında belirgin değişimlerin olduğu gözlenmiştir. Her iki mısır hattında da miR396 ailesi üyelerinin gen ifade seviyelerinde azalma gözlenirken, miR395 ve miR474 aileleri üyelerinin ifade seviyelerinde ise artış gözlenmiştir (Ding v.d., 2009).

2.4.6. miRNA ve Kuraklık Stresi İlişkisi

Tüm abiyotik stres faktörleri arasında kuraklık en fazla ürün kaybına neden olan stres çeşididir. Bitkiler kuraklıkla başa çıkabilmek için çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bitki stres hormonu olan ABA, su kaybını önlemek amacıyla stomaların kapanmasını sağlayarak bitkiyi kuraklıktan kurtarmaya çalışır. Yine kuraklıktan kaçabilmek için bitkiler ozmoprotektanlar denilen organik bileşikler akümüle ederler. Bu bileşikler su alımını sağlayarak bitkinin su kaybını önlemeye çalışırlar. Fakat bu bileşiklerin hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu şartlarda bile enzim aktivitelerini inhibe etme yetenekleri yoktur (Kumar, 2014).

miR169'un kuraklık stresi toleransında çok önemli bir rolünün olduğu görülmüştür. Kuraklık durumunda *Arabidopsis*'te miR169'un ABA-bağımlı yolak üzerinden ekspresyonu azalır. Böylece hedefi olan transkripsiyon faktörü nuklear faktör YA5'in (NFYA5) ekspresyonu artar ve sonuçta kuraklık stresine cevap genlerinin ekspresyonları artmış olur (Li v.d., 2008). Çeltikte kuraklık stresinde miR169g ve miR393'ün gen ifadesinde artış olduğu gözlenmiştir (Zhao v.d., 2007). Gen ifadesinde artış olan miR393 transport inhibitör cevabı 1 (TIR1) transkripsiyon faktörünü hedefler ve bitkinin büyümesi ve gelişimi yavaşlar böylece bitki kendini kuraklık stresinden korumaya çalışır (Shukla v.d., 2008). Domateste miR169 ile yapılan çalışmalarda kuraklık stresindeki bitkilerde stres altında olmayan bitkilerle

karşılaştırıldığında miR169'un daha fazla indüklendiği görülmüştür. Sonuçta domateste miR169'un ve onun hedefinin kuraklık stresine cevapta önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur (Zhang v.d., 2011).

Kök ve sürgün gibi farklı dokularda ayrı ayrı yapılan miRNA ekspresyon analizleri sonucunda bazı miRNA'ların stres sırasında farklı dokularda değişik cevaplar verebileceğini göstermektedir. Kuraklık durumunda arpada yapılan çalışmalar dört miRNA'nın dokuya spesifik regülasyonunu ortaya koymuştur. miR169 yapraklarda regülasyonu artarken, köklerde regülasyonunun azaldığı görülmüştür. miR156a, miR171 ve miR408 yapraklarda indüklenirken, köklerde herhangi bir değişimin olmadığı gözlenmiştir. Bu durum tüm bitkide yapılan miRNA çalışmaları sırasında dokuya spesifik önemini göstermektedir (Kantar v.d., 2010).



3. MATERYAL METOD

Tez kapsamında İstanbul Kültür Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda mutasyon ıslahı metodu ile kuraklığa toleranslı hale getirilmiş olan M₃ generasyonuna ait mutant domates hatlarında kuraklıkla ilişkili olduğu düşünülen on üç miRNA'nın ve hedef genlerinin gen ifade seviyeleri farklı kuraklık dozlarında kuraklığa toleranslı yabancı tip domates ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

3.1. TOHUMLARIN ELDESİ

Bu çalışmada iki mutant domates hattı ile yabancı tip *Solanum pennellii* kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mutant domatesler İstanbul Kültür Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarından alınmıştır. X5671R varyetesinin 300 Gray gama radyasyon dozu ile ışınlanması sonucu elde edilen M₃ generasyonundan *in vitro* seleksiyon ile kuraklığa toleranslı olarak belirlenen 4.5 ve 3.409 kodlu mutant bitkiler çalışmaya alınmıştır.

Yabancı tip kuraklığa toleranslı *Solanum pennellii* ise NL037.CGN15533#689680 kodlu Wageningen, Centre for Genetic Resources (CGN) Hollanda'dan alınmıştır. CGN'den tohumlarla birlikte gönderilen tohum bilgisi Ek.1'de gösterilmektedir.

3.2. miRNA'LARIN ve mRNA'LARIN DİZİLERİNİN BELİRLENMESİ VE PRİMER TASARIMI

Çalışmada kullanılan miRNA'lar daha önce domates, *Arabidopsis*, tütün gibi bitkilerde kuraklıkla ilişkili olduğu bildirilmiş olan miRNA'lar arasından seçilmiştir.

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

Çalışmada kullanılan miRNA dizileri www.mirbase.org isimli internet sitesinden elde edilmiştir. Buradan elde edilen miRNA dizileri için tasarlanan stem-loop cDNA primerleri ve qRT-PCR sırasında kullanılan reverse ve forward primerler <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadestool/> isimli internet sitesi yardımıyla tasarlanmıştır (Tablo 3.1).

Domates bitkisinin mRNA dizileri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore> internet sitesi aracılığıyla belirlenmiştir. Belirlenen mRNA dizilerine göre

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> internet sitesi aracılığıyla miRNA'ların hedef genlerine ait olan qRT-PCR reverse ve forward primerleri tasarlanmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.1: Olgun miRNA dizileri, stem-loop primerler ve qRT-PCR'da kullanılacak olan forward primerler.

miRNA Adı	Olgun miRNA Dizisi	Stem-loop Primer	Forward Primer
miR157b	5' - GAAAAGAAGAUAGAGA GCAC - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CGTGCTC - 3'	5' - GTTTGGGGGAAAAGAA GATAGA - 3'
miR170a	5' - UGAUUGAGCCGUGUCA AUAUC - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CGATATT - 3'	5' - GTTGTGATTGAGCCGT GTC - 3'
miR170b	5' - UGAUUGAGCCGUGCCA AUAUC - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CGATATT - 3'	5' - GTTTTGATTGAGCCGTG CC - 3'
miR170c	5' - UGAUUGAGCCGUGCCA AUAUC - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CGATATT - 3'	5' - GTTTTGATTGAGCCGTG CC - 3'
miR398	5' - UGUGUUCUCAGGUCAC CCCUU - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CAAGGGG - 3'	5' - GTGGTGTGTTCTCAGG TCA - 3'
miR473	5' - CCUCUCCUCAAGGGC UUCUC - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CGAGAAG - 3'	5' - TTGCCTCTCCCTCAAG GG - 3'
miR479	5' - AGUGAUUUGGUUCGG CUCAUC - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CGATGAG - 3'	5' - GGGAGTGATATTGGTT CGG - 3'
miR828	5' - UCUUGCUCAAAUGAGU AUUCCA - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CTGGAAT - 3'	5' - GTTTGGTCTTGCTCAAA TGAGT - 3'
miR830	5' - UGACUUAUAUGAGAAG AAGUG - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CCACTTC - 3'	5' - GTTGGGGTGACTATTAT GAGAA - 3'
miR1446	5' - UUCUGAACUCUCUCCC UCA - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CTTGAGG - 3'	5' - GTGGGTTCTGAACTCT CTC - 3'
miR2111	5' - UAAUCUGCAUCCUGAG GUUUA - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CTAAACC - 3'	5' - GGGTAATCTGCATCC TGA - 3'
miR2118a	5' - UUUCCAAUCCACCCA UUCUA - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CTAGGAA - 3'	5' - GGGTTTCCAATTCCACC CA - 3'
miR2118b	5' - UUACCAAUCCACCCA UUCUA - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCCAA CTAGGAA - 3'	5' - GGGTTACCAATTCCAC CCA - 3'

Tablo 3.2: miRNA'ların hedef genleri ve hedef genlere ait forward ve reverse primerler

miRNA adı	Hedef gen adı	Forward/Reverse primer
miR157b	Squamosa promotör bağlanma benzeri protein	F: 5'-GGCCCAATAGTTCTCCTCA-3' R: 5'-CGACCTGGCAAGAAGGATGT-3'
miR170a, miR170b, miR170c	Scarecrow benzeri proteinler	F: 5'-GCAGGGTTCCACCAGTATCC-3' R: 5'-CTTCAGTGCCAAGCTGATGC-3'
miR398	Cu/Zn süperoksit dismutaz	F: 5'-AGGTTGCGGATCTATAACAATACT-3' R: 5'-GAAGGCGTGGCAAGTAACAG-3'
miR828	MYB transkripsiyon faktörleri	F: 5'-CCACTGAAGAAGAGTTCCCGT-3' R: 5'-TCTCTGAGTATCCTTCAATTCTGAT-3'
miR2111	F-box protein	F: 5'-TGGAGATTATTCCTTCTTCCCT-5' R: 5'-CAATTCGAGCTTGCGCCATT-3'
miR2118a, miR2118b	Pektat liyaz ailesi proteini	F: 5'-TCTTTTCTACCCCCACACCA-3' R: 5'-GATTCCTGATCCGCACGAT-3'

3.3. BİTKİLERİN BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ İLE YETİŞTİRİLMESİ VE STRES UYGULAMASI

Solanum pennellii, 4.5 ve 3.409 bitkilerinden her uygulama için (kontrol, %4 PEG ve %6 PEG) beşer adet olmak üzere toplamda on beş adet tohum önce %20'lik ticari çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyonu uygulamasına alındı. Yüzey sterilizasyonundan sonra ise tohumlar %3 sükröz (S-5391 Sigma-Aldrich) ve %0,8 agar (P1001.1000, Duchefa Biochemie) içeren Murashige and Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962) (M0222.0001, Duchefa biochemie) besiyerine ekildi. 14. gün sonunda dört yapraklı aşamaya gelen bitkiler kontrol için yeniden %3 sükröz ve %0,8 agar içeren ve kuraklık stresi uygulaması için sırasıyla %4 ve %6 polietilenglikol 6000 (PEG 6000) (807491, Merck millipore), %3 sükröz ve %0,8 agar içeren MS besiyerine aktarıldılar. Kuraklık stresi uygulamasının 14. gününün sonunda ise bitkiler eş zamanlı olarak toplandı ve sıvı azotta dondurulduktan sonra RNA izolasyonu yapılana kadar -80°C'de saklandı.

3.4. KÜÇÜK RNA'LARIN İZOLASYONU

Küçük RNA'lar ve total RNA izolasyonu mirVana miRNA izolasyon kiti (Ambion, by life technologies) ile izolasyon kitinin çalışma protokolüne bağlı kalınarak yapılmıştır. miRNA izolasyon kitinin çalışma protokolü:

- 0,1 gram bitki yaprağı 1000µl liziz tamponu (Lysis/Binding buffer) ile steril havanda homojenize edilmiştir.

- Elde edilen homojenatın toplam hacminin 1/10'u kadar miRNA homogenate additive tamponu eklenmiş ve 10 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.
- Buzdan alındıktan sonra örneklere homojenat hacmi kadar asit-fenol:kloroform eklenmiş, 30 saniye vorteks yapıldıktan sonra 5 dakika 10000g'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında asit-fenol:kloroform sebebiyle faz farkı oluşmuş, üst faz yeni bir tüpe alınmıştır. Elde edilen toplam hacmin 1,25 katı kadar %100 etanol eklenmiştir ve filtrelili tüplere alınmış, 30 saniye 10000g'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda filtreden geçen süpernatant atılmış, 700µl miRNA wash solution 1 eklenerek 15 saniye 10000g'de santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonunda filtreden geçen süpernatant atılmış, 500µl wash solution 2/3 eklenerek 15 saniye 10000g'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda filtreden geçen süpernatant atılmış, 500µl wash solution 2/3 eklenerek 15 saniye 10000g'de santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonunda filtreden geçen sıvı kısım atılmış, filtre boş olarak 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda filtre yeni bir santrifüj tüpüne alınmış, 50µl önceden 95°C'de bekletilmiş elution solution eklenmiştir. 30 saniye maksimum hızda santrifüj edilmiş ve filtreden geçen RNA'lar tüpe aktarılmıştır.
- Elde edilen RNA daha sonraki çalışmalar yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.5. RNA İZOLASYONUNUN NİTEL VE NİCEL ÖLÇÜMLERİ

RNA'ların nicel ölçümleri olan saflık ve konsantrasyon analizleri UV spektrofotometre (NanoDrop 2000c ThermoScientific) kullanılarak yapılmıştır (Downs ve Wilfinger, 1983).

RNA'ların nitel ölçümleri ise agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezi ile ilgili işlemler:

- 0,5 µg/ml etidyum bromür (Sigma-aldrich E1510) içeren %3'lük agaroz (Sigma-aldrich A5093) jel 1X TAE (Tris edta asetat) ile hazırlanmıştır.
- Agaroz jelin polimerizasyonun gerçekleşmesi için 30 dakika bekletilmiştir.
- Polimerize olan agaroz jele 1ng RNA, 1:1 RNA yükleme boyası (RNA loading dye mirVana ambion) ile karıştırılarak yüklenmiştir. Küçük RNA markerı da yüklenerek 70V'da 40 dakika yürütülmüştür.

- Agarozun jelin görüntülenmesi Bio-Rad jel görüntüleme sistemi Gel Doc XR System ile yapılmıştır.

3.6. cDNA SENTEZİ

cDNA sentezi miRNA'lar ve poliA RNA'lar (mRNA) için iki ayrı protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. PoliA Kuyruğu Taşıyan mRNA'lar İçin cDNA Sentezi

cDNA sentezi için iScript cDNA Synthesis Kit (170-8890 Bio-Rad) kullanılmıştır ve sentez kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için gereken reaksiyon bileşenleri Tablo 3.3'te, sentezin gerçekleşme koşulu ise Tablo 3.4'te gösterilmektedir.

Tablo 3.3: PoliA taşıyan mRNA'ların cDNA sentezi için gereken reaksiyon bileşenleri

İçerik	Her bir reaksiyon için gereken miktar
5X reaksiyon miktarı	4 µl
iScript reverse transcriptaz	1 µl
Nukleaz-free su	Değişken
RNA	200 ng
Toplam hacim	20 µl

Tablo 3.4: PoliA taşıyan mRNA'ların cDNA sentezi için gereken sentez koşulu

Derece	Zaman
25°C	5 dakika
45°C	30 dakika
85°C	5 dakika

3.6.2. miRNA'lar İçin cDNA Sentezi

miRNA'ların cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche 05091284001) kullanılmıştır ve sentez kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için gereken reaksiyon bileşenleri Tablo 3.5'te, sentezin gerçekleşme koşulu ise Tablo 3.6'da gösterilmektedir.

Tablo 3.5: miRNA'ların cDNA sentezi için gereken reaksiyon bileşenleri

İçerik	Her bir reaksiyon için gereken miktar	Son konsantrasyon
dH₂O	Değişken	10 µl tamamlamak için
Stem-loop primer (250nM)	2 µl	50nM
5X reaksiyon tamponu	2 µl	8mM MgCl ₂
Protector RNase inhibitor	0,25 µl	20 ünite
dNTP mix	1 µl	1mM her biri
Transcriptor reverse transcriptase	0,25 µl	1 ünite
miRNA	Değişken	200 ng

Tablo 3.6:miRNA'ların cDNA sentezi için gereken sentez koşulu

Zaman	Derece	Siklus sayısı
30 dakika	16°C	1
30 saniye	20°C	60
30 dakika	42°C	
1 saniye	50°C	
5 dakika	85°C	1
1 dakika	4°C	1

3.7. qRT-PCR

Tez kapsamında kuraklık stresi ile ilişkili miRNA'ların ve bu miRNA'ların hedef genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR analizi ile gösterilmiştir. qRT-PCR analizleri Bio-Rad CFX Connect Real Time PCR cihazı ile yapılmıştır. qRT-PCR için gereken reaksiyon bileşenleri Tablo 3.7'de, gerçekleşme koşulu ise Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: qRT-PCR için gereken reaksiyon bileşenleri

İçerik	Miktar
Primer	2 µl
dH₂O	5,5 µl
cDNA	2,5 µl
SYBR Green IQ supermix (Bio-Rad 170-8882)	10 µl

Tablo 3.8: qRT-PCR koşulu

PCR cihazı okuma modu	Derece	Zaman	Siklus sayısı
SYBR Green	95°C	3 dakika	1
	95°C	10 saniye	40
	55°C	30 saniye	
	72°C	60 saniye	
	95°C-55°C	5 saniye	Erime eğrisi (0,5°C her bir siklus değişimi)

3.8. qRT-PCR ANALİZ METODU

qRT-PCR sonucunda elde edilen cT değerleri Pfaffl metodu kullanılarak analiz edilmiş ve anlaşılabilir veriler haline getirilmiştir. Bu metodda içsel kontrol olarak kullanılan uzama faktörü 1 alfa'ya (eEF1a1) oranla rölatif gen ifade farkları hesaplanmıştır. Hesaplama kullanılan formül aşağıdaki gibidir (Referans olarak elongation faktör 1 alpha geni kullanılmıştır.) (Pfaffl, 2001).

$$\frac{(E_{hedef})^{\Delta C_{T_{hedef}}(kontrol-uygulama)}}{(E_{referans})^{\Delta C_{T_{referans}}(kontrol-uygulama)}}$$

4. SONUÇLAR

4.1. KURAKLIK STRESİ UYGULAMASININ SONUÇLARI

Çalışmada iki mutant domates hattı 4.5, 3.409 ve yabani tip *Solanum pennellii*ye uygulanan %4 ve %6 PEG 6000 uygulamalarının sonuçları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: *in vitro* kuraklık stresine ait sonuçlar (A) *Solanum pennelli* (B) 4.5 (C) 3.409

4.2. miRNA GEN İFADESİ ANALİZ SONUÇLARI

Çalışmada elde edilen cT değerleri 3 teknik tekrar sonucunda onların ortalamaları hesaplanarak elde edilmiştir. Uzama faktörü 1 alfa için her çalışmada tekrar PCR yapılmış, hepsinin ortalaması alınarak sonuç elde edilmiştir. Çalışma sonucunda tüm hesaplamalar yapılarak elde edilen cT değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.



Tablo 4.1: miRNA ve uzama faktörü 1 alfa cT değerleri

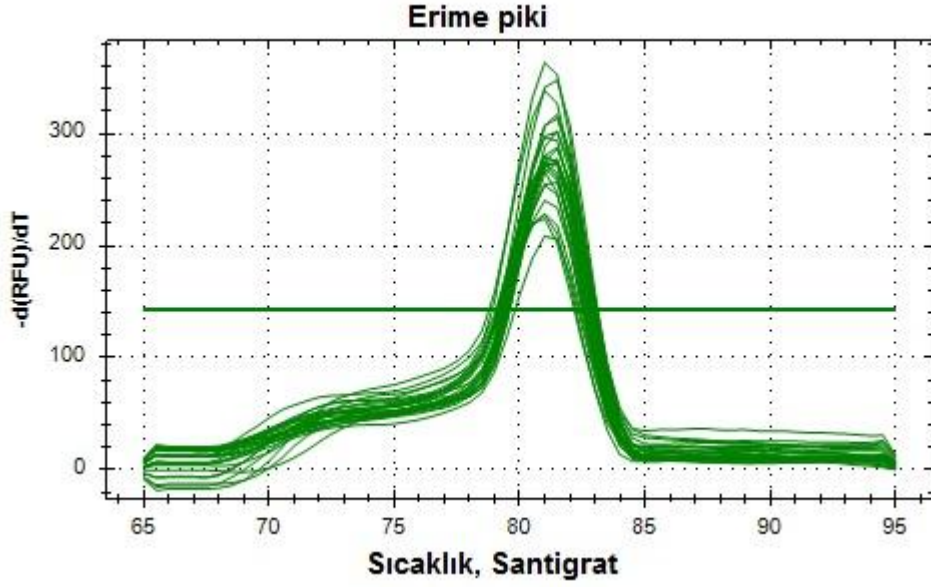
	Solanum pennellii kontrol	Solanum pennellii %4 PEG	Solanum pennellii %6 PEG	4.5 kontrol	4.5 %4 PEG	4.5 %6 PEG	3.409 kontrol	3.409 %4 PEG	3.409 %6 PEG
eEF1a1	20,33 ±0,3	20,30 ±0,5	20,43 ±0,2	20,10 ±0,4	20,25 ±0,5	20,28 ±0,2	20,10 ±0,6	20,35 ±0,5	20,26 ±0,4
miR157b	34,65 ±0,2	35,57 ±0,4	36,36 ±0,5	36,41 ±0,3	38,22 ±0,2	38,65 ±0,4	35,44 ±0,4	35,91 ±0,6	36,11 ±0,1
miR170a	33,68 ±0,5	33,84 ±0,3	34,29 ±0,4	32,82 ±0,5	33,33 ±0,4	33,61 ±0,3	34,36 ±0,3	34,68 ±0,1	34,62 ±0,5
miR170b	28,39 ±0,4	28,82 ±0,6	29,36 ±0,4	28,34 ±0,1	28,76 ±0,5	28,89 ±0,5	27,54 ±0,5	27,96 ±0,5	27,97 ±0,4
miR170c	28,37 ±0,3	28,95 ±0,2	29,58 ±0,6	26,75 ±0,3	27,24 ±0,2	27,56 ±0,4	28,16 ±0,4	28,71 ±0,1	28,74 ±0,2
miR398	32,64 ±0,2	33,22 ±0,1	33,66 ±0,4	31,12 ±0,4	32,03 ±0,4	32,33 ±0,2	32,23 ±0,2	32,58 ±0,2	32,48 ±0,4
miR473	34,70 ±0,5	33,63 ±0,4	33,57 ±0,2	34,53 ±0,6	33,95 ±0,3	33,90 ±0,4	33,20 ±0,1	33,12 ±0,3	32,92 ±0,4
miR479	26,69 ±0,6	27,27 ±0,6	28,85 ±0,4	26,26 ±0,2	26,49 ±0,5	26,60 ±0,1	26,42 ±0,2	26,79 ±0,2	26,68 ±0,5
miR828	32,27 ±0,4	33,41 ±0,5	34,20 ±0,5	34,25 ±0,1	35,02 ±0,3	35,44 ±0,2	32,92 ±0,3	33,18 ±0,5	33,31 ±0,4
miR830	34,55 ±0,7	35,22 ±0,4	35,53 ±0,6	34,18 ±0,5	34,58 ±0,4	34,62 ±0,4	33,20 ±0,4	34,67 ±0,4	34,72 ±0,2
miR1446	35,32 ±0,2	35,33 ±0,5	35,53 ±0,2	34,18 ±0,3	34,58 ±0,5	34,46 ±0,5	34,37 ±0,4	34,44 ±0,6	34,39 ±0,4
miR2111	32,26 ±0,4	32,14 ±0,3	31,60 ±0,3	31,11 ±0,4	31,01 ±0,7	30,98 ±0,6	30,24 ±0,5	30,52 ±0,2	30,16 ±0,3
miR2118a	30,91 ±0,3	30,39 ±0,2	29,99 ±0,4	30,43 ±0,5	29,89 ±0,4	29,83 ±0,7	31,16 ±0,6	31,40 ±0,3	31,15 ±0,5
miR2118b	30,21 ±0,6	29,76 ±0,4	29,53 ±0,4	28,88 ±0,4	28,49 ±0,1	29,29 ±0,6	30,24 ±0,4	30,52 ±0,4	30,49 ±0,6

4.3. miRNA GEN İFADESİ ANALİZ GRAFİKLERİ

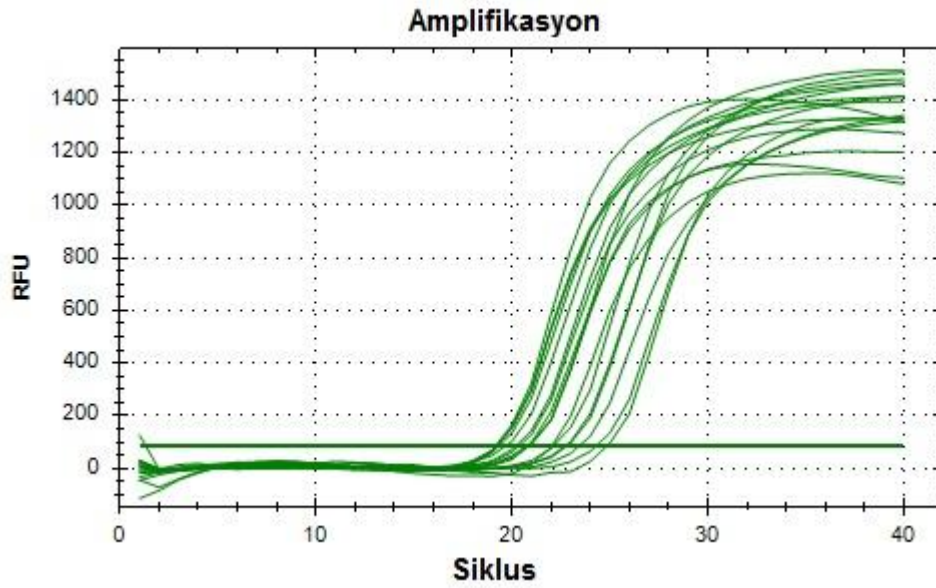
miRNA gen ifadelerinin erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri qRT-PCR sonucunda primerlerin doğru yerlere bağlandıklarını göstermek amacıyla verilmiştir.

4.3.1. İçsel Kontrol Uzama Faktörü 1 Alfa Analiz Sonucu

İçsel standart genine ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.



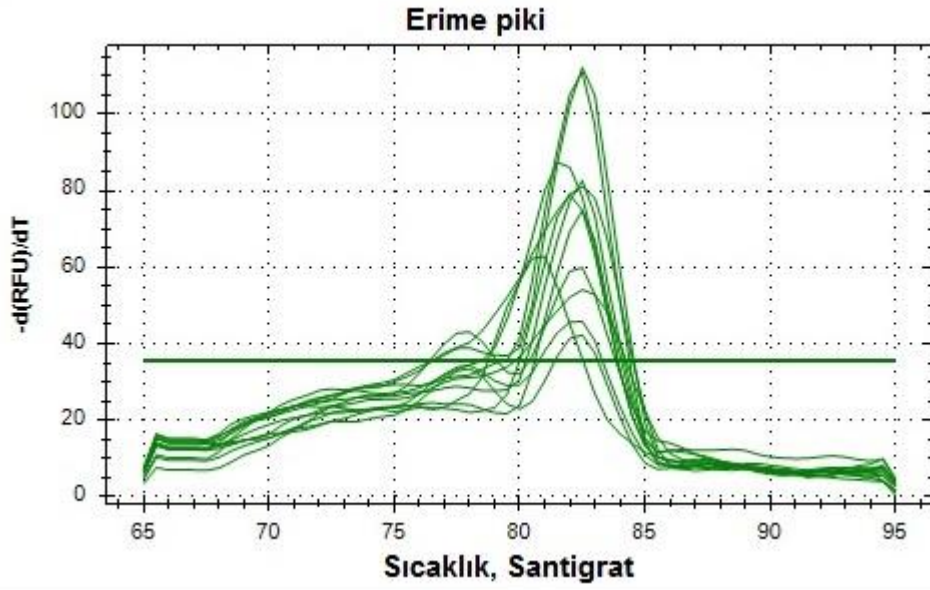
Şekil 4.2: Uzama faktörü 1 alfa erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



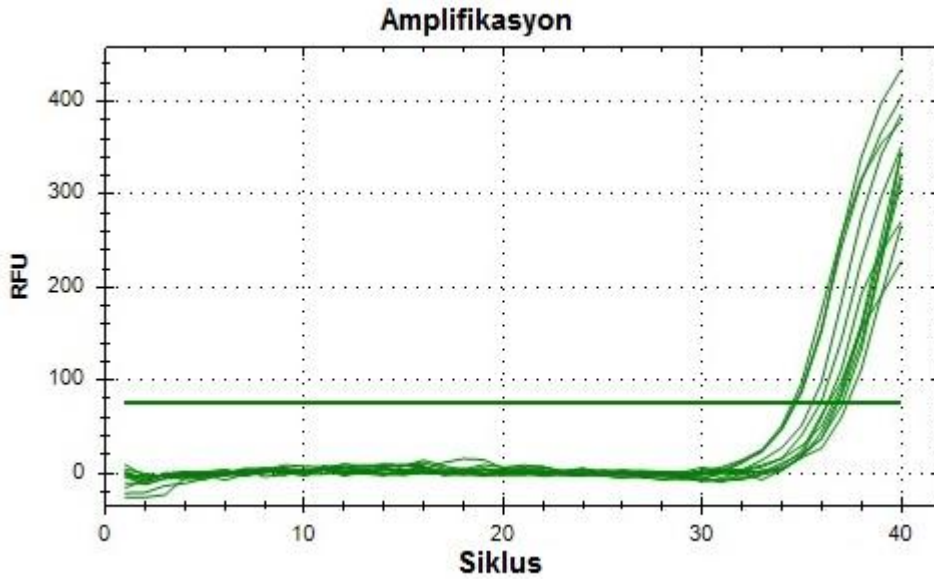
Şekil 4.3: Uzama faktörü 1 alfa amplifikasyon eğrisi

4.3.2. miR157b Analiz Sonucu

miR157b'ye ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.



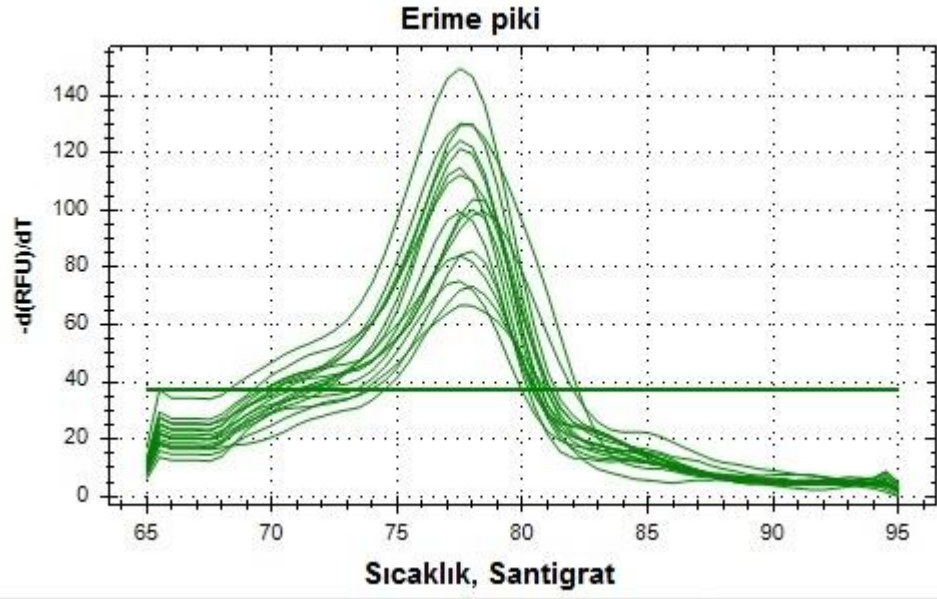
Şekil 4.4: miR157b erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



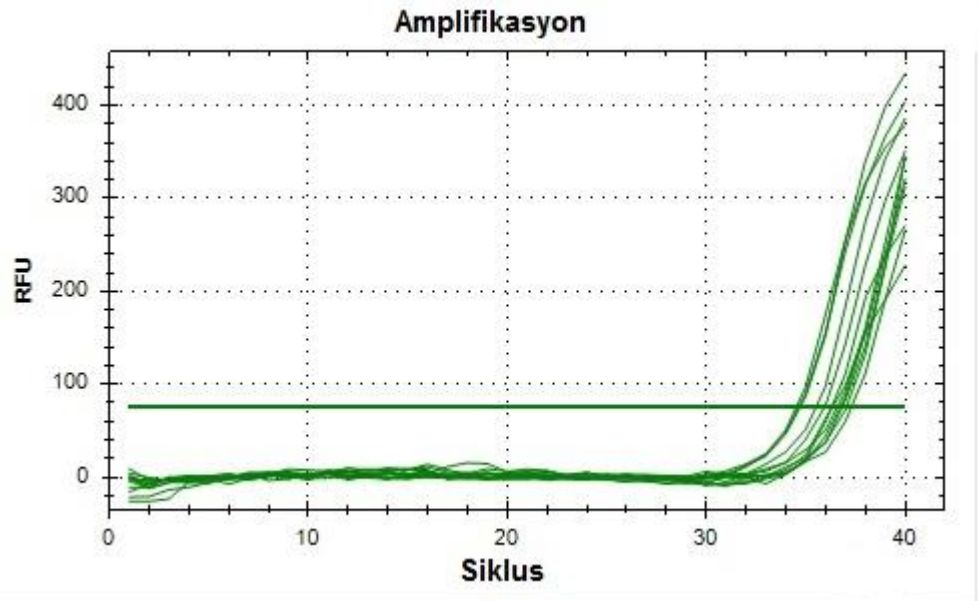
Şekil 4.5: miR157b amplifikasyon eğrisi

4.3.3. miR170a Analiz Sonucu

miR170a'ya ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.



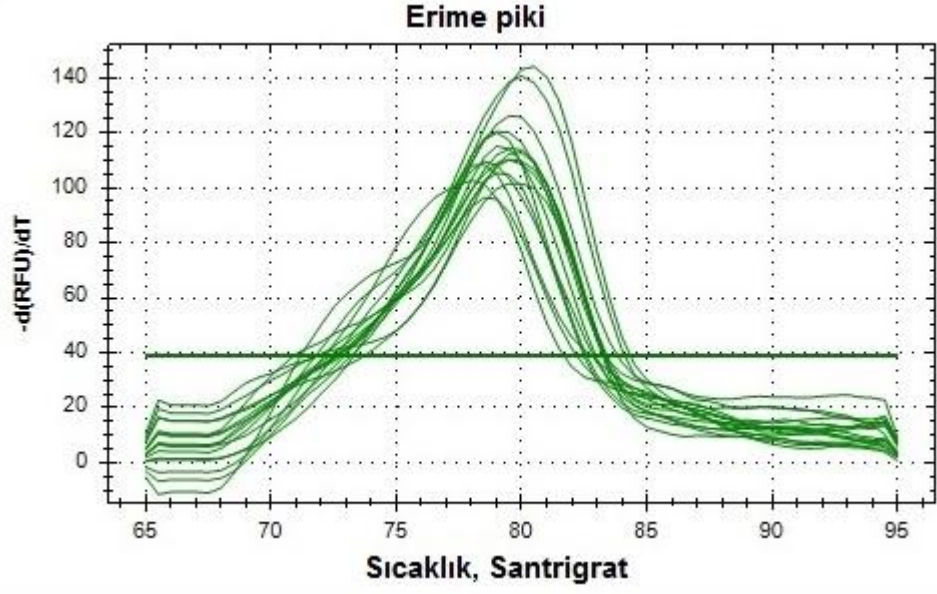
Şekil 4.6: miR170a erime piki. RFU: Relatif floresan ünitesi (okunan floresan miktarı)



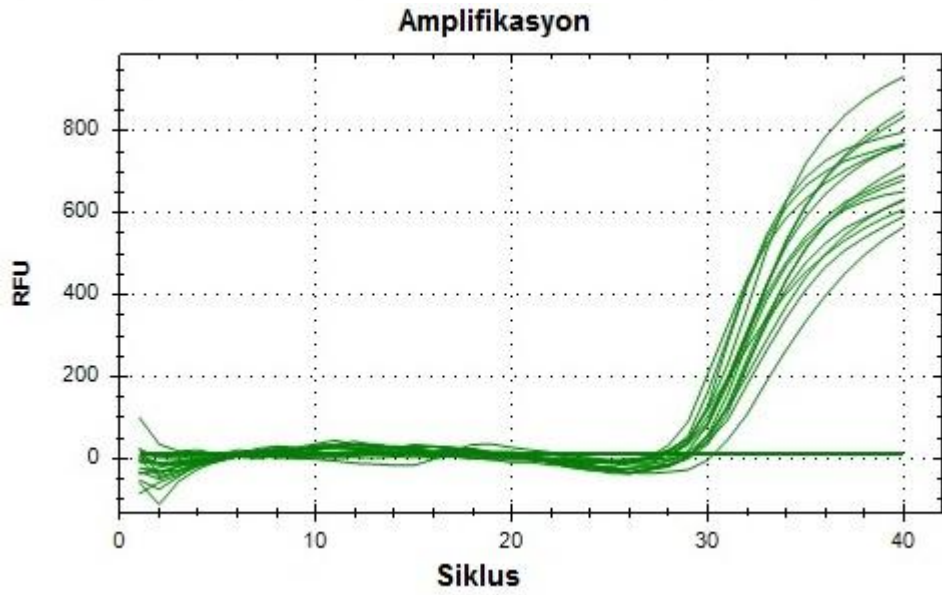
Şekil 4.7: miR170a amplifikasyon eğrisi

4.3.4. miR170b Analiz Sonucu

miR170b'ye ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.



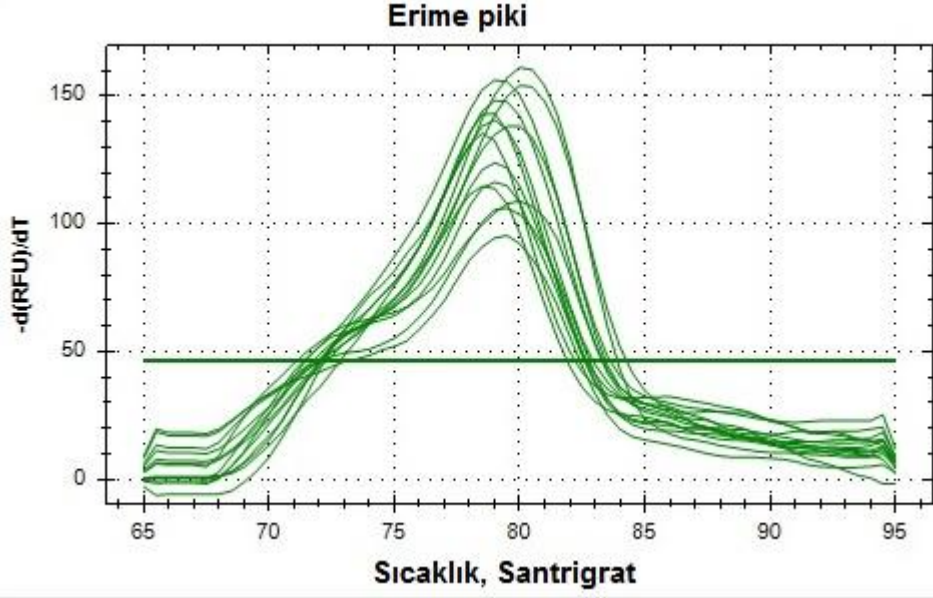
Şekil 4.8: miR170b erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



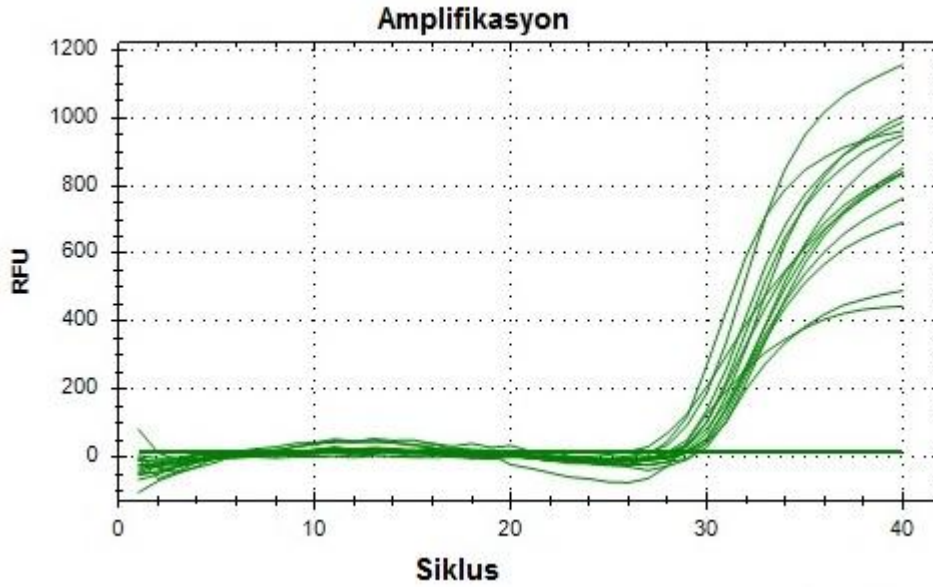
Şekil 4.9: miR170b amplifikasyon eğrisi

4.3.5. miR170c Analiz Sonucu

miR170c'ye ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.



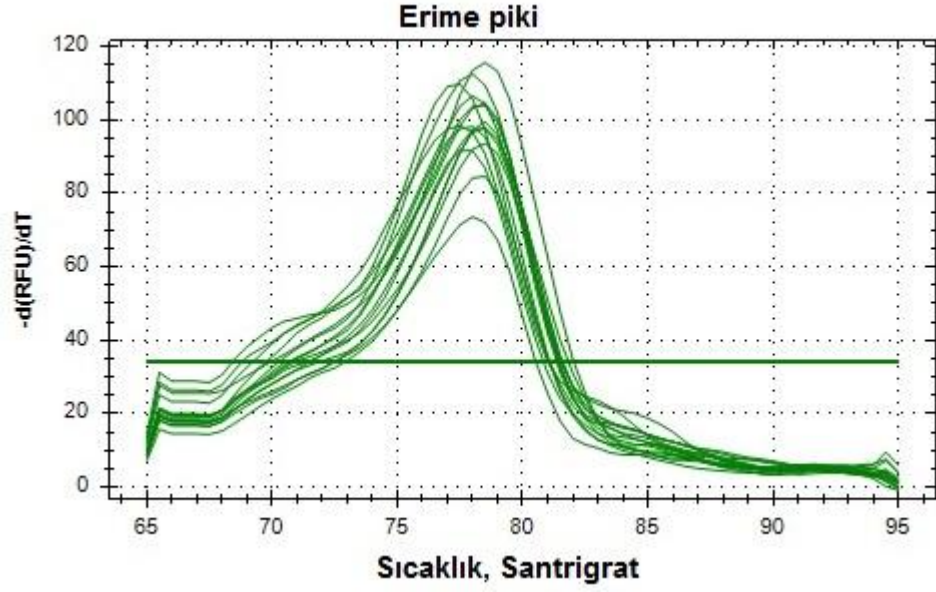
Şekil 4.10: miR170c erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



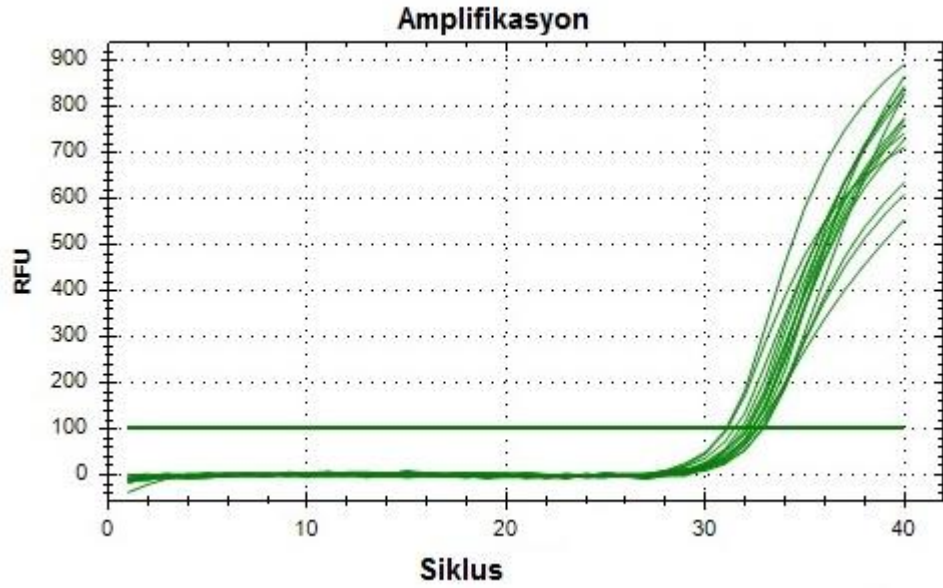
Şekil 4.11: miR170c amplifikasyon eğrisi

4.3.6. miR398 Analiz Sonucu

miR398'e ait qRT-PCR analizine ait erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te verilmiştir.



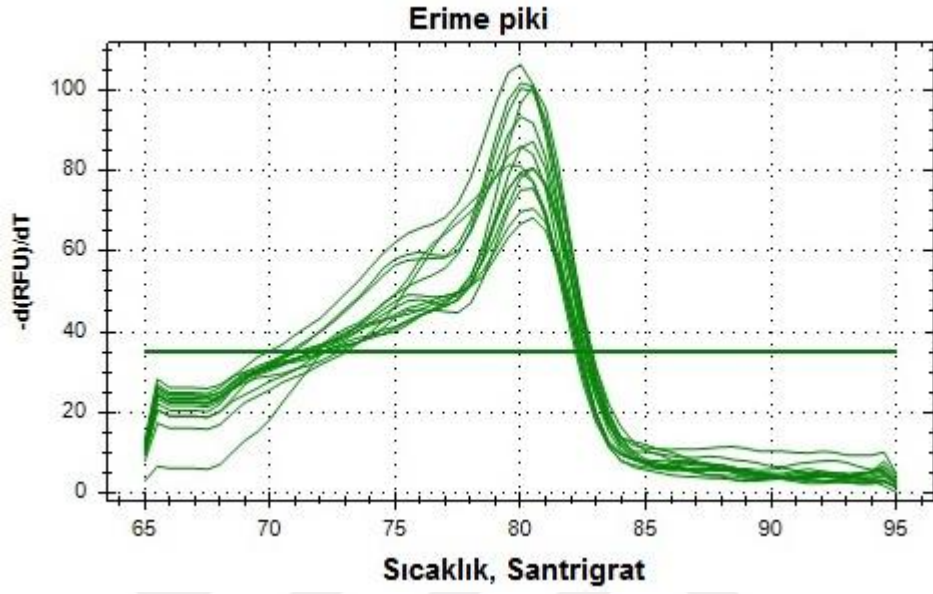
Şekil 4.12:miR398 erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



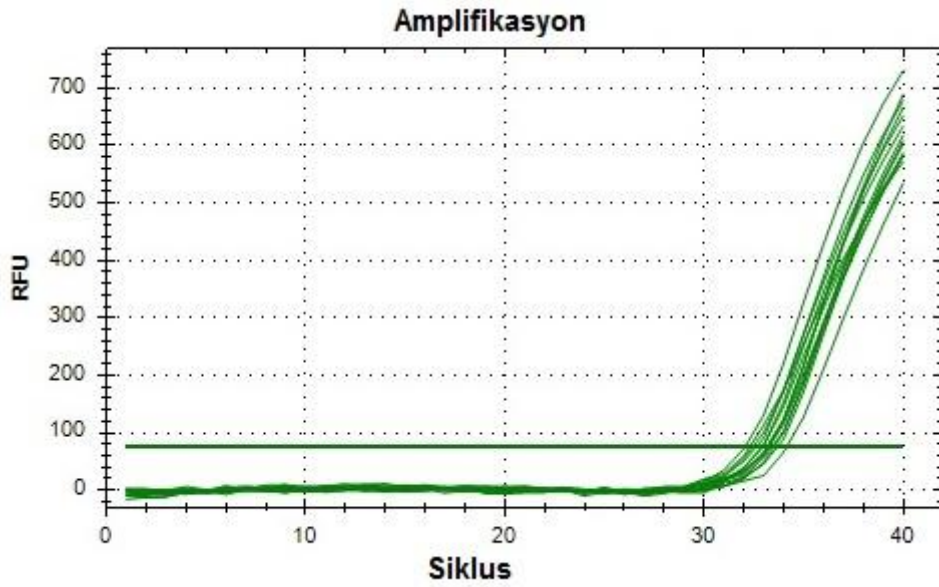
Şekil 4.13:miR398 amplifikasyon eğrisi

4.3.7. miR473 Analiz Sonucu

miR473'e ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir.



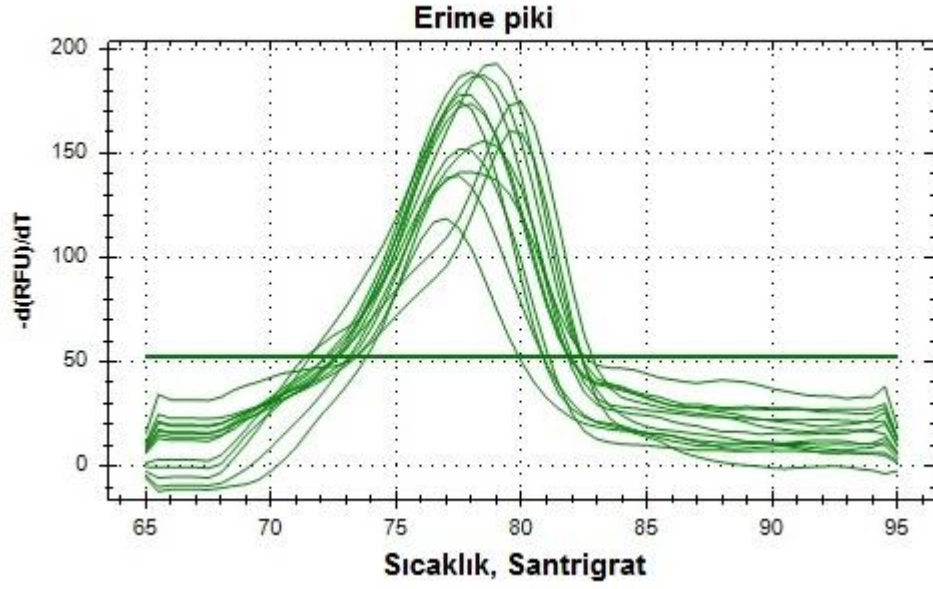
Şekil 4.14:miR473 erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



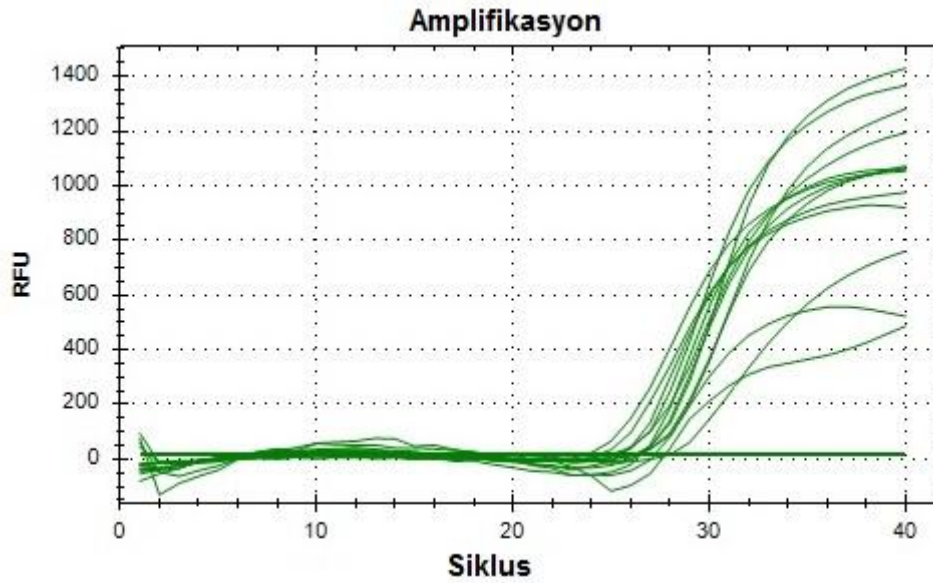
Şekil 4.15:miR473 amplifikasyon eğrisi

4.3.8. miR479 Analiz Sonucu

miR479'a ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir.



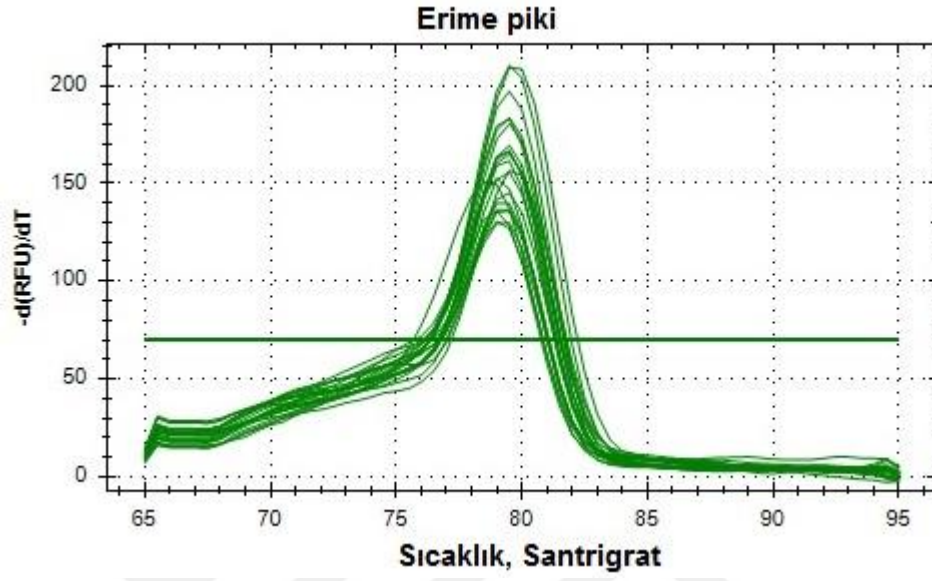
Şekil 4.16: miR479 erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



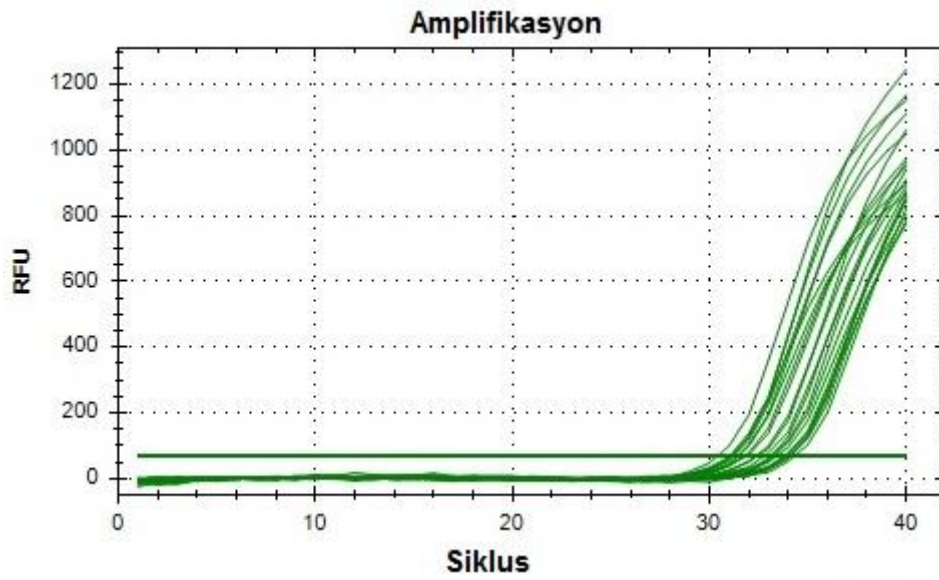
Şekil 4.17: miR479 amplifikasyon eğrisi

4.3.9. miR828 Analiz Sonucu

miR828'e ait qRT-PCR analizi ait erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.



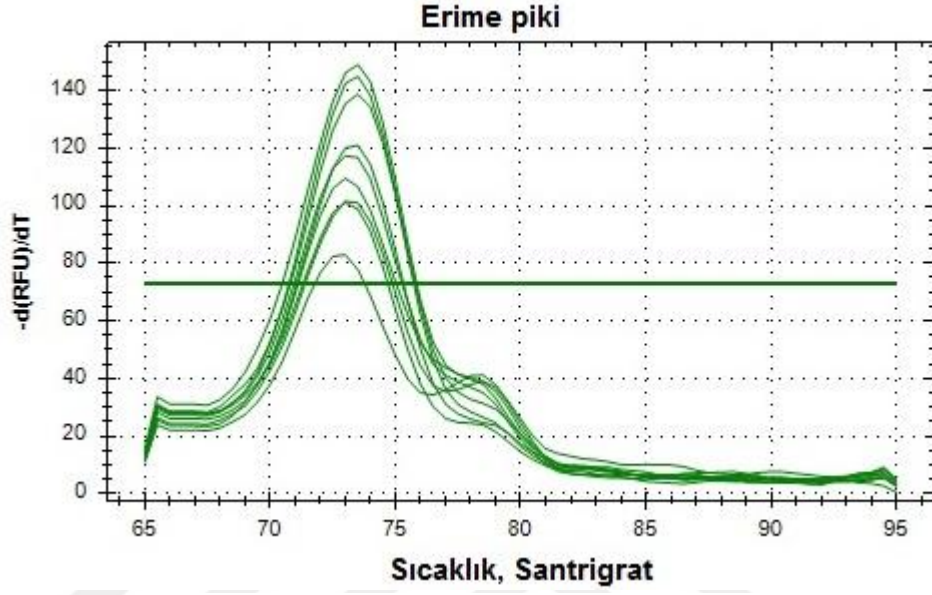
Şekil 4.18:miR828 erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



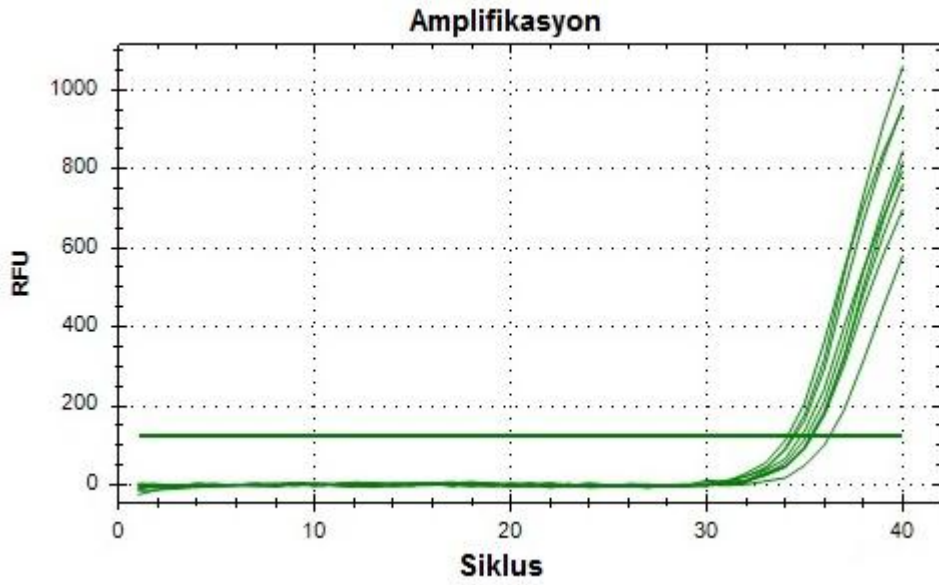
Şekil 4.19:miR828 amplifikasyon eğrisi

4.3.10. miR830 Analiz Sonucu

miR830'a ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de verilmiştir.



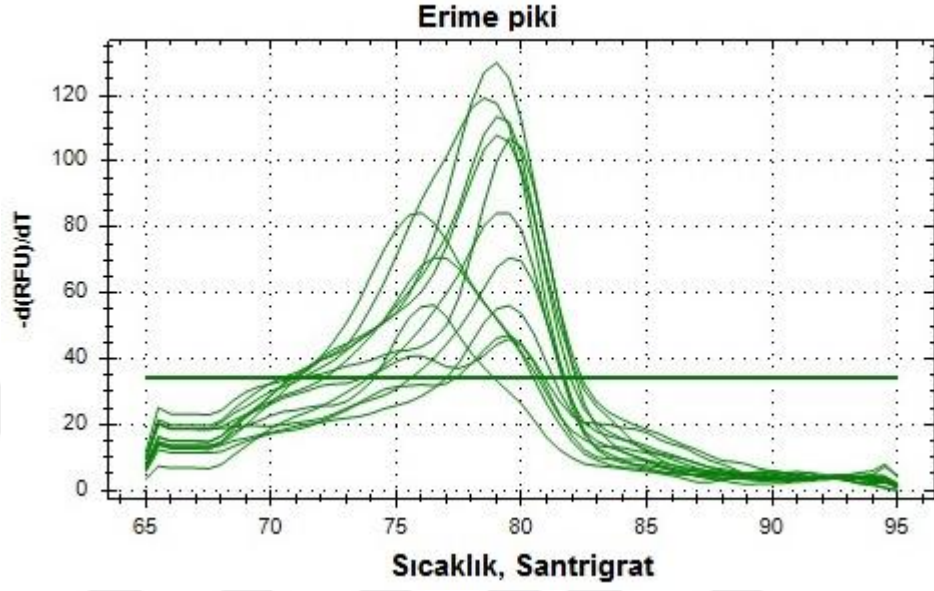
Şekil 4.20:miR830 erime piki. RFU: Relatif floresan ünitesi (okunan floresan miktarı)



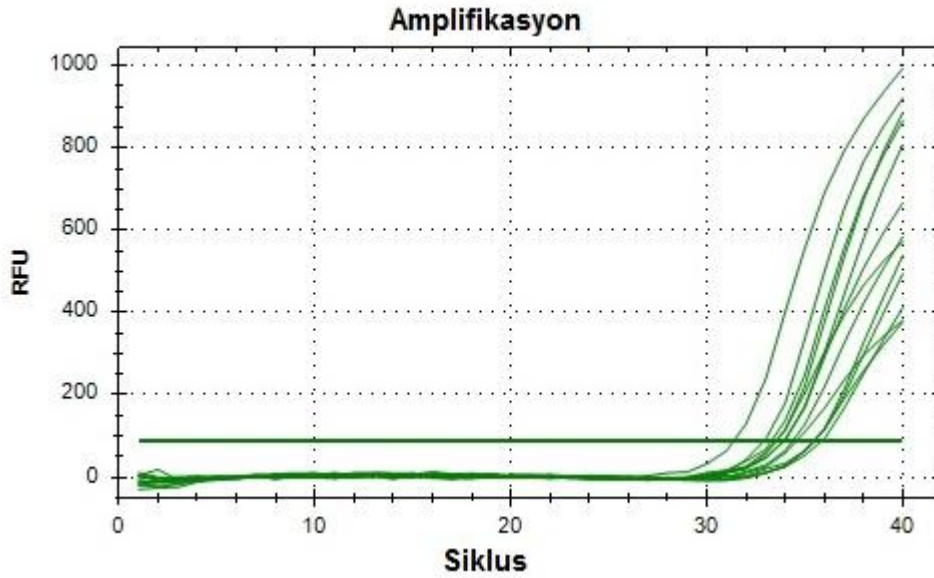
Şekil 4.21:miR830 amplifikasyon eğrisi

4.3.11. miR1446 Analiz Sonucu

miR1446'ya ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te verilmiştir.



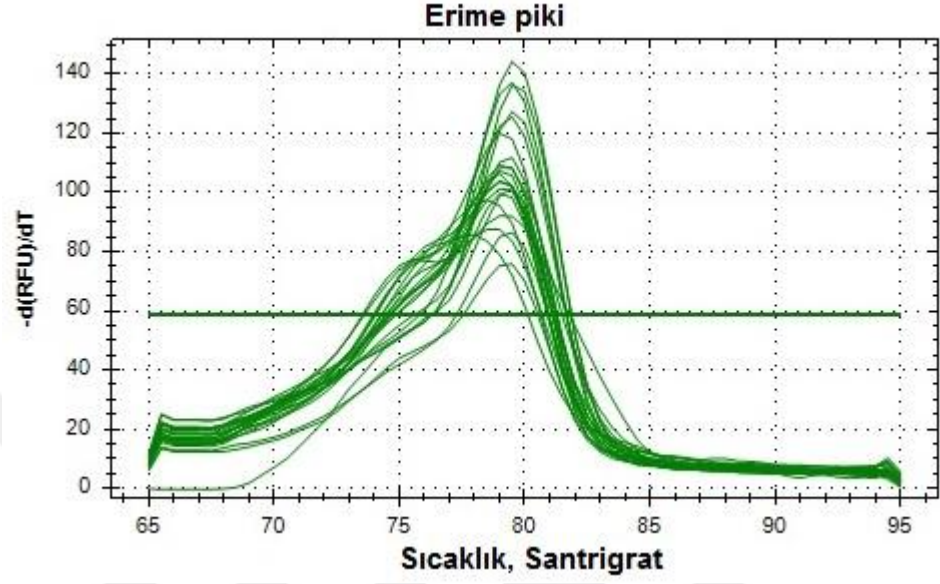
Şekil 4.22:miR1446 erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



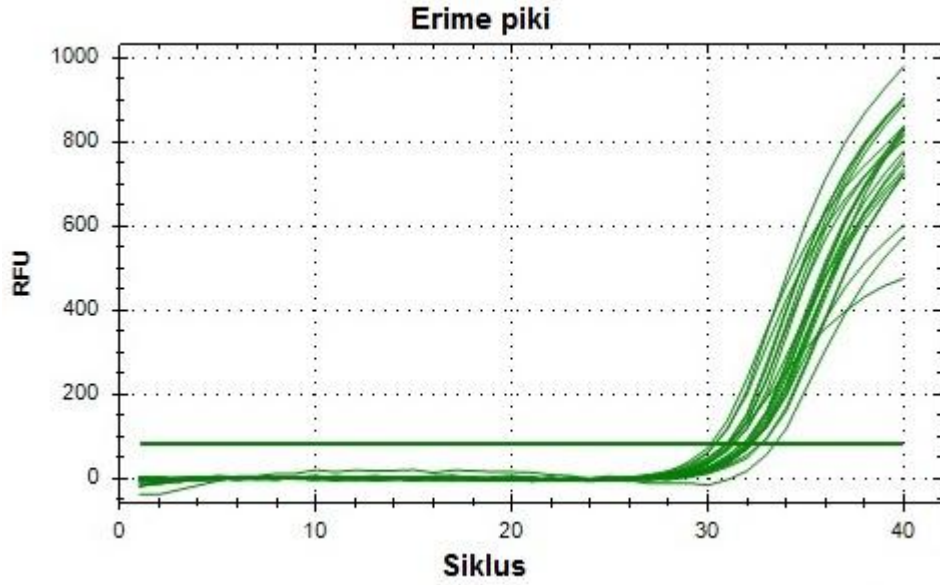
Şekil 4.23:miR1446 amplifikasyon eğrisi

4.3.12. miR2111 Analiz Sonucu

miR2111'e ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te verilmiştir.



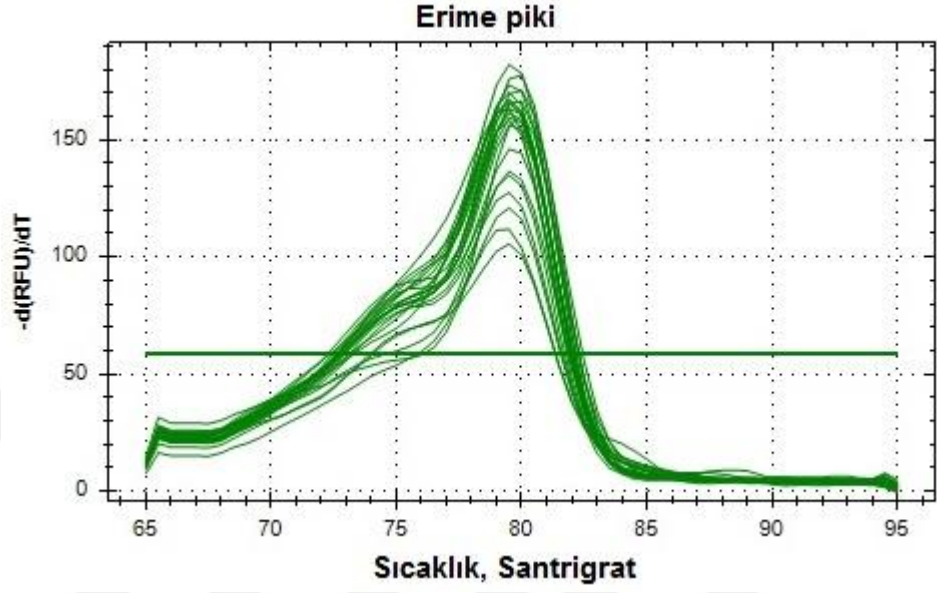
Şekil 4.24:miR2111 erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



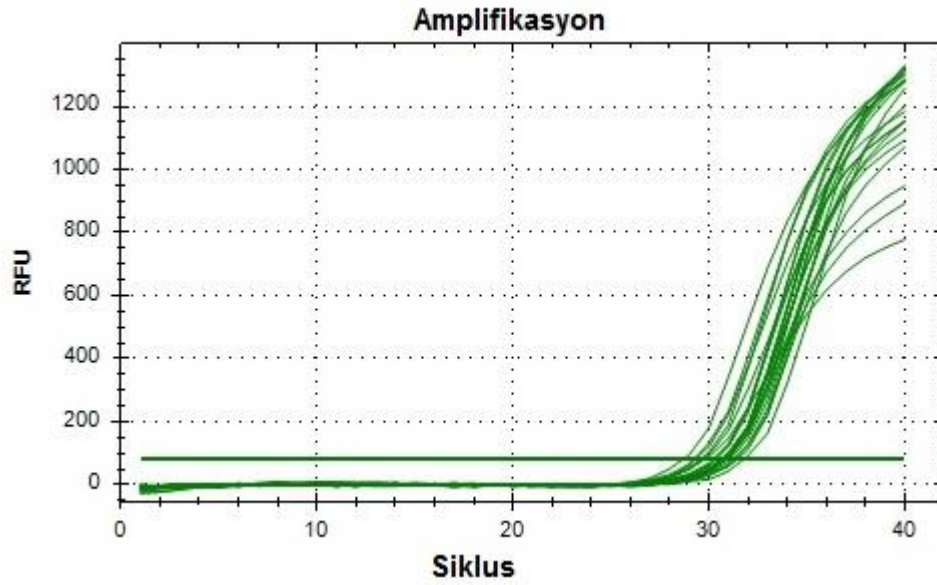
Şekil 4.25:miR2111 amplifikasyon eğrisi

4.3.13. miR2118a Analiz Sonucu

miR2118a'ya ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.26 ve Şekil 4.27'de verilmiştir.



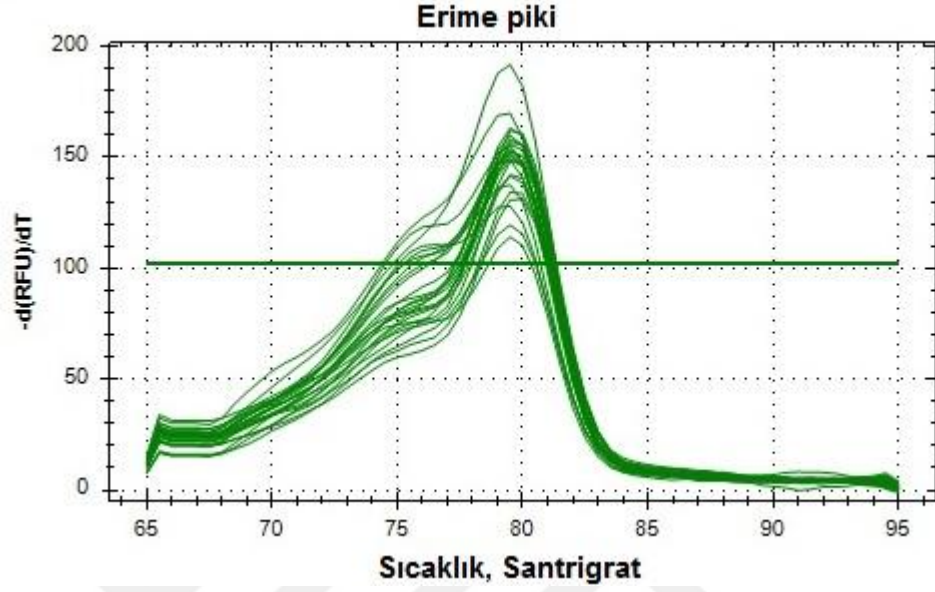
Şekil 4.26:miR2118a erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



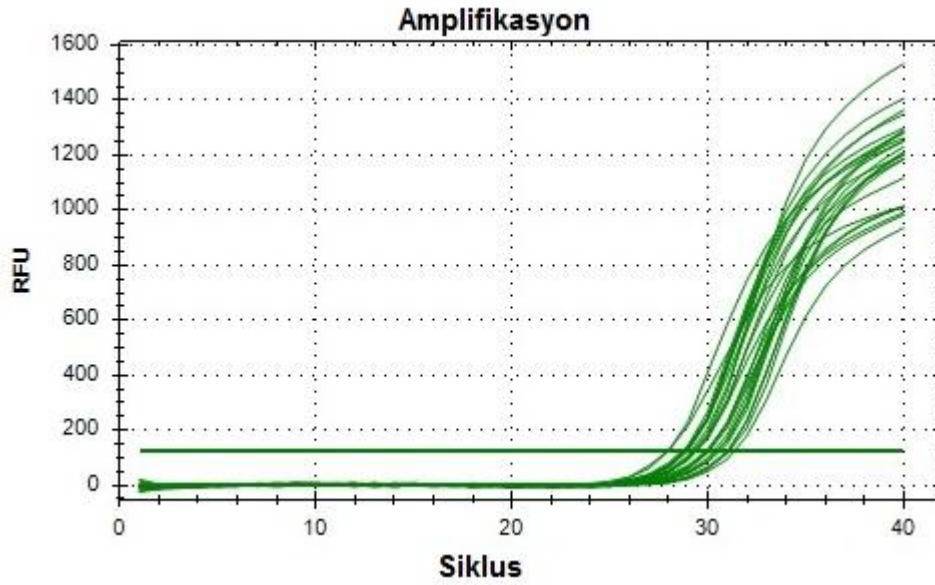
Şekil 4.27:miR2118a amplifikasyon eğrisi

4.3.14. miR2118b Analiz Sonucu

miR2118b'ye ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.28:miR2118b erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



Şekil 4.29:miR2118b amplifikasyon eğrisi

4.4. HEDEF GENLERİN GEN İFADESİ ANALİZ SONUÇLARI

Tez kapsamında kuraklıkla ilişkili olan miRNA'ların hedef aldıkları genlerin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Elde edilen cT değerleri 3 teknik tekrar sonucunda ortalamaları hesaplanarak elde edilmiştir. Elongation faktör 1 alpha için her çalışmada tekrar PCR yapılmış, hepsinin ortalaması alınarak sonuç elde edilmiştir. Çalışma sonucunda tüm hesaplamalar yapılarak elde edilen cT değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2: Hedef genler ve uzama faktörü 1 alfa cT değerleri

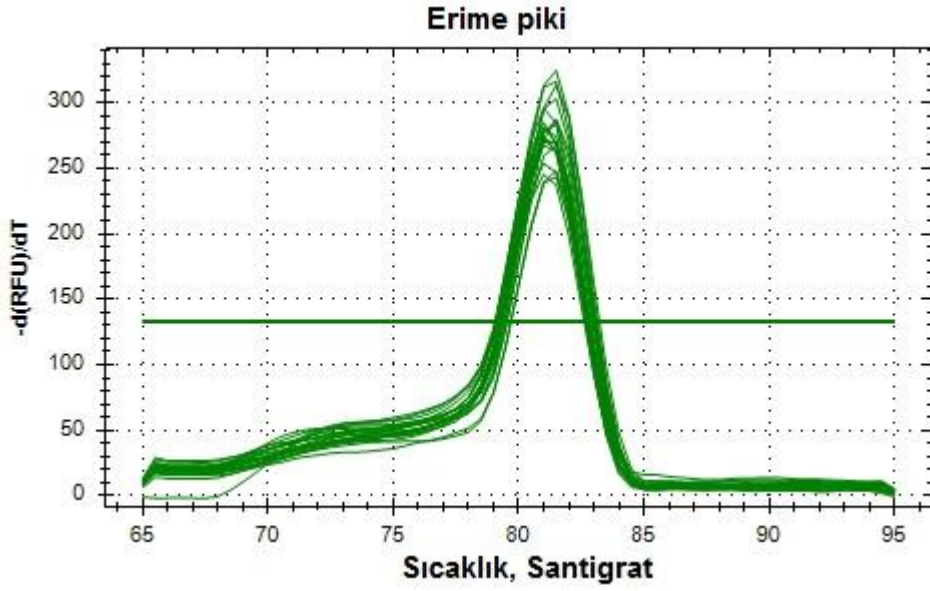
	Solanum pennellii kontrol	Solanum pennellii %4 PEG	Solanum pennellii %6 PEG	4.5 kontrol	4.5 %4 PEG	4.5 %6 PEG	3.409 kontrol	3.409 %4 PEG	3.409 %6 PEG
eEF1a1	20,30 ±0,2	20,06 ±0,3	20,32 ±0,5	20,26 ±0,2	20,25 ±0,4	20,34 ±0,3	20,16 ±0,4	20,36 ±0,4	20,24 ±0,4
Squamosa promotör bağlanma proteini	29,62 ±0,3	28,75 ±0,4	28,57 ±0,4	29,67 ±0,3	28,91 ±0,2	28,78 ±0,5	29,13 ±0,2	28,97 ±0,3	28,84 ±0,3
Scarecrow benzeri protein	27,81 ±0,5	26,87 ±0,5	26,83 ±0,5	27,82 ±0,4	27,34 ±0,1	27,10 ±0,4	28,49 ±0,5	28,58 ±0,2	28,19 ±0,4
Cu/Zn süperoksit dismutaz	28,01 ±0,4	27,04 ±0,4	26,36 ±0,4	27,51 ±0,5	26,81 ±0,5	26,25 ±0,1	27,85 ±0,4	27,68 ±0,6	27,30 ±0,6
MYB domainli TF	30,80 ±0,3	30,23 ±0,3	30,43 ±0,2	30,73 ±0,4	30,49 ±0,4	30,36 ±0,7	31,12 ±0,3	31,42 ±0,4	31,30 ±0,4
F-box	28,40 ±0,4	30,39 ±0,4	31,07 ±0,1	29,60 ±0,6	30,60 ±0,6	30,64 ±0,6	29,99 ±0,4	30,78 ±0,5	30,50 ±0,2
Pektat liyaz	30,32 ±0,6	30,56 ±0,5	31,32 ±0,4	30,25 ±0,3	30,52 ±0,1	30,75 ±0,5	29,70 ±0,6	30,11 ±0,1	30,04 ±0,3

4.5. HEDEF GENLERİN GEN İFADESİ ANALİZ GRAFİKLERİ

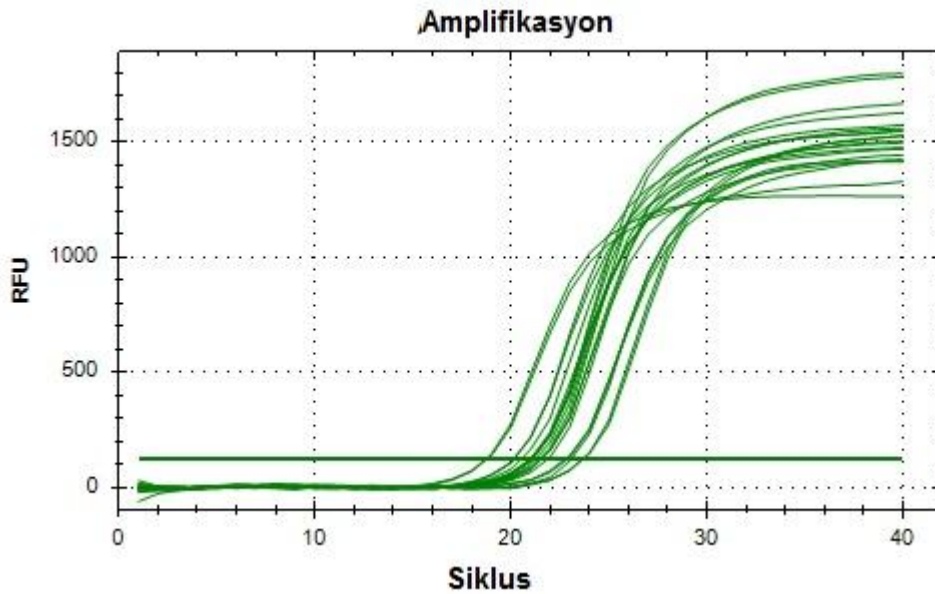
Hedef genlerin gen ifadelerinin erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri qRT-PCR sonucunda primerlerin doğru yerlere bağlandıklarını göstermek amacıyla verilmiştir.

4.5.1. İçsel Kontrol Uzama Faktörü 1 Alfa Analiz Sonucu

İçsel standart genine ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de verilmiştir.



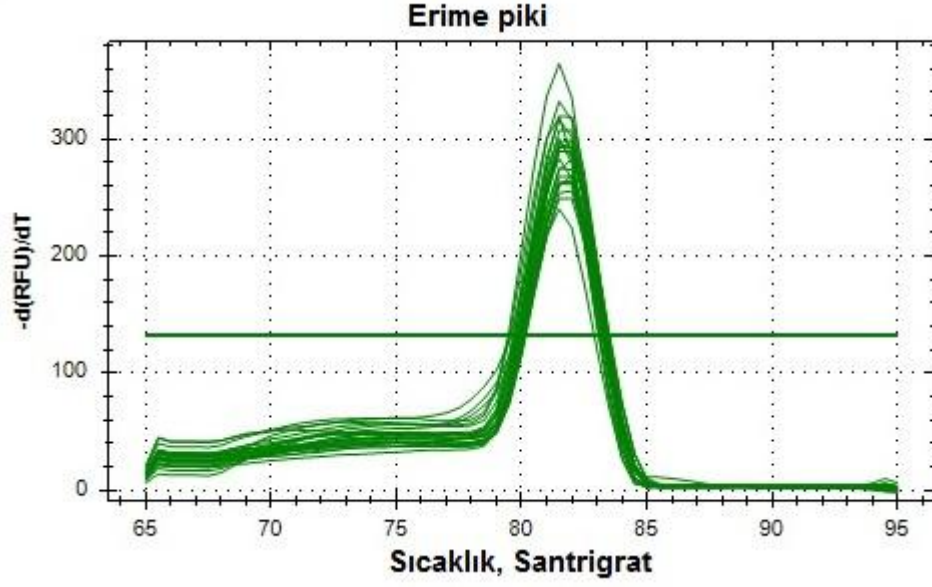
Şekil 4.30: Uzama faktörü 1 alfa erimepiki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



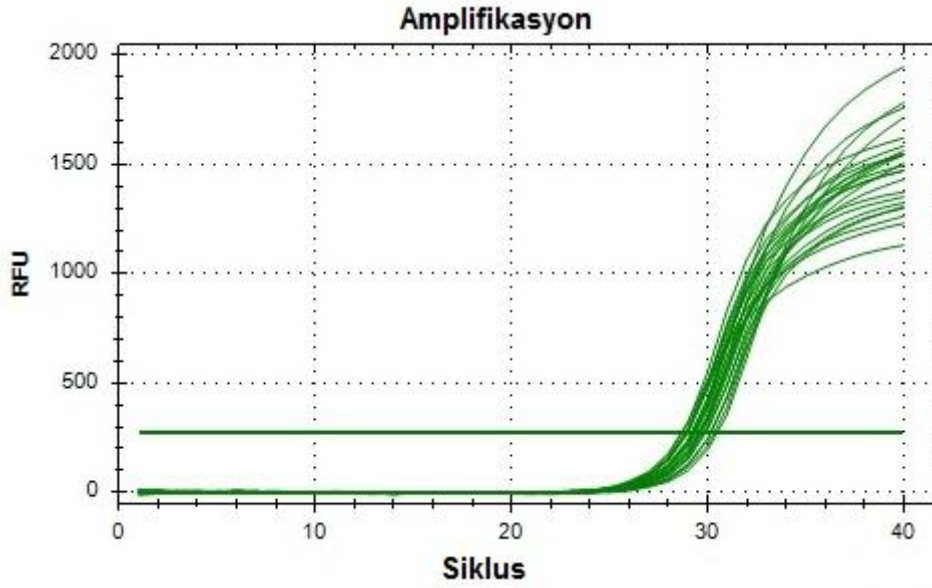
Şekil 4.31: Uzama faktörü 1 alfa amplifikasyon eğrisi

4.5.2. Squamosa Promotör Bağlanma Benzeri Protein Analiz Sonucu

miR157b'nin hedefi olan squamosa promotör bağlanma benzeri proteinine ait qRT-PCR analizinden elde edilen ait erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'de verilmiştir.



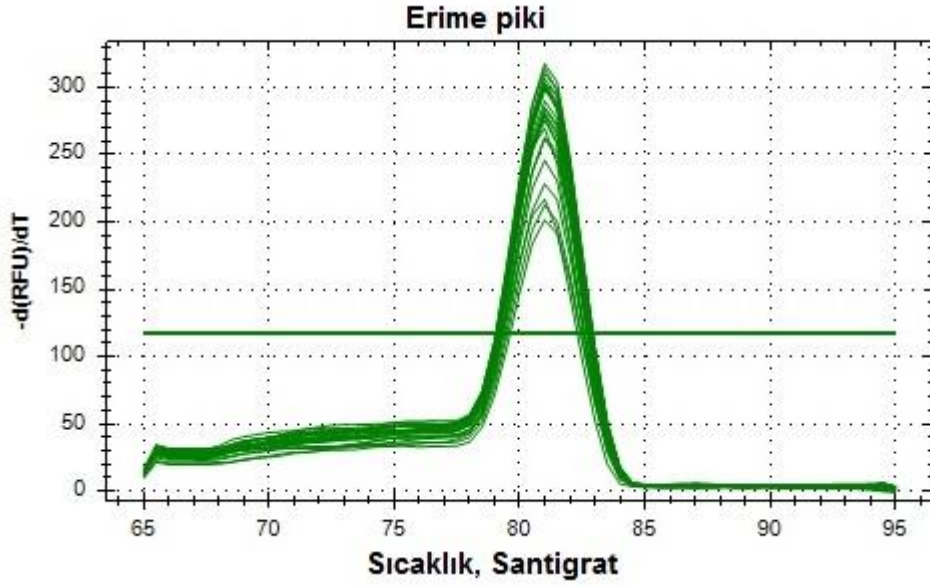
Şekil 4.32: Squamosa promotör bağlanma benzeri protein erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



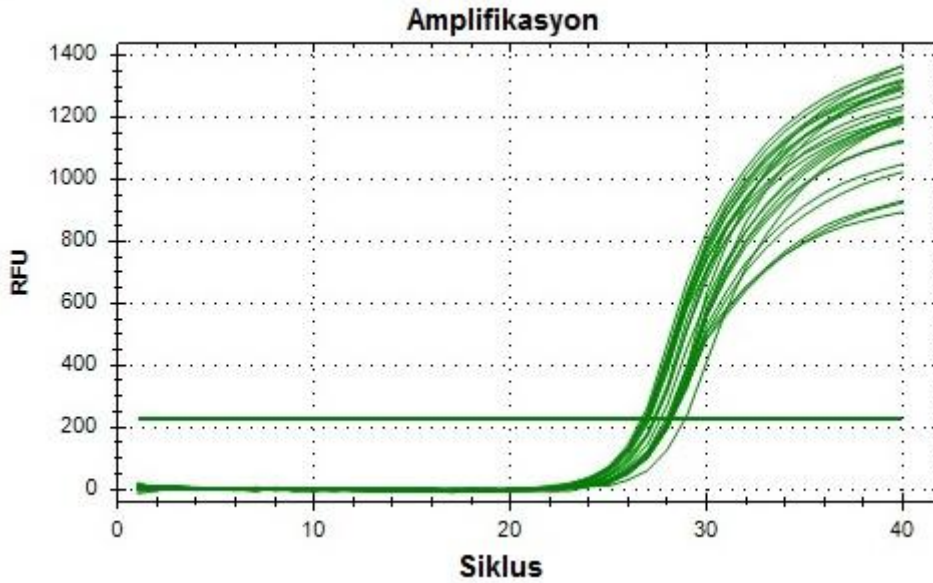
Şekil 4.33: Squamosa promotör bağlanma benzeri protein amplifikasyon eğrisi

4.5.3. Scarecrow Benzeri Protein Analiz Sonucu

miR170 ailesinin hedefi olan scarecrow benzeri proteine ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.34 ve Şekil 4.35'de verilmiştir.



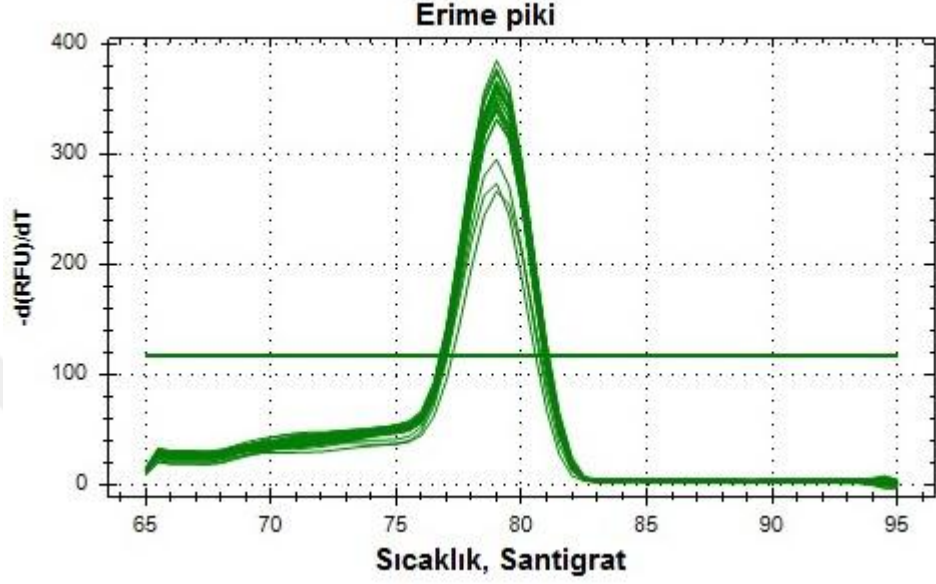
Şekil 4.34: Scarecrow benzeri protein erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



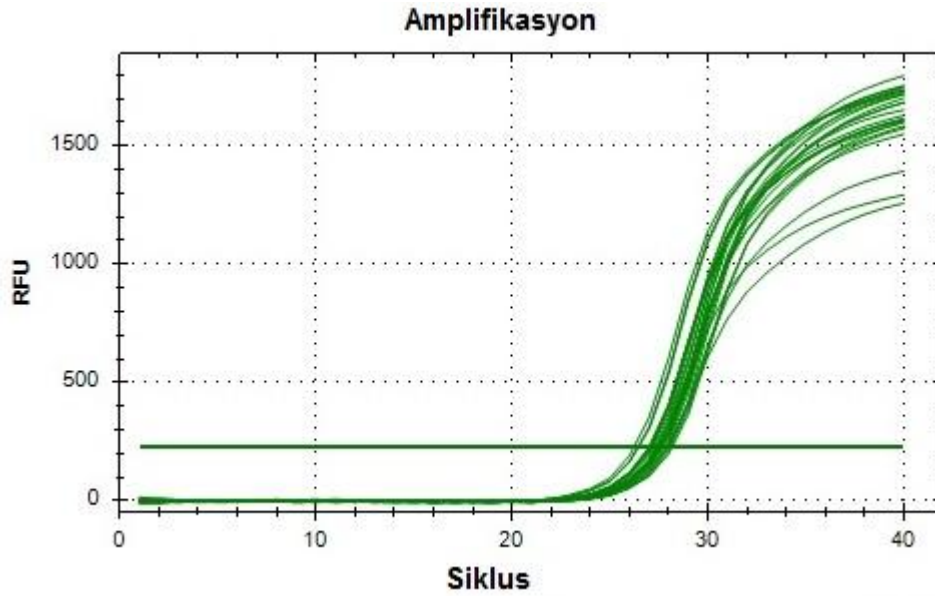
Şekil 4.35: Scarecrow benzeri protein amplifikasyon eğrisi

4.5.4. Cu/Zn Süperoksit Dismutaz Analiz Sonucu

miR398'in hedefi olan Cu/Zn süperoksit dismutaza ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.36 ve Şekil 4.37'de verilmiştir.



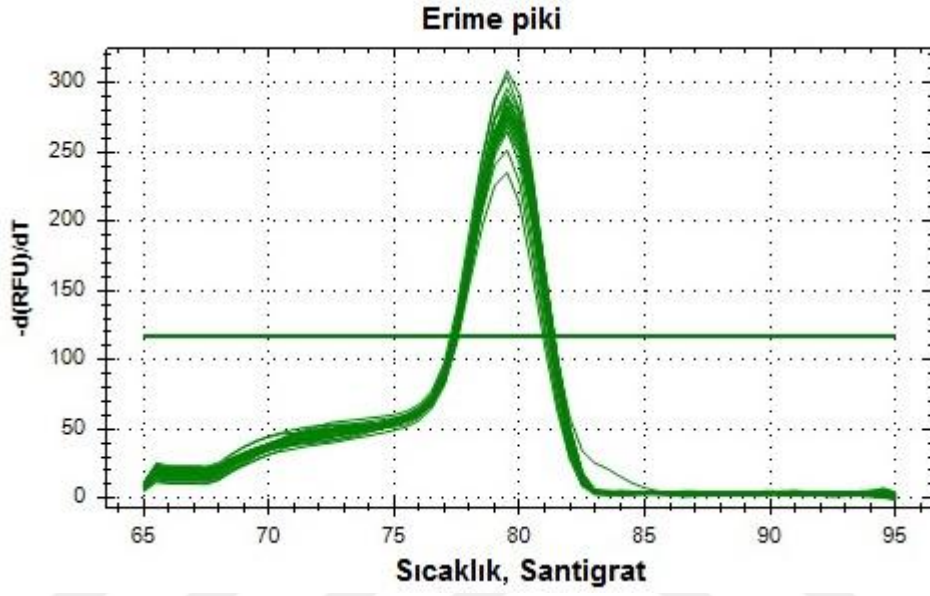
Şekil 4.36: Cu/Zn süperoksit dismutaz erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



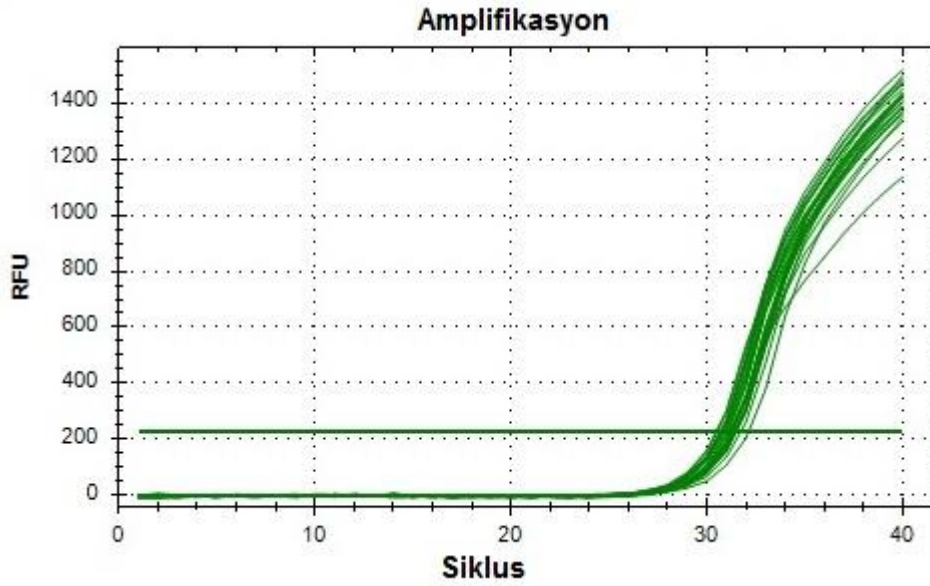
Şekil 4.37: Cu/Zn süperoksit dismutaz amplifikasyon eğrisi

4.5.5. MYB Transkripsiyon Faktörü Analiz Sonucu

miR828'in hedefi olan MYB transkripsiyon faktörüne ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.38 ve Şekil 4.39'da verilmiştir.



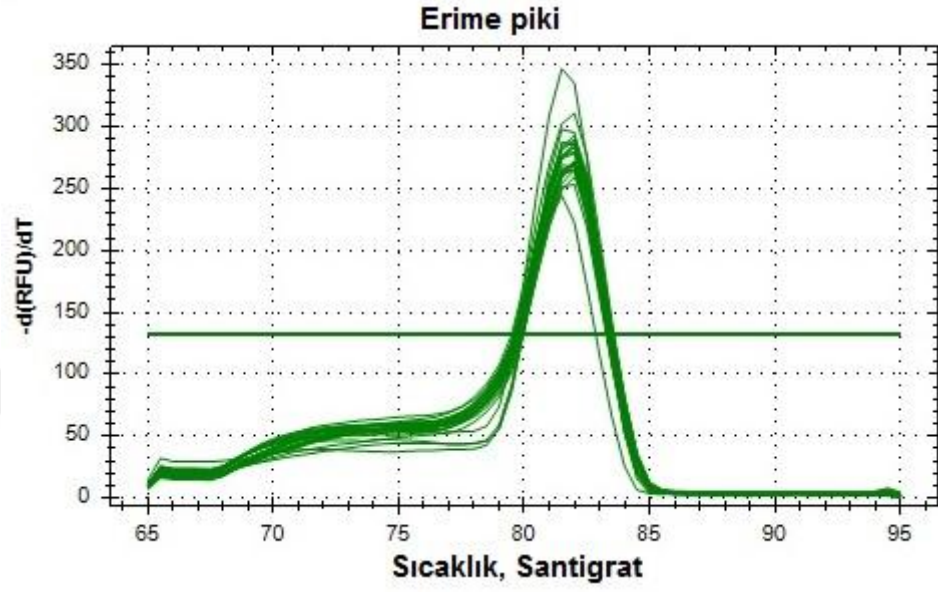
Şekil 4.38:MYB transkripsiyon faktörleri erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



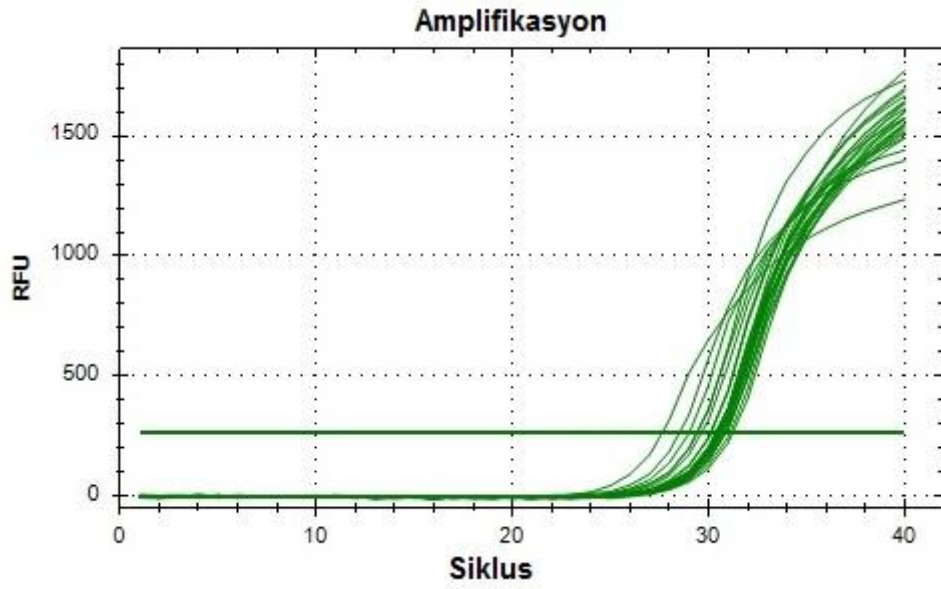
Şekil 4.39:MYB transkripsiyon faktörleri amplifikasyon eğrisi

4.5.6. F-box Protein Analiz Sonucu

miR2111'in hedefi olan f-box proteinine ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.40 ve Şekil 4.41'de verilmiştir.



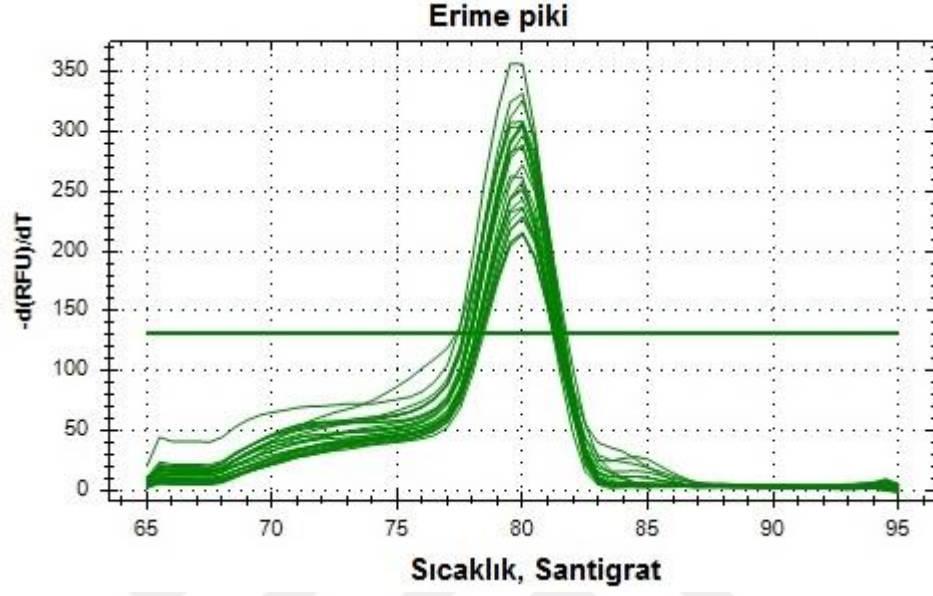
Şekil 4.40: F-box protein erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



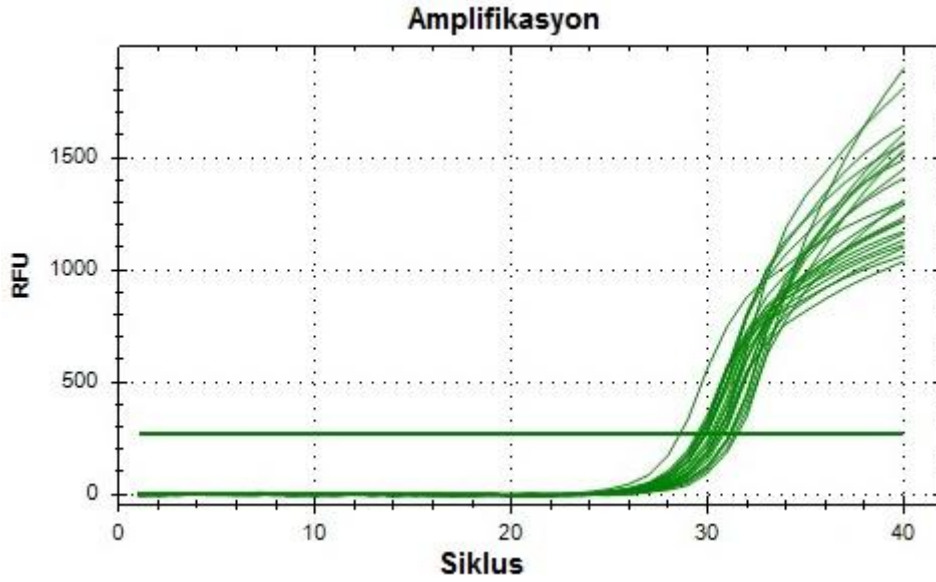
Şekil 4.41: F-box protein amplifikasyon eğrisi

4.5.7. Pektat Liyaz Analiz Sonucu

miR2118 ailesinin hedefi olan pektat liyaza ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime pikleri ve amplifikasyon eğrileri Şekil 4.42 ve Şekil 4.43'te verilmiştir.



Şekil 4.42:Pektat liyaz erime piki. RFU: Relatif floresan unitesi (okunan floresan miktarı)



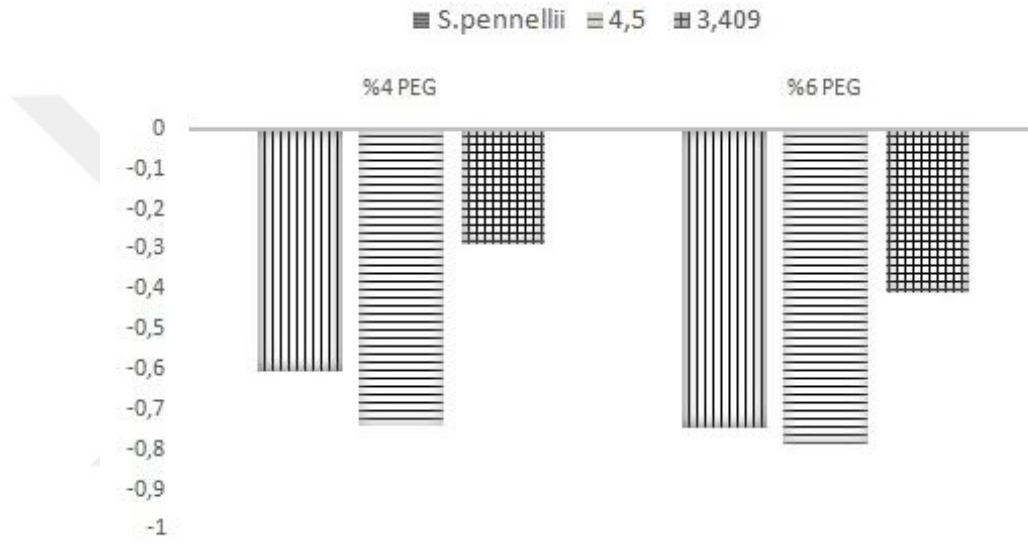
Şekil 4.43:Pektat liyaz amplifikasyon eğrisi

4.6. miRNA'LARA AIT RÖLATIF GEN İFADE SEVİYESİ

Tez kapsamında çalışılan kuraklıkla ilişkili miRNA'ların eEF1a1'ya göre rölatif gen ifade farkları verilmiştir.

4.6.1. miR157b Rölatif Gen İfade Seviyesi

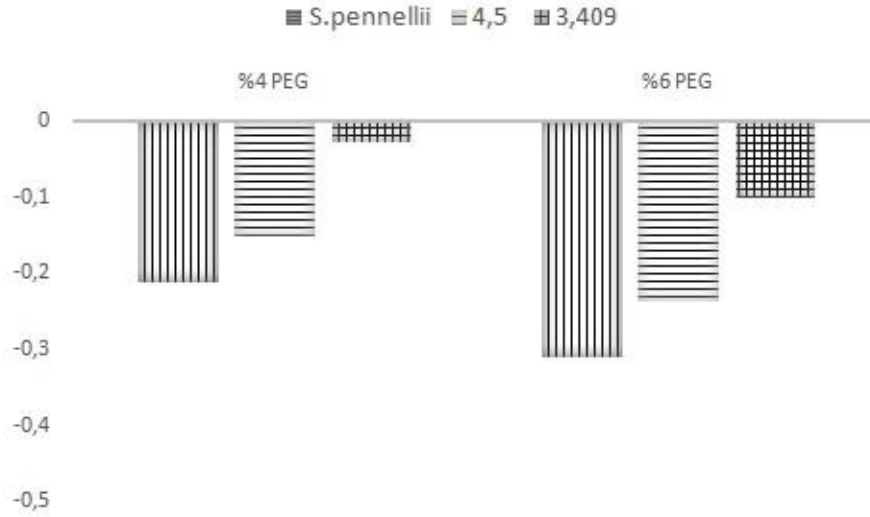
miR157b gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.44'de verilmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabancı tip *S. pennellii*'nin %74, mutant 4.5'in %78 ve mutant 3.409'un ise %40 oranında kontrol gruplarına göre azaldıkları görülmektedir.



Şekil 4.44: Yabancı tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR157b gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.6.2. miR170a Rölatif Gen İfade Seviyesi

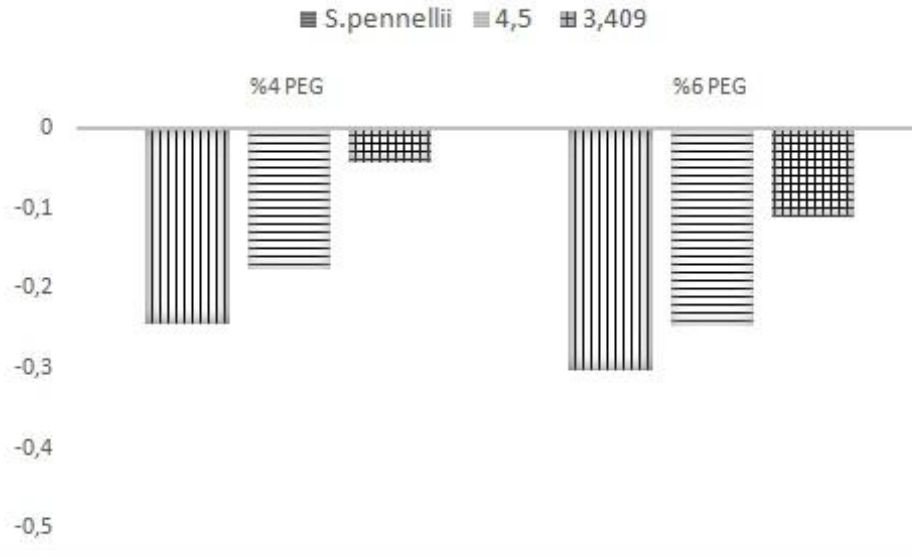
miR170a gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.45'de verilmiştir. Her iki stres uygulamasıyla miR170a gen ifadesinde azalış saptanmıştır. %6 PEG 6000 uygulamasında yabancı tip *S. pennellii*'nin %30, mutant 4.5'in %23 ve mutant 3.409'un ise %10 azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.45:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR170a gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.6.3. miR170b Rölatif Gen İfade Seviyesi

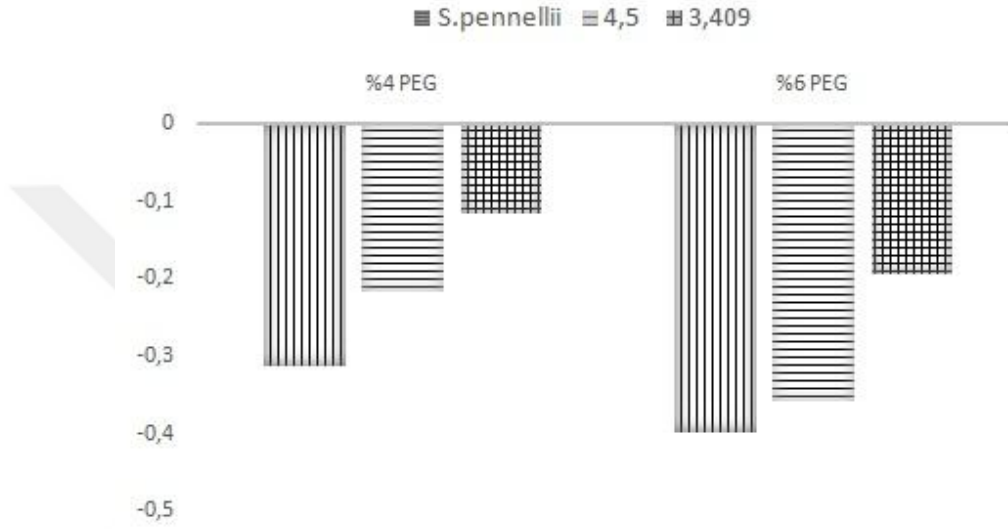
miR170b gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.46'da verilmiştir. Kuraklık stres uygulamalarında miR170b de, miR170a ile benzer bir değişim profili göstermiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %30, mutant 4.5'in %26 ve mutant 3.409'un ise %11 azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.46:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR170b gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.6.4. miR170c Rölatif Gen İfade Seviyesi

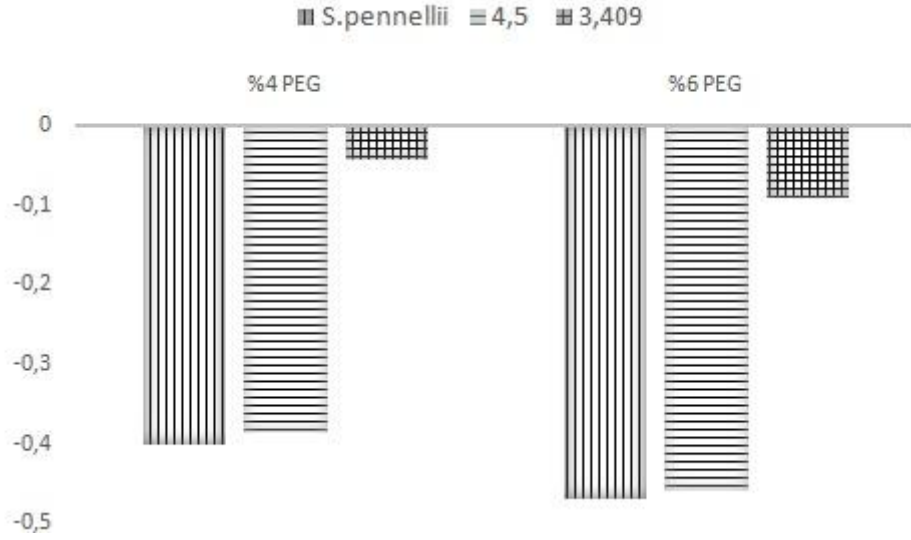
miR170c gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.47'de verilmiştir. Kuraklığa toleranslı olan yabancı tip domates bitkisinde her iki kuraklık stresi uygulamasında miR170c'nin gen ifadesinde en yüksek oranda azalma saptanmış olup, stres dozunun artmasıyla da paralel bir azalma gözlenmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabancı tip *S. pennellii*'nin %39, mutant 4.5'in %35 ve mutant 3.409'un ise %19 azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.47: Yabancı tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR170c gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.6.5. miR398 Rölatif Gen İfade Seviyesi

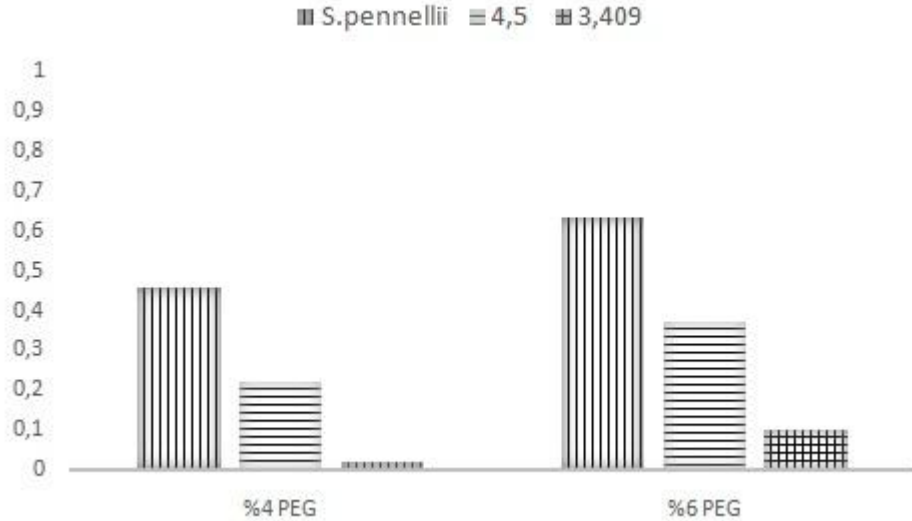
miR398 gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.48'de verilmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabancı tip *S. pennellii*'nin %46, mutant 4.5'in %45 ve mutant 3.409'un ise %9 azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.48:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR398 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.6.6. miR473 Rölatif Gen İfade Seviyesi

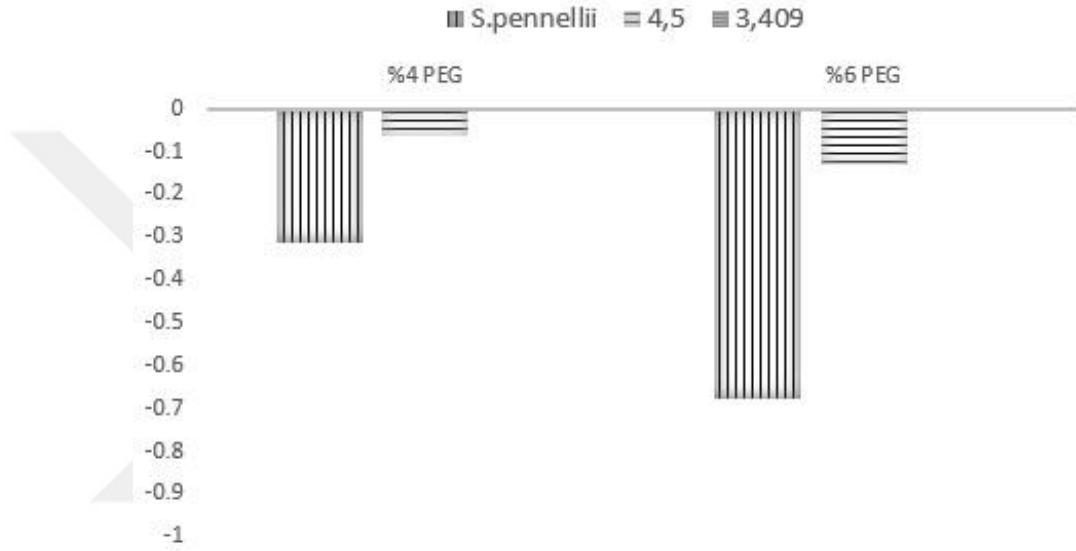
miR473 gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.49'da verilmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %63, mutant 4.5'in %37 ve mutant 3.409'un ise %10 arttığı görülmektedir.



Şekil 4.49:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR473 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.6.7. miR479 Rölatif Gen İfade Seviyesi

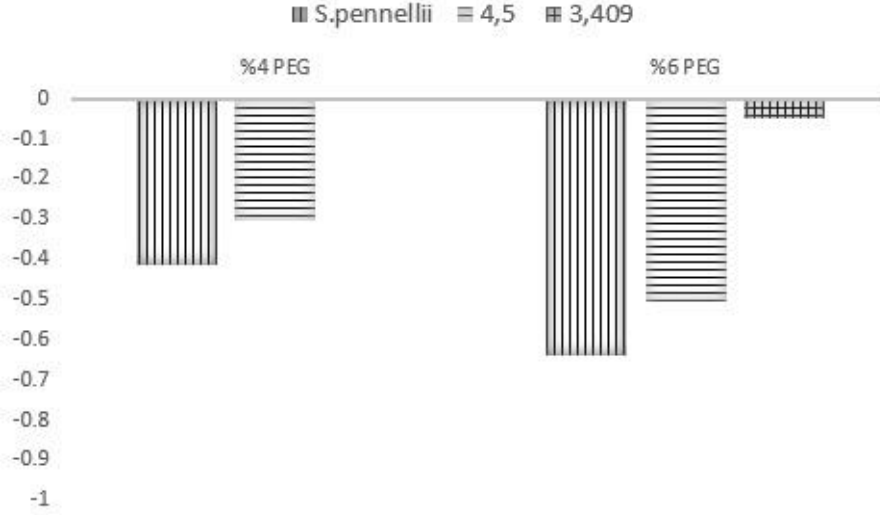
miR479 gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.50'de verilmiştir. Her iki stres uygulamasında da miR479 gen ifadesinin mutant 3.409'da kontrol grubuna göre farklılık göstermediği belirlenmiştir. Mutant 4.5'te her iki dozda da *S. pennellii* gibi azalış gözlenirse de bu azalış yabancı tipe göre önemli oranda az olarak bulunmuştur. %6 PEG 6000 uygulamasında yabancı tip *S. pennellii*'nin %67, mutant 4.5'in %13 ve mutant 3.409'un ise %0,5 azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.50: Yabancı tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR479 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.6.8. miR828 Rölatif Gen İfade Seviyesi

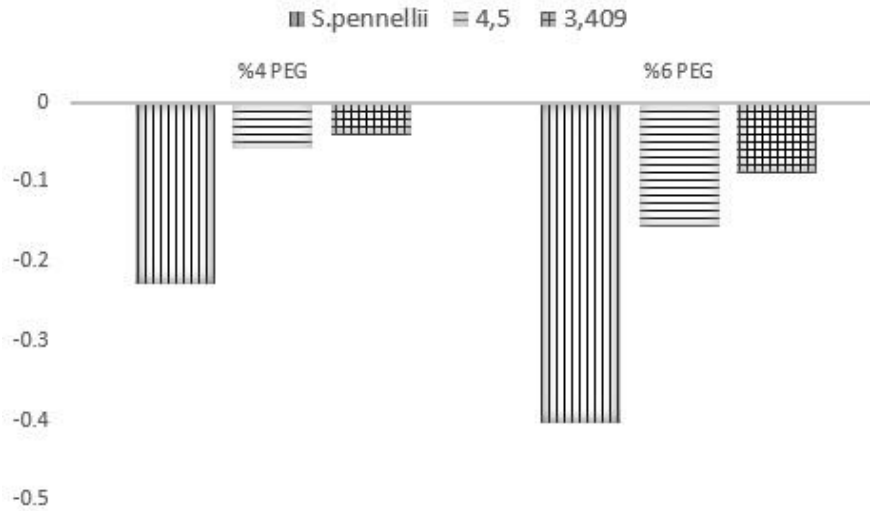
miR828 gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.51'de verilmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabancı tip *S. pennellii*'nin %64, mutant 4.5'in %50 ve mutant 3.409'un ise %4 azaldığı görülmektedir. Kuraklık toleranslılığının en belirgin farklılığını gösteren sonuçlardan bir tanesini temsil etmektedir.



Şekil 4.51:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR828 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.6.9. miR830 Rölatif Gen İfade Seviyesi

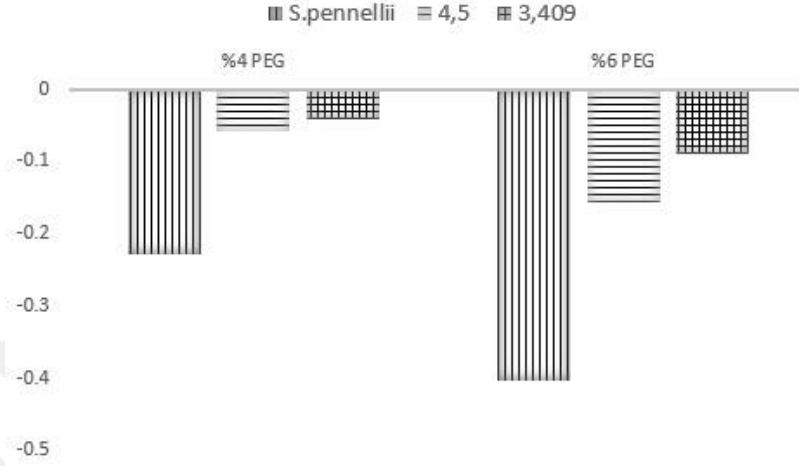
miR830 gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.52'de verilmiştir. Uygulanan PEG 6000 konsantrasyonuna bağlı olarak miR830 gen ifadesinde hem mutant hatlarda hem de yabani tip domates çeşidinde azalma kaydedilmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %40, mutant 4.5'in %15 ve mutant 3.409'un ise %8 azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.52:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR830 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.6.10. miR1446 Rölatif Gen İfade Seviyesi

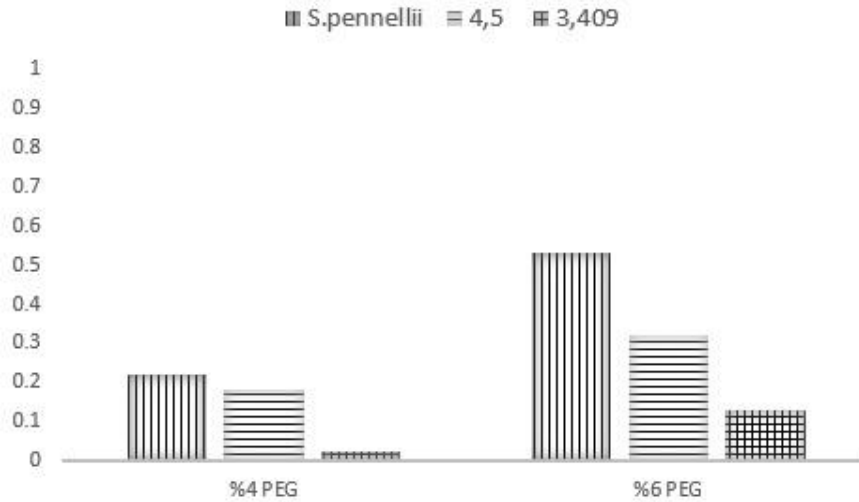
miR1446 gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.53'te verilmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %42, mutant 4.5'in %18 ve mutant 3.409'un ise %9 azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.53: Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR1446 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelerle verilmiştir.

4.6.11. miR2111 Rölatif Gen İfade Seviyesi

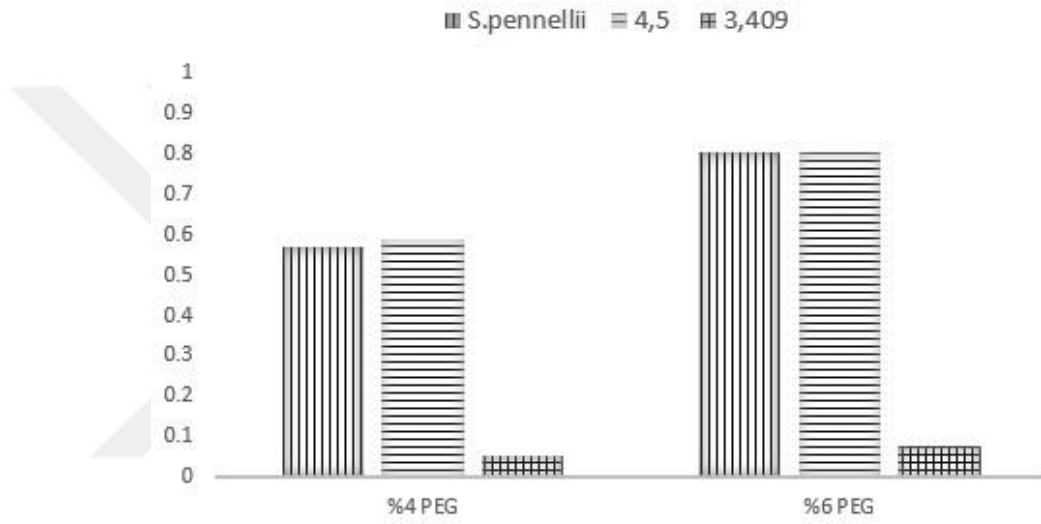
miR2111 gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.54'de verilmiştir. Çalışmada kullanılan miRNA'ların gen ifade değişimlerinden farklı olarak, miR2111, tüm örneklerde kuraklık stresinin artışına paralel olarak bir artış göstermiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %53, mutant 4.5'in %32 ve mutant 3.409'un ise %13 arttığı görülmektedir.



Şekil 4.54: Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR2111 gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelerle verilmiştir.

4.6.12. miR2118a Rölatif Gen İfade Seviyesi

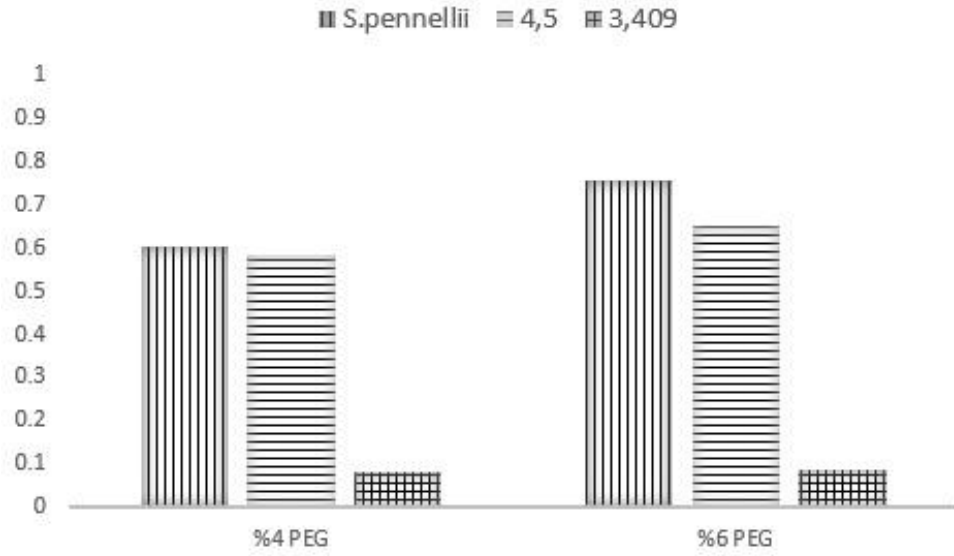
miR2118a gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.55'de verilmiştir. Kuraklık stres dozunun artmasıyla mutant 3.409 hattında miR2118 gen ifade seviyesinin önemli bir değişim göstermediği ancak buna karşın mutant 4.5'in gen ifade seviyesindeki artış oranının stres dozu ile paralellik göstermesi, bu miRNA'nın gen ifadesinde rol oynadığı hedef genlerin tolerans mekanizmasında rol alan yolağın, mutant 4.5 açısından önemini göstermektedir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %80, mutant 4.5'in %80 ve mutant 3.409'un ise %7 arttığı görülmektedir.



Şekil 4.55: Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR2118a gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelerle verilmiştir.

4.6.13. miR2118b Rölatif Gen İfade Seviyesi

miR2118b gen ifadesinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.56'da verilmiştir. miR2118b gen ifade değişimleri de miR2118a ile benzerlik göstermekle birlikte, mutant 4.5'te gözlenen artış, %6 PEG 6000 uygulamasında *S. pennellii*'nin altında kalmıştır. Mutant 3.409 örneğinde gen ifade seviyesinde stres dozunun artışı önemli bir değişiklik oluşturmamıştır. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %75, mutant 4.5'in %65 ve mutant 3.409'un ise %8 arttığı görülmektedir.



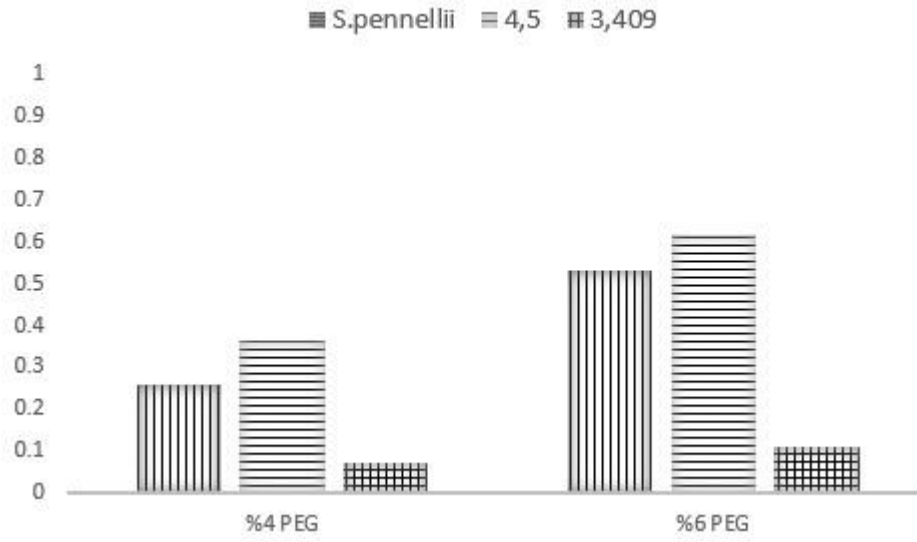
Şekil 4.56:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde miR2118b gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelerle verilmiştir.

4.7. HEDEF GENLERE AİT RÖLATİF GEN İFADE SEVİYESİ

Tez kapsamında çalışılan kuraklıkla ilişkili miRNA'ların hedef genlerinin eEF1a1'ya göre rölatif gen ifade farkları verilmiştir.

4.7.1. Squamosa Promotör Bağlanma Benzeri Protein Rölatif Gen İfade Seviyesi

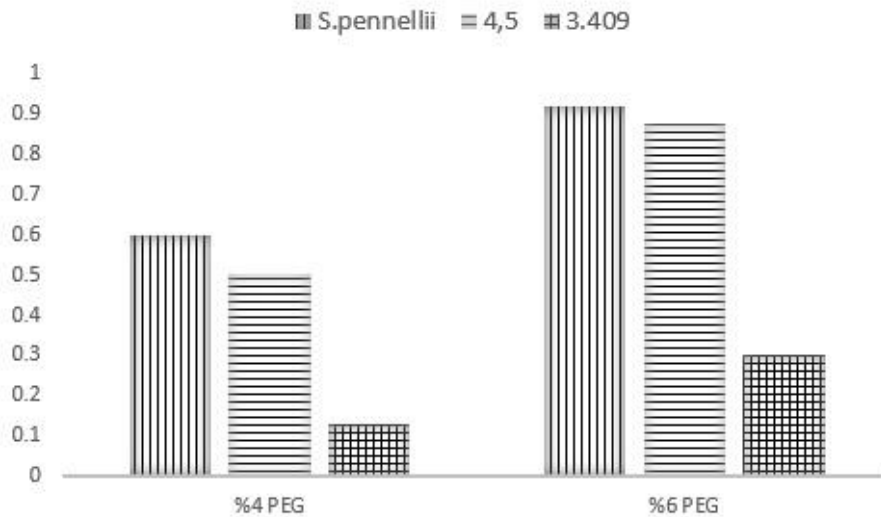
miR157b'nin hedefi olan squamosa promotör bağlanma benzeri proteininin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.57'de verilmiştir. %4 ve %6 PEG 6000 uygulamalarında, mutant 4.5'in gen ifade seviyesinin *S. pennellii*'den daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir. Mutant 3.409'da ise stres dozunun artışına göre gözlenen artış oranının mutant 4.5'e göre az olduğu kaydedilmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %53, mutant 4.5'in %62 ve mutant 3.409'un ise %30 arttığı görülmektedir.



Şekil 4.57:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde squamosa promotör bağlanma benzeri protein gen ifadelerinin kontrole göre rölâtif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdeler verilmiştir.

4.7.2. Scarecrow Benzeri Protein Rölâtif Gen İfade Seviyesi

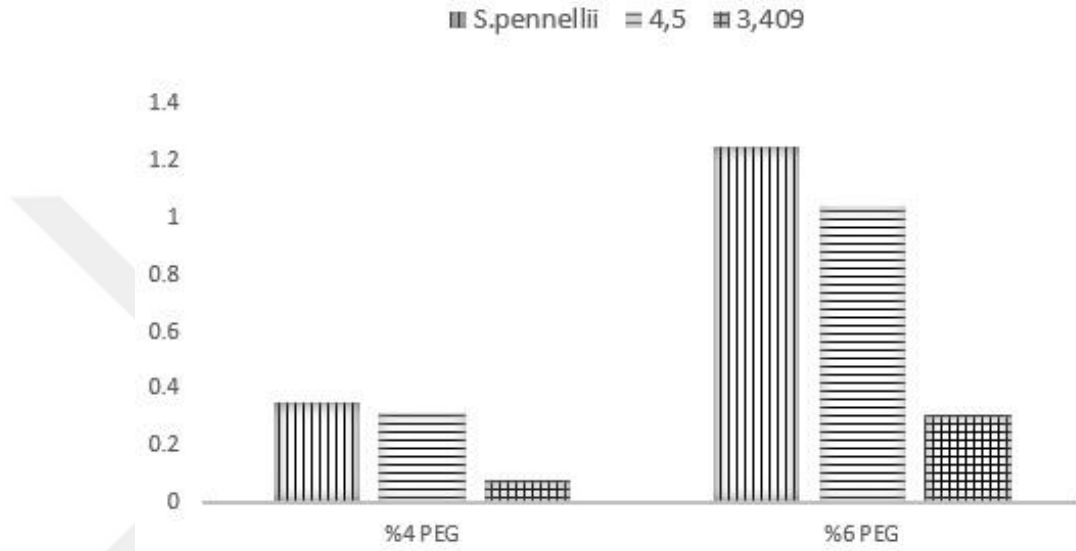
miR170 ailesinin hedefi olan scarecrow benzeri proteininin kontrole göre rölâtif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.58'de verilmiştir. Her iki stres dozuna paralel olarak tüm örneklerde gen ifadelerinde artış saptanmıştır. %4 PEG 6000 uygulamasına cevaben elde edilen *S.pennellii* ve mutant 4.5 arasındaki gen ifade farklılığının %6 PEG 6000 uygulamasında daha arttığı gözlenmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %90, mutant 4.5'in %87 ve mutant 3.409'un ise %30 arttığı görülmektedir.



Şekil 4.58:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde scarecrow benzeri protein gen ifadelerinin kontrole göre rölâtif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdeler verilmiştir.

4.7.3. Cu/Zn Süperoksit Dismutaz Rölatif Gen İfade Seviyesi

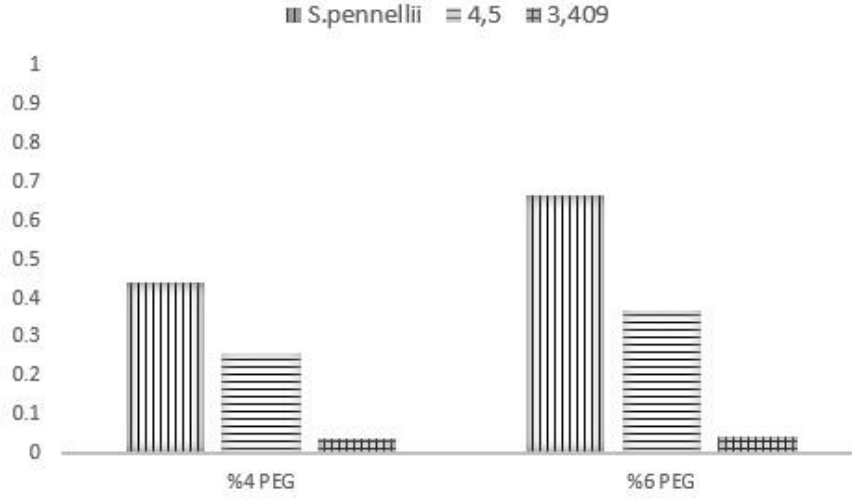
miR398'in hedefi olan Cu/Zn süperoksit dismutazın kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.59'da verilmiştir. %4 PEG 6000 uygulamasına göre gen ifade seviyelerinin stres dozunun artması ile belirgin bir artış profili ortaya koyduğu yapılan analiz sonucunda belirlenmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabancı tip *S. pennellii*'nin %125, mutant 4.5'in %104 ve mutant 3.409'un ise %30 arttığı görülmektedir.



Şekil 4.59: Yabancı tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde Cu/Zn süperoksit dismutaz gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelerle verilmiştir.

4.7.4. MYB Transkripsiyon Faktörü Rölatif Gen İfade Seviyesi

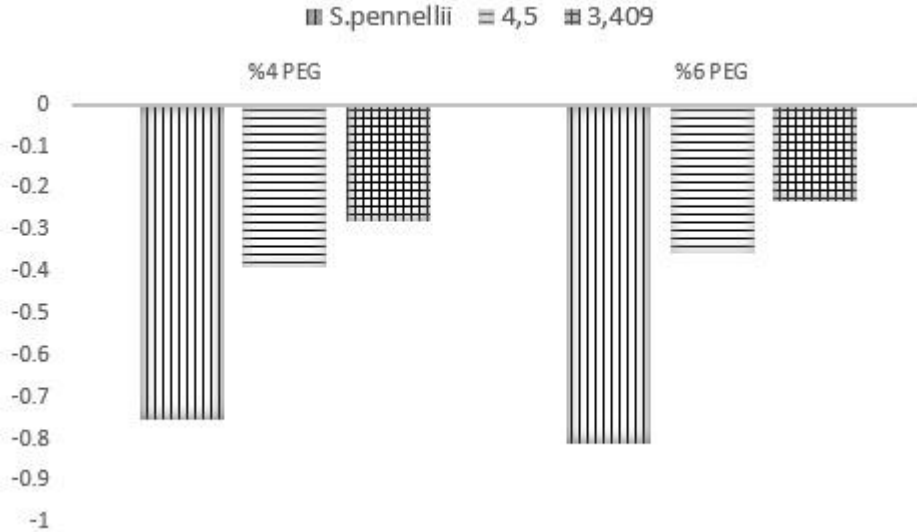
miR828'in hedefi olan MYB transkripsiyon faktörünün kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.60'da verilmiştir. Mutant 3.409 hattında MYB transkripsiyon faktörü gen anlatımının, kuraklık stres dozunun artışına rağmen çok düşük oranda cevap vermiş olması, kuraklık toleranslı olan ancak toleranslılık seviyesi mutant 4.5'e göre daha düşük olan bu mutantın, stres varlığında kullandığı yolların aydınlatılması açısından önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabancı tip *S. pennellii*'nin %66, mutant 4.5'in %36 ve mutant 3.409'un ise %4 arttığı görülmektedir.



Şekil 4.60:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde MYB transkripsiyon faktörü gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.7.5. F-box Protein Rölatif Gen İfade Seviyesi

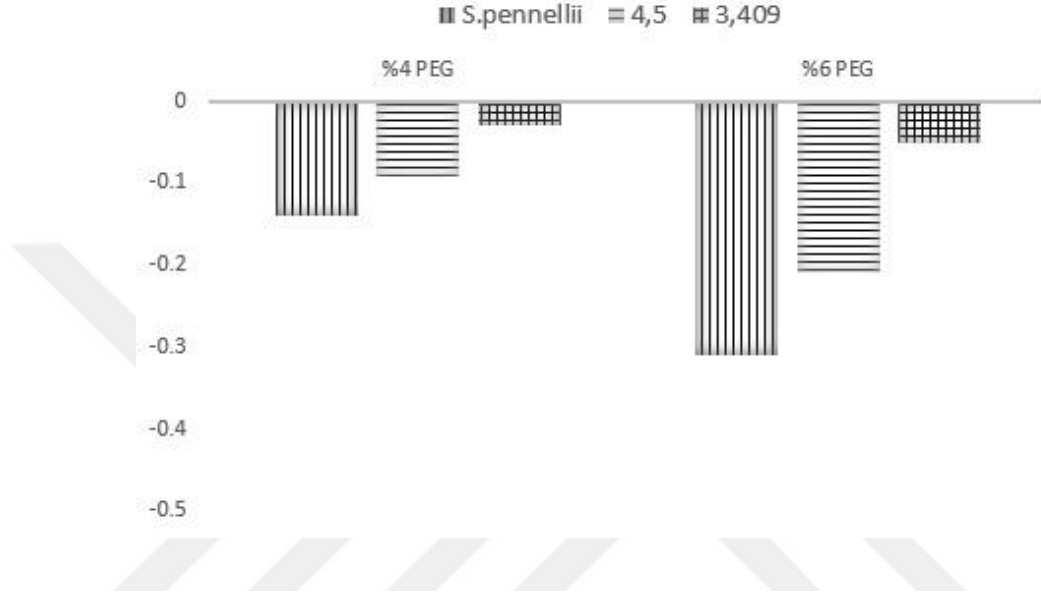
miR2111'in hedefi olan f-box proteininin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.61'de verilmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabani tip *S. pennellii*'nin %81, mutant 4.5'in %35 ve mutant 3.409'un ise %23 azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.61:Yabani tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde f-box protein gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelik verilmiştir.

4.7.6. Pektat Liyaz Rölatif Gen İfade Seviyesi

miR2118 ailesinin hedefi olan pektat liyazın kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği Şekil 4.62'de verilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm örneklerde, stres dozunun artmasına paralel olarak, hedef genin ifade seviyelerinde azalış gözlenmiştir. %6 PEG 6000 uygulamasında yabancı tip *S. pennellii*'nin %30, mutant 4.5'in %20 ve mutant 3.409'un ise %5 azaldığı görülmektedir



Şekil 4.62: Yabancı tip *Solanum pennellii*, mutant 4.5 ve mutant 3.409 bitkilerinde pektat liyaz gen ifadelerinin kontrole göre rölatif gen ifade miktarı bar grafiği. Değerler yüzdelerle verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarlarında Cs-137 gama kaynağı kullanılarak, X5671R domates varyetesine ait kuraklığa toleranslı olarak seçilen iki mutantın (4.5 ve 3.409) kuraklık stresi altında miRNA cevapları araştırılmıştır. Domates, tütün gibi farklı bitki türlerinde kuraklık stresi toleransı yanıtıyla ilişkili oldukları belirlenmiş 13 miRNA geninin, elde edilen mutant varyeteler üzerinde kuraklık stresi toleransında nasıl rol oynadıkları ve hedef genleri üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kuraklıkla ilişkili olduğu düşünülen miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef genleri seçilmiş, qRT-PCR ile ekspresyonları analiz edilmiş ve yabani tip *Solanum pennellii* ile veriler karşılaştırılmıştır.

Kuraklık stresiyle birlikte bitkilerde miR157b'nin gen ifadesi indirgenmektedir. miR157b; squamosa promotör bağlanma protein benzeri (SPL) geninin gen ifadesini regüle etmektedir (Chen v.d., 2010, Preston v.d., 2013). Squamosa promotör bağlanma proteini; bitkilerde kök uzamasında rol oynayan faktörlerden olan giberellinin sinyal mekanizmasında ve bitki morfolojisinin yönetimi konusunda kritik bir role sahiptir (Chen v.d., 2010). miR157b'nin gen ifadesinin mutant hatlarda ve yabani tip domateste azaldığı gözlenirken hedef geni olan squamosa promotör bağlanma proteini benzeri genin gen ifadesinin arttığı görülmektedir. Bununla birlikte mutant 4.5'de gen ifade düzeyinin %4 ve %6 PEG 6000 uygulamaları ile yabani tipe oranla artış göstermiş olması önemli bir veri olarak kaydedilmiştir. Bunun yanı sıra mutant 3.409'da miR157b hedef geninin ifadesinin 4.5 ve yabani tipe göre düşük seviyelerde gözlenmesi, bitkinin maruz kaldığı kuraklık stres dozlarını tolere etmekte zorlandığını ve strese bağlı olarak bu hedef genin rol aldığı glikoz, inorganik tuzlar, ATP ve giberellin sentezindeki metabolik süreçlerinin de yavaşlaması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

miR170 ailesi ve miR171 ailesi aynı gen ailesinin ortologlarını post-transkripsiyonel olarak regüle eden miRNA aileleridir (Bari v.d., 2013). Her iki aile de Scarecrow-benzeri (SCLp) proteinler ailesinin gen ifadesini regüle etmektedirler. SCLp ışık altında büyüyen bitkilerde protoklorofillid oksidoredüktaz (POR) geninin gen ifadesinin durdurulmasında kilit rol oynar (Todesco v.d., 2010, Ma v.d., 2014). miR170 ailesinin *Arabidopsis*'de karakterizasyonu yapılmış scarecrow benzeri proteinleri hedef aldığı gösterilmiştir. Hedefi olan scarecrow benzeri proteinler GT cis elementlere bağlanarak giberellin regülasyonundaki klorofil II biyosentezini ışıklı koşullarda yönetmekte ve indüklemektedir (Ma v.d., 2014). Kuraklık stresinin

sonuçlarından biri olan klorosis yani fotosistem II'nin yıkılarak bitkinin fotosentez kapasitesinin azalması, bitkilerde senesense sebep olmaktadır (Thomas v.d., 2003). Yapılan çalışmada mutant domates hatlarında miR170a, miR170b ve miR170c gen ifadelerinin kuraklık stresi uygulamasıyla yabancı tipe kıyasla daha az oranda azaldığı gösterilmiştir. miRNA gen ifade seviyelerinin mutantlarda ve yabancı tipte hedef gen ifadesi açısından bir korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. *S. pennellii*'de miRNA'ların hedef geninin ifadesinin mutant hatlardan her iki stres dozunda da daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir. Mutant 4.5'in gen ifadesinin %6 PEG uygulamasında mutant 3.409'dan 3 kat fazla artış göstererek yabancı tipe yakın bir gen ifade düzeyi gösterdiği belirlenmiştir. Böylece mutant hatların ve *S. pennellii*'nin kuraklık stresi koşullarında hayatta kalabilmek ve senesensten kurtulabilmek için klorofil II biyosentezini indükledikleri ve klorosisten kaçınma yönünde mekanizmalarını devreye soktukları gözlenmiştir.

Kuraklıkla birlikte diğer birçok abiyotik streste olduğu gibi miR398 gen ifadesi azalmaktadır. miR398; sitoplazmik ve kloroplastik Cu/Zn süperoksit dismutaz (CSD) genlerini post-transkripsiyonel olarak regüle eder (Sunkar v.d., 2006, Zhu v.d., 2011). CSD enzimi ROS detoksifikasyonunda görevlidir. Oldukça toksik olan süperoksit anyonunu daha az toksik olan hidrojen peroksit'e çevirerek bitkiyi süperoksit radikallerinden korur ve ROS detoksifikasyonu ağının ilk adımını oluşturur (Apel v.d., 2004, Mittler v.d., 2004). Yapılan çalışmada %4 ve %6 PEG 6000 uygulamalarında miR398'in gen ifadesinin *S.pennellii* ve mutant 4.5'te önemli oranda azalış gösterdikleri ve buna bağlı olarak miR398 hedef geni olan CSD geninin gen ifadesinin ise arttığı gözlenmiştir. %6 oranında PEG 6000 uygulanmış mutant 4.5 ve yabancı tip *S. pennellii*'de CSD geninin daha yüksek oranda artış göstermesinin sebebinin bu türlerin ROS detoksifikasyonunu gerçekleştirebilmiş olması ve kuraklık stresine karşı yüksek tolerans geliştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna karşılık mutant 3.409'un CSD geninin gen ifadesinin her iki stres uygulamasında da belirgin bir artış gösteremiyor olması; bu bitkinin ROS detoksifikasyonunda başarısız olduğu ve mutant 4.5 ile aralarında gözlenen toleranslılık farklılığını gösteren önemli bir bulgu olduğu düşünülmektedir.

miR473, post-transkripsiyonel olarak orman ağaçlarında vep1 (damar şekillenmesi 1) genini kontrol etmektedir (Harfouche v.d., 2014). Vep1 geni kardenolid sekonder metabolizmasını yöneten proteini üretmektedir (Herl v.d., 2009). Kardenolidler toksik steroidlerdir ve bitkilerin herbivora karşı savunmasında görev alırlar (Agarwal v.d., 2011). Yapılan çalışmada kuraklık stresine maruz bırakılan domates hatlarında miR473'ün gen ifadesinin arttığı

gösterilmiştir. miR473'ün gen ifadesinin artmasının sebebi; bitkinin kuraklık stresine maruz kalmasıyla var olan metabolizmasını kuraklık stresine başa çıkarmaya yönlendirmiş olması ve aslında biyotik strese karşı görevli olan bir miRNA'nın, abiyotik stres cevabında da fonksiyonel olduğunu göstermektedir. Diğer miRNA cevaplarında gözlemlendiği üzere, mutant 3.409'da kuraklık stres uygulamaları sonucunda gözlenen gen ifade artışları, mutant 4.5 ve yabani tip domatesten elde edilen değerlerin çok altında kaydedilmiştir. Bu tez kapsamında miR473'ün hedef gen ifade seviyeleri henüz domatesteki hedefinin de vep1 geni olup olmadığının doğrulanamamış olması sebebiyle çalışılmamıştır.

miR479'un hedefi tütün bitkisinde BAF60b domainini içeren SWI/SNF (Switch/Sükroz fermente olmayan) protein kompleksidir (Guo v.d., 2011). SWI/SNF kromatin yeniden modelleme kompleksi transkripsiyonun regülasyonunda oldukça önemli bir rol oynar (Lores v.d., 2010). SWI/SNF kompleksi aynı zamanda DNA replikasyonunda ve tamirinde görev alır. Bitki büyümesi ve gelişmesi üzerinde de önemli etkileri vardır. Bitki hormon metabolizmasında özellikle de giberellin biyosentezinde anahtar role sahiptir (Sarnowska v.d., 2013). Giberellin kök ve gövde uzamasında görevli bir bitki hormonudur. Yapılan çalışmada miR479'un gen ifade seviyesinin *S. pennellii* ve mutant 4.5'te kuraklık stres dozunun artmasına paralel olarak azaldığı ancak mutant 3.409'da gen ifade seviyesinin stres uygulaması ile kontrol grubundan farklılık göstermediği gözlenmiştir. miR479'un gen ifadesinde kuraklık stres uygulaması ile gözlenen değişimlerin hedef genin gen ifadesi üzerindeki etkisi, bu tez çalışması kapsamında henüz domatesteki hedef geninin SWI/SNF kompleksi olup olmadığının gösterilememiş olması sebebiyle çalışılmamıştır. Ancak kuraklık stresine maruz kalan bitkinin su bulabilmek amacıyla köklerini uzatarak hayatta kalma refleksi göstermesinin ve bu durumla ilişkili olarak oksin ve giberellin biyosentezinin de uyarılabileceği ön görülmektedir. Mutant 3.409 bitkisinde miR157b'nin hedef geninin de (SPL) bu mutantta düşük ifade seviyesi göstermesinin domates bitkisinde de potansiyel hedefin oksin ve/veya giberellin mekanizması ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

miR828'in hedefi; MYB domainli transkripsiyon faktörü genidir (Guan v.d., 2014). MYB proteini transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır. Bitkilerde, bitkilere özgü çeşitli süreçlerde görevlidir. Bitki gelişiminin, metabolizmanın, biyotik ve abiyotik stresin regülasyonunda anahtar rol oynar (Dubos v.d., 2010). MYB domainli transkripsiyon faktörü aynı zamanda RD22'nin gen ifadesini indükler. RD22 gen ifadesi arttığında bitki kuraklık stresine karşı kendini modifiye eder, fenotipik değişiklikler gözlemlenir. Stomaların bekçi hücrelerinde eksprese olan RD22 proteini

stomaların kapanmasına ve var olan suyun korunmasına olanak verir (Harshavardhan v.d., 2014). Yapılan çalışmada miR828'in gen ifadesinin azaldığı buna bağlı olarak hedefi olan MYB domainli transkripsiyon faktörü geninin gen ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu durumda domates bitkisinde artan MYB domainli transkripsiyon faktörü geninin ve onun indüklediği RD22 proteininin kuraklık stresi toleransında önemli bir rol oynadığı söylenebilir.

Yapılan transkriptomik çalışmalarda miR830'un tespit edilebilmiş bir hedefi bulunmamaktadır (Yin v.d., 2008). Yapılan çalışmada miR830'un gen gen ifade ifadesinin kuraklık stresiyle en fazla oranda azalmasının *S. pennellii*'de olduğu gözlenmiştir. Kuraklık toleransına sahip olan yabancı tip domates bitkisinde %6 PEG 6000 uygulaması ile belirgin bir azalma gösteren miR830'un rol aldığı mekanizmaların aydınlatılması için ileri moleküler analizler yapılması gerekmektedir.

miR1446'nın hedefinin RGL1/RGL2 (giberellin cevabı modülatörü benzeri protein) olduğu gösterilmiştir (Merchan v.d., 2009). RGL1/RGL2 giberellin yanıtının negatif regülatörüdür (Wen v.d., 2002). Giberellin bitkilerde uzamayı sağlayan hormondur (Yamaguchi, 2008). Bitki kuraklık stresi altında gövde uzamasını durdurup kök uzamasına yönelmelidir. Bu sebeple giberellin gen ifadesinin düzenlenmesi gerektiğinden RGL1/RGL2 gen ifadesi artmaktadır. Yapılan çalışmada miR1446'nın ifade seviyesinin diğer miRNA'lara benzer bir gen ifade profili gösterdiği gözlenmiştir. miR1446'nın domatesteki hedefinin de RGL1/RGL2 olup olmadığının gösterilmemiş olması sebebiyle hedef gen ifade düzeyini belirleme yönünde çalışma yürütülememiştir.

miR2111'in hedefinin F-box proteinleri olduğu gösterilmiştir (Xu v.d., 2013). F-box proteinleri ubiquitinasyon aracılığıyla hücrel proteinlerin kontrollü degradasyonunu sağlamaktadır. Yapılan çalışmada kuraklığa toleranslı olarak geliştirilen mutant domates hatlarında stres dozunun artışına paralel olarak bir artış gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak da hedef gen ifadesinde bu artışa paralel bir azalış gözlenmiştir.

miR2118a ve miR2118b'nin putative (varsayımsal) hedefi pektat liyaz proteinidir (Luan v.d., 2014). Pektat liyaz; pektini α 1-4 bağlı galakturonik asite ayıran bir enzimdir (Sun v.d., 2010). Pektin primer hücre çeperinde yer alır. Bitki uzaması sırasında öncelikle hücrelerin belli bir büyüklüğe gelmesi gerekmektedir. Bu sebeple primer çeper zayıflamalı ve yeterli büyüme alanı oluşturulmalıdır. Pektat liyaz, pektinleri kırarak çeperin zayıflamasına ve hücrenin uzamasına olanak sağlar. Yapılan çalışmada miR2118a ve miR2118b'nin kuraklığa toleranslı bitkilerde gen

ifadesinin arttığı buna bağlı olarak pektat liyazın gen ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda hücre membran stabilitesi bozulmayacak, böylece membran zayıflamadığı için hücreler turgor yardımıyla da büyüyemeyeceklerdir.

Bu çalışma ile kuraklıkla ilişkili olduğu düşünülen miRNA'larla ve hedef genleriyle yapılan qRT-PCR analizlerinin verileri incelendiğinde seçilen miRNA'ların mutant domates bitkilerinde kuraklık toleransı ile ilişkileri başarı ile ortaya konmuştur.

Çalışmada kullanılan gama radyasyonu ile kuraklığa toleranslı olarak geliştirilen ancak in vitro stres uygulamasında toleranslılık farklılığı gösteren mutantların, tez kapsamında seçilen miRNA'ların ifade seviyelerinde farklılıklar göstermiş olmaları çalışma açısından önemli bir bulgudur. Mutant hatlarda farklı miRNA'ların kuraklık stres toleransı ile ilişkilerinin aydınlatılması ve farklı miRNA'ları kullanarak toleranslılık düzeylerinin değerlendirilmesinin de çalışmalarda faydalı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, tez kapsamında kullanılan mutant domates hatlarının yeni nesil dizileme metodu kullanılarak miRNA dizilerinin belirlenmesi ve tüm transkriptom taraması ile de toleranslılıktan sorumlu mekanizmaların detaylı bir şekilde aydınlatılması ticari önem taşıma potansiyeli bulunan bu mutantların ileriki dönemlerde kullanılabilirliğinin artması açısından son derece önem arz etmektedir.

6. KAYNAKÇA

- Agarwal, Pradeep. Agarwal, Parinita. M, Reddy. Sopory, Sudhir. "Role of DREB Transcription Factors in Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants." *Plant Cell Rep.* 25 (2006):1263-1274.
- Agarwal, Anurag. Petschenka, Georg. Bingham, Robin. Weber, Marjorie. Rasmann, Sergio. "Toxic Cardenolides: Chemical Ecology and Coevolution of Specialized Plant-Herbivore Interactions." *New Phytologist* 194 (2012): 28-45.
- Apel, Klaus. Hirt, Heribert. "Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction." *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (2004): 373-399.
- Ashraf, M. Foolad, M.R. "Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance." *Environmental and Experimental Botany* 59 (2007): 206–216.
- Bahuguna, N. Jagadish, K. Coast, O. Wassmann, R. "Plant Abiotic Stress: Temperature Extremes." *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* 4 (2014): 330-334.
- Bari, Rajendra. Pant, Bikram. Stitt, Mark. Scheible, Wolf-Rüdiger. "PHO₂, MicroRNA399, and PHR1 Define a Phosphate-Signaling Pathway in Plants." *Plant Physiology* 141 (2006): 988-999.
- Bari, Assyl. Orazova, Saltanat. Ivashchenko, Anatoliy. "miR156 and miR171 Binding Sites in the Protein-Coding Sequences of Several Plant Genes." *Biomed Research International* 2013 (2013): 1-7.
- Bartel, David. "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function." *Cell* 116 (2004): 281-297.
- Bej, Sonali. Jolly, Basak. "MicroRNAs: The Potential Biomarkers in Plant Stress Response." *American Journal of Plant Sciences* 5 (2014): 748-759.
- Bergougnoux, Véronique. "The History of Tomato: From Domestication to Biopharming." *Biotechnology Advances* 32 (2014): 170–189.
- Bhatnagar-Mathur, Pooja. Vadez, V. Sharma, Kiran. "Transgenic Approaches for Abiotic Stress Tolerance in Plants: Retrospect and Prospects." *Plant Cell Rep* 27 (2008): 411–424.

- Chen, Tony. Murata, Norio. "Enhancement of Tolerance of Abiotic Stress by Metabolic Engineering of Betaines and Other Compatible Solutes." *Current Opinion in Plant Biology* 5 (2002): 250–257.
- Chen, Xiaobo. Zhang, Zenglin. Liu, Danmei. Zhang, Kai. Li, Aili. Mao, Long. "Squamosa Promoter-Binding Protein-Like Transcription Factors: Star Players for Plant Growth and Development." *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (2010): 946–951.
- Chiou, Tzyy-Jen. "The Role of MicroRNAs in Sensing Nutrient Stress." *Plant, Cell and Environment* 30 (2007): 323–332.
- Cramer, Grant. Urano, Kaoru. Delrot, Serge. Pezzotti, Mario. Shinozaki, Kazuo. "Effects of Abiotic Stress on Plants: A Systems Biology Perspective." *BMC Plant Biology* 11 (2011): 1-14.
- Çırak, Cüneyt. Enver, Esendal. "Soyada Kuraklık Stresi." *OMÜ Zir. Fak. Dergisi* 2 (2006): 231-237.
- Ding, Dong. Zhang, Lifang. Wang, Hang. Liu, Zhijie. Zhang, Zuxin. Zheng, Yonglian. "Differential Expression of miRNAs in Response to Salt Stress in Maize Roots." *Annals of Botany* 103 (2009): 29–38.
- Downs, Thomas. Wilfinger, William. "Fluorometric Quantification of DNA in Cell and Tissue." *Analytical Biochemistry* 131 (1983): 538-547.
- Dubos, Christian. Stracke, Ralf. Grotewold, Erich. Weisshaar, Bernd. Martin, Cathie. Lepiniec, Loic. "MYB Transcription Factors in Arabidopsis." *Trends in Plant Science* 15 (2010): 573-581.
- Flowers, Timothy. Colmer, Timothy. "Salinity Tolerance in Halophytes." *New Phytologist* 179 (2008): 945-963.
- Fujii, Hiroaki. Chiou, Tzyy-Jen. Lin, Shu-I. Aung, Kyaw. Zhu, Jian-Kang. "A miRNA Involved in Phosphate-Starvation Response in Arabidopsis." *Current Biology* 15 (2005): 2038-2043.
- Giardi, M.T. Cona, A. Geiken, B. Kucera, T. Masojidek, J. Mattoo, A. K. "Long-term Drought Stress Induces Structural and Functional Reorganization of Photosystem II." *Planta* 199 (1996): 118-125.

- Gill, Sarvajeet Singh. Tuteja, Narendra. "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (2010): 909-930.
- Grigorova, Biliana. Vaseva, Irina I. Demirevska, Klimentina. Feller, Urs. "Expression of Selected Heat Shock Proteins After Individually Applied and Combined Drought and Heat Stress." *Acta Physiol Plant* 33 (2011): 2041-2049.
- Guan, Xueying. Pang, Mingxiong. Nah, Gyoungju. Shi, Xiaoli. Ye, Wenxue. Stelly, David M. Chen, Jeffrey. "miR828 and miR858 Regulate Homoeologous MYB2 Gene Functions in Arabidopsis Trichome and Cotton Fibre Development." *Nature Communications* 5 (2014): 1-14.
- Gubler, Ueli. Hoffman, Beth J. "A Simple and Very Efficient Method For Generating cDNA Libraries." *Gene* 25 (1983): 263-269.
- Guo, Hongxiang. Kan, Yunchao. Liu, Weiqun. "Differential Expression of miRNAs in Response to Topping in Flue-Cured Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Roots." *Plos One* 5 (2011): 1-15.
- Harfouche, Antoine. Meilan, Richard. Altman, Arie. "Molecular and Physiological Responses to Abiotic Stress in Forest Trees and Their Relevance to Tree Improvement." *Tree Physiology* 00 (2014): 1-18.
- Harshavardhan, Vokkaliga Thammegowda. Son, Le Van. Seiler, Christiane. Junker, Astrid. Weigelt-Fischer, Kathleen. Klukas, Christian. Altmann, Thomas. Sreenivasulu, Nese. Baumlein, Helmut. Kuhlmann, Markus. "AtRD22 and AtUSPL1, Members of the Plant-Specific BURP Domain Family Involved in *Arabidopsis thaliana* Drought Tolerance." *Plus One* 9 (2014): 1-14.
- Herl, V. Fischer, G. Reva, V. A. Stiebritz, M. Muller, Y. A. Müller-Uri, F. Kreis, W. "The VEP1 Gene (At4g24220) Encodes a Short-Chain Dehydrogenase/Reductase with 3-Oxo-D4,5-Steroid 5b-Reductase Activity in *Arabidopsis thaliana* L." *Biochimie* 91 (2009): 517-525.
- Hirayama, Takashi. Shinozak, Kazuo. "Research on Plant Abiotic Stress Responses in The Post-Genome Era: Past, Present and Future." *The Plant Journal* 61 (2010): 1041-1052.
- Hsieh, Li-Ching. Lin, Shu-I. Shih, Arthur Chun-Chieh. Chen, June-Wei. Lin, Wei-Yi. Tseng, Ching-Ying. Li, Wen-Hsiung. Chiou, Tzyy-Jen. "Uncovering Small

- RNA-Mediated Responses to Phosphate Deficiency in Arabidopsis by Deep Sequencing." *Plant Physiology* 151 (2009): 2120-2132.
- Jain, Mukesh. Nijhawan, Aashima. Arora, Rita. Agarwal, Pinky. Ray, Swatimita. Sharma, Pooja. Kapoor, Sanjay. Tyagi, Akhilesh K. Khurana, Jitendra P. "F-Box Proteins in Rice. Genome-Wide Analysis, Classification, Temporal and Spatial Gene Expression during Panicle and Seed Development, and Regulation by Light and Abiotic Stress." *Plant Physiology* 143 (2007):1467–1483.
- Kalefetoğlu, Tuğçe. Ekmekçi, Yasemin. "The Effects of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms." *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi* 18 (2005): 723-740.
- Kantar, Melda. Unver, Turgay. Budak, Hikmet. "Regulation of Barley miRNAs Upon Dehydration Stress Correlated with Target Gene Expression." *Funct Integr Genomics* 10 (2010): 493–507.
- Khraiwesh, Basel. Zhu, Jian-Kang. Zhu, Jianhua. "Role of miRNAs and siRNAs in Biotic and Abiotic Stress Responses of Plants." *Biochimica et Biophysica Acta* 1819 (2012): 137–148.
- Kumar, Rajesh. "Role of MicroRNAs in Biotic and Abiotic Stress Responses in Crop Plants." *Appl Biochem Biotechnol* 174 (2014):93–115.
- Lee, Rosalind C. Feinbaum, Rhonda L. Ambros, Victor. "The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*." *Cell* 75 (1993): 843-854.
- Li, Wen-Xue. Oono, Youko. Zhu, Jianhua. He, Xin-Jian. Wu, Jian-Min. Iida, Kei. Lu, Xiao-Yan. Cui, Xinping. Jin, Hailing. Zhu, Jian-Kang. "The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance." *The Plant Cell* 20 (2008): 2238–2251.
- Liang, Gang. Yang, Fengxi. Yu, Diqiu. "MicroRNA395 Mediates Regulation of Sulfate Accumulation and Allocation in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* 62 (2010): 1046–1057.
- Liu, Han-Hua. Tian, Xin. Li, Yan-Jie. Wu, Chang-Ai. Zheng, Cheng-Chao. "Microarray-Based Analysis of Stress-Regulated MicroRNAs in *Arabidopsis thaliana*." *RNA* 14 (2008):836-843.

- Llave, Cesar. Kasschau, Kristin D. Rector, Maggie A. Carrington, James C. "Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants." *The Plant Cell* 14 (2002): 1605-1619.
- Lores, Patrick. Visvikis, Orane. Luna, Rosa. Lemichez, Emmanuel. Gacon, Gerard. "The SWI/SNF Protein BAF60b Is Ubiquitinated Through A Signalling Process Involving Rac GTPase and the RING Finger Protein Unkempt." *FEBS Journal* 277 (2010): 1453–1464.
- Lozano, Rafael. Giménez, Estela. Cara, Beatriz. Capel, Juan. Angosto, Trinidad. "Genetic Analysis of Reproductive Development in Tomato." *Int. J. Dev. Biol.* 53 (2009): 1635-1648.
- Lu, Congming. Zhang, Jianhua. "Effects of Water Stress on Photosystem II Photochemistry and Its Thermostability in Wheat Plants." *Journal of Experimental Botany* 50 (1999): 1199–1206.
- Lu, Xiao-Yan. Huang, Xue-Lin. "Plant miRNAs and Abiotic Stress Responses." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368 (2008a): 458–462.
- Lu, Shanfa. Sun, Ying-Hsuan. Chiang, Vincent L.. "Stress-responsive microRNAs in Populus." *The Plant Journal* 55 (2008b): 131–151.
- Luan, Yushi. Wang, Weichen. Liu, Ping. "Identification and Functional Analysis of Novel and Conserved MicroRNAs in Tomato." *Molecular Biology Reports* 41 (2014): 5385-5394.
- Ma, Zhaoxue. Hu, Xupeng. Cai, Wenjuan. Huang, Weihua. Zhou, Xin. Luo, Qian. Yang, Hongquan. Wang, Jiawei. Huang, Jirong. "Arabidopsis miR171-Targeted Scarecrow-Like Proteins Bind to GT cis-Elements and Mediate Gibberellin-Regulated Chlorophyll Biosynthesis under Light Conditions." *Plos One* 10 (2014): 1-12.
- Maheswari, M. Yadav, S. K. Shanker, Arun K. M. Kumar, Anil. Venkateswarlu, B. "Overview of Plant Stresses: Mechanisms, Adaptations and Research Pursuit." *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies* 1 (2012): 1-18.
- Maksymiec, Waldemar. "Signaling Responses in Plants to Heavy Metal Stress." *Acta Physiol Plant* 29 (2007): 177-187.

- McCauley, Ann. Jones, Clain. Jacobsen, Jeff. "Plant Nutrient Functions and Deficiency and Toxicity Symptoms." *Nutrient Management Module 9* (2009): 1-16.
- Merchan, Francisco. Boualem, Adnane. Crespi, Martin. Frugier, Florian. "Plant Polycistronic Precursors Containing Non-Homologous MicroRNAs Target Transcripts Encoding Functionally Related Proteins." *Genome Biology* 10 (2009): 1-14.
- Millar, Anthony A. Waterhouse, Peter M. "Plant and Animal MicroRNAs: Similarities and Differences." *Funct Integr Genomics* 5 (2005): 129-135.
- Mittler, Ron. Vanderauwera, Sandy. Gollery, Martin. Breusegem, Frank Van. "Reactive Oxygen Gene Network of Plants." *Trends in Plant Science* 9 (2004): 490-498.
- Mittler, Ron. "Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance." *Trends in Plant Science* 9 (2002): 405-410.
- Mittler, Ron. "Abiotic Stress, The Field Environment and Stress Combination." *Trends in Plant Science* 11 (2006): 15-19.
- Miyashita, Koichi. Tanakamaru, Shigemi. Maitani, Toshihiko. Kimura, Kazuyoshi. "Recovery Responses of Photosynthesis, Transpiration, and Stomatal Conductance in Kidney Bean Following Drought Stress." *Environmental and Experimental Botany* 53 (2005): 205–214.
- Mullet, John E. Whitsitt, Mark S. "Plant Cellular Responses to Water Deficit." *Plant Growth Regulation* 20 (1996): 119-124.
- Murashige, Toshio. Skoog, Folke. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiologia Plantarum* 15 (1962): 473-497.
- Navarro-González, Inmaculada. García-Valverde, Verónica. García-Alonso, Javier. Periago, M. Jesús. "Chemical Profile, Functional and Antioxidant Properties of Tomato Peel Fiber." *Food Research International* 44 (2011): 1528–1535.
- Park, Wonkeun. Li, Junjie. Song, Rentao. Messing, Joachim. Chen, Xuemei. "CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act

- in microRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana*." *Current Biology* 12 (2002): 1484–1495.
- Pfaffl, Micheal W. "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 29 (2001): 2002-2007.
- Phillips, Jonathan R. Dalmay, Tamas. Bartels, Dorothea. "The Role of Small RNAs in Abiotic Stress." *Febs Letters* 581 (2007): 3592-3597.
- Preston, Jill C. Hileman, Lena C. "Functional evolution in the plant Squamosa-Promote rBinding Protein-Like (SPL) gene family." *Frontiers in Plant Science* 4 (2013): 1-13.
- Redondo-Gomez, Susana. "Abiotic and Biotic StressTolerance in Plants." *Molecular Stress Physiology of Plants* 1 (2013): 1-20.
- Reinhart, Brenda J. Weinstein, Earl G. Rhoades, Matthew W. Bartel, Bonnie. Bartel, David P. "MicroRNAs in Plants." *Genes & Development* 16 (2002): 1616–1626.
- Sahlin, E. Savagea, G.P. Lister, C.E. "Investigation of the Antioxidant Properties of Tomatoes After Processing." *Journal of Food Composition and Analysis* 17 (2004): 635–647.
- Sarnowska, Elzbieta A. Rolicka, Anna T. Bucior, Ernest. Cwiek, Pawel. Tohge, Takayuki. Fernie, Alisdair R. Jikumaru, Yusuke. Kamiya, Yuji. Franzen, Rainer. Schmelzer, Elmon. Porri, Aimone. Sacharowski, Sebastian. Gratkowska, Dominika M. Zugaj, Dorota L. Taff, Aleksandra. Zalewska, Anna. Archacki, Rafal. Davis, Seth J. Coupland, George. Koncz, Csaba. Jerzmanowski, Andrzej. Sarnowski, Tomasz J. "DELLA -Interacting SWI3C Core Subunit of Switch/Sucrose Nonfermenting Chromatin Remodeling Complex Modulates Gibberellin Responses andHormonal Cross Talk in Arabidopsis." *Plant Physiology* 163 (2013): 305–317.
- Sauter, A. Dietz, K. J. Hartung, W. "A Possible Stress Physiological Role of Abscisic Acid Conjugates in Root-To-Shoot Signalling." *Plant, Cell and Environment* 25 (2002): 223-228.
- Sharp, Robert E. Poroyko, Valeriy. Hejlek, Lindsey G. Spollen, William G. Springer, Gordon K. Bohnert, Hans J. Nguyen, Henry T. "Root Growth Maintenance

- During Water Deficits: Physiology To Functional Genomics.” *Journal of Experimental Botany* 55 (2004): 2342-2351.
- Shukla, Lata I. Chinnusamy, Viswanathan. Sunkar, Ramanjulu. “The Role of MicroRNAs and Other Endogenous Small RNAs in Plant Stress Responses.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1779 (2008): 743-748.
- Singh, Karam B. Foley, Rhonda C. Oñate-Sánchez, Luis. “Transcription factors in plant defense and stress responses.” *Current Opinion in Plant Biology* 5 (2002): 430–436.
- Sun, Weining. Montagu, Marc Van. Verbruggen, Nathalie. “Small Heat Shock Proteins and Stress Tolerance in Plants.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1577 (2002): 1-9.
- Sun, Lingxia. Nocker, Steven Van. “Analysis of Promoter Activity of Members of The Pectate Lyase-Like (PLL) Gene Family in Cell Separation in Arabidopsis.” *BMC Plant Biology* 10 (2010): 1-13.
- Sunkar, Ramanjulu. Zhu, Jian-Kang. “Novel and Stress-Regulated MicroRNAs and Other Small RNAs from Arabidopsis.” *The Plant Cell* 16 (2004): 2001-2019.
- Sunkar, Ramanjulu. Kapoor, Avnish. Zhu, Jian-Kang. “Post-transcriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in Arabidopsis Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance.” *The Plant Cell* 18 (2006): 2051-2065.
- Sunkar, Ramanjulu. Li, Yong-Fang. Jagadeeswaran, Guru. “Functions of microRNAs in plant stress responses.” *Trends in Plant Science* 17 (2012): 196-203.
- Tarczynski, Mitchell C. Jensen, Richard G. Bohnert, Hans J. “Stress Protection of Transgenic Tobacco by Production of the Osmolyte Mannitol.” *Science* 259 (1993): 508-510.
- Thomas, Howard. Ougham, Helen J. Wagstaff, Carol. Stead, Anthony D. “Defining Senescence and Death.” *Journal of Experimental Botany* 54 (2003): 1127-1132.

- Todesco, Marco. Rubio-Somoza, Ignacio. Paz-Ares, Javier. Weigel, Detlef. "A Collection of Target Mimics for Comprehensive Analysis of MicroRNA Function in *Arabidopsis thaliana*." *Plos Genetics* 6 (2010): 1-10.
- Tunnacliffe, Alan. Wise, Michael J. "The continuing conundrum of the LEA proteins." *Naturwissenschaften* 94 (2007): 791–812.
- Verma, Sandhya. Nizam, Shadab. Verma, Praveen K. "Biotic and Abiotic Stress Signaling in Plants." *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective* 1 (2013): 25-49.
- Vinocur, Basia. Altman, Arie. "Recent Advances in Engineering Plant Tolerance To Abiotic Stress: Achievements and Limitations." *Current Opinion in Biotechnology* 26 (2005): 123-132.
- Wahid, A. Gelani, S. Ashraf, M. Foolad. M.R. "Heat Tolerance in Plants: An Overview." *Environmental and Experimental Botany* 61 (2007): 199–223.
- Wang, Wangxia. Vinocur, Basia. Altman, Arie. "Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering For Stress Tolerance." *Planta* 218 (2003): 1–14.
- Weese, Terri L. Bohs, Lynn. "A Three-Gene Phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae)." *Systematic Botany* 32 (2007): 445–463.
- Wen, Chi-Kuang. Chang, Caren. "Arabidopsis RGL1 Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Responses." *The Plant Cell* 14 (2002): 87–100.
- Xin, Mingming. Wang, Yu. Yao, Yingyin. Xie, Chaojie. Peng, Huiru. Ni, Zhongfu. Sun, Qixin. "Diverse Set of MicroRNAs Are Responsive To Powdery Mildew Infection And Heat Stress In Wheat (*Triticum aestivum* L.)." *BMC Plant Biology* 10 (2010): 1-11.
- Xu, Feng. Liu, Qian. Chen, Luying. Kuang, Jiebin. Walk, Thomas. Wang, Jinxiang. Liao, Hong. "Genome-wide Identification of Soybean Micrnas and Their Targets Reveals Their Organ-Specificity and Responses To Phosphate Starvation." *BMC Genomics* 14 (2013): 1-30.
- Yamaguchi, Shinjiro. "Gibberellin Metabolism and Its Regulation." *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008): 225-251.

- Yamasaki, Hiroaki. Abdel-Ghany, Salah E. Cohu, Christopher M. Kobayashi, Yoshichika. Shikanai, Toshiharu. Pilon, Marinus. "Regulation of Copper Homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis." *The Journal Of Biological Chemistry* 282 (2007): 16369–16378.
- Yang, Xiaozeng. Li. Lei. "Analyzing the microRNA Transcriptome in Plants Using Deep Sequencing Data." *Biology* 1 (2012): 297-310.
- Yasuda, Michiko. Ishikawa, Atsushi. Jikumaru, Yusuke. Seki, Motoaki. Umezawa, Taishi. Asami, Tadao. Maruyama-Nakashita, Akiko. Kudo, Toshiaki. Shinozaki, Kazuo. Yoshida, Shigeo. Nakashita, Hideo. "Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid-Mediated Abiotic Stress Response in Arabidopsis." *The Plant Cell* 20 (2008): 1678-1692.
- Yıldız, Mustafa. Terzi, Hakan. Cenkcı, Süleyman. Arıkan Terzi, E. Suna. Uruşak, Behiye. "Bitkilerde Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik Ve Biyokimyasal Markörleri." *Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi* 1 (2010): 1-33.
- Yin, Zujun. Li, Chunhe. Han, Xiulan. Shen, Fafu. "Identification of Conserved MicroRNAs and Their Target Genes In Tomato (*Lycopersicon esculentum*)." *Gene* 414 (2008): 60–66.
- Zhang, Baohong. Pan, Xiaoping. Cobb, George P. Anderson, Todd A. "Plant microRNA: A Small Regulatory Molecule With Big Impact." *Developmental Biology* 289 (2006): 3-6.
- Zhang, Jingyu. Xu, Yunyuan. Huan, Qing. Chong, Kang. "Deep Sequencing of Brachypodium Small RNAs At The Global Genome Level Identifies microRNAs Involved In Cold Stress Response." *BMC Genomics* 10 (2009): 1-16.
- Zhang, Xiaohui. Zou, Zhe. Gong, Pengjuan. Zhang, Junhong. Ziaf, Khurram. Li, Hanxia. Xiao, Fangming. Ye, Zhibiao. "Over-expression of microRNA169 confers enhanced droughttolerance to tomato." *Biotechnol Lett* 33 (2011): 403–409.
- Zhao, Botao. Liang, Ruqiang. Ge, Liangfa. Li, Wei. Xiao, Huasheng. Lin, Hongxuan. Ruan, Kangcheng. Jin, Youxin. "Identification of Drought-Induced microRNAs in Rice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354 (2007): 585–590.

Zhua, Cheng. Dinga, Yanfei. Liua, Haili. "miR398 and Plant Stress Responses." *Physiologia Plantarum* 143 (2011): 1–9.

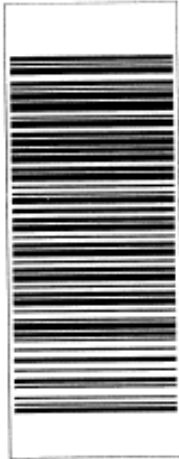
Zhu, Jian-Kang. "Salt And Drought Stress Signal Transduction in Plants." *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 (2002): 247–73.

Zhu, Jian-Kang. "Regulation of Ion Homeostasis Under Salt Stress." *Current Opinion in Plant Biology* 6 (2003): 441–445.



13-DEC-2014 13:55:32

UNICEL
CENTRE FOR GENETIC RESOURCES, THE NETHERLANDS



TRANSACTION 6076
Normal distribution

CGN_nr	Scn	P	Botanical name	Name	Date	Origin	Most important ancestor	Dorm. Break Meth.	M-Cnt
CGN15333	37	W	Solanum pennellii	LA 716	PER 19580216				NLD

Short explanation of the meaning of the columns and the codes used in the columns.
Column "CGN-nr." gives the CGN number, the unique accession and the codes used in the columns.
Column "Scn" gives the (sub-) crop of the population. Following codes have been used:

- 37 tomato
 - H Hybrid
 - W Wild
 - B Breeders variety
 - R Research material
 - L Land variety
 - O Weedy
- Column "P" gives the type of the population. Following codes can be used:

- I inbred line
- M mutant
- P pedigree according to Purdy et al.(1976)
- S selection
- X other

Column "Dorm.Break Meth." gives information on the method that can be used to dormancy in the seeds. Following method(s) can be used:

- Remove seed coat
 - Scarification
 - Long period/high temperature
 - Prolong period
- Column "Date" gives the date of first reference.
Column "Origin" gives the code of the origin of the accession. Following codes can be used:

Column "Most important ancestor" gives information about the ancestors. The first character is one of the following :

- NLD Netherlands
 - PER Peru
- Column "Date" gives the date of first reference.
Column "Origin" gives the code of the origin of the accession. Following codes can be used: