

**BAZI YERLİ BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE AĞIR METAL STRESİNE KARŞI  
MİRNA CEVAPLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Meryem ÇETİNKAYA**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Botanik Bilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Emel SÖZEN**

**Eskişehir**

**Eskişehir Teknik Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

Click or tap to enter a date.

## ÖZET

### BAZI YERLİ BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE AĞIR METAL STRESİNE KARŞI MİRNA CEVAPLARININ ARAŞTIRILMASI

Meryem ÇETİNKAYA

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, [Click or tap to enter a date.](#)

Danışman: Prof. Dr. Emel SÖZEN

Bu çalışmada kadmiyum stresine maruz bırakılan iki farklı buğday çeşidinin (Kutluk-94 ve Kunduru-1149) Cd biriktirme potansiyelleri ile ağır metal stresinde görevli olduğu bilinen 3 farklı miRNA, miR159, miR171 ve miR395'in ekspresyon seviyelerindeki değişikliğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kutluk-94 ve Kunduru-1149 tohumları petrilere distile su ile çimlendirilmiş, daha sonra buğday fideleri 100, 200 ve 300  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  solusyonunda bir hafta süre ile muamele edilmiştir. Buğday kök ve yaprak örneklerinde Cd miktarı yaş yakma yöntemi kullanılarak ICP-OES cihazında ölçülmüştür. Hem Kutluk-94 hem de Kunduru-1149 çeşitlerinin yaprak ve köklerinde biriken Cd miktarları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kutluk-94 ve Kunduru-1149 yapraklarında biriken Cd miktarı açısından belirgin bir farklılık yokken, köklerde ise tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir farklılık söz konusudur ( $p < 0.05$ ). Kunduru-1149 çeşidi köklerinde daha fazla Cd birikimi tespit edilmiştir. miRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Artan Cd dozlarında ağır metal stresi ile ilişkili miR159, miR171 ve miR395'in ekspresyonları çeşitler arasında değişiklik göstermiştir. Kunduru-1149'da miR159 ekspresyonu kökte yukarı regüle edilirken, yaprakta ise 100  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyon hariç diğer konsantrasyonlarda aşağı regüle edilmiştir.

Kutluk-94' de ise miR159'un ekspresyonunun hem yaprak hem de kökte yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir. miR171'in ekspresyonunun Kutluk-94 yaprak ve köklerinde 100  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonda yukarı regüle edildiği, 200 ve 300  $\mu\text{M}$ 'lık

konsantrasyonda ise aşağı regüle edildiği görülmüştür. Cd uygulanan Kunduru-1149 bitkilerinin kök ve yapraklarında ise miR171'in ekspresyonu aşağı regüle edilmiştir. Son olarak, miR395'in ekspresyonunun Kutluk-94 yapraklarında 100  $\mu$ M'lık konsantrasyonda aşağı regüle edildiği, 200 ve 300  $\mu$ M'lık konsantrasyonda ise yukarı regüle edildiği gözlenmiştir. Kutluk-94 köklerinde ise miR395'in ekspresyonunun tüm konsantrasyonlarda yukarı regüle edildiği görülmüştür. Kunduru-1149 yapraklarında tüm konsantrasyonlarda miR395'in ekspresyonunun aşağı regüle edildiği, köklerde ise 100  $\mu$ M'lık konsantrasyonda aşağı regüle edilirken, 200 ve 300  $\mu$ M'lık konsantrasyonda yukarı regüle edildiği gözlemlenmiştir.

Buğdayda bugüne kadar ağır metal stresinde görevli miRNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalar olmakla birlikte bu çalışma yerli buğday eşitleri üzerinde ağır metal stresi ile ilişkili miRNA'ların araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmadan elde edilen bilgiler bu konuda yapılacak sonraki çalışmalara rehberlik etmesi açısından önemlidir.

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

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF MIRNA RESPONSES AGAINST HEAVY METAL STRESS IN SOME DOMESTIC WHEAT VARIETIES

Meryem ÇETİNKAYA

Department of Biology

Programme in Botanical

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, Click or tap to enter a date.

Supervisor: Prof. Dr. Emel SÖZEN

In this study, it was aimed to determine the Cd accumulation potential of two different wheat cultivars (Kutluk-94 and Kunduru-1149) exposed to cadmium stress and determine the changes in the expression levels of 3 different miRNAs miR159, miR171 and miR395 which are known to be involved in heavy metal stress. Kutluk-94 and Kunduru-1149 seeds were germinated in petri dishes containing distilled water and then seedlings were treated in 100, 200 and 300  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  solution for one week. The amount of Cd in wheat root and leaf samples was measured in the ICP-OES device using the wet ashing method. The amount of Cd accumulated in the leaves and roots of both Kutluk-94 and Kunduru-1149 cultivars was found to be statistically significant when compared with the control group. While there was no significant difference in the amount of Cd accumulated in Kutluk-94 and Kunduru-1149 leaves, there was a significant difference in all concentrations in the roots ( $p < 0.05$ ). More Cd accumulation was detected in the roots of Kunduru-1149 cultivar. miRNA expression levels were determined by RT-PCR method. Expressions of heavy metal stress associated miRNAs miR159, miR171 and miR395 varied between cultivars at increasing Cd doses. In Kunduru-1149, miR159 expression was up-regulated in the root, while it was down-regulated in the leaf except the 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  concentration.

In Kutluk-94, the expression of miR159 was up-regulated in both leaves and roots. It was observed that miR171 was up-regulated in Kutluk-94 leaves and roots at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  and down-regulated at a concentration of 200 and 300  $\mu\text{M}$ . The expression of miR171 was down-regulated in the roots and leaves of Cd-treated Kunduru-1149 cultivar. Finally, miR395 was observed to be down-regulated at 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$

concentration and up-regulated at 200 and 300  $\mu\text{M}$  concentrations in Kutluk-94 leaves. In Kutluk-94 roots, miR395 was up-regulated at all concentrations. It was observed that miR395 was down-regulated at all concentrations in the leaves of Kunduru-1149, while it was down-regulated at 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  concentration in the roots, while it was up-regulated at 200 and 300  $\mu\text{M}$  concentrations.

Although there have been studies on miRNAs responsible for heavy metal stress in wheat, no such study has been found on domestic wheat varieties. The information obtained from the study is important in terms of guiding future studies on this subject.

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



## TEŞEKKÜR

Öncelikle Biyoloji Anabilim Dalı'nda Botanik alt bilim dalını seçmemde büyük bir etkisi olan araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Emel SÖZEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması kapsamında bizden tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Harun BÖCÜK'e ve Uzm. Merve SAĞLAM'a çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme en derin teşekkürlerimi sunarım.

Meryem ÇETİNKAYA

Click or tap to enter a date.

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

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

Meryem ÇETİNKAYA

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI .....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar DİZİNİ .....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Buğday.....	3
2.2. Bitkilerde Stres .....	7
2.3.Biyotik Stres Faktörleri .....	8
2.4.Abiyotik Stres Faktörleri.....	9
2.4.1. Su stresi.....	10
2.4.2.Tuz stresi .....	11
2.4.3.Işık stresi .....	12
2.4.4.Oksijen stresi.....	13
2.4.5.Yüksek sıcaklık stresi.....	14
2.4.6.Düşük sıcaklık (soğuk ve donma stresi) .....	14
2.4.7.Ağır metal stresi.....	15
2.5.Ağır Metallerin Bitkiye Alınması ve Taşınması .....	16
2.6.Bitkiler Ağır Metal Stresine Karşı Kendini Nasıl Korur? .....	18
2.6.1.Fitoşelatinler .....	18
2.6.2.Metallotiyoneinler .....	19

2.6.3.Reaktif oksijen türleri (ros) ve detoksifikasyonu .....	20
2.7.Ağır Metallere Yanıt Olarak Bitki Sinyali .....	20
2.8.MikroRNA (miRNA) .....	22
2.8.1.Bitki miRNA'ların sentezi .....	22
2.8.2.miRNA'lar hedef genlerinin ekspresyonunu nasıl düzenler? .....	24
2.8.3.mirRNA ve stres .....	24
2.8.3.1.miRNA ve ağır metal stresi.....	25
2.9.Çalışmada Kullanılan miRNA'lar ve Hedef Genleri .....	26
2.10.Konu ile İlgili Önceki Çalışmalar .....	28
<b>3.MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>33</b>
3.1.Materyal.....	33
3.2.Metot.....	33
3.2.1.Tohum yüzey sterilizasyonu .....	33
3.2.2.Çimlendirme ve stres uygulaması.....	33
3.2.3.Bitki kök ve yapraklarında Cd miktarının belirlenmesi .....	35
3.2.4.miRNA Dizilerinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı.....	36
3.2.5.miRNA izolasyonu.....	36
3.2.6.cDNA Sentezi .....	37
3.2.7. Kantitatif Real -Time PCR (qRT-PCR).....	38
3.2.8.qRT-PCR Analiz Metodu ve İstatistik .....	39
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>41</b>
4.1.Kutluk-94 ve Kunderu-1149 Buğday Çeşitlerinde Kadmiyum Miktarının Belirlenmesi .....	41
4.2.Kantitatif Real Time PCR Analizi.....	46
4.3.miRNA Gen ifadesi Analiz Sonuçları.....	47
4.4.miRNA Gen İfadesi Analiz Grafikleri .....	48
4.4.1. miR159 analiz sonucu .....	49
4.4.2.miR161 analiz sonucu .....	50
4.4.3.miR171 analiz sonucu .....	51
4.4.4.miR395 analiz sonucu .....	52
4.5.Çalışılan miRNA'ların Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi .....	53

4.5.1.Kutluk-94 çeşidi yaprak ve köklerinden elde edilen bulgular .....	53
4.5.2. Kunduru-1149 çeşidi yaprak ve köklerinden elde edilen bulgular.....	54
5.TARTIŞMA VE SONUÇ .....	57
KAYNAKÇA.....	62
ÖZGEÇMİŞ	



## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1.</b> Türkiye’de ve Avrupa Birliği Ülkelerinde Buğday Ürünleri Tüketimi...6	
<b>Tablo 2.2.</b> Tarımı Yapılan Bitkilerde Strese Bağlı Verim Kayıpları.....7	
<b>Tablo 3.1.</b> Hoagland besin solüsyon içeriği hazırlamak için kullanılan stok Miktarları.....34	
<b>Tablo 3.2.</b> Çalışmada Kullanılan miRNA’lar ve Hedef Genleri.....35	
<b>Tablo 3.3.</b> miRNA-cDNA Sentezi için Kullanılan MasterMix Bilgileri.....37	
<b>Tablo 3.4.</b> miRNA-cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları.....37	
<b>Tablo 3.5.</b> Real-Time qPCR için Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri.....38	
<b>Tablo 3.6.</b> Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları.....38	
<b>Tablo 4.1.</b> Kutluk-94 ve Kunduru-1149 yapraklarında Cd miktarı.....40	
<b>Tablo 4.2.</b> Kutluk-94 yapraklarında Ağır Metal miktarının İstatistikî Sonuçları...41	
<b>Tablo 4.3.</b> Kunduru-1149 yapraklarında Ağır Metal miktarının İstatistikî Sonuçları.....42	
<b>Tablo 4.4.</b> Kutluk-94 ve Kunduru-1149 köklerinde Cd miktarı.....43	
<b>Tablo 4.5.</b> Kutluk-94 kökte Ağır Metal miktarının İstatistikî Sonuçları.....44	
<b>Tablo 4.6.</b> Kunduru-1149 kökte Ağır Metal miktarının İstatistikî Sonuçları.....44	
<b>Tablo 4.7.</b> Kutluk-94 Yaprak miRNA Fc değerleri.....46	
<b>Tablo 4.8.</b> Kutluk-94 Kök miRNA Fc değerleri.....46	
<b>Tablo 4.9.</b> Kunduru-1149-yaprak miRNA Fc değerleri.....47	
<b>Tablo 4.10.</b> Kunduru-1149-kök miRNA Fc değerleri.....47	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. <i>Triticum sp</i> .....	3
Şekil 2.2. Bereketli Hilal bölgesi.....	3
Şekil 2.3. Buğday'ın Evrimi.....	4
Şekil 2.4. Buğday ürünlerinden elde edilenler.....	5
Şekil 2.5. Bitkilerin biyotik ve abiyotik strese karşı tutumu.....	7
Şekil 2.6. Bitkilerde biyotik stres faktörleri.....	8
Şekil 2.7. Abiyotik stres sinyal yollarını düzenleyen transkripsiyon faktörleri.....	9
Şekil 2.8. Tuz stresine karşı bitki tepkisinin şematik gösterimi .....	11
Şekil 2.9. Bitkilerde madde taşınım yolları .....	15
Şekil 2.10. Apoplastik ve simplastik yollardan kadmiyumun köklerden bitkilerin yapraklarına alınması ve taşınması .....	16
Şekil 2.11. Bitkilerde mikroRNA (miRNA) sentezi.....	22
Şekil 2.12. Bitkilerde ağır metale duyarlı mikroRNA'ların ifadesi....	25
Şekil 3.1. Buğday tohumlarının çimlendirilmesi, Cd uygulaması, ağır metal analizi ön hazırlık aşamalarına ait görseller.....	33
Şekil 4.1. miR159 Erime Eğrisi (a) Amplifikasyon Grafiği(b).....	48
Şekil 4.2. miR161 Erime Eğrisi (a) Amplifikasyon Grafiği(b).....	49
Şekil 4.3. miR171 Erime Eğrisi (a) Amplifikasyon Grafiği(b).....	50
Şekil 4.4. miR395 Erime Eğrisi (a) Amplifikasyon Grafiği(b).....	51
Şekil 4.5. Kutluk-94 Çeşidi Yaprak Örneklerinde miR159, miR171 ve miR395'in Farklı Cd Konsantrasyonlarındaki Ekspresyon Seviyeleri.....	52
Şekil 4.6. Kutluk-94 Çeşidi Kök Örneklerinde miR159, miR171 ve miR395'in Farklı Cd Konsantrasyonlarındaki Ekspresyon Seviyeleri.....	53

<b>Şekil 4.7.</b> Kutluk-94 Çeşidi Kök Örneklerinde miR159, miR171 ve miR395'in Farklı Cd Konsantrasyonlarındaki Ekspresyon Seviyeleri.....	54
<b>Şekil 4.8.</b> Kunduru-1149 Çeşidi Kök Örneklerinde miR159, miR171 ve miR395'in Farklı Cd Konsantrasyonlarındaki Ekspresyon Seviyeleri.....	54



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu$	: Mikro
$\mu$ l	: Mikrolitre
AGO	: Argounote protein
Cd	: Kadmiyum
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DCL1	: Dicer like 1
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleozidtrifosfatlar
g	: Gram
HEN1	: Hua Arttırıcı
lncRNA	: Uzun kodlanmaayan RNA
miRNA	: MikroRNA
ml	: mililitre
mM	: milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Pri-mRNA	: Primer Mikro Ribonükleik Asit
qrt-pcr	: Kantitatif Real Time PCR
RISC	: Ribonükleik Asit ile uyarılmış ile uyarılmış susturma kompleksi
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal RNA
RT-PCR	: Reverse-transkriptaz PCR
siRNA	: Küçük sessizleştirici RNA
snoRNA	: Küçük nükleolar RNA
snRNA	: Küçük nükleer RNA
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TF	: Transkripsiyon Faktörü
tRNA	: Taşıyıcı RNA

## 1. GİRİŞ

Bitkiler doğaları gereği hareketsiz olduklarından yaşamları boyunca büyüme, gelişme ve verimliliklerini olumsuz yönde etkileyen birçok stres faktörüyle karşılaşır (Büyük vd., 2012). Bu stres faktörleri patojenlerin enfeksiyonu, herbivorların saldırıları gibi biyotik faktörler olabileceği gibi kuraklık, soğuk, besin eksikliği ve ağır metallerin birikimi gibi abiyotik faktörler de olabilir. Abiyotik stres faktörlerinden olan ağır metal stresi, karasal ekosistemlerde önemli bir sorun teşkil etmektedir (Shahid vd., 2015). Sanayileşmenin gelişmesine bağlı olarak ağır metallerin birikimi toprağın yapısının bozulmasına ve toprakta yetişen bitkilerin fizyolojik ve moleküler aktivitelerinin bozulmasına neden olmaktadır (Panuccio vd., 2009; Hassan vd., 2017). Flora ve faunayı olumsuz yönde etkileyen başlıca ağır metaller arsenik (As), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) ve civa (Hg)'dir.

Kadmiyum, fitotoksik etkilere sahip önemli ağır metallere aittir. Besin zincirinde temel rol oynayan bitkilerin, Cd gibi suda kolay çözünebilen ağır metalleri kökleri aracılığıyla alması sonucu ciddi sorunlar meydana gelmektedir (Buchet vd., 1990). Kadmiyum, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC, 1993; Gill ve Tuteja, 2011) tarafından insan için güçlü bir kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. Kadmiyum, hem bitkilerin hem de hayvanların gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bitkilerde fotosentez, stoma hareketleri, su alınımları, protein sentezi gibi fizyolojik olayların bozulmasına sebep olmaktadır (Kennedy vd., 1987). Kadmiyum, tarım arazilerini; kanalizasyon sulama, düşük dereceli fosfat gübre kullanımı, böcek ilacı kullanımı, gübre uygulaması ve antropojenik aktivitelerle kirletmektedir (Clemens vd., 2013). Metallerin birikmesi izin verilen sınırlarda olduğunda tahıl tüketimi güvenlidir (Khan vd., 2008); ancak, tüketimin aşırısı toksik etki göstermektedir (Nariago vd., 1990, Melamed vd., 2003, Al-Othman vd., 2012).

Bitkilerin stres sinyallerini nasıl algıladığı ve olumsuz ortamlara nasıl adapte olduğu temel biyolojik sorulardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bitkilerin artan metal kirliliği gibi çevresel streslerden kaçınmamasından dolayı, bu tür stresleri etkili bir şekilde tanımak, cevaplamak ve buna uyum sağlamak için farklı sinyal yolları kullandığını göstermiştir.

Ağır metallerin (Cd, Pb) bitkiler tarafından tanınması, hücrenin moleküler ve biyokimyasal mekanizmalarının düzenlenmesi açısından bir cevap üretir.

Bu sinyal yolları, MAPK sinyali, kalsiyum sinyali ve hormon sinyalleri olarak bilinmektedir (Jalmi vd., 2018).

Bitkiler stres durumunda mikroRNA'lar (miRNA) tarafından gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası regülasyonu da dahil olmak üzere gen ekspresyonunu düzenlemek için çeşitli mekanizmalar kullanır (Nazir vd., 2011). MikroRNA'lar (miRNA) 20-22 nükleotit uzunluğunda, protein kodlamayan küçük RNA moleküllerinin bir sınıfını oluşturmaktadır. MikroRNA'lar, hedef mRNA'lara bağlanarak mRNA degradasyonunu veya translasyon inhibisyonunu gerçekleştirerek gen ifadesinin düzenlenmesini sağlarlar (Jones-Rhoades vd., 2012). Bugüne kadar bitkilerde ağır metal stresi ile ilişkili çok sayıda miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar genel olarak yaprak gelişimi, çiçek organların tanımlanması, yaprak polaritesi, oksin sinyalizasyonu ve stres cevabı şeklinde sınıflandırılabilir (Zhou vd., 2008).

Buğday, ılıman bölgelerde insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanılan temel besin maddelerindedir. İnsan diyetine katkı sağlayan temel amino asitler, mineraller ve vitaminler gibi bileşikler içerir (Sing vd., 2010). Buğday ve ürünleri açısından Uluslararası Hububat Konseyi (IGC); 2020/2021 sezonu için 2019/2020 sezonuna dayanarak, buğday üretiminin 4 milyon ton artarak 766 milyon ton, buğday tüketiminin 2 milyon ton artışla 750 milyon ton olacağını öngörmektedir (<https://www.tarimorman.gov.tr/> Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü Tarım Havzaları Daire Başkanlığı).

Buğday bitkisi, besin piramidindeki önemli bir yere sahip olması ve ağır metal birikimine eğilimli olmasından dolayı birçok araştırmada kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında ağır metale maruz bırakılan yerel buğday çeşitlerinden Kutluk-94 ve Kunduru-1149'un farklı organlarındaki Cd dağılımı incelenerek, ağır metalle ilişkilendirilen 3 farklı miRNA, miR159, miR171 ve miR395'in ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Buğday

Triticum, Poaceae familyasına ait çeşitli tahıl türlerinden ve bunların yenilebilir tanelerinden olan otsu ve tek yıllık bir bitkidir (Şekil 2.1). Buğday, ülkemizde yayılış gösteren 12 bine yakın bitki taksonu arasında hem bilimsel hem de sosyo-ekonomik açıdan büyük öneme sahiptir.



Şekil 2.1. *Triticum sp.* ([https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b4/Wheat\\_close-up.JPG](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b4/Wheat_close-up.JPG))

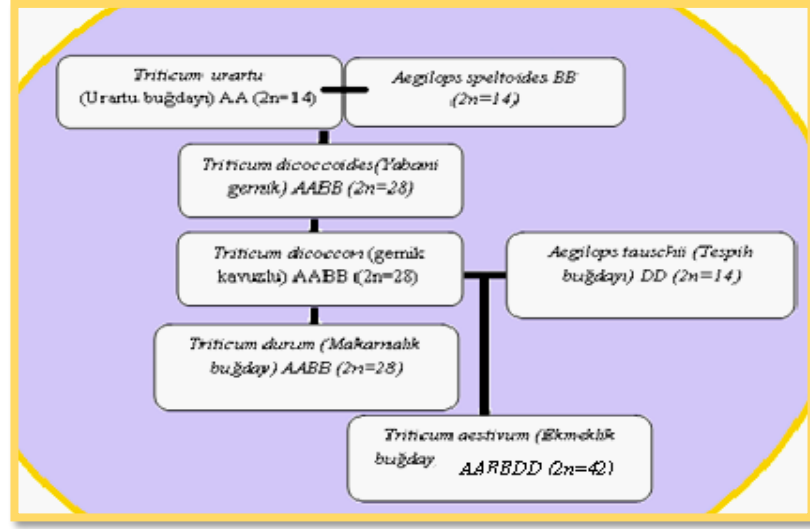
İlk buğday ekimi yaklaşık 10 bin yıl önce ve ‘Bereketli Hilal’ diye adlandırılan bölgede başlamıştır. Başta buğday ve arpa olmak üzere pek çok tahılın yabani atası, bu bölgenin doğal bitki türleridir. Bereketli Hilal, Türkiye'nin güney doğusundan başlayıp, güneyde Irak ve Suriye'yi, doğusunda İran'ı ve diğer bölgeleri (Lübnan, İsrail, Filistin) kapsamaktadır (Türkiye'nin Buğday Atlası, 2016), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Bereketli Hilal bölgesi (<http://www.mrdowling.com/603mesopotamia.html>)

Buğday, insan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında en eski ve en çok önem verilen bir tahıl ürünü olduğundan dolayı Türkiye’de olduğu gibi dünyada da (Avrupa, Kuzey Amerika ve Yakın Doğu) ekiliş ve üretim bakımından ilk sıralarda yer almaktadır (Dörtok vd., 2018). Ekonomik açıdan önem taşıması nedeniyle pirinçten sonra en çok ekilen ve tercih edilen bir tahıl ürünüdür (Emiroğlu vd., 2017).

Buğday türlerinin ilk ataları olan *Triticum* ve *Aegilops* cinslerinin, yaklaşık 3 milyon yıl önce meydana geldiği düşünülmektedir. Buğdayın evrimi sırasında *Triticum urartu*'dan A genomu, *Aegilops speltoides*'den B genomu, *Aegilops tauschii*'den ise D genomu'nun geldiği kabul edilmektedir (Şekil 2.3). Hekzaploid ekmeklik buğday *T. aestivum* ( $2n=42$ , AABBDD) ve tetraploid sert makarnalık buğday *T. durum* ( $2n=28$ , AABB) yaygın olarak üretilmekte ve en çok ekmeklik buğday (*T. aestivum*) tüketilmektedir (Özberk vd., 2010).



Şekil 2.3. Buğday'ın Evrimi

([http://www.gurbuzmizrak.com/Yayinlarim/BUGDAY\\_TopraktanSofrayaEkitap.pdf](http://www.gurbuzmizrak.com/Yayinlarim/BUGDAY_TopraktanSofrayaEkitap.pdf))

Buğdayın Türkiye'de bulunan yabani akrabalarından, insan eliyle ya da kendi aralarında doğal melezlenmeler sonucunda önce kavuzlu daha sonra da çıplak taneli kültür formları oluşmuştur (Türkiye'nin Buğday Atlası, 2016).

Buğday bitkisinin binlerce çeşidi bulunmaktadır, bunlardan en önemlisi insan beslenmesinde; ekme yapımında kullanılan ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum*); makarna yapımında kullanılan makarnalık buğday (*T. durum*); hamur işleri ve unlar için kullanılan daha yumuşak olan (*T. compactum*)'dur.

Buğday bitkisinin iklim özellikleri buğdayın gelişim dönemlerine göre farklılık göstermektedir.

Yetiştirme döneminin başlarında düşük sıcaklık ve bol nemli hava gerekli olup, çimlenme zamanında buğdayın istediği sıcaklık 5–10°C nem ise %60 olup, gelişim evresinde ise 10–15°C sıcaklık ve %65 oranında nispi nem gereklidir. Buğday kışa oldukça dayanıklı bir tahıl ürünüdür. Kışa dayanma toleransları buğday çeşitlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (<https://turktob.org.tr/tr/bugday-yetistirciligi/4914>).

Buğday bitkisi, insanların temel enerji ve protein kaynağı oluşturması bakımından en ön sıralarda yer almaktadır. Dünyada 94 ülkede 4,5 milyar insanın protein ihtiyacının yüzde 20'si buğday ürünleri tarafından karşılanmaktadır (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Buğday ürünlerinden elde edilenler (Boyacıoğlu, 2017)

<http://www.gidateknolojisi.com.tr/>

Ayrıca bazı buğday çeşitleri de nişasta, salça, malt, dekstroz, glüten, alkol gibi sanayi ürünlerin üretimi için kullanılmaktadır. B vitamini ve mineral maddeler, yağ asitleri ile sekonder bitki metabolitler olarak adlandırılan renk maddeleri ve fenoller bakımından zengindir. Ayrıca buğday ve ürünlerinin içerisinde bulunan yararlı maddelerden dolayı birçok hastalığı önleyici etkisinin olduğu bilinmektedir (Ryan vd., 2011).

Buğdayın içerisinde bulunan fenolik bileşikler, karotenoidler ve E vitamini gibi maddeler doğal besinsel antioksidan kaynağıdır ve bu bileşiklerin güçlü antioksidan aktiviteleri ile insan ve hayvanlarda meydana gelen birçok rahatsızlığın önüne geçilebilmektedir (Menteş-Yılmaz vd., 2011).

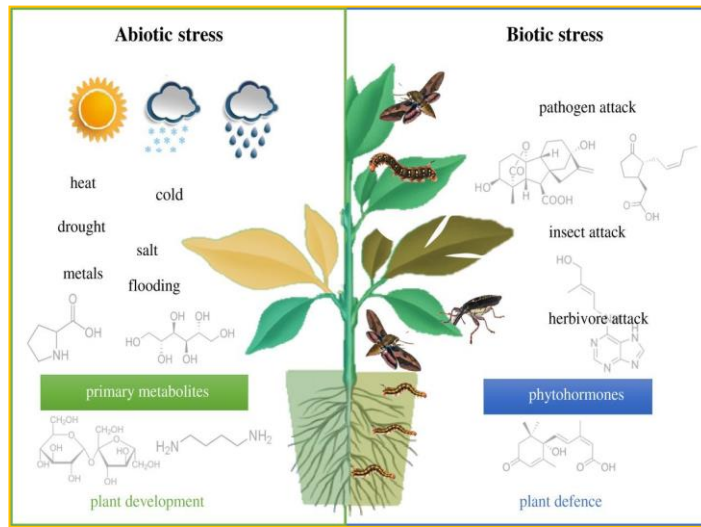
Dünyada en fazla buğday veya buğday ürünü tüketen ülkelerin başında Türkiye gelmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, Türkiye ve Avrupa Birliği ülkelerinde kişi başına düşen yıllık buğday miktarı Tablo 2.1’de gösterilmiştir (Kızılaslan, 2017).

**Tablo 2.1.** Türkiye’de ve Avrupa Birliği Ülkelerinde Buğday Ürünleri Tüketimi

	Kişi Başına Buğday Ürünleri Tüketimi (kg/yıl)	Toplam Kalori (kcal/gün)	Buğday ürünlerinden karşılana n kalori (kcal/gün)
Türkiye	173,5	3680	1311
AB Ülkeleri	102,9	3416	772

## 2.2. Bitkilerde Stres

Canlılar yaşamları boyunca birçok stres faktörüne maruz kalmaktadır. Bitkilerde stres; çevre şartlarının bir bitkinin büyümesini, gelişmesini ve verimliliğini olumsuz yönde etkileyerek, bitkilerde bir hasarın oluşması sonucunda bitkide meydana gelen duruma denir (Büyük vd., 2012). Stresin süresi, stres çeşidine bağlı olarak kısa süreli ya da uzun süreli olabilmektedir. Bitkiler yaşamları boyunca birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadır. Stres faktörleri biyotik ve abiyotik faktörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** Bitkilerin biyotik ve abiyotik strese karşı tutumu

(<https://www.slideshare.net/KeerthanaVk1/biotic-and-abiotic-stress-response>)

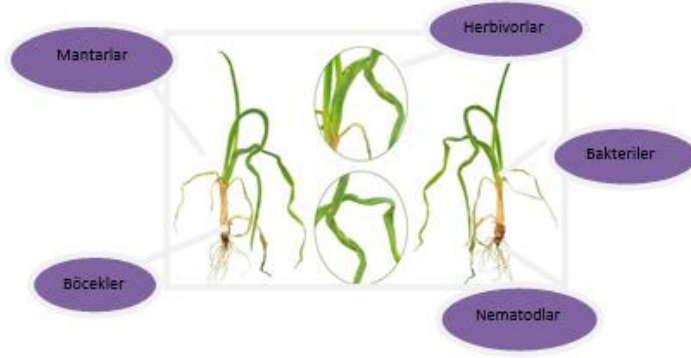
Biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kalan bitkilerde verim kaybı %65-90 oranında olabilmektedir (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2.** *Tarımı Yapılan Bitkilerde Strese Bağlı Verim Kayıpları*  
([https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/20578/mod\\_resource/content/0/BF%2014.%20HAFTA.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/20578/mod_resource/content/0/BF%2014.%20HAFTA.pdf))

Bitki	Rekor verim	Ort. verim	Strese bağlı ort. Verim kayıpları		Abiyotik kayıp rekor verim (%)
			Biyotik	Abiyotik	
Mısır	193000	4600	1952	12700	65.8
<b>Buğday</b>	<b>145000</b>	<b>1880</b>	<b>726</b>	<b>11900</b>	<b>82.1</b>
Soya	7390	1610	666	5120	69.3
Arpa	11400	2050	765	8590	75.4

### 2.3. Biyotik Stres Faktörleri

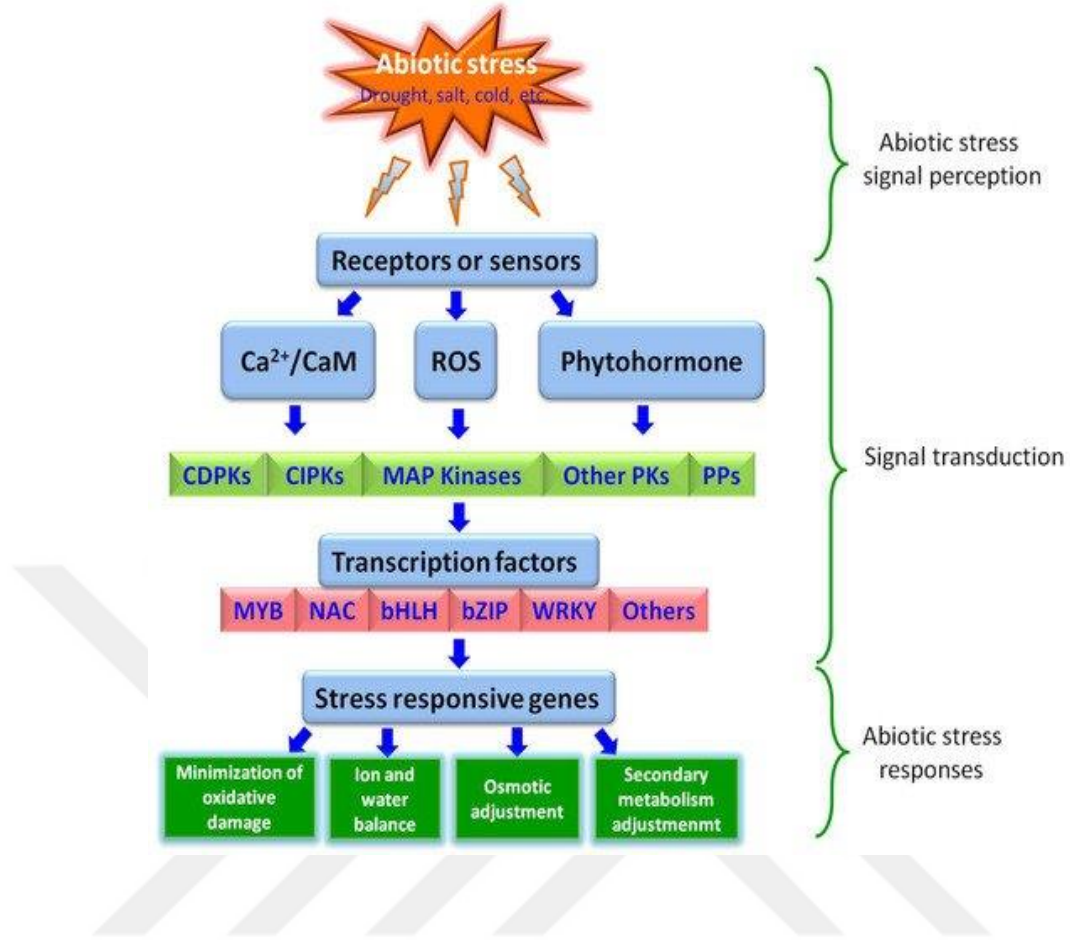
Biyotik stres, mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) enfeksiyonu veya zararlı hayvanların saldırıları sonucunda bitkide kısmi hasara veya bitkinin yaşayamayacağı ciddi zararlara neden olması olarak tanımlanabilir (Şekil 2.6). Stresin etkisi bitkilerin moleküllerinde, hücrelerinde, dokularında farklı derecelerde olabilmektedir. Bitkiler stres faktörlerine fizyolojik, hücrel ve moleküler olmak üzere üç farklı şekilde cevap verebilmektedir (Hill vd., 1998).



Şekil 2.6. Bitkilerde biyotik stres faktörleri (Fangping Gong (2014) ' den modifiye edilmiştir).

#### 2.4.Abiyotik Stres Faktörleri

Bitkiler, yaşamları boyunca çeşitli abiyotik stres faktörlerine maruz kalan hassas organizmalardır (He vd., 2018). Optimum büyüme, gelişme ve üreme faaliyetlerini devam ettirebilmek için ışık, su, karbon ve minerallere ihtiyaç duyarlar. Optimal seviyelerin altında veya üstünde olan bu gereksinimler bitki büyümesini ve gelişimini sınırlar. Bitkiler aşırı yüksek veya düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, ağır metallerle maruz kalma gibi abiyotik stres faktörleriyle karşılaşır (Şekil 2.7), (Zhu vd., 2016).



Şekil 2.7. Abiyotik stres sinyal yollarını düzenleyen transkripsiyon faktörleri (Khan, 2018)

(CDPK'ler, Siklin bağımlı protein kinazlar; MAP Kinazlar, Mitojenle aktive olan protein kinazlar; diğer protein kinazlar; transkripsiyon faktörleri; bZIP, bazik lözün fermuar ailesi; bHLH, temel heliks-loop-heliks DNA bağlama)

### 2.4.1. Su stresi

Bitkilerde, terlemeyle (transpirasyon) yitirilen suyun, çevreden alınan su miktarından fazla olması ya da bitkilerin köklerine suyun ulaşmadığı durumlarda ortaya çıkması sonucunda su stresi meydana gelmektedir. Stres sinyali olarak bilinen absisik asit (ABA)'in, su stresinin bir sonucu olarak arttığı ve bitki tepkilerinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Absisik asit' in (ABA; bitkisel bir hormon) miktarı yapraklarda oldukça fazladır fakat kök ve diğer organlarda bu artış daha azdır. Absisik asit stomaların kapanmasını sağlar ve suyun transpirasyonunu (terlemeyle kaybını) önler.

Ayrıca, bitkinin tepe organlarında gelişmeyi azaltarak suyun kök sisteminde kullanılmasına, dolayısıyla kökün derinlere doğru inebilmesine imkân sağlar.

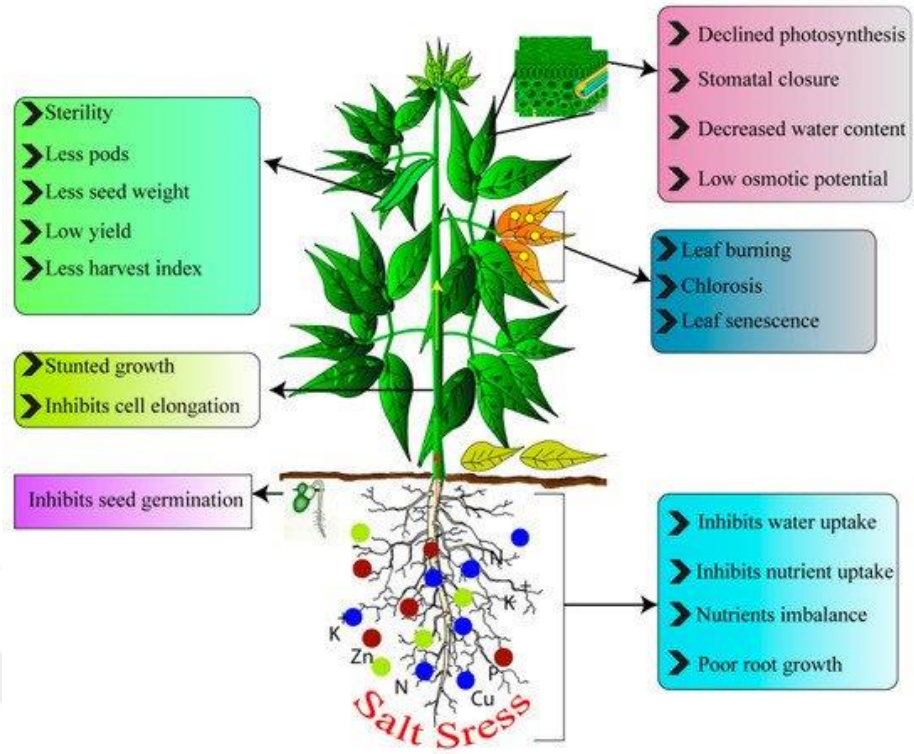
Su kazanma ve kullanma yeteneği yüksek olan bitkiler (C<sub>4</sub> ve CAM gibi) kuraklığa daha fazla direnç gösterebilmektedir (Seyed vd., 2012).

#### **2.4.2. Tuz stresi**

Tuz stresine yönelik yapılan araştırmalarda tuz stresi ve tuz şoku olmak üzere farklı iki kavram ortaya atılmıştır. İlk kavram tuz stresi, bitkilerin NaCl ile karşı karşıya kalması durumundaki tepkilerini ortaya koymakta ve iki farklı tipte ortaya çıkabilmektedir. Birincisi bitkilerin giderek artan tuz konsantrasyonu ile muamele edilmesi, ikincisi ise bitkileri düşük bir tuz konsantrasyonu ile karşı karşıya bırakmak ya da bu iki olayın birlikte yapılmasını kapsamaktadır (Shavrukov vd., 2013).

Tuz stresi genelde bitkilerde iki nedenden dolayı meydana gelmektedir. İlk neden; kök bölgesinde çözünmüş tuzların fazlalığı sonucunda yoğunluğun artmasına bağlı olarak bitkinin suyu almakta güçlük çekmesi durumudur. İkinci neden ise iyon artışına bağlı olarak toksik etki göstermesinden kaynaklanmaktadır. Tuz stresi bitkilerde kısırlık, düşük verim, büyümede gerilik (bodurluk), tohum çimlenmesinin engellenmesi, kloroz, su alınımının engellenmesi gibi olaylara neden olmaktadır (Şekil 2.8). Sonuç olarak, tuz stresine karşı tuzluluk toleransında yer alan mekanizmaların anlaşılması ve tuza toleranslı bitkiler geliştirmek gerekmektedir (Dell'Aversana vd., 2011).

Tuz şokunda ise bitkiler yüksek tuz konsantrasyonu durumu ile anlık ve ani olarak karşılaşmaktadır (Tiryaki vd., 2018). Dünyada özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde yetiştirilen kültür bitkilerinde görülür.



Şekil 2.8. Tuz stresine karşı bitki tepkisinin şematik gösterimi (Nadeem, M., 2019)' dan modifiye edilmiştir.

### 2.4.3. Işık stresi

Işık bitkilerin yaşamlarını sürdürebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak ışık şiddeti miktarının değişmesine bağlı olarak bitkilerde bazı hasarlar meydana gelmektedir. Örneğin; aşırı ışık, bitkilerde fotosentez mekanizmasını negatif yönde etkileyerek fotosistem II (PSII) ve reaksiyon merkezlerinin bozulmasına yol açmaktadır. Ayrıca ışığa bağımlı tepkimelerini de etkileyerek strese neden olmaktadır. UV ışınları da yüksek miktarda enerji taşıdıklarından dolayı zararlı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin; proteinlerdeki disülfid bağlarının parçalanmasına ve DNA'nın yapısında bozukluklar meydana gelmesine neden olabilmektedir (Arróniz-Crespo vd., 2004).

Gelişmiş bitkilerin özellikle kütikula tabakasında yer alan mumlar ve sitoplazmalarındaki bazı maddeler, UV ışınlarını tutarak bitkinin korunmasına yardımcı olmaktadır.

#### 2.4.4.Oksijen stresi

Bitkiler ve algler oksijen üreten aerobik organizmalardır ve enerji üretmek için aerobik solunum yapmaktadır. Ancak oksijenin yeterli olmaması durumunda bitkiler dahil tüm aerobik canlıların yaşamı tehlikeye girmekte hatta ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Yaşamları boyunca bitkiler ve algler, tamamen aerobik bir durumdan oksijen eksikliğine (hipoksi) veya toplam oksijen yokluğuna (anoksi) kadar değişebilen çeşitli oksijen konsantrasyonlarına maruz kalmaktadır (Drew vd., 1997). Oksijen eksikliği, ATP üretimini de olumsuz yönde etkilemektedir. Bunun nedeni oksijenin, solunum sırasında meydana gelen mitokondriyal oksidatif fosforilasyondaki elektronların son alıcısı olmasından kaynaklanmaktadır (Banti vd., 2013).

Toprağın drenajının (su tutma kapasitesinin üzerindeki suyun toprak alt katmanlarına sızması) yetersiz olması, yağmur ya da sulamanın aşırı olması gibi durumlarda toprağın içi suyla dolmaktadır. Porların su ile dolması durumunda gaz haldeki O<sub>2</sub>'nin difüzyonu da yavaşlamaktadır, çünkü çözülmüş oksijenin durgun suda difüzyonu çok yavaştır. Dolayısıyla, aşırı yağış, toprak su birikintisine veya bitkilerin tamamen su içerisinde kalmasına neden olabilir, bu da ürün verimini ve miktarını olumsuz yönde etkilemektedir.

Oksijen sıcaklığın düşük olduğu durumlarda çok yavaş azalır, fazla zarar oluşmaz ancak sıcaklığın yüksek olduğu (20°C'den büyük) durumlarda toprak faunası ve mikroorganizmalar tarafından 24 saat gibi kısa bir süre içerisinde tüketilir. Oksijensiz ortamlarda kökler zarar görür. O<sub>2</sub> kıtlığından zarar görmüş kökler sürgünlere zarar verebilmektedir. Anoksik ve hipoksik köklerde sürgünlerde gerçekleşmesi gereken fizyolojik işlemlerin gerçekleşmesine yetecek miktarda enerji bulunmamaktadır. Buğday ve arpa köklerinin besleyici iyonları absorplayamaması ve ksileme (ve oradan sürgüne) taşıyamaması, büyüyen ve gelişen dokularda iyon kıtlığına neden olur. Floemde taşınabilen elementlerin (N, P, K) genç yapraklara aktarılması sonucu yaşlı yapraklarda sararma erken başlar.

#### **2.4.5.Yüksek sıcaklık stresi**

Bitkilerde yüksek sıcaklık stresi; sıcaklığın optimum seviyesinin üzerinde olduğu durumda ortaya çıkan bir faktördür. Bu yüksek sıcaklık değeri 15-45°C sınırının üstündeki sıcaklıklar olarak tanımlanabilir. Bu sıcaklık değerlerinin artması küresel ısınmanın da gittikçe artacağı düşüncesini ortaya çıkarmaktadır.

Ayrıca CO<sub>2</sub> miktarının ve diğer sera gazlarının miktarının yükselmesi bitkilerin ciddi ölçüde zarar görmesine ve diğer sorunların ortaya çıkmasına neden olacaktır (Bahuguna vd., 2014). Yüksek sıcaklık, bitkilerin (büyüme, metabolizma ve ürünler) üzerinde büyük ölçüde negatif etkilere sahiptir. Bu negatif etkiler moleküllerin hareketlerini hızlandırarak büyük organik moleküller arasındaki bağların gevşemesine ve zarların daha akışkan hale gelmesine neden olur. Yüksek sıcaklık hücrenin yapısında değişikliklere ve hücrenin fonksiyonlarının değişmesine neden olmaktadır.

Bitkiler yüksek sıcaklığa karşı tepki gösterirler. Bu tepki uzun dönemde evrimsel, fenolojik ve morfolojik, kısa dönemde ise yaprak yapısında meydana gelen değişimi, transpirasyonun, membran lipit durumunun değişimi gibi durumları da içermektedir (Redondo vd., 2013).

#### **2.4.6.Düşük sıcaklık (soğuk ve donma stresi)**

Bitkilerin optimum koşullarının altındaki (20°C'nin altında) veya 0°C'nin altındaki sıcaklıklara maruz kalmaları (donma) sonucunda, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi olumsuz yönde etkilenerek üreme ve verimliliği önemli ölçüde kısıtlanmaktadır. Bitkiler düşük sıcaklıklara maruz kaldıklarında hücre membran yapısının bozulması, kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlarda yavaşlama, enzimlerin yapısında meydana gelen bozulmalar ve son olarak da su miktarındaki değişiklikler gibi problemlerle karşılaşmaktadır. Bitkilerin düşük sıcaklıklara tolerasında hücresel ve moleküler mekanizmaların önemi çok büyüktür. Bu mekanizmalar bitki öz suyunda çözülebilir madde değişimlerine, membran lipit bileşiminde, protein miktarında, enzim aktivitesinde ve antioksidant sistemdeki değişimlere neden olmaktadır (Aslantaş vd., 2010). Örneğin, dinlenme halindeki hücrelerde şekerlerin ve proteinlerin artışı hücre içindeki buz oluşumunu azaltır ve bu durum bitkinin dona dayanıklılığını arttırmaktadır (Küden vd.,

1998). Bitkilerin soğuga karşı toleransları bitki türüne ve organlarına (çiçek ve tomurcuk) bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Pamuk, soya fasulyesi, pirinç ve mısır gibi bitkiler soğuga karşı duyarlı bitkilerdendir.

#### **2.4.7. Ağır metal stresi**

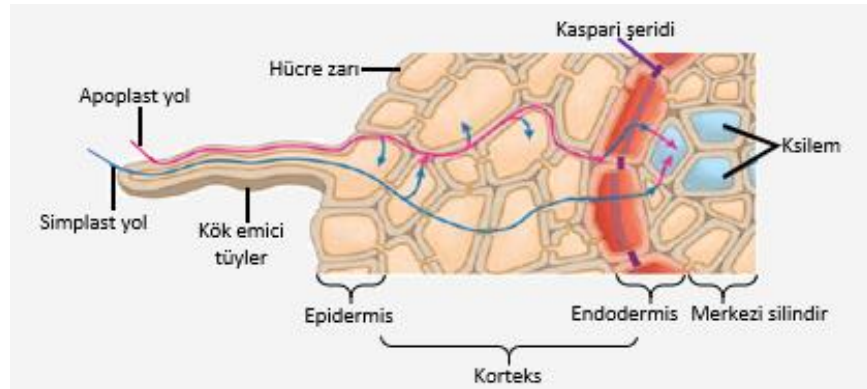
Ağır metaller, özgül ağırlıkları 5 gr/cm<sup>3</sup>'ten fazla olan elementler olarak tanımlanmaktadır ve periyodik tablonun geçiş grubunda bulunmaktadır (Guevara-García vd., 2017). Ağır metaller, doğada yer kabuğunda, ayrışma süreci boyunca da toprakta bulunur. Ni, Cr ve Co gibi metaller serpentin topraklarda bulunurken; Zn, Pb ve Cd gibi metaller en çok kalamın topraklarda bulunur. İnsan aktiviteleri doğada ağır metal birikimine neden olmaktadır. Tarım toprağında kullanılan inorganik ve organik gübreler, kirli sulama suları, insektisitler (böcek ilaçları) ve mantar ilaçları buna örnek olarak verilebilir. Ayrıca, maden atıkları ve metallerin aşınımı toprak ve yeraltı suyunu kirletebilmektedir (Greger vd., 2002).

Bitki gelişimi için gerekli olan makro (C, O, H, Mg, S, N, Ca, P, K) ve mikro elementler (Cu, Zn, Mn, Fe, Mo, B, Ni, Co ve Cl) bitkiler için temel fizyolojik ve biyokimyasal süreçler için önemlidir. Fotosentez, klorofil biyosentezi, redoks reaksiyonları, nükleik asit metabolizması, protein modifikasyonu, karbonhidrat mekanizmalarında ve azot fiksasyonu gibi olayların gerçekleşebilmesi açısından oldukça önemli rollere sahiptirler (Dutta vd., 2018). Bitki gelişimi için gerekli elementlerin arasında bazı ağır metaller de vardır ancak alüminyum, arsenik, vanadyum, cıva, kurşun, kadmiyum ve selenyum gibi ağır metallerin aşırı birikiminden dolayı bitkilerin doku ve organlarında bozukluklar meydana gelmekte ve bitkilerin gelişimi olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu toksik etkiler bitkilerde stoma hareketleri, transpirasyon, su alınımı, fotosentez, enzim yapısı, çimlenme, protein sentezi, hormonal düzenlemeler ve membran stabilitesi gibi fizyolojik olayların bozulmasına neden olmaktadır (Kennedy vd., 1987; Öktüren vd., 2006). Ağır metallerin ekosistemlerde (su, hava, toprak) aşırı birikimi, Dünya'daki tüm canlıların yaşamını büyük ölçüde tehdit etmektedir.

## 2.5.Ağır Metallerin Bitkiye Alınması ve Taşınması

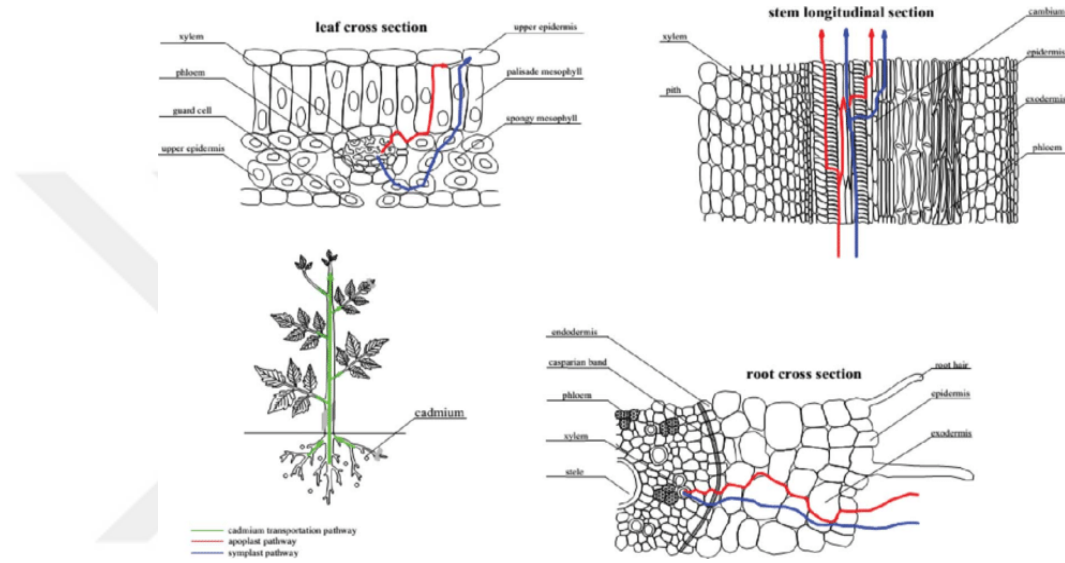
Ağır metallerin alınması difüzyon yoluyla topraktan kökler aracılığıyla, gövdeye taşınmasını içermektedir. Ağır metallerin aşırı alınımı bitkilere doğrudan veya dolaylı yönden zarar verebilmektedir. Ağır metallerin doğrudan zararı bitkinin bazı organlarında aşırı birikimi ve bu organlara zarar vermesini kapsarken, dolaylı yönden ise ağır metallerin toprakta birikmesiyle olmaktadır.

Ağır metallerin asıl alınımı kökler aracılığıyla simplastik (interselüler) ve apoplastik (ekstraselüler) yollarla gerçekleşmektedir (Şekil 2.9) Apoplastik yolla taşınımında hücre çeperinin katyon değişim kapasitesi ile ilgili bir sınırlama vardır (Raskin vd., 1997). Bu sınırlama kökün endodermis tabakasında bulunan kaspari şeridinden kaynaklanmaktadır. Hücreler arası boşluklara taşınan ağır metaller kökün endodermis tabakasında bulunan kaspari şeridinden dolayı iletim dokularına ulaşamamaktadır. Kaspari şeridini aşamayan bu metaller ancak hücre membranında bulunan bazı taşıyıcı proteinler aracılığıyla endodermis hücrelerinin sitoplazmasına geçebilmektedir. Daha sonra taşınan bu ağır metaller hücreleri birbirine bağlayan plazmodesmalar yardımıyla odun (ksilem) ve soymuk (floem) borularını çevreleyen perisikl dokuya geçerek simplastik yolla taşınım gerçekleşmektedir.



Şekil 2.9. Bitkilerde madde taşınım yolları(<http://www.biyolojiportali.com/konu-anlatimi/12/24/Bitkilerde-Madde-Tasinmasi>)

Ağır metal iyonları, iyon taşıyıcıları ya da kanalları aracılığıyla bitki hücrelerine girmektedir (Şekil 2.10) (Worms vd., 2006). Bitkilerde birkaç protein sınıfı ağır metallerin taşınmasında rol oynamaktadır. Bitkilerde ağır metal stresine karşı metal iyonu homeostazisi ve toleransında rol alan ağır metal (veya CPx-tip) ATPaz'ları, (Williams vd., 2000) katyon-difüzyon hızlandırıcı (CDF) protein ailesi, doğal dirençle ilişkili makrofaj protein (Nramp) ailesi ve çinko-demir permeaz (ZIP) ailesi (Guerinot vd., 2000) örnek olarak verilebilir.



**Şekil 2.10.** Apoplastik ve simplastik yollardan kadmiyumun köklerden bitkilerin yapraklarına alınması ve taşınması. Kırmızı çizgi apoplastik yolu, mavi çizgi simplastik yolu göstermektedir (Song, Yu vd. 2017)

P-tipi ağır metal ATPaz'ların çeşitli organizmalarda tanımlanmış ve hücre zarından  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Pb}$  gibi ağır metallerin taşınmasında rol oynadığı bilinmektedir (Williams vd., 2000). Arabidopsis P-tip ATPaz (PAA1) yüksek bitkilerde keşfedilen ilk CPxATPaz'dır (Belouchi vd., 1997). Nramp metal taşıyıcılarının  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  gibi ağır metallerin taşınmasına aracılık ettiği bildirilmiştir (Belouchi vd., 1997). Tütün'de hiperakümülatör bitki *Thlaspi caerulescens* Nramp3 (TcNramp3) geninin ekspresyonunun yüksek derecede olması Cd hassasiyetine karşı duyarlı olduğunu ve TcNramp3 taşıyıcısının bitkilerde katyon homeostazisinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir (Wei vd., 2009).

Arabidopsis ve *Oryza sativa* bitkileri sekiz HMA (ağır metal ATPaz) genine sahip olup (Baxter vd., 2003) ağır metal taşıyıcı ATPaz4 (HMA4) olarak da adlandırılan P1B-tip ATPaz'lar metal taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır. Arabidopsis'te yapılan çalışmalar, HMA'ların bir grubu olan HMA1-4'ün, Co, Zn, Cd ve Pb'nın taşınmasında diğer grubunun ise HMA5-8'in Ag ve Cu'nun taşınmasından sorumlu olduğunu göstermiştir (Takahashi vd., 2012).

Yüksek bitkilerdeki ağır metal taşıyıcılarından birisi de ZIP protein ailesi olarak bilinmektedir. Cd, Fe, Zn ve Mn iyonlarının taşınmasında rol oynayan ZIP gen ailesine ait birçok gen ve ZIP gen homoloğu olan ZNT1 geni hiperakümülatör *Thlaspi caerulescens* bitkisinde de tespit edilmiştir (Pence vd.,2000, Yang vd., 2005).

## **2.6.Bitkiler Ağır Metal Stresine Karşı Kendini Nasıl Korur?**

Bitki hücreleri, ağır metal stresinden korunmak için bazı mekanizmalar geliştirmiştir. Hücre duvarının ligninleşmesi, kalın epidermal tabaka, yaprak yüzey trikomları ve mikorizal birleşimler gibi morfolojik yapılar ağır metal stresine karşı ilk duyarlı kısımlardır. Trikomların, metallerin detoksifikasyonu için depolanma yeri olarak işlev gördüğü ve çeşitli sekonder metabolitleri açığa çıkardığı gözlemlenmiştir. Bitki hücreleri, fazla ağır metallerin sitozolden uzaklaştırılması için şelatlayıcı bileşiklerin üretiminin (metal bağlayıcı ligandlar) aktivasyonunu gerçekleştirmektedir.

### **2.6.1.Fitoşelatinler**

Fitoşelatinler, tiyol bakımından zengin, düşük molekül ağırlıklı peptitlerdir. Fitoşelatinler sitozolde sentezlenir ve daha sonra ATP bağlayıcı kaset taşıyıcısı vasıtasıyla taşınır. Ayrıca farklı bitki türlerinde Cd<sup>+2</sup> kaynaklı stres altında fitoşelatinlerin sentezinin arttığı gözlemlenmiştir. *Pisum sativum*'da (bezelye) (Klapheck vd., 1995), domates (Chen vd., 1997) ve Arabidopsis'te (Howden vd., 1995) benzer fitoşelatin sentaz aktiviteleri tespit edilmiştir. Dokuya özgü fitoşelatin sentaz ekspresyonunun belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada domates bitkilerinin kök ve gövdelerinde aktivite tespit edilmiş ancak yaprak veya meyvelerde tespit edilmemiştir (Chen vd., 1997).

## 2.6.2.Metallotiyoneinler

Metallotiyoneinler (MT'ler); düşük moleküler ağırlıklı (4-14 kDa), sistince zengin., Cu, Zn, Cd, As gibi çeşitli ağır metallerin detoksifikasyonunda rol oynayan metal bağlayıcı proteinlerin bir sınıfı olarak bilinmektedir (Cobbett vd., 2002).

Ağır metallerin plazma membranı yardımıyla sitozolden atılması veya sitozolik metal bağlanması ardından vakuolde bu komplekslerin tutulması ağır metal stresine karşı gösterilen temel mekanizmalardandır.

Bakıra toleranslı *Silene vulgaris* populasyonlarında artmış düzeyde SvMT2b gen transkriptlerinin bulunduğu ve mayada yüksek SvMT2b ifadesinin Cu toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Van vd., 2001).

*Medicago sativa* (yonca) bitkilerinde MsMT2a geninin hem kontrol hem de Cd stresi altında; MsMT2b geninin ise sadece Cd stresi varlığında ifade edildiği gösterilmiştir. Bu durumda MsMT2a'nın bitkinin tüm gelişim evrelerinde yaygın olarak bulunabileceği ancak MsMT2b'nin ağır metallerle muamelesi sonucunda duyarlı bir gen olabileceği ileri sürülmüştür (Wang vd., 2011).

Ayrıca bazı amino asitler de metal iyonlarının aşırı birikimine karşı bitkilere direnç kazandırmada önemli rol oynamaktadır. Örneğin; histidin amino asidinin ağır metal metabolizmasında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada; ağır metal birikimini ve direncini araştırmak için kadmiyum (Cd) ağır metali iki farklı bitki türünde incelenmiştir. Bu bitkiler *Noccaea caerulescens* ve *Arabidopsis halleri*' dir. Cd ile kontamine olan toprakta 30, 60 ve 90 günlük bitki yetiştiriciliği farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak (Cd1 = 30, Cd2 = 60 ve Cd3 = 90 mg Cd / kg toprak) gerçekleştirilmiş ve her iki tür arasında Cd stresinin, amino asit seviyelerinde farklı değişikliklere yol açtığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak *Arabidopsis halleri*'ye kıyasla *Noccaea caerulescens* köklerinde daha yüksek amino asit birikimi olduğunu ve histidin içeriğinin *Arabidopsis halleri* 'ye göre 10 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Zemanová vd., 2014).

### **2.6.3.Reaktif oksijen türleri (ros) ve detoksifikasyonu**

Ağır metal birikimi organizmalara büyük ölçüde zarar vermektedir. Bu zararlar; organizmalarda mutasyonlara ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açmaktadır. Bu kararsız ve oldukça reaktif türler, oksijenin elektron alıp vermesiyle ilişkilidir. Hücrelerde bilinen en önemli ROS'lar; hidroksil radikali, süperoksit anyonu, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve lipit peroksitleri kapsamaktadır.

ROS üretiminin artması lipit oksidasyonunu başlatır ve belirli bir eşik değere ulaşıldığında da bitkilerde programlanmış hücre ölümünü teşvik eder.

Bitkiler stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek ve ROS'un kontrolünü sağlamak için farklı antioksidanlara sahiptir. Bu antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

Enzimatik olan antioksidanlar; askorbat peroksidaz (APX), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX), enzimatik olmayanlar ise askorbik asit (AA), karotenoidler, tokoferoller (E vitamini), glutatyon ve fenolik bileşiklerdir (Büyük vd., 2012). Enzimatik olan antioksidanlardan; SOD enzimi süperoksit radikallerini temizlerken; katalaz, hidrojen peroksitin suya ve oksijene dönüşümünü katalizler (Beyer vd., 1987). Glutatyon peroksidaz, radikallerin ve lipit ürünlerinin uzaklaştırılmasında görevlidir (Kireççi vd., 2018).

Enzimatik olmayan antioksidanlardan; tokoferoller (vitamin E), radikallerin yok edilmesi, yapıların onarılması ve endojen savunma sistemlerinin güçlendirilmesi gibi görevlere sahip olması açısından önemli bir antioksidandır (Karabulut vd., 2016). Fenolik bileşikler ise flavonoidleri ve tanenleri içeren polifenolik sekonder metabolitlerdendir. Serbest radikal zincirlerinin sonlandırıcıları ve lipit peroksidasyonunu katalize edebilen redoks-aktif metal iyonlarının bağlanmasında rol oynamaktadır.

### **2.7.Ağır Metallere Yanıt Olarak Bitki Sinyali**

Son zamanlarda yapılan çalışmalar bitkilerin artan metal kirliliği gibi çevresel streslerden kaçamamasından dolayı, bu tür stresleri etkili bir şekilde tanımak, cevaplamak ve buna uyum sağlamak için farklı sinyal yollarına sahip olduğunu göstermiştir.

Ağır metallerin (özellikle Cd ve Pb gibi) bitkiler tarafından tanınması, hücrenin moleküler ve biyokimyasal mekanizmalarının düzenlenmesi açısından bir cevap üretir. Bu sinyal yolları; MAPK sinyali, kalsiyum sinyali ve hormon sinyalleri olarak bilinmektedir (Jalmi vd., 2018). Mitojenle aktive edilen protein kinazlar (MAPK'lar) yüksek oranda korunmuş bir Protein Kinaz (PK) ailesini oluşturmaktadır.

MAPK kaskadları, ardışık olarak aktive edilen üç protein kinazdan (MAP3K, MAP2K, MAPK) oluşur (Gallego vd., 2012). Yonca (*Medicago sativa*) fideleri üzerinde yapılan bir çalışmada bitkinin Cu veya Cd iyonlarına maruz kalmasıyla, mitojenle aktive edilen protein kinazların (MAPK) aktif hale geçtiğini göstermiştir (SIMK, MMK2, MMK3 ve SAMK).

MAPK aktivasyonunun karşılaştırılması, SIMK, MMK2, MMK3 ve SAMK'nın Cu iyonları tarafından hızlı bir şekilde aktive edildiğini, Cd iyonlarının da gecikmeli MAPK aktivasyonunu teşvik ettiğini ortaya koymuştur (Jonak vd., 2004).

Kalsiyum iyonu ( $Ca^{2+}$ ), bitkilerin normal işleyişinde ve çeşitli çevresel stres faktörlerine cevap olarak ikincil bir haberci görevi görür (Sanders vd., 2002).  $Ca^{2+}$  sinyali, aşırı tuzluluk, fazla ve düşük sıcaklık, ozmotik ve oksidatif stres, anoksi (oksijen yokluğu) gibi çeşitli abiyotik stres durumlarıyla ilişkilidir. Ağır metallerin aşırı birikiminin  $Ca^{2+}$  kanallarının stabilitesinde değişikliğe neden olduğu böylece hücreye kalsiyum akışının arttığı gözlemlenmiştir.

Hormonlar; ağır metaller de dahil çeşitli stres faktörlerine maruz kalan bitkilerdeki birincil sinyal molekülleridir (Luo vd., 2016). Ağır metallerle ilişkili hormonlar arasında (ABA), etilen (ET), oksin, jasmonik asit (JA) ve salisilik asit (SA) yer almaktadır (Luo vd., 2016). Kadmiyum uygulamasından sonra çeşitli bitki türlerinin köklerinde ABA düzeylerinin artmış olduğu gözlemlenmiştir (Stroiński vd., 1999). Bakır sülfat ( $CuSO_4$ ) ve kadmiyum sülfat ( $CdSO_4$ ) ile indüklenen etilen üretiminde bitkinin farklı organlarına bağlı olarak artış miktarı farklılık göstermiştir. Örneğin; çiçek salkımları en büyük indüksiyonu gösterirken test edilen bitkinin diğer organlarında belirgin şekilde daha az bir artış gözlemlenmiştir (Arteca vd., 2007).

## 2.8.MikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar (miRNA) 20-25 nükleotit uzunluğunda, tek zincirli, protein kodlamayan küçük RNA moleküllerinden oluşmaktadır. miRNA'lar hedef mRNA'lara bağlanarak mRNA degradasyonunu (yıkımını) veya translasyon inhibisyonu (baskılanmasını) yoluyla gen ifadesinin negatif yönde düzenlenmesini sağlarlar (Jones-Rhoades vd., 2012). İlk kez 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans*'ta (*C. elegans*) lin-4 adı verilen miRNA keşfedilmiştir.

İkinci bir keşif ile yine aynı yıl Wightman ve arkadaşları tarafından *C. elegans* üzerinde yapılan çalışmada lin-4 adı verilen miRNA'ların lin-14 geninin negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığı gösterilmiştir. Bitki mikroRNA'ları ise 2002 yılında Arabidopsis'te bulunmuştur (Reinhart vd., 2002). En son 2018'de güncellenen miRBase veritabanında toplam 38589 adet olgun miRNA bulunmaktadır (mirbase.org).

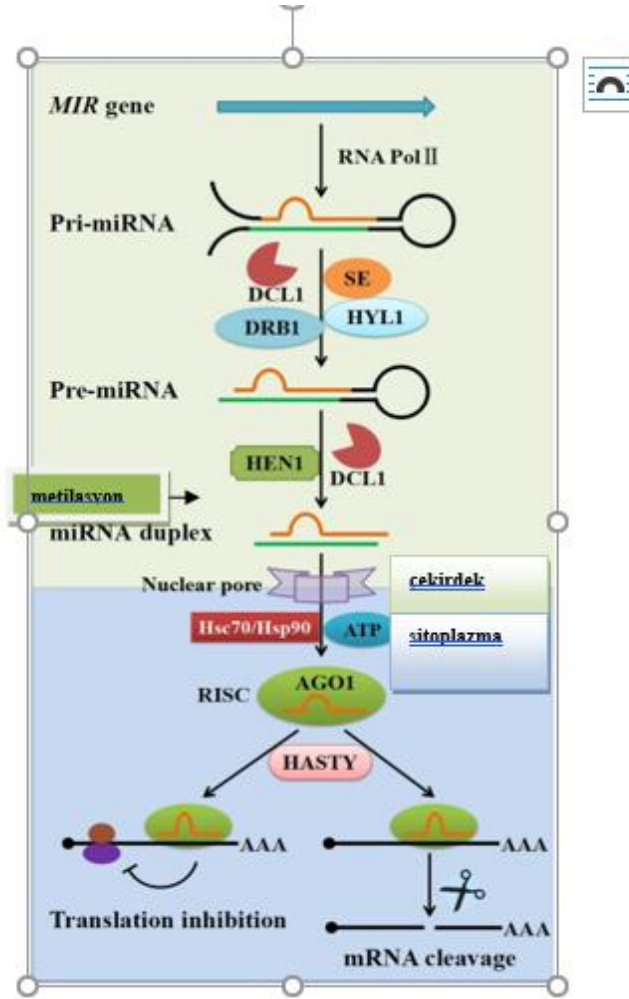
### 2.8.1.Bitki miRNA'ların sentezi

Bitkilerde mikroRNA (miRNA) sentezinin ilk basamağı, genomik DNA'dan RNA polimeraz II (pol II) enzimi aracılığıyla primer miRNA (pri-miRNA)'ların sentezlenmesidir (Noman vd., 2017). pri-miRNA'lar (birincil transkripsiyonel ürünler) saç tokası yapılarına sahip uzun tek zincirli RNA'lardır (Yang vd., 2013). Ayrıca pri-miRNA'ların 5' ucunda metillenmiş şapka, 3'ucunda ise poliadenilat kuyruk (poli-A) bulunmaktadır (Aydınoglu vd., 2017).

İkinci basamak, RNaz III (Dicer-like1-DCL1) tarafından pri-miRNA, daha kısa nükleotit uzunluğuna sahip pre-miRNA'ya (prekürsör-mRNA) küçültülür. pre-miRNA'ların işlenmesi hayvanlarda Drosha bitkilerde ise DCL1 enzimleri tarafından sağlanmaktadır. Bu işlem çekirdek içerisinde gerçekleşmektedir. Üçüncü basamak, miRNA/miRNA\* çift zincirinin HEN 1 tarafından (metil transferaz) 3' uçlarından metillenmesinin gerçekleşmesidir. miRNA/miRNA\* çift zinciri Hasty aracılığıyla sitoplazmaya taşınır.

Son basamakta, miRNA/miRNA\* metillenmesi işleminden sonra, hedef mRNA'yı inhibe etmek veya kesmek için Argonaute (AGO) RNaz devreye girmektedir. AGO'nun etkisiyle iki iplikçikten uygun olanı seçilip, diğer iplikçik parçalanmaktadır.

RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) ile birleşen miRNA'lar, protein sentezinin durdurulmasına ve mRNA'ların yıkımına sebep olmaktadır (Şekil 1.11)



Şekil 2.11. Bitkilerde mikroRNA (miRNA) sentezi (Liu, Zhou, Hu, Wei and Zhang, 2017)

Hayvanlarda, pri-miRNA'dan pre-miRNA'nın oluşumu, Drosha enzimi aracılığıyla gerçekleşirken, bitkilerde DCL1 tarafından gerçekleştirilir. Bitki miRNA'ların geneli intergenik bölgelerdeki lokuslardan tek bir birincil transkriptten üretilirken, hayvan miRNA'larının geneli, kromozomun intergenik ve intronlarından üretilir.

Hayvanlarda pre-miRNA'ların nükleustan sitoplazmaya taşınması Exportin5 proteini tarafından gerçekleştirilirken, bitkilerde HASTY proteini tarafından gerçekleştirilir. Hayvan miRNA'ları genel olarak 3'-UTR'deki hedefleri kullanarak translasyonel baskı ile çalışırken, bitki miRNA'ları RNA'nın kodlama bölgelerinde çalışır (Millar vd., 2005).

### 2.8.2.miRNA'lar hedef genlerinin ekspresyonunu nasıl düzenler?

Bitki miRNA'ları, transkripsiyon sonrası düzeyde hedef genleri iki şekilde düzenlemektedir. Bunlar; transkriptlerin bölünmesi ve translasyonun baskılanmasıdır (Chen vd., 2009). Transkript bölünmesi, hedef mRNA'da belli bir yerde gerçekleşir (Llave vd., 2002). Bitkilerde, translasyonun baskılanması durumu, transkript bölünmesine göre daha az gerçekleşir. Genelde transkripsiyon bölünmesi veya translasyon baskısı yoluyla transkripsiyon sonrası gen susturulmasını yönlendirmek için olgun miRNA'lar ARGONAUTE proteinleriyle birleşir. ARGONAUTE 1 (AGO1) miRNA hedefini parçalar ve ardından parçalanan fragmanları bozar. Burada 5' klevaj fragmanlarının uridilasyonu ve devri gerçekleşir. Endoplazmik retikulum'(ER)-lokalize ALTERED MERISTEM PROGRAMI 1 (AMP1)'in yardımıyla membrana bağlı polizomlarda translasyon baskısı gerçekleşir. ARGONAUTE 7 (AGO7) daha sonra MBPs SUPPRESSOR OF GENE SENSING 3 (SGS3) ve RNA-BAĞIMLI RNA POLİMERAZ 6 (RDR6) ile birlikte miRNA hedeflerini parçalar ve siRNA yapılarını oluşturur.

miRNA'lar hedef transkriptlerine genellikle uygun bir şekilde bağlanırlar. miRNA'lar, hedef mRNA molekülünün parçalanması ve/veya bozulması yoluyla translasyonlarını inhibe ederek, gelişmiş ökaryotlarda hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesinde büyük rol oynarlar (Budak vd., 2015).

### 2.8.3.mirRNA ve stres

Doğada sessil (sabit) olarak bulunan bitkiler çeşitli abiyotik ve biyotik stres faktörlerine maruz kalmaktadır. Bu stres faktörleri bitkilerde metabolik yan ürünlerin birikmesine neden olarak bitki büyümesini ve gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (Dutta vd., 2018).

Stres, bitkilerin belirli miRNA'ların ifade düzeylerinin etkilenmesine (aşırı veya az ifade etmesine) ya da stresle başa çıkmak için yeni miRNA'ların sentezlenmesine neden olmaktadır.

Besin eksikliği (Fujii vd., 2005), kuraklık (Liu vd., 2008; Liang vd., 2007; Zhou vd., 2010), soğuk (Zhou vd., 2008), tuzluluk (Liu vd.,2008; Sunkar vd., 2008), bakteriyel

enfeksiyon (Navarro vd., 2006), UV-B radyasyonu (Zhou vd., 2007), mekanik stres (Lu vd., 2005) ve ağır metaller (Ding vd., 2016; Shriram vd., 2016; Zhou vd., 2017) gibi çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşulları altında bitkilerde stresle düzenlenen çeşitli miRNA'lar tanımlanmıştır.

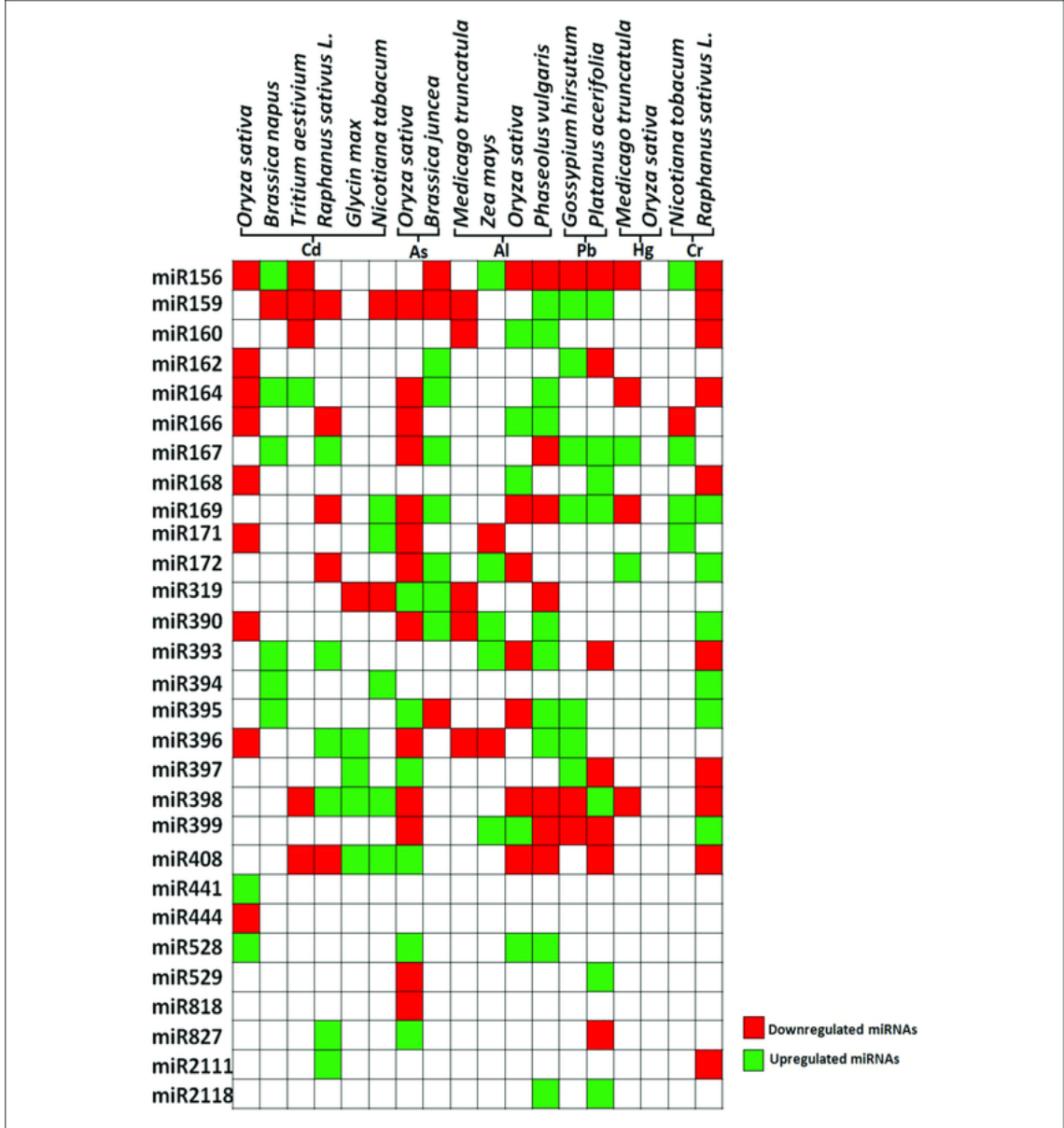
Genomik teknolojilerin ilerlemesiyle, abiyotik stresle karşı karşıya kalan bitkilerde miRNA'lar ve bunların potansiyel hedef genleri hakkında bilgi ve anlayış çok gelişmiştir. Son zamanlarda artan miRNA çalışmaları, bitki miRNA'larının ve hedeflerinin kuraklık (Ferdous vd., 2015), tuzluluk (Gao vd., 2011) gibi çeşitli abiyotik stresler gibi durumlarda önemli roller oynadığını göstermiştir. Bu nedenle de strese karşı bitki toleransını indüklemek için miRNA aracılı gen düzenleme sürecinin kullanımı günümüzde daha güvenilir ve istikrarlı hale gelmektedir (Noman vd., 2019).

### ***2.8.3.1. miRNA ve ağır metal stresi***

Yeni nesil dizileme çalışmalarıyla ağır metal stresi ile karşılaşan bitkilerde miRNA'ların yapıları ve işlevleri ayrıntılı olarak incelenmektedir. miRNA'lar, ağır metal stresi durumunda bitki tepkilerinin modülatörleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Metal stresi altında yetiştirilen bitkilerin metale duyarlı miRNA'ları ile ilgili bulgular, miRNA'ların metallerin toksik etkilerini iyileştiren bazı genleri veya transkripsiyon faktörlerini aktive ettiğini ve böylece detoksifikasyonda rol oynadığını göstermiştir. Transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, farklı çevresel abiyotik streslerle ilişkili ve/veya bunlara yanıt veren birçok başka gen de vardır ve bu strese duyarlı genlerin çoğu, bireysel bir miRNA tarafından hedeflenir (Zhang, 2015).

Bitkilere uygulanan metal stresleri altında miRNA'ların tepkiler göstermesi miRNA'ların fizyolojik mekanizmalarda yer aldığını göstermektedir. Spesifik bir miRNA'nın rolünü anlamak, hedeflerinin işlevini ve bunların metal toksisite tepkileriyle ilgili sinyal yollarıyla etkileşimlerini analiz etmek önemlidir.

Metale duyarlı korunmuş miRNA'lar için benimsenen hedeflerin çoğu, temel olarak bitki gelişiminde yer alan transkripsiyon faktörleridir (Mendoza-Soto vd., 2012). Bugüne kadar çok farklı bitkide Cd, As, Al, Pb, Hg ve Cr gibi çok farklı ağır metale stres cevabı olarak farklı şekilde regüle edilen miRNA'lara ait bilgiler Şekil 2.12 'de verilmiştir.



Şekil 2.12. Bitkilerde ağır metale duyarlı mikroRNA'ların ifadesi. Yeşil renk; yukarı regüle; kırmızı renk aşağı regüle miRNA'lar (<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00012>)

## 2.9. Çalışmada Kullanılan miRNA'lar ve Hedef Genleri

miR159 ve ailesi, GAMYB ve GAMBYB gibi benzer hedef genlerin düzenlenmesinde rol oynayan en eski miRNA çeşitlerinden bir tanesidir (Axtell vd., 2005). Bu hedef genlerin tohum (aleurone) ve anterler (apetum) de giberellin (GA) sinyalinde yer alan R2R3 MYB transkripsiyon faktörlerini kodladığı ve programlanmış hücre ölümlerine yol açtığı bilinmektedir (Millar vd., 2019).

Arabidopsis'te (*Arabidopsis thaliana*), miR159 aile üyelerinden, miR159a ve miR159b, iki GAMYB benzeri gen olan MYB33 ve MYB65 için fonksiyonel olarak özeldir ve bunların anter gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (Alonso-Peral vd., 2010).

miR171 ve ailesi de diğer miRNA'lar gibi temel düzenleyici olarak işlev görmekte ve bitki türlerinin çeşitliliğine bağlı olarak hedef genlerinin sayısı farklılık göstermektedir. miR171'in GRAS transkripsiyon faktörü ailesinin üyelerini hedefleyerek çeşitli bitki büyüme ve gelişme süreçlerini düzenlediği bilinmektedir. Bu ailenin adı GAI (Gibberellic Asit Sensitifi), RGA (GAI Temsilcisi) ve SCR (Scarecrow) transkripsiyon faktörlerinden türetilmiştir (Fiorilli vd., 2015). miR171'in en iyi incelenen iki hedefi, Scarecrow-Like (SCL) ve Nodulasyon Sinyal Yolu 2 (NSP2) transkripsiyon faktörleridir (Hirsch vd., 2009). Arabidopsis'te miR171, apikal meristem ve aksiller meristem için kritik olan SCL6-II, SCL6-III ve SCL6-IV de dahil olmak üzere üç SCL6 genini hedef alır. miR171 öncüllerinin aşırı ekspresyonu, aksiller tomurcuk oluşumunu inhibe ederek ve çiçek sayısını baskılayarak Arabidopsis'te sürgün yapısını değiştirmiştir (Schulze vd., 2010).

miR395'in sülfat eksikliği durumunda ekspresyon seviyesinin indüklendiği ve sülfat homeostazının düzenlenmesi açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Kawashima vd.,2009; Liang 2010). miR395'in ekspresyonunun yukarı regülasyonu, köklerden artan translokasyona bağlı olarak yapraklarda sülfat birikmesine sebep olur (Kawashima vd.,2009; Liang 2010). Arabidopsis bitkisinde yapılan bir çalışmada miR395'in sülfat eksikliğinde yukarı regüle edildiği ve sülfat miktarını etkileyen bileşenlerinden söz edilmiştir. Sisteinin eksikliği sonucunda biriken sistein öncüsü O-asetilserin, miR395 birikiminde artışa neden olur. Bitkilerin sülfat alımını ve asimilasyonunu inhibe eden sistein ile beslenmesi miR395 ekspresyonunu arttırırken, glutatyon sentezinin bir inhibitörü olan butiyonin sülfoksimin miR395 ekspresyonunu azaltmıştır. Sonuç olarak miR395'i sülfat asimilasyonunun bir parçası olarak değerlendirmek mümkündür (Matthewman vd., 2012)

## 2.10.Konu ile İlgili Önceki Çalışmalar

Pirinç (*Oryza sativa*) bitkisinde Cd stresi altında miRNA'ların yanıt veren işlevlerini araştırmak için miRNA mikrodiziler kullanılmıştır. 10 aileye ait 19 miRNA'nın Cd'ye duyarlı olduğu belirlenmiştir. Aynı aileden miRNA üyelerinin, hibridizasyona dayalı yöntemler kullanılarak bile ayırt edilmesi zor olan yüksek derecede homolog diziler nedeniyle benzer ekspresyon profillerine sahip olduğu görülmüştür. Sonuçta; 18 miRNA'nın aşağı regüle edildiği ve Cd stresi altında sadece miR528'in yukarı regüle edildiği bulunmuştur (Ding vd., 2011).

Pirinçte (*Oryza sativa L.*) Cd stresine yanıt olarak gen ekspresyonundaki değişikliklerin düzenlenmesinde miRNA'ların rolü araştırılmıştır (Tang vd., 2014). Yapılan çalışmanın sonucunda kökte ve sürgünde farklı şekilde ifade edilen yeni miRNA'lar keşfedilmiştir. Toplam 163 miRNA ve 2.574 mRNA'nın Cd stresi altında kök ve sürgünde farklı şekilde eksprese edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, Cd uygulamasına yanıt olarak farklı şekilde ekspres olan kökten 8 ve sürgünden 5 yeni miRNA adayı belirlenmiştir. mRNA'lar için, kökte 1.044 gen ve sürgünde 448 genin yukarı regüle edildiği, yine kökte ve sürgünde sırasıyla 572 ve 645 genin aşağı regüle edildiği bulunmuştur (Tang vd., 2014).

*Typha angustifolia* bitkisinde Cd stresine cevap veren miRNA'ların ve hedeflerinin tespiti için yapılan bir çalışmada transkriptom ve küçük RNA'ları (sRNA'lar) analiz etmek için yüksek verimli dizileme tekniği kullanılmıştır. Yaklaşık 57.608.230 ham okuma, havuzlanmış bir cDNA kitaplığı diziliminden elde edilmiştir. Daha sonra sırasıyla Cd maruziyeti olan veya olmayan *T. angustifolia*'dan iki sRNA kütüphanesi oluşturulmuştur. *T. angustifolia*'nın transkriptom verilerine dayanarak, her iki küçük RNA kitaplığında 114 korunmuş miRNA ve 41 yeni aday miRNA'nın tanımlanmasıyla sonuçlanan sRNA'ları kataloglanmış ve analiz edilmiştir. In silico analiziyle, 89 korunmuş miRNA ve 21 yeni miRNA için 764 hedef belirlenmiştir. Dizileme üzerine yapılan istatistiksel analiz, 4 korunmuş ve 6 yeni miRNA'nın spesifik ekspresyon gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca önemli ölçüde değiştirilmiş 8 miRNA için 10 transkript hedefi tahmin edilmiştir (Xu vd., 2015).

*M. truncatula* bitkisinde yeni miRNA'ların EST'ler (İfade Edilmiş Dizi Etiketleri) ve GSS (Genomik Araştırma Dizileri) çapında tahmini için biyoinformatik çalışmalar yapılmıştır. Dizileme işlemi sonucu toplam 38 potansiyel miRNA tespit edilmiştir. Bunlardan 26 miRNA'nın yeni olduğu bulunmuştur. Yeni tanımlanan miRNA dizileri kullanılarak, *M. Truncatula* mRNA veritabanından miRNA'ların 16 potansiyel hedefi tespit edilmiştir. Birçok miRNA hedefli genin, bitki gelişimini, sinyalleşmeyi ve metabolizmayı düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodladığı bulunmuştur. Ayrıca bu miRNA'ların ekspresyonu, ağır metaller (Hg, Cd ve Al) tarafından yukarı veya aşağı regüle edildiği ve bazı miRNA'ların, ağır metal stresine karşı bitki tepkisi ve gelişimin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ağır metallere verilen cevaba göre 8 aileden miRNA'lar üç gruba ayrılmıştır. İlk grupta miR171, miR319, miR393 ve miR529'u içerdiği ve sırasıyla Hg (20µM), Cd (80µM) veya Al'a (50µM) yanıt olarak genel olarak yukarı regüle edildiği bulunmuştur. İkinci grup, Hg, Cd ve Al maruziyeti ile aşağı regüle edilen miR166 ve miR398'i içermektedir. miR160 ve miR395'in ise üçüncü gruba ait olduğu gözlenmiştir. miR160 ifadesinin Hg, Cd ve Al'den etkilenmediği tespit edilmiştir. Bu çalışmada normal koşullarda veya ağır metal stresi altında yetiştirilen bitkilerden alınan numunelerde miR395 tespit edilmemiştir (Zhou vd., 2008).

Turpta (*Raphanus sativus* L.) Cd stresine yanıt veren miRNA'lar ve hedefleri arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Turp fidelerinin Cd ile muamele edilmiş ve Cd içermeyen köklerinden iki küçük RNA kitaplığı oluşturulmuştur. Solexa dizileme teknolojisi kullanılarak, 93 korunmuş ve 16 korunmamış miRNA (26 miRNA ailesini temsil eder) ve 28 yeni miRNA (22 miRNA ailesini temsil eder) tanımlanmıştır. 15 miRNA ailesine ait toplam 22 bilinen miRNA ve 8 miRNA ailesine ait 11 yeni miRNA'nın Cd stresine yanıt olarak farklı şekilde ekspres edildiği belirlenmiştir. Bu Cd'ye yanıt veren miRNA'ların çoğu aşağı regüle edilirken, bilinen 5 miRNA (miR167a, miR167d, miR396a, miR396b ve miR398) ve 3 yeni miRNA'nın (rsa-miRn3, rsa-miRn11 ve rsa-miRn19) yukarı regüle edildiği gözlenmiştir (Xu vd., 2013).

*Brassica napus* L. bitkisinde 0, 1 ve 3 günlük Cd uygulamasından sonra 3 küçük RNA kitaplığı oluşturularak toplamda 44 bilinen miRNA (27 aileye ait) ve 103 yeni miRNA tanımlanmıştır. miRNA ekspresyon profillerinin kapsamlı analiziyle kontrol ve Cd ile muamele edilmiş bitkiler arasında 39 farklı şekilde eksprese edilmiş miRNA

bulunmuştur; 13 farklı şekilde eksprese edilen miRNA, qRT-PCR ile doğrulanmıştır (Jian vd., 2018).

Benzer bir başka çalışmada *B. napus* fidelerinin Cd ile muamele edilmiş ve Cd ile muamele edilmemiş kök ve sürgünlerinden dört küçük RNA kütüphanesi ve dört degradome kütüphanesi oluşturulmuştur (Zhou vd., 2012). Çalışmada, yüksek verimli dizileme kullanarak, Cd ile muamele edilen ve edilmeyen *B. napus*'tan 84 korunmuş ve korunmamış miRNA (37 miRNA ailesine ait) tanımlanmıştır. Tanımlanan miRNA'ların çoğunun köklerde/sürgünlerde farklı şekilde ifade edildiği veya Cd maruziyeti ile düzenlendiği bulunmuştur. Köklerde, ekspresyonu Cd maruziyeti ile önemli ölçüde düzenlenen miR159, miR394, miR398, miR857 ve miR2111 ve miR172f, miR319d ve miR398b olmak üzere 8 miRNA ailesi tespit edilmiştir. Bunlardan miR398, miR857 ve miR172f, Cd maruziyeti ile yukarı regüle edilirken diğerleri aşağı regüle edilmiştir. Sürgünlerde 13 miRNA ailesi (miR158, miR159, miR161, miR162, miR164, miR171, miR319, miR394, miR395, miR400, miR858, miR1885 ve miR2111) ve yeni tanımlanmış 5 miRNA (miR156m, miR158a, miR167f-h, miR167i ve miR319c) ailesinden miR158, miR161, miR400 ve miR1885 ile miR156m ve miR158a'nın yukarı regüle edildiği, diğer miRNAların aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Zhou vd., 2012).

*Brassica napus*, ağır metallere tolerans göstermesi açısından kadmiyumla kirlenmiş toprakların fitoremediasyonu için kullanılan önemli bir bitkidir. Yapılan bir çalışmada, 10 günlük 10 mg/L Cd<sup>2+</sup> uygulamasından sonra *B. napus* fidelerinin köklerinde ve sürgünlerinde miRNA ve mRNA profillerinde eş zamanlı değişiklikler analiz edilmiştir (Fu vd., 2019). Toplamda, kökte 14 aileye ait 39 miRNA tespit edilmiş ve sürgünde 16 miRNA ailesine ait 53 miRNA tespit edilmiştir. Bunlardan miR397, miR395, miR408, miR398 ve miR858 aileleri Cd stresi durumunda önemli ifade değişiklikleri göstermiştir. Doku tipleri arasında çok az örtüşme ile kökte 399 ve sürgünde 389 farklı şekilde ekspres edilmiş genler tanımlanmıştır. Bitki stres yanıtının temel yollarında yer alan Cd'ye yanıt olarak toplamda 24 kök ve 16 sürgün anti-regülasyonu miRNA-mRNA etkileşim çifti (miRNA'nın yukarı regülasyonu ve mRNA'nın aşağı regülasyonu veya tam tersi) tanımlanmıştır (Fu vd., 2019).

*Brassica napus* kullanılarak yapılan bir çalışmada, Cd'ye maruz kalma üzerine, köklerde ve yapraklarda miRNA156a, miRNA167a/c, yapraklarda miRNA393 ve tüm dokularda miRNA394a/b/c, miRNA164b yukarı regüle olurken, miRNA160 da aşağı regüle olmuştur (Huang vd., 2010).

Pirinçte Cd birikimi ve toleransında miR166'nın rolü araştırılmıştır. miR166'nın ekspresyon seviyelerinin hem kök hem de yapraklarda, fide halinden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gözlemlenmiştir. Pirinç fidelerinin köklerindeki miR166'nın ekspresyonu, Cd işleminden sonra azalmıştır. Ancak pirinçte miR166'nın aşırı ekspresyonunun bitkide Cd'a karşı tolerans geliştirdiği bulunmuştur (Ding vd., 2018).

*Solanum torvum*, Cd toleransı yüksek olan bir bitkidir. *Solanum torvum* bitki köklerine Cd ağır metali uygulandıktan sonra bitkide yeni miRNA aileleri ve bu aileler içinde 165 miRNA tespit edilmiştir. 21 miRNA ailesinden ekspres edilen miRNA aileleri arasında, köklerde 6 miRNA ailesi yukarı regüle edilirken, 15 miRNA ailesi aşağı regüle edilmiştir. Sonuçlar spesifik miRNA'ların *S. torvum* köklerinde Cd toksisitesi ile düzenlendiğini, bunun da *S.torvum* bitkisinde Cd toleransında rol oynayabileceğini göstermiştir (Kang vd., 2017).

Ağır metal stresine duyarlı miRNA'ları tanımlamak için toksik kadmiyum seviyelerine maruz kalan pirinç fidelerinden RNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Kütüphanenin düzenlenmesi ve sonrasında yapılan analizler, 6 aileyi temsil eden 19 yeni miRNA'yı ortaya çıkarmıştır. Yeni miRNA'lar herhangi bir türde dizi benzerliği göstermemiştir. Yeni pirinç miRNA'ların çoğu, metal maruziyetine tepki olarak yukarı veya aşağı yönde düzenlenmiştir. Çalışma sonucunda 34 miRNA hedefi tahmin edilmiş ve miRNA'ların tahmin edilen bazı hedeflerinin ağır metal kaynaklı streslere verilen yanıtın düzenlenmesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Huang vd., 2009).

Cd stresine yanıt olarak miRNA'ların rolünü incelemek için mısır soyları B73 ve Mo17'nin fidelerinin kökleri toplanmış ve farklı sürelerde 200mg/L CdCl 2.5 H<sub>2</sub>O uygulanmıştır. Süperoksit dismutaz ve peroksidaz gibi enzimlerin aktiviteleri ölçülmüş ve 6 aday miRNA'ların ekspresyonu ve hedefleri, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) teknolojisi kullanılarak doğrulanmıştır. Sonuç olarak, miRNA'ların ve hedeflerinin

Cd stresine maruz bırakılan mısır fide köklerinde farklı şekilde edildiği gösterilmiştir (Gao vd., 2019).

Buğday (*Triticum*) ve *Arabidopsis*'te Cd stresine yanıt olarak miR408 aşağı regülasyonunun, aynı zamanda hedef kemosiyanin geninin yukarı regülasyonuna da yol açtığı gözlemlenmiştir (Feng vd., 2013).

Kadmiyum (Cd) stresine cevap veren buğday miRNA'larının ve hedef genlerinin belirlenmesine yönelik bir çalışmada miRNA'ların ve hedeflerinin, Cd stresine maruz kalan buğday fidelerinin yapraklarında ve köklerinde farklı şekilde ifade edildiği gözlemlenmiştir (Qiu vd., 2016).

Yapılan literatür çalışmasında ülkemizde yetiştirilen buğday çeşitlerinde Cd stresi ile ilişkili miRNA ekspresyonlarına yönelik yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, yaptığımız bu çalışmada Cd stresi altındaki Kutluk-94 ve Kunduru-1149 buğday çeşitlerinde kök ve yapraklarda biriken Cd miktarı ile ağır metallerle ilişkilendirilmiş 3 farklı miRNA'nın (miR159, miR171 ve miR395) ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler araştırılmıştır.

### **3.MATERYAL VE METOT**

#### **3.1.Materyal**

Bu tez çalışmasında ülkemizde en çok tarımı yapılan buğday (*Triticum aestivum* L.)'ın Kutluk-94 ve Kunduru-1149 çeşitlerine ait tohumları Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir.

#### **3.2.Metot**

Kutluk-94 ve Kunduru-1149 buğday tohumları çimlendirildikten sonra fidelerine ağır metal stresi ( $CdCl_2$ -1 hidrat, extra pure, Riedel-de Haën) uygulanmıştır. Stres uygulamasının ardından ilk olarak, yaş yakma yöntemiyle kök ve yaprakların kadmiyum içerikleri belirlenmiştir. Kök ve yapraklardan total RNA izolasyonu ve miRNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından, miRNA'ların ağır metal stresine bağlı ekspresyonlarını belirlemek amacıyla gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) analizleri uygulanmıştır.

##### **3.2.1.Tohum yüzey sterilizasyonu**

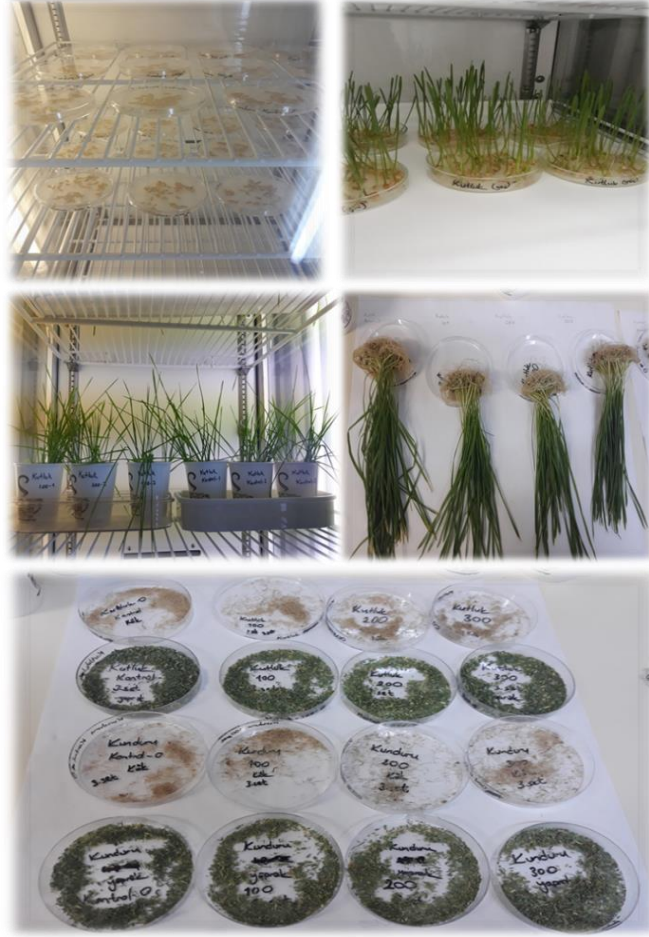
Buğday tohumları, yüzey sterilizasyonunu sağlamak amacıyla %5'lik sodyum hipoklorit ( $NaOCl$ ) çözeltisi içinde 15dk süresince bekletilmiştir. Daha sonra distile su ile 5dk'lık periyotlar halinde 4 kez yıkanmıştır.

##### **3.2.2.Çimlendirme ve stres uygulaması**

Petrilerin içine büyüklüklerine uygun kurutma kağıtları konularak distile su ile hafif nemlendirilmiştir. Her bir petriye 50'şer adet buğday tohumu konularak iklim kabininde (Sanyo) 16/8 saat-aydınlık/karanlık periyotta,  $25^{\circ}C$ 'de çimlendirilmiştir

(Şekil 3.1). Çimlenen tohumlar filizlenmeye başladığında petri kapakları kaldırılarak Hoagland besin çözeltisi verilerek büyütülmüş ve bir hafta sonra 15'erli gruplar halinde bölünerek karton bardaklara yerleştirilmişlerdir. Stres uygulaması için gruplar  $CdCl_2$ 'nin  $100\mu M$ ,  $200\mu M$ ,  $300\mu M$  konsantrasyonlarına bir hafta süre ile maruz bırakılmış, kontrol

bitkileri ise sadece Hoagland besin solüsyonu içerisinde tutulmuştur. Her uygulama 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Cd kalıntılarının bitki fidelerinin kök yüzeyinden uzaklaştırılması için kökler 10 mM'lık EDTA solusyonu içerisinde 5dk bekletildikten sonra ve 3 kez distile sudan geçirilmiştir. Köklerdeki suyun fazlası kurutma kağıdına emdirildikten sonra fidelerin bir kısmı ağır metal tespiti için ayrılmıştır. miRNA analizi için kullanılacak buğday örnekleri ise kök ve yaprakları bistüri yardımıyla ayrıldıktan sonra folyolara sarılıp etiketlenmiş, ardından sıvı azot içinde dondurulup -20 °C 'de saklanmıştır.



**Şekil 3.1.** Buğday tohumlarının çimlendirilmesi, Cd uygulaması, ağır metal analizi ön hazırlık aşamalarına ait bazı görseller

**Tablo 3.1.** Hoagland besin solüsyon içeriği hazırlamak için kullanılan stok miktarları

<b>Elementler</b>	<b>Hacim</b>
KNO <sub>3</sub>	2 ml
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,5 ml
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	1 ml
KCl	0,2 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 ml
MnSO <sub>4</sub>	0,5 ml
ZnSO <sub>4</sub>	0,5 ml
CuSO <sub>4</sub>	0,5 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,5 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,5 ml
Fe-EDTA	2,5 ml

Tabloda verilen stok solüsyonlardan ilgili miktarlar bir araya getirilerek 1lt'ye distile su ile tamamlanmış, denemelerde %50 seyreltilerek kullanılmıştır.

### **3.2.3.Bitki kök ve yapraklarında Cd miktarının belirlenmesi**

Farklı dozlarda CdCl<sub>2</sub>'a maruz bırakılan Kutluk-94 ve Kunduru-1149 buğday örneklerinin yaprak ve kökleri ile kontrol bitkilerinin kök ve yaprakları etüvde 70°C 'de 24 saat boyunca kurutulmuştur. Son olarak kuruyan yapraklar ve kökler makas yardımıyla küçük parçalar haline getirilip, önceden etiketlenmiş alüminyum folyolara sarılmıştır.

Kurutulan bitki materyalleri (0.18-0.20 gram) olacak şekilde sırasıyla tartılıp, vesseller içerisine aktarılmıştır. Her bir örneğin üzerine 10 ml %68'lik HNO<sub>3</sub> (nitrik asit) eklenerek çeker ocak altında 20dk kadar gaz çıkışı olması için beklenmiş ve yakma işlemi için 30dk süreyle mikrodalgaya (CEM MARS 6 240/50) yerleştirilmiştir. Vessellerin kapakları çeker ocak altında açılıp içindeki karışım 15 ml'lik etiketlenmiş falkon tüplerine sırasıyla aktarılmıştır. Cd miktarının belirlenebilmesi için örnekler Ege Ormancılık

Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Toprak ve Ekoloji Laboratuvarına gönderilmiştir. Örneklerdeki Cd miktarı ICP OES spektrofotometresinde (Inductively Couple Plasma spectrophotometer) (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP/OES, Shelton, CT 06484-4794, USA) tespit edilmiştir.

### 3.2.4.miRNA Dizilerinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı

Çalışmamızda daha önce *Triticum sp.* ve *Arabidopsis sp.* gibi bitkilerde ağır metalle ilişkili olduğu bildirilmiş miRNA'lar arasından bitkilerde korunmuş 3 miRNA (miR159, miR171 ve miR395) kullanılmıştır. miRNA dizi bilgileri “www.mirbase.org” internet sitesinden elde edilmiştir. Buradan elde edilen miRNA dizileri için tasarlanan stem-loop cDNA primerleri ve qRT-PCR sırasında kullanılan geri ve ileri primerler de aynı web sitesinden mature dizileri alınarak dizayn edilmiştir.

Kullandığımız miRNA'lara ait primer bilgileri Tablo 3.2' de verilmiştir.

**Tablo 3.2.**Çalışmada Kullanılan miRNA'lar ve Hedef Genleri

miRNA Adı	Primer	Hedef gen
miR159	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTG	MYB transkripsiyon faktörleri
miR171	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	Scarecrow benzeri proteinler
miR395	TGAAGTGTGGGGGAAGTCTC	ATP sülfirilaz

### 3.2.5.miRNA izolasyonu

miRNA izolasyonu işlemlerinden önce pipetler, pipet uçları ve çalışılacak ortam RNaz bulaşmasını engellemek için sterilize edilmiştir. Kutluk-94 ve Kunduru-1149 çeşitlerine ait yaprak ve kök örnekleri sıvı azot içerisinde toz haline getirilmiş ve her bir tüpte 100mg örnek olacak şekilde tartılmıştır. miRNA izolasyonu Hybrid-R miRNA izolasyon kiti (Geneall, 325-150) kullanılarak kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak, total RNA izolasyonu için öğütülmüş bitki örneklerinin üzerine 500 µl RiboEx eklenerek, 2ml'lik tüplerde homojenize edilmiştir. 5dk oda sıcaklığında tutularak, nükleoprotein yapının ayrışması sağlanmıştır. 12.000rpm de 4°C'de 10dk süresince santrifüj yapılmış ve süpernatant (üstteki sıvı faz) yeni bir tüpe aktarılmış ve

karışım üzerine kloroform eklenerek karıştırılmıştır. Tüpler 15dk boyunca elle alt-üst edilip, 2dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12.000rpm de 15dk 4°C’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant üzerine %50’lik etanol eklenerek pipetaj yapılmıştır. Elde edilen karışımdan 700µl hacimde Tip B kolona aktarılmış, 12.000rpm de 1dk 4°C’de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sırasında total mRNA kolona bağlanmış ve küçük RNA’lar süpernatant içerisinde toplama tüpünde birikmiştir. Bu aşamadan sonra miRNA izolasyonu için toplama tüpünde biriken sıvının üzerine 1:1 oranında %100 etanol eklenerek pipetaj yapılmıştır. Daha sonra karışımdan 650 µl Tip W kolona aktarılmış, 12.000 rpm’de, 1dk oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir.

Toplama tüpü yenisi ile değiştirilip Tip W kolon üzerine 500µl RBW tampon eklenmiş 12.000rpm de, 1dk oda sıcaklığı koşullarında santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpü yenisi ile değiştirilip, kolon üzerine 500µl RNW tamponu eklenmiştir. Toplama tüpü yenisi ile değiştirilip üzerine tekrar 500µl RNW tamponu eklenmiş ve santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpü yenisi ile değiştirilip üzerine bir şey eklemeden 12.000rpm de 2dk, oda sıcaklığı koşullarında santrifüj edilmiştir. Kolon, temiz bir ependorf tüpe alınmıştır. Kolon üzerine tam merkeze 50µl RNase-free su eklenip, oda sıcaklığında 2dk bekletilmiş ve ardından 12.000rpm de 2dk boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen miRNA örnekleri -80°C ‘de saklanmıştır.

### **3.2.6.cDNA Sentezi**

Toplam 48 örnek için miRNA-cDNA sentezi A.B.T. cDNA sentez kiti ve stem loop primerler kullanılarak kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. miRNA-cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon bileşenleri Tablo 3.3’de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** miRNA-cDNA Sentezi için Kullanılan MasterMix Bilgileri

<b>MasterMix Bileşenleri</b>	<b>Hacim</b>
10X reaksiyon Tamponu	2 µl
Steem-loop primer (miRNA için spesifik)	2 µl
20X dNTP mix	1 µl
Reverse transkriptaz	1 µl
RNase inhibitor	0,5 µl
RNase free water	3,5 µl
miRNA örneği	10 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>20 µl</b>

Her bir örnek için yukarıda verilen malzemelerle mastermix hazırlanmış daha sonra ters transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. Ters transkripsiyon için kullanılan koşullar Tablo 3.4’ de verilmiştir. Elde edilen miRNA-cDNA örnekleri kantitatif real-time PCR aşamasına kadar -80 °C’de saklanmıştır.

**Tablo 3.2.** miRNA-cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları

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

### 3.2.7. Kantitatif Real -Time PCR (qRT-PCR)

Tez çalışması kapsamında ağır metal stresi ile ilişkili miRNA’lar arasından seçilen 3 adet miRNA’nın (miR159, miR171 ve miR395) ekspresyon seviyeleri qRT-PCR analizi ile çalışılmıştır. qRT-PCR analizleri Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazında ve A.B.T. 2X miRqGreen Master Mix (with ROX) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR için kullanılan mastermix bilgileri Tablo 3.5’de verilmiştir.

**Tablo 3.5.** *Real-Time qPCR için Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri*

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

miRNA örnekleri için mastermix hazırlandıktan sonra qRT-PCR reaksiyonuna geçilmiştir. qRT-PCR için kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 3.6' da belirtilmiştir.

**Tablo 3.6.** *Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları*

<b>PCR Basamakları</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Döngü</b>
1. Ön Denatürasyon	95	300	1
2. Denatürasyon	95	10-30	25 – 40
3. Bağlanma	55 – 68	10-60	

Erime eğrisi analizi (melting curve) PCR amplifikasyonunun özgünlüğünü ispatlamak ve primerin non-spesifik olarak bağlanma yapıp yapmadığını kontrol etmek amacıyla yapılmıştır.

### **3.2.8.qRT-PCR Analiz Metodu ve İstatistik**

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR); gen ekspresyon çalışmalarında, genlerin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması amacıyla yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Korkmaz Ağaoğlu vd., 2020). qRT-PCR analizinde miR161 referans miRNA olarak seçilmiştir. miR161 atasal olarak korunmuş bir bölgeyi temsil ettiği için referans olarak birçok çalışmada tercih edilmiştir. Bu nedenle

çalışmamızda miRNA ekspresyonları kantitasyonu miR161 referans miRNA olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplamasında “ $\Delta\Delta Ct$  Yöntemi” kullanılmıştır.  $\Delta\Delta Ct$  hesaplaması aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir:

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

2. Hedef grupta hedef miRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak hedef grup  $\Delta Ct$  değerleri elde edilmiştir.

3. Referans grupta hedef miRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak referans grup  $\Delta Ct$  değerleri elde edilmiştir.

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

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

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

Fold Change değeri 1’in altında çıkması durumunda ise hedef grubu miRNA ekspresyonunun referans grubun miRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlanır.

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

İstatistik verilerini hesaplarken kullanılan programa çalıştığımız örneklere ait hesaplanan fold change değerleri ve farklı konsantrasyon değerleri girilmiştir. 3 biyolojik tekrar için elde edilen fc değerleri girilmiş ve istatistik-anova-one way analysis-tukey-kramer kısmı seçilip analiz yaptırılmıştır.

## 4.BULGULAR

### 4.1.Kutluk-94 ve Kunduru-1149 Buğday Çeşitlerinde Kadmiyum Miktarının Belirlenmesi

Kutluk-94 ve Kunduru-1149 buğday çeşitlerinin farklı Cd dozlarına (100-200-300 $\mu$ M) maruz bırakıldıktan sonra yapraklarında belirlenen Cd miktarları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Kutluk-94 ve Kunduru-1149 yapraklarında Cd miktarı

KUTLUK-94				KUNDURU-1149			
YAPRAK				YAPRAK			
	0	Analiz sonucu (ICP-OES) ppm	Örnekteki Cd miktarı (mg/kg)		Biyomas (gram)	Analiz sonucu (ICP-OES) ppm	Örnekteki Cd miktarı (mg/kg)
Kontrol-1	0,20	0,00	-	Kontrol-1	0,185	0,00	-
Kontrol-2	0,20	0,00	-	Kontrol-2	0,185	0,00	-
Kontrol-3	0,20	0,00	-	Kontrol-3	0,185	0,00	-
100-1 $\mu$ M	0,20	84,60	0,016	100-1	0,185	154,80	0,028
100-2 $\mu$ M	0,20	75,03	0,015	100-2	0,185	155,10	0,028
100-3 $\mu$ M	0,20	123,90	0,024	100-3	0,185	116,30	0,021
200-1 $\mu$ M	0,20	150,30	0,030	200-1	0,185	235,90	0,043
200-2 $\mu$ M	0,20	192,20	0,038	200-2	0,185	217,70	0,040
200-3 $\mu$ M	0,20	188,10	0,037	200-3	0,185	247,80	0,045
300-1 $\mu$ M	0,20	373,60	0,074	300-1	0,185	293,10	0,054
300-2 $\mu$ M	0,20	311,20	0,062	300-2	0,185	372,30	0,068
300-3 $\mu$ M	0,20	423,60	0,084	300-3	0,185	360,90	0,066

Uygulanan Cd konsantrasyonu ile Kutluk-94 çeşidi yaprak örneklerinde biriken Cd konsantrasyonları arasındaki ilişki SPSS 21.0 programı kullanılarak, One-Way ANOVA testi ve Tukey post-hoc testi uygulanarak belirlenmiştir.

Kutluk-94 çeşidine ait yaprak örneklerinin Cd miktarları uygulanan Cd dozları ile kıyaslandığında Tablo 4.2’ de görüleceği üzere kontrol grubu ile diğer tüm gruplar

arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Sadece 100 ve 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Bu durum 100 $\mu\text{M}$  grubunun 3. tekrarındaki yüksek değerden kaynaklanmaktadır.

**Tablo 4.2.** Kutluk-94 yapraklarında Ağır Metal miktarının İstatistiki Sonuçları

Multiple Comparisons							
Dependent Variable: kutluk							
	(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1,00	2,00	-94,51000 <sup>*</sup>	27,00470	,033	-180,9885	-8,0315
		3,00	-176,86667 <sup>*</sup>	27,00470	,001	-263,3452	-90,3881
		4,00	-369,46667 <sup>*</sup>	27,00470	,000	-455,9452	-282,9881
	2,00	1,00	94,51000 <sup>*</sup>	27,00470	,033	8,0315	180,9885
		3,00	-82,35667	27,00470	,062	-168,8352	4,1219
		4,00	-274,95667 <sup>*</sup>	27,00470	,000	-361,4352	-188,4781
	3,00	1,00	176,86667 <sup>*</sup>	27,00470	,001	90,3881	263,3452
		2,00	82,35667	27,00470	,062	-4,1219	168,8352
		4,00	-192,60000 <sup>*</sup>	27,00470	,000	-279,0785	-106,1215
	4,00	1,00	369,46667 <sup>*</sup>	27,00470	,000	282,9881	455,9452
		2,00	274,95667 <sup>*</sup>	27,00470	,000	188,4781	361,4352
		3,00	192,60000 <sup>*</sup>	27,00470	,000	106,1215	279,0785

Uygulanan Cd konsantrasyonu ile Kunduru-1149 çeşidi yaprak örneklerinde biriken Cd konsantrasyonları arasındaki ilişki SPSS 21.0 programı kullanılarak, One-Way ANOVA testi ve Tamhane post-hoc testi uygulanarak belirlenmiştir.

Kunduru-1149 çeşidine ait yaprak örneklerinin Cd miktarları uygulanan Cd dozları ile kıyaslandığında Tablo 4.3' de görüleceği üzere kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ). Sadece 200 $\mu\text{M}$  ve 300 $\mu\text{M}$  grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4.3.** Kunduru-1149 yapraklarında Ağır Metal miktarının İstatistiki Sonuçları

Tamhane	1,00	2,00	-142,06667*	12,88362	,048	-280,8139	-3,3194
		3,00	-233,80000*	8,75233	,008	-328,0562	-139,5438
		4,00	-342,10000*	24,72003	,031	-608,3167	-75,8833
	2,00	1,00	142,06667*	12,88362	,048	3,3194	280,8139
		3,00	-91,73333*	15,57534	,036	-174,6335	-8,8332
		4,00	-200,03333*	27,87594	,033	-371,7385	-28,3282
	3,00	1,00	233,80000*	8,75233	,008	139,5438	328,0562
		2,00	91,73333*	15,57534	,036	8,8332	174,6335
		4,00	-108,30000	26,22372	,200	-309,7880	93,1880
	4,00	1,00	342,10000*	24,72003	,031	75,8833	608,3167
		2,00	200,03333*	27,87594	,033	28,3282	371,7385
		3,00	108,30000	26,22372	,200	-93,1880	309,7880

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Kutluk-94 ve Kunduru-1149 buğday çeşitlerinin farklı Cd dozlarına (100-200-300 $\mu$ M) maruz bırakıldıktan sonra köklerinde belirlenen Cd miktarları Tablo 4.4 de gösterilmiştir.

**Tablo 4.4.** Kutluk-94 ve Kunduru-1149 köklerinde Cd miktarı

KUTLUK-94				KUNDURU-1149			
KÖK				KÖK			
	0	Analiz sonucu (ICP-OES) ppm	Örnekteki Cd miktarı (mg/kg)		Biyomas (gram)	Analiz sonucu (ICP-OES) ppm	Örnekteki Cd miktarı (mg/kg)
Kontrol-1	0,18	8,00	-	Kontrol-1	0,18	0,00	-
Kontrol-2	0,19	9,00	-	Kontrol-2	0,18	0,00	-
Kontrol-3	0,18	10,00	-	Kontrol-3	0,18	0,00	-
100-1 $\mu\text{M}$	0,18	608,80	0,109	100-1	0,18	965,50	0,173
100-2 $\mu\text{M}$	0,18	598,00	0,107	100-2	0,18	897,00	0,161
100-3 $\mu\text{M}$	0,18	692,80	0,124	100-3	0,18	912,70	0,164
200-1 $\mu\text{M}$	0,18	1113,00	0,200	200-1	0,18	1369,00	0,246
200-2 $\mu\text{M}$	0,18	1014,00	0,182	200-2	0,18	1352,00	0,243
200-3 $\mu\text{M}$	0,18	1082,00	0,194	200-3	0,18	1263,00	0,227
300-1 $\mu\text{M}$	0,17	1281,00	0,217	300-1	0,18	1864,00	0,335
300-2 $\mu\text{M}$	0,17	1259,00	0,214	300-2	0,18	1821,20	0,327
300-3 $\mu\text{M}$	0,17	1468,00	0,249	300-3	0,18	1903,80	0,342

Uygulanan Cd konsantrasyonu ile Kutluk-94 çeşidi kök örneklerinde biriken Cd miktarları arasındaki ilişki SPSS 21.0 programı kullanılarak, One-Way ANOVA testi ve Tamhane post-hoc testi uygulanarak belirlenmiştir. Tablo 4.5 de görüleceği üzere kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ). Sadece 200 $\mu\text{M}$  ve 300 $\mu\text{M}$  grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4.5. Kutluk-94 kökte Ağır Metal miktarının İstatistikî Sonuçları**

Tamhane	1,00	2,00	-624,20000*	29,96821	,014	-946,5147	-301,8853
		3,00	-1060,66667*	29,24228	,005	-1375,1533	-746,1801
		4,00	-1327,00000*	66,30737	,015	-2040,8915	-613,1085
	2,00	1,00	624,20000*	29,96821	,014	301,8853	946,5147
3,00		-436,46667*	41,86332	,003	-638,4061	-234,5272	
4,00		-702,80000*	72,76052	,019	-1190,9698	-214,6302	
3,00	1,00	1060,66667*	29,24228	,005	746,1801	1375,1533	
	2,00	436,46667*	41,86332	,003	234,5272	638,4061	
	4,00	-266,33333	72,46455	,219	-759,6096	226,9429	
4,00	1,00	1327,00000*	66,30737	,015	613,1085	2040,8915	
	2,00	702,80000*	72,76052	,019	214,6302	1190,9698	
	3,00	266,33333	72,46455	,219	-226,9429	759,6096	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Uygulanan Cd konsantrasyonu ile Kunduru-1149 çeşidi kök örneklerinde biriken ağır metal miktarları arasındaki ilişki SPSS 21.0 programı kullanılarak, One-Way ANOVA testi ve Tukey post-hoc testi ile belirlenmiştir. Tablo 4.6’da da görüldüğü üzere tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ )

**Tablo 4.6. Kunduru-1149 kökte Ağır Metal miktarının İstatistikî Sonuçları**

Multiple Comparisons							
Dependent Variable: kunduru_kok							
	(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1,00	2,00	-925,06667*	32,23663	,000	-1028,2997	-821,8336
		3,00	-1328,00000*	32,23663	,000	-1431,2330	-1224,7670
		4,00	-1863,00000*	32,23663	,000	-1966,2330	-1759,7670
	2,00	1,00	925,06667*	32,23663	,000	821,8336	1028,2997
		3,00	-402,93333*	32,23663	,000	-506,1664	-299,7003
		4,00	-937,93333*	32,23663	,000	-1041,1664	-834,7003
	3,00	1,00	1328,00000*	32,23663	,000	1224,7670	1431,2330
		2,00	402,93333*	32,23663	,000	299,7003	506,1664
		4,00	-535,00000*	32,23663	,000	-638,2330	-431,7670
	4,00	1,00	1863,00000*	32,23663	,000	1759,7670	1966,2330
		2,00	937,93333*	32,23663	,000	834,7003	1041,1664
		3,00	535,00000*	32,23663	,000	431,7670	638,2330

Aynı Cd konsantrasyonlarına maruz bırakılan çeşitlerin kök ve yapraklarında biriken ağır metal miktarları arasındaki fark da yine SPSS programı kullanılarak, paired

sample t test ile gerçekleştirilmiştir. Bu analiz buğday çeşitlerine uygulanan tüm Cd konsantrasyonları için ayrı ayrı yapılmıştır.

Kutluk-94 ve Kunduru-1149'ya ait kontrol gruplarının yaprak örnekleri arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur ( $p>0.05$ ).  $100\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonda yine her iki çeşidin yapraklarında biriken ağır metal konsantrasyonu açısından anlamlı bir farklılık söz konusu değildir ( $p>0.05$ ,  $t:-1,175$ ).  $200\mu\text{M}$  konsantrasyonunda da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ,  $t:-3,271$ ). Aynı durum  $300\mu\text{M}$  konsantrasyon için de geçerlidir ( $p>0.05$ ,  $t: 0,601$ ).

Kutluk-94 ve Kunduru-1149 çeşitleri kök örneklerinin kontrol grupları arasında da istatistiksel olarak bir fark yoktur ( $p>0,05$ ).

$100\mu\text{M}$  konsantrasyonunda ise her iki türün köklerinde biriken ağır metal konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık söz konusudur ( $p<0.05$ ,  $t:-7,361$ ).  $200\mu\text{M}$  konsantrasyonunda da durum aynıdır ( $p<0.05$ ,  $t: -5,698$ ).  $300\mu\text{M}$  konsantrasyonunda da çeşitlerin köklerinde biriken ağır metal konsantrasyonları açısından anlamlı bir fark vardır ( $p<0.05$ ,  $t: -11,458$ ).

Özetle, Kutluk-94 ve Kunduru-1149 yapraklarında biriken Cd miktarı açısından hiçbir konsantrasyonda anlamlı bir fark yokken, köklerde ise tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir farklılık söz konusudur. Kunduru-1149 çeşidi köklerinde daha fazla Cd birikimi tespit edilmiştir.

#### **4.2.Kantitatif Real Time PCR Analizi**

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

Çalışmamızda kullanılan 3 farklı miRNA (miR159, miR171 ve miR395) ile kontrol olarak kullanılan miR161'e ait cDNA ürünleri ters transkriptaz enzimi ile spesifik primerler kullanılarak elde edilmiştir.

### 4.3.miRNA Gen ifadesi Analiz Sonuçları

Real time PCR kullanarak gen ifadesindeki nispi değişiklikleri ölçmek ve verileri doğru şekilde analiz etmek için belirli denklemler, varsayımlar ve bu varsayımların test edilmesini gerektirir (Livak ve Schmittgen, 2001).  $C_t$  (cycle threshold), gerçek zamanlı PCR deneylerinde floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısıdır. Çalışmamızda  $C_t$  değerleri 3 biyolojik tekrar ve 2 teknik tekrar sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları hesaplanarak elde edilmiştir. Real time PCR analinde veriler, hedef genin endojen bir referans gen ile normalize edilip kontrole göre gen ekspresyonundaki kat değişimi (Fc) olarak sunulur.

Çalışma sonucunda tüm hesaplamalar yapılarak elde edilen Fc değerleri Tablo 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.

**Tablo 4.7.** Kutluk-94-Yaprak miRNA Fc değerleri

<b>Kutluk-94</b>	<b>miR159</b>	<b>miR171</b>	<b>miR395</b>
100	0,930±0.10	1,218±0.35	0,814±0.005
200	1,090±0.002	0,915±0.07	1,864±0.23
300	1,127±0.05	0,767±0.13	1,151±0.09

**Tablo 4.8.** Kutluk-94-Kök miRNA Fc değerleri

<b>Kutluk-94</b>	<b>miR159</b>	<b>miR171</b>	<b>miR395</b>
100	1,406±0.24	1,064±0.17	1,033±0.07
200	1,540±0.50	0,820±0.10	1,081±0.03
300	1,944±0.02	0,715±0.10	1,158±0.11

**Tablo 4.9.** *Kunduru-1149-yaprak mirna Fc değerleri*

<b>Kunduru-1149</b>	<b>miR159</b>	<b>miR171</b>	<b>miR395</b>
100	1,396±0.15	0,815±0.01	0,412±0.05
200	2,195±0.24	0,862±0.06	0,360±0.02
300	2,541±0.92	0,522±0.01	0,314±0.19

**Tablo 4.10.** *Kunduru-1149-kök mirna Fc değerleri*

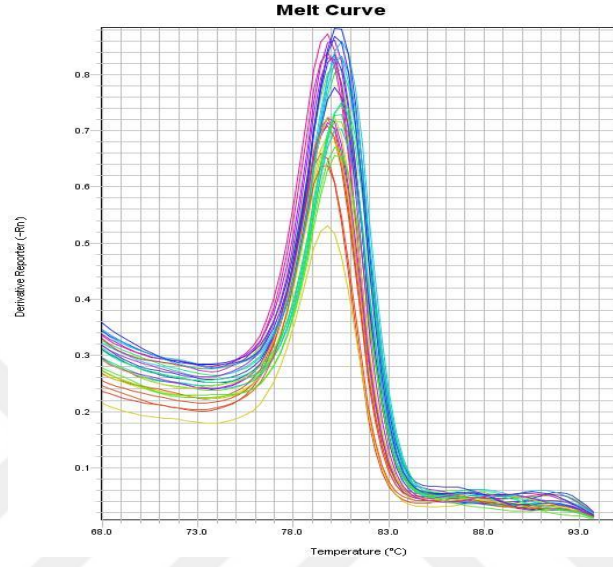
<b>Kunduru-1149</b>	<b>miR159</b>	<b>miR171</b>	<b>miR395</b>
100	1,059±0.08	0,831±0.19	0,629±0.27
200	0,827±0.10	0,656±0.11	1,043±0.01
300	0,674±0.14	0,559±0.21	1,371±0.45

#### **4.4.miRNA Gen İfadesi Analiz Grafikleri**

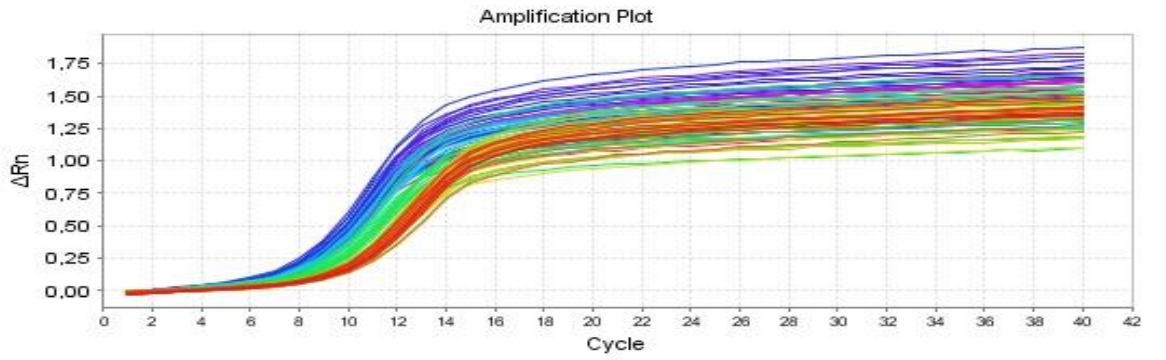
Erime eğrisi analizi (Melting curve), SYBR-Green gibi floresan boya ların kullanıldığı analizlerde, çoğalan DNA'nın hedef bölge olduğunu kesinleştirmek amacıyla kullanılır. Erime eğrisi analizinde, ikili sarmal DNA örneğinin sıcaklığı yavaş yavaş artırılarak floresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik oluşturulur. Çalışmamızda hedef miRNA'lara ait primerlerin güvenilirliğini test etmek için erime eğrisi analizi yapılmış ve primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin varlığı kontrol edilmiştir.

#### 4.4.1. miR159 analiz sonucu

miR159'a ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



a. Erime eğrisi

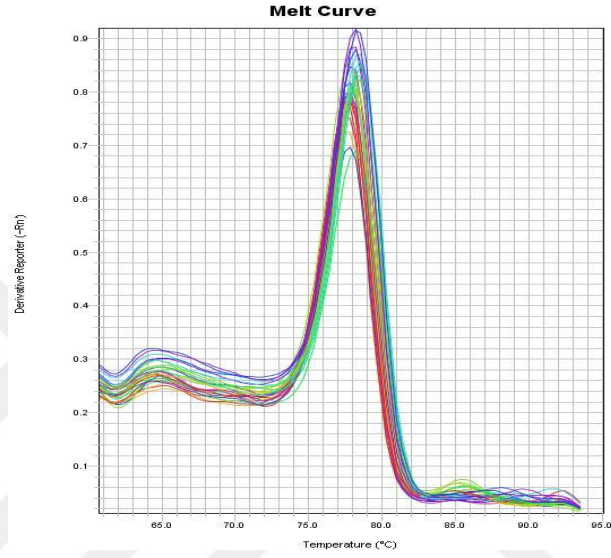


b. Amplifikasyon Grafiği

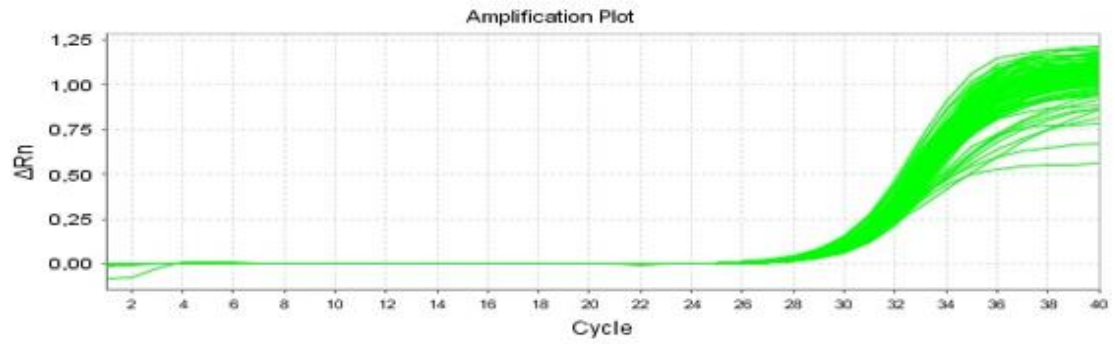
Şekil 4.1. miR159 Erime Eğrisi (a) Amplifikasyon Grafiği (b)

#### 4.4.2.miR161 analiz sonucu

miR161'e ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



a. Erime Eğrisi

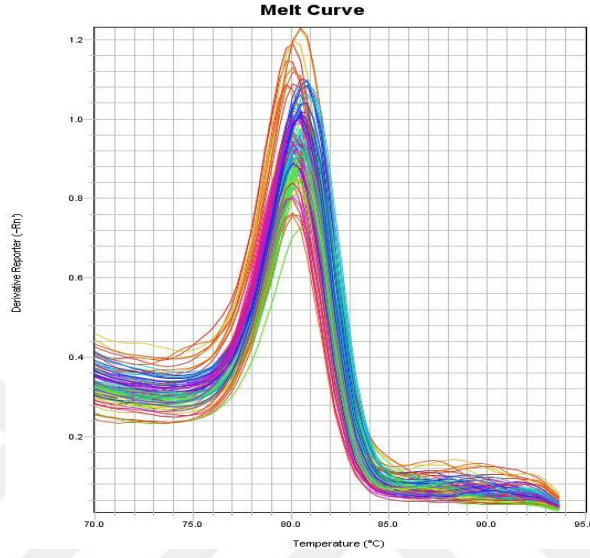


b. Amplifikasyon Grafiği

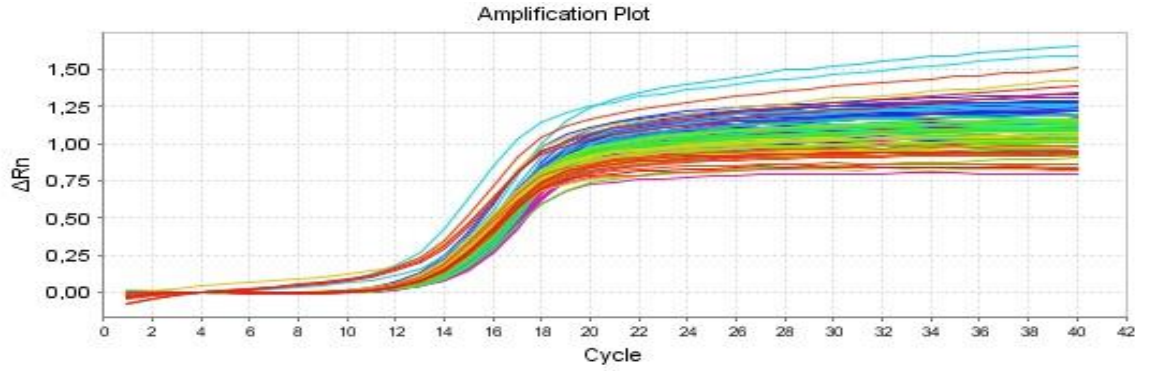
Şekil 4.2. miR161 Erime Eğrisi (a) Amplifikasyon Grafiği (b)

#### 4.4.3.miR171 analiz sonucu

miR171'e ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği Şekil 4.3' de gösterilmiştir.



a. Erime Eğrisi

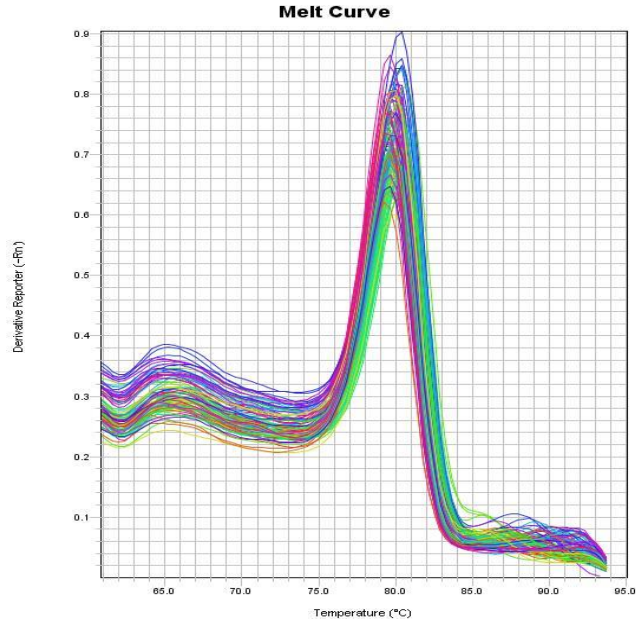


b. Amplifikasyon Grafiği

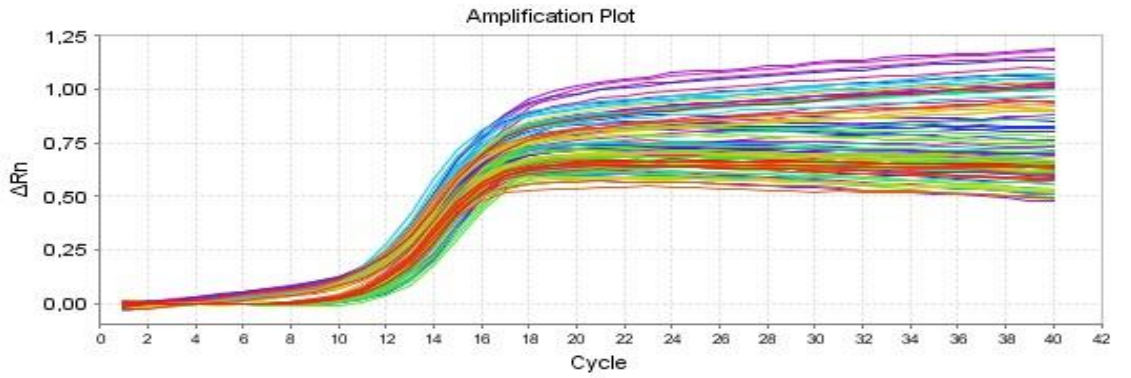
Şekil 4.3. miR171 Erime Eğrisi (a) Amplifikasyon Grafiği (b)

#### 4.4.4.miR395 analiz sonucu

miR395'e ait qRT-PCR analizinden elde edilen erime eğrisi ve amplifikasyon grafiği Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



a. Erime Eğrisi



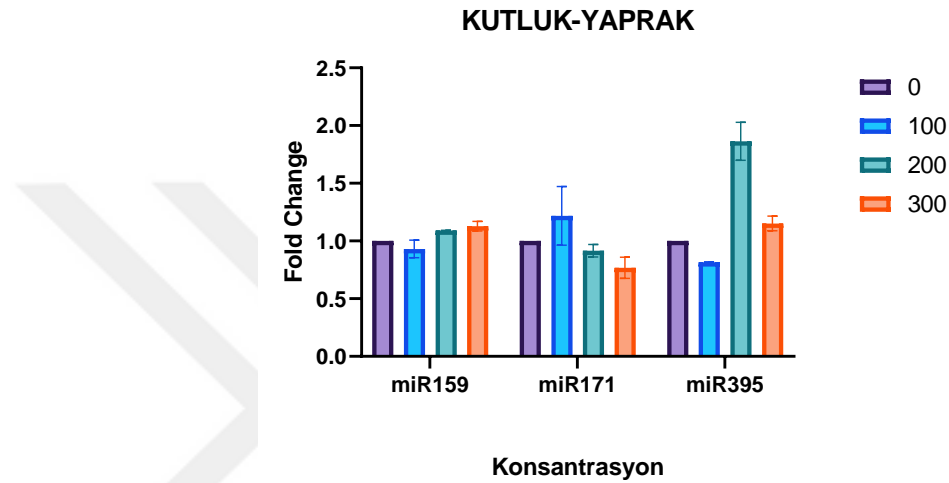
b. Amplifikasyon Grafiği

Şekil 4.4. miR395 Erime Eğrisi (a) Amplifikasyon Grafiği(b)

## 4.5.Çalışılan miRNA'ların Gen Ekspresyon Seviyesine Göre Karşılaştırmalı Analizi

### 4.5.1.Kutluk-94 çeşidi yaprak ve köklerinden elde edilen bulgular

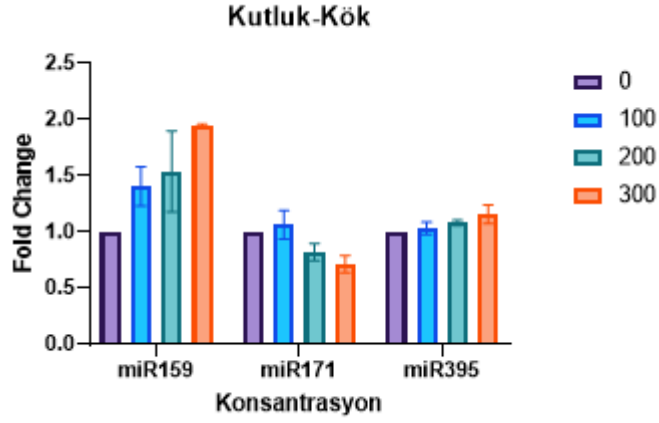
Kutluk-94 çeşidine ait bitkilere farklı dozlarda Cd uygulanmasının ardından yaprakta miR159, miR171 ve miR395 gen ekspresyon seviyelerindeki değişim Şekil 4.5 de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Kutluk-94 Çeşidi Yaprak Örneklerinde miR159, miR171 ve miR395'in Farklı Cd Konsantrasyonlarındaki Ekspresyon Seviyeleri

Kutluk-94 yapraklarında 100µM'lık Cd uygulamasında miR159 ekspresyon seviyesinde azalma, 200µM'lık ve 300µM'lık Cd uygulamasında ise ekspresyon seviyesinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Kutluk-94 yapraklarında 100µM'lık Cd uygulamasında miR171'in ekspresyon seviyesinde artış olurken diğer iki dozda azalma gözlemlenmiştir. Kutluk-94 yapraklarında 100µM'lık Cd uygulamasında miR395'in ekspresyon seviyesinde azalma, 200µM'lık Cd uygulamasında ise artış görülmüştür. 300µM'lık Cd uygulamasında ise miR395'in ekspresyon seviyesinde kontrole göre artış olurken 200µM'lık Cd uygulamasına göre azalma gözlemlenmiştir.

Kutluk-94 köklerinde farklı dozlarda Cd uygulanmasından sonra tespit edilen miR159, miR171 ve miR395'in gen ekspresyon seviyelerindeki değişim Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

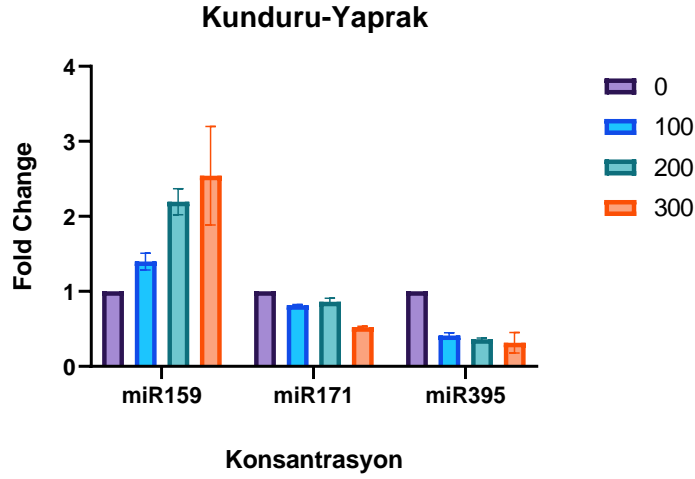


**Şekil 4.6.** Kutluk-94 Çeşidi Kök Örneklerinde miR159, miR171 ve miR395'in Farklı Cd Konsantrasyonlarındaki Ekspresyon Seviyeleri

Kutluk-94 köklerinde 100, 200 ve 300µM'lık Cd uygulamasında miR159'un ekspresyon seviyesinde doza bağlı artış gözlemlenmiştir. Kutluk-94 köklerinde 100µM'lık Cd uygulamasında miR171'in ekspresyon seviyesinde kontrole göre hafif bir artış, 200 ve 300µM'lık Cd uygulamasında ise ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Kutluk-94 köklerinde 100, 200 ve 300µM'lık Cd uygulamasında miR395'un ekspresyon seviyesinde kontrole göre artış gözlenmiştir.

#### 4.5.2. Kunduru-1149 çeşidi yaprak ve köklerinden elde edilen bulgular

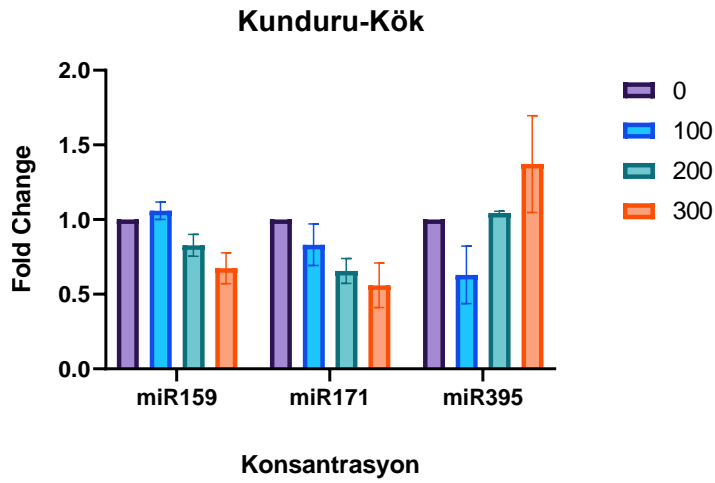
Kunduru-1149 çeşidine ait bitkilere Cd'un farklı dozlarının uygulanmasının ardından yaprakta miR159, miR171 ve miR395'un gen ekspresyon seviyelerindeki değişim Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.7.** Kunduru-1149 Çeşidi Yaprak Örneklerinde miR159, miR171 ve miR395'in Farklı Cd Konsantrasyonlarındaki Ekspresyon Seviyeleri

Kunduru-1149 yapraklarında 100, 200 ve 300µM'lık Cd uygulamasında miR159'un ekspresyon seviyesinde doza bağlı artış görülmüştür. Kunduru-1149 yapraklarında 100, 200 ve 300µM'lık Cd uygulamasında miR171 ve miR395'in ekspresyon seviyesinde ise azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Kunduru-1149 çeşidine ait bitkilere farklı Cd dozları uygulandıktan sonra kökte miR159, miR171 ve miR395'in gen ekspresyon seviyelerindeki değişim Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.8.** Kunduru-1149 Çeşidi Kök Örneklerinde miR159, miR171 ve miR395'in Farklı Cd Konsantrasyonlarındaki Ekspresyon Seviyeleri

Kunduru-1149 köklerinde 100 $\mu$ M'lık Cd uygulamasında miR159 ekspresyon seviyesinde artış, 200 ve 300 $\mu$ M'lık Cd uygulamasında ise ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Kunduru-1149 köklerinde 100, 200 ve 300 $\mu$ M'lık Cd uygulamasında miR171'in ekspresyon seviyesinde doza bağlı azalma görülmüştür. Kunduru-1149 köklerinde 100 $\mu$ M'lık Cd uygulamasında miR395'in ekspresyon seviyesinde kontrole göre azalma görülmüştür. 200 ve 300 $\mu$ M'lık Cd uygulamasında ise ekspresyon seviyesinde artış olduğu gözlemlenmiştir.



## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda, abiyotik stres faktörlerinden olan ağır metallerin aşırı birikimi dünyayı; bitkilerin büyümesini ve gelişimini olumsuz yönde etkileyen önemli bir çevresel sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Kadmiyum (Cd), atmosfer birikimi, endüstriyel faaliyetler, kanalizasyon atıkları ve gübre uygulaması gibi doğal süreçler ve antropojenik faaliyetler yoluyla toprakta birikmektedir (Fan ve ark., 2009). Cd, bitkiler tarafından kolayca alınır ve nispeten yüksek konsantrasyonda biriktirebileceği yenilebilir kısımlara aktarılır; buğday danelerinde de yüksek oranlarda Cd biriktiği tespit edilmiştir (Adams ve ark., 2004). Buğday (*Triticum aestivum* L.) dahil olmak üzere birçok mahsul türünün, mahsul büyümesi üzerinde olumsuz etkiler olmaksızın insan tüketimi için önerilen maksimum seviyeyi aşabilecek bir dereceye kadar Cd biriktirdiği rapor edilmiştir (Gray ve ark., 2001).

Bu tez çalışmasında ülkemizde en çok tarımı yapılan tahıl bitkisi buğdayın (*Triticum aestivum* L.) Kutluk-94 ve Kunderu-1149 çeşitleri CdCl<sub>2</sub>'nin farklı dozlarına (100 µM, 200 µM, 300 µM) maruz bırakılarak kök ve yapraklardaki Cd birikim seviyeleri belirlenmiş, ağır metal stresi ile ilişkili bazı miRNAların (miR159, miR171 ve miR395) ekspresyonlarındaki değişiklikler araştırılmıştır.

Yapılan ağır metal ölçümlerinin istatistik analiz sonuçları her iki buğday çeşidinde de kontrole kıyaslandığında artan doza bağlı olarak kök ve yapraklarda Cd miktarının arttığını göstermiştir (p<0.05). Benzer şekilde, Tongarlak ve ark. (2020) ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde bitkilerin tüm organlarında biriken Cd miktarının uygulanan Cd dozlarındaki artışa paralel olarak arttığını bildirmiştir (P < 0.01) Kutluk-94 ve Kunderu-1149 çeşitlerini Cd birikimi açısından kıyasladığımızda (Paired sample t-test) Kunderu-1149 çeşidinde Kutluk-94 çeşidinden daha fazla Cd biriktiği ve bu birikimin köklerde daha fazla olduğu görülmüştür. Greger ve Löfstedt (2004) makarnalık buğdayların ekmeklik buğdaylardan daha fazla Cd akümüle ettiğini bildirmiştir; dolayısıyla Kunderu-1149 makarnalık buğday çeşidi olduğundan Kutluk-94'e göre daha fazla Cd biriktirmesi beklenen bir durumdur. Bitkilerin ağır metalleri tolere edilebilirlik ve biriktirebilirlik üst sınırları farklı bitki türlerinde farklı derecelerde olabilmektedir (Ernst vd, 1992).

Bu farklılıklar bitkilerde morfolojik yapıların bozulmasından kaynaklı ya da yüksek ağır metal birikiminin sitozolden uzaklaştırılmasında kullanılan metal bağlayıcı ligandların inaktivasyonundan, enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidanların işlevini düzenli olarak yerine getirememesinden, ağır metallerin (Cd, Pb) bitkiler tarafından tanınmasında ve ilgili moleküler mekanizmaların düzenlenmesinde rol oynayan sinyal mekanizmalarının bozulmasından kaynaklı olabilir. Ayrıca, Yücel ve Yücel (2013), farklı ağır metallerin 17 buğday genotipi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışma sonucunda ağır metal stresinden en çok “Kutluk-94” çeşidinin etkilendiğini, “Kıraç” ve “Kunduru-1149” çeşitlerinin çalışılan 17 genotip arasında en dayanıklı çeşitler olduğunu belirtmişlerdir.

Sonuçlarımıza göre çalışılan çeşitlerin kök ve yapraklarında biriken Cd miktarı farklılık göstermektedir. Kutluk-94 kök ve yapraklarında biriken Cd miktarı sırasıyla 0,226 ve 0,073 mg/kg, Kunduru-1149 kök ve yapraklarında biriken Cd miktarı ise sırasıyla 0,334 ve 0,062 mg/kg olarak bulunmuştur. Kadmiyum, buğdayın köküne taşıyıcılar (NRAMP, ZIP ve düşük nitelikli kalsiyum taşıyıcılar), katyon kanalları ve Cd şelatları yoluyla girer. Kadmiyum, yüksek mobilitesi nedeniyle kök alımı ve sürgünlere ve tanelere yer değiştirme yoluyla geçerek bitkilere kolayca ulaşabilir (Abedi ve Mojiri, 2020). Birçok çalışma, buğdaydaki yüksek Cd içeriğinin köklerde biriktiğini ve Cd'nin sürgün ve tanelere translokasyonla geçebileceğini göstermiştir (Abbas ve ark. 2017). Payandeh vd. (2018) buğdayda yaptıkları bir çalışmada tohum, gövde ve kökte biriken Cd miktarlarını 0.29, 0.62, ve 0.95mg/kg olarak belirlemişler ve bunu buğday bitkilerinin Cd transferine karşı bir direnç mekanizmasına sahip olduğu ve Cd birikiminin en fazla kökte sonrasında ise azalarak gövde ve tohumda biriktiğini bildirmişlerdir.

Son zamanlarda artan biyotik veya abiyotik stres faktörlerine karşı miRNA'ların önemi artmıştır. miRNA'lar özel hedef gen bölgelerini baskılayarak patojen zararının etkisinden ve diğer kuraklık tuzluluk ve ağır metal gibi abiyotik stres faktörlerinin etkisinin azaltılması gibi stres cevaplarını düzenlemektedir (İlhan vd., 2014). MikroRNA (miRNA), hedef mRNA'nın degradasyonuna veya translasyonuna aracılık ederek transkripsiyondan sonra hedef genlerin ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen ve yeni bir ekspresyon düzenleyici tipi olan önemli bir küçük RNA grubudur (Lee ve ark., 1993).

Önceki çalışmalar, Cd ile ilişkili miRNA'ların ağır metal taşıma, kükürt asimilasyonu, antioksidan stres ve oksin sinyal iletim yolları yoluyla Cd stresine verilen yanıtı katılabileceğini ve bitkilerin ağır metal stresine yanıt verme sürecinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Mendoza-Soto ve ark., 2012).

Son yıllarda, yüksek verimli dizileme teknolojisinin geliştirilmesi ve uygulanmasıyla, bitkilerde ağır metallerle ilgili giderek daha fazla miRNA klonlanmış ve tanımlanmıştır (Liulu vd., 2020).

Bu çalışmamızda iki farklı buğday çeşidinin (Kutluk-94 ve Kunduru-1149) kadmiyum stresine verdiği cevaplar 3 farklı miRNA (miR159, miR171 ve miR395) kullanılarak araştırılmıştır.

MikroRNA'lar içerisinde çoğunlukla korunmuş olarak bilinen en önemli miRNA'lardan biri miR159'dur. miR159 özellikle yaprak gelişimi, çiçek organları tanımlanması gibi önemli rolü olan birkaç MYB transkripsiyon faktör genini hedefleyen bir mikroRNA çeşididir (Millar vd., 2019; Achard vd., 2004).

Çalışmamızda Kunduru-1149'da miR159 ekspresyonunun kökte yukarı regüle edildiği, yaprakta ise 100 µM'lık konsantrasyon hariç diğer konsantrasyonlarda (200µM ve 300µM) aşağı regüle edildiği görülmüştür. Kutluk-94' de ise miR159'un ekspresyonunun hem yaprak hem de kökte yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir. Farklı bitkilerde yapılan çalışmalar miR159'un kadmiyum, civa, alüminyum, mangan ve arsenik gibi ağır metal streslerine yanıt olarak aşağı regüle edildiğini bildirmiştir (Noman ve Aqeel, 2017). *Triticum aestivum*'da yapılan bir diğer çalışmada kadmiyum stresinde miR159'un kökte ve yaprakta aşağı regüle edildiği bulunmuştur (Qiu vd., 2016). Ağır metal biriktiren bir bitki olarak bilinen *R. communis*'te ise miR159'un nikel stresinde kökte ve yaprakta yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Çelik ve Akdaş, 2019). *Brassica juncea*'da yapılan bir diğer çalışmada arsenik stresi altında miR159 gen ekspresyonunun kökte ve filizde 6. ve 24. saatlerde yukarı regüle edildiği 72 saatte ise kökte aşağı regüle edildiği, filizde ise yukarı regüle edildiği bulunmuştur (Srivastava vd., 2012). Dolayısıyla, miR159 ekspresyonu bitki türünden türüne, ayrıca farklı organlarda farklı ekspresyon gösterebilmektedir.

miR171, 21 nükleotid dizisi ile kapalı tohumlu bitkiler (angiosperm) arasında korunan mikroRNA'lar içinde yer almaktadır (Zhu vd., 2015). Ayrıca miR171'in SCL transkripsiyon faktör ailesinin üyelerini düzenlemede rolü olduğu bilinmektedir.

*A. thaliana*'da yapılan bir çalışmada miR171'in hedef genleri (SCL6 - II, SCL6 - III ve SCL6 - IV)'nin meristem oluşumunda, kök ve yaprak gelişiminde, vasküler gelişim ve stres tepkisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Llave vd., 2002a, 2002b; Bolle, 2004; Lee vd., 2008; Wang vd., 2010). miR171'in *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* ve *Oryza sativa*'da cıva, arsenik ve kadmiyum streslerine yanıt olarak aşağı regüle edildiği, alüminyum stresi altında yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Yang, 2013). Yapılan başka bir çalışmada, *R. communis* bitkisi üzerinde nikel ağır metalinin miR171'in kökte ve yaprakta aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Çelik ve Aktaş, 2019).

Çalışmamızda Kutluk-94 yaprak ve köklerinde 100 µM'lık konsantrasyonda miR171'in yukarı regüle edildiği, 200 ve 300 µM'lık konsantrasyonda aşağı regüle edildiği görülmüştür. Cd uygulanan Kunduru-1149 bitkilerinin kök ve yapraklarında ise miR171'in aşağı regüle edildiği görülmüştür.

miR395'in sülfat eksikliği durumunda ekspresyon seviyesinin indüklendiği ve sülfat homeostazının düzenlenmesi açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Kawashima vd.,2009; Liang 2010). miR395'in ekspresyonunun yukarı regülasyonu, köklerden artan translokasyona bağlı olarak yapraklarda sülfat birikmesine sebep olur (Kawashima vd.,2009; Liang 2010). Arabidopsis bitkisinde yapılan bir çalışma da miR395'in sülfat eksikliğinde yukarı regüle edildiği ve sülfat miktarını etkileyen bileşenlerinden söz edilmiştir. Sistein'in eksikliği sonucunda biriken sistein öncüsü O-asetilserin miR395 birikiminde artışa neden olur. Bitkilerin sülfat alımını ve asimilasyonunu inhibe eden sistein ile beslenmesi miR395 ekspresyonunu arttırırken, glutatyon sentezinin bir inhibitörü olan butiyonin sülfoksimin miR395 ekspresyonunu azaltmıştır (Matthewman vd., 2012). *R. communis*'te yapılan bir çalışmada nikel stresinde miR395'in yaprakta ve kökte aşağı regüle olduğu gösterilmiştir (Çelik ve Aktaş, 2009). *Brassica juncea*'da yapılan bir diğer çalışmada, arsenik stresinde miR395 gen ekspresyonunun kökte ve filizde 6. ve 24. saatlerde yukarı regüle edildiği 72 saatte ise aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Srivastava vd., 2012).

Kutluk-94 yapraklarında miR395'in 100  $\mu$ M'lık konsantrasyonda aşağı regüle edildiği, 200 ve 300  $\mu$ M'lık konsantrasyonda ise yukarı regüle edildiği gözlemlenmiştir. Kutluk-94 köklerinde ise miR395'in tüm konsantrasyonlarda yukarı regüle edildiği gözlenmiştir.

Kunduru-1149 yapraklarında tüm konsantrasyonlarda miR395'in aşağı regüle edildiği, köklerde ise 100  $\mu$ M'lık konsantrasyonda aşağı regüle edilirken, 200 ve 300  $\mu$ M'lık konsantrasyonda yukarı regüle edildiği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında buğdayın Kutluk-94 ve Kunduru-1149 eşitlerinde artan Cd dozlarında köklerde yapraklara göre daha fazla Cd biriktiği ve Kunduru-1149 köklerindeki birikimin Kutluk-94'e göre belirgin şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışma laboratuvar ortamında yapıldığından eşitleri olgunluğa kadar büyüterek danelerinde biriken Cd miktarını ölçmek mümkün olmamıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda Kutluk-94 ve Kunduru-1149 eşitlerinin tarla denemeleri yapılarak danelerde biriken Cd miktarının da saptanması hangi çeşidin daha güvenilir bir şekilde kullanılabileceği konusunda bilgi verecektir. Çalışmamızda artan Cd dozlarında ağır metal stresi ile ilişkili miR159, miR171 ve miR395'in ekspresyonları da çeşitler arasında değişiklik göstermiştir. Bu çalışmanın ağır metal stresiyle ilişkili ilave miRNA'lar ve çalışılan miRNA'ların hedef genlerinin ekspresyonlarının da dahil edilerek genişletilmesi buğdayda Cd birikimi sürecinin nasıl kontrol edildiği ile ilgili önemli bilgiler sağlayacaktır.

## KAYNAKÇA

- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Zia-ur-Rehman, M., Qayyum, M. F., Abbas, F., ... & Ok, Y. S. (2017). Effect of biochar on cadmium bioavailability and uptake in wheat (*Triticum aestivum L.*) grown in a soil with aged contamination. *Ecotoxicology and environmental safety*.
- Achakzai, H. K. (2018). Identification and annotation of newly conserved microRNAs and their targets in wheat (*Triticum aestivum L.*). *PloS one*, *13*(7), e0200033.
- Alonso-Peral, M. M., Li, J., Li, Y., Allen, R. S., Schnippenkoetter, W., Ohms, S., & Millar, A. (2010). The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. *Plant physiology*, *154*(2), 757-771.
- Al-Othman, Z. A., Ali, R., Al-Othman, A. M., Ali, J., & Habila, M. A. (2016). Assessment of toxic metals in wheat crops grown on selected soils, irrigated with different water sources. *Arabian Journal of Chemistry*,
- Arróniz-Crespo, M., Núñez-Olivera, E., Martínez-Abaigar, J., & Tomás, R. (2004). A survey of the distribution of UV-absorbing compounds in aquatic bryophytes from a mountain stream.
- Arteca, R. N. & Arteca, J. M. (2007). Heavy-metal-induced ethylene production in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology*, *164*(11), 1480-1488.
- Aslantaş, R. K. (1988). R., Karakurt, H., & Karakurt, Y. (2010). Bitkilerin düşük sıcaklıklara dayanımında hücresel ve moleküler mekanizmalar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *41*(2), 157-167.
- Atıl, M. J., & Bartel, D. P. (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *The Plant Cell*, *17*(6), 1658-1673.
- Aydınoglu M. J., & Bartel, D. P. (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *The Plant Cell*, *17*(6), 1658-1673.

- Bahuguna, R. N., Jagadish, K. S. V., Coast, O., & Wassmann, R. (2014). Plant abiotic stress: Temperature extremes. *Encyclopedia of agriculture and food systems*, 330-334.
- Banti, V., Giuntoli, B., Gonzali, S., Loreti, E., Magneschi, L., Novi, G., & Perata, P. (2013). Low oxygen response mechanisms in green organisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4734-4761.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M. R., Boutry, M., Palmgren, M. G., Gribskov, M., & Axelsen, K. B. (2003). Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology*, 132(2), 618-628.
- Belouchi, A., Kwan, T., & Gros, P. (1997). Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Molecular Biology*, 33(6), 1085-1092.
- Beyer Jr, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559-566.
- BİR, T. İ. Türkiyenin Buğday Atlası. (2016).
- Bolle, C., Koncz, C., & Chua, N. H. (2000). PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction *Genes&Development*, 14(10), 1269-1278.
- Buchet, J. P., Lauwerys, R., Roels, H., Bernard, A., Bruaux, P., Claeys, F., & Nick, L. (1990). Renal effects of cadmium body burden of the general population. *The Lancet*, 336(8717), 699-702.
- Bukhari, SAH, Shang, S., Zhang, M., Zheng, W., Zhang, G., Wang, TZ, Wu, F. (2015). Tütün (*Nicotiana tabacum*) köklerinde krom stresine duyarlı mikroRNA'ların ve bunların hedef genlerinin genom çapında tanımlanması. *Çevresel Toksikoloji ve Kimya*, 34 (11), 2573-2582.
- Büyük, İ. SOYDAM-AYDIN, S., & Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2)

- Carillo, P. A. P., Annunziata, M. G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., & Woodrow, P. (2011). Salinity stress and salt tolerance. *Abiotic stress in plants—Mechanisms and Adaptations, 1*, 21-38.
- Carrington, J. C., & Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science, 301*(5631),
- Chen, H., Li, Y., Ma, X., Guo, L., He, Y., Ren, Z., & Zhang, Z. (2019). Analysis of potential strategies for cadmium stress tolerance revealed by transcriptome analysis of upland cotton. *Scientific Reports, 9*(1), 1-13.
- Chen, J., Zhou, J., & Goldsbrough, P. B. (1997). Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiologia Plantarum, 101*(1), 165-172
- Clemens, S., Aarts, M. G., Thomine, S., & Verbruggen, N. (2013). Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science, 18*(2), 92-99
- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology, 53*(1), 159-182.
- Çelik, Ö., & Akdaş, E. Y. (2019). Tissue-specific transcriptional regulation of seven heavy metal stress-responsive miRNAs and their putative targets in nickel indicator castor bean (*R. communis* L.) plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 170*, 682-690.
- Dell'Aversana, E., Hessini, K., Ferchichi, S., Fusco, G. M., Woodrow, P., Ciarmiello, L. F., ...& Carillo, P. (2021). Salinity Duration Differently Modulates Physiological Parameters and Metabolites Profile in Roots of Two Contrasting Barley Genotypes. *Plants, 10*(2), 307.
- Dietz K. J., Baier, M., & Krämer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *In Heavy Metal Stress in Plants* (pp.73-97). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ding, Y. F., & Zhu, C. (2009). The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 386*(1), 6-10.

- Ding, Y., Chen, Z., & Zhu, C. (2011). Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3563-3573.
- Ding, Y., Gong, S., Wang, Y., Wang, F., Bao, H., Sun, J., & Zhu, C. (2018). MicroRNA166 modulates cadmium tolerance and accumulation in rice. *Plant Physiology*, 177(4), 1691-1703.
- Dörtok, A., & Aksoy, A. (2018). Türkiye Buğday Sektörünün Eşanlı Model Yöntemiyle Tahmini. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 21(4), 580-586.
- Drew, M. C. (1997). Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1), 223-250.
- Dutta, S., Mitra, M., Agarwal, P., Mahapatra, K., De, S., Sett, U., & Roy, S. (2018). Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. *Plant signaling & behavior*, 13(8), e1460048.
- Emiroğlu, M. (2017). Türkiye'nin Beslenme Problemi ve Buğday Üretimi *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi*, 22(1-2).
- Eng, B. H., Guerinot, M. L., Eide, D., & Saier, M. H. (1998). Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *The Journal of membrane biology*, 166(1), 1-7.
- Eryılmaz, G. A., & Kılıç, O. (2018). Türkiye'de sürdürülebilir tarım ve iyi tarım uygulamaları. *Tarım ve Doga Dergisi*, 21(4), 624.
- Frazier, T. P., Sun, G., Burklew, C. E., & Zhang, B. (2011). Salt and drought stresses Induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. *Molecular Biotechnology*, 49(2), 159-165.
- Fu, Y., Mason, A. S., Zhang, Y., Lin, B., Xiao, M., Fu, D., & Yu, H. (2019). MicroRNA mRNA expression profiles and their potential role in cadmium stress response in *Brassica napus*. *BMC plant biology*, 19(1), 1-20.

- Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales, E.P., & Benavides, M. P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 83, 33-46.
- Gao, J., Luo, M., Peng, H., Chen, F., & Li, W. (2019). Characterization of cadmium-responsive MicroRNAs and their target genes in maize (*Zea mays*) roots. *BMC Molecular Biology*, 20(1), 1-9.
- Gill, S. S., Khan, N. A., Anjum, N. A., & Tuteja, N. (2011). Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: morphological, physiological and biochemical aspects. *Plant Stress*, 5(1), 1-23.
- Greger, M., & Bengtsson, B. E. (2002). Accumulation of heavy metals in water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated in the Bangkok region, Thailand. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(9), 1934-1939.
- Guerinot, M. L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 190-198.
- Guevara-García, Á.A., Juárez, K., & Herrera-Estrella, L. R. (2017). Heavy metal adaptation. *eLS*, 1-9.
- Hassan, M. A., Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2010). Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(3), 259-272.
- He, M., He, C. Q., & Ding, N. Z. (2018). Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1771.
- Hemantaranjan, A., Bhanu, A. N., Singh, M. N., Yadav, D. K., Patel, P. K., Singh, R., & Katiyar, D. (2014). Heat stress responses and thermotolerance. *Adv.Plants Agric. Res*, 1(3), 1-10.
- Hill, Becker, H. C., & Tigerstedt, P. M. (1997). Quantitative and ecological aspects of plant breeding. *Springer Science & Business Media*.

- Hossain, M. A., Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2010). Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *16*(3), 259-272.
- Howden, R., Goldsbrough, P. B., Andersen, C. R., & Cobbett, C. S. (1995). Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology*, *107*(4), 1059-1066.
- Huang, S. Q., Peng, J., Qiu, C. X., & Yang, Z. M. (2009). Heavy metal-regulated new microRNAs from rice. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *103*(2), 282-287.
- Huang, S.Q., Xiang, A.L., Che, L.L., Chen, S., Li, H., Song, J.B., Yang, Z.M., 2010. A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulphate deficiency and cadmium stress. *Plant Biotechnol. J.* *8*, 887–899. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00517>.
- Jalmi, S. K., Bhagat, P. K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K., & Sinha, A. K. (2018). Traversing the links between heavy metal stress and plant signaling. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 12.
- Jian H, Yang B, Zhang A., Genome-wide identification of micromnas in response to cadmium stress in oilseed rape (*Brassica napus* L) using high-throughput sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; *19*: 1431.
- Jin, Q., Xue, Z., Dong, C., Wang, Y., Chu, L., & Xu, Y. (2015). Identification and characterization of microRNAs from tree peony (*Paeonia ostii*) and their response to copper stress. *PLoS One*, *10*(2), e0117584.
- Jonak, C., Nakagami, H., & Hirt, H. (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology*, *136*(2), 3276-3283.
- Jones-Rhoades, M. W. (2012). Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Molecular Biology*, *80*(1), 3-16.

- Kang, X. P., Gao, J. P., Zhao, J. J., Yin, H. X., Wang, W. Y., Zhang, P., & Xu, J. (2017). Identification of cadmium-responsive microRNAs in *Solanum torvum* by high-throughput sequencing. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(2), 283-300.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Karabulut, Sebahattin., Bayramov, K. K., & Gölgeli, A. (2018). Belleğin Epigenetik Düzenlenmesi: *MikroRNA'ların Rolü Sağlık Bilimleri Dergisi*, 27(1), 87-94.
- Kawashima, C. G., Yoshimoto, N., Maruyama-Nakashita, A., Tsuchiya, Y. N., Saito, K., Takahashi, H., & Dalmay, T. (2009). Sulphur starvation induces the Expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *The Plant Journal*, 57(2), 313-321.
- Kennedy, C. D., & Gonsalves, F. A. N. (1987). The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H<sup>+</sup>, efflux of excised roots. *Journal of Experimental Botany*, 38(5), 800-817.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y. M., Huang, Y. Z., & Zhu, Y. G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution*, 152(3), 686-692.
- Kızılaslan, H. (2004). Dünya'da ve Türkiye'de buğday üretimi ve uygulanan politikaların karşılaştırılması.
- Kireççi, O. A. (2018). Bitkilerde Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2), 473-483.
- Klapheck, S., Schlunz, S., & Bergmann, L. (1995). Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology*, 107(2), 515-521.
- Korkmaz Ağaoğlu, Ö., & Sidekli, Ö. (2020). Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun Housekeeping Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University/Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(1).
- Kravchik, M., Stav, R., Belausov, E., & Arazi, T. (2019). Functional characterization of microRNA171 family in Tomato. *Plants*, 8(1), 10.

- Kulcheski, F. R., de Oliveira, L. F., Molina, L. G., Almerão, M. P., Rodrigues, F. A., Marcolino J., & Margis, R. (2011). Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC genomics*, *12*(1), 1-17.
- Küden, A. B., Küden, A., Paydaş, S., Kaşka, N., & İmrak, B. (1998). Bazı Ilıman İklim Meyve Tür ve Çeşitlerinin Soğuğa Dayanıklılığı Üzerinde Çalışmalar. *Tr. J. of Agriculture ve Forestry*, *22*, 101-109.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, *75*(5), 843-854.
- Li, J. C., Guo, J. B., Xu, W. Z., & Ma, M. (2007). RNA interference-mediated silencing of phytochelatase synthase gene reduce cadmium accumulation in rice seeds. *Journal of Integrative Plant Biology*, *49*(7), 1032-1037.
- Li, X., Ziadi, N., Bélanger, G., Cai, Z., & Xu, H. (2011). Cadmium accumulation in wheat grain as affected by mineral N fertilizer and soil characteristics. *Canadian Journal of Soil Science*, *91*(4), 521-531.
- Liang, G., & Yu, D. (2010). Reciprocal regulation among miR395, APS and SULTR2; 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(10), 1257- 1259.
- Lisar, S. Y., Motafakkerzad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M. (2012). Causes, Effects and Responses. *Water Stress*, *1*.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., & Carrington, J. C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, *297*(5589), 2053-2056.
- Luo, Z. B., He, J., Polle, A., & Rennenberg, H. (2016). Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. *Biotechnology Advances*, *34*(6), 1131-1148.
- Mendoza-Soto, A. B., Sánchez, F., & Hernández, G. (2012). MicroRNAs as regulators in plant metal toxicity response. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 105.
- Menteş Yılmaz, Ö. Y., & Ercan, R. T. D. (2011). Türkiye’de yetiştirilen başlıca buğday çeşitlerinin antioksidan aktivitelerinin ve fenolik asit dağılımlarının belirlenmesi

ve ekmeğin nar kabuğu ekstraktı ile zenginleştirilmesi (*Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*).

- Millar, A. A., & Gubler, F. (2005). The Arabidopsis GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *The Plant Cell*, 17(3), 705-721.
- Millar, A. A., & Waterhouse, P. M. (2005). Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Functional & Integrative Genomics*, 5(3), 129-135.
- Min Yang, Z., & Chen, J. (2013). A potential role of microRNAs in plant response to metal toxicity. *Metallomics*, 5(9), 1184-1190.
- Nag, A., & Jack, T. (2010). Sculpting the flower; the role of microRNAs in flower development. *Current Topics in Developmental Biology*, 91, 349-378.
- Nazir, A., Malik, R. N., Ajaib, M., Khan, N., & Siddiqui, M. F. (2011). Hyperaccumulators of heavy metals of industrial areas of Islamabad and Rawalpindi. *Pak J Bot*, 43(4), 1925-1933.
- Noman, A., & Aqeel, M. (2017). miRNA-based heavy metal homeostasis and plant growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(11), 10068-10082.
- Noman, A., Fahad, S., Aqeel, M., Ali, U., Anwar, S., Baloch, S. K., & Zainab, M. (2017). miRNAs: major modulators for crop growth and development under abiotic stresses. *Biotechnology Letters*, 39(5), 685-700.
- Öktüren Asri, F., & Sönmez, S. (2006). Ağır Metal Toksisitesinin Bitki Metabolizması Üzerine Etkileri. *Derim; Cilt 23, Sayı 2 (2006)*; 36-45.
- Özberk, İ., Zencirci, N., Özkan, H., Özberk, F., & Eser, V. (2010). Dünden bugüne makarnalık buğday ıslahı ve geleceğe bakış. *In Durum Wheat and Products Conference, Şanlıurfa* (pp. 43-66).
- Panuccio, M. R., Sorgonà, A., Rizzo, M., & Cacco, G. (2009). Cadmium adsorption on vermiculite, zeolite and pumice: batch experimental studies. *Journal of Environmental Management*, 90(1), 364-374.

- Payandeh, K., Jafarnejadi, A., Gholami, A., Shokohfar, A., & Panahpor, E. (2018). Evaluation of Cadmium Concentration in Wheat Crop Affected by Cropping System. *Jundishapur Journal of Health Sciences*, 10(2).
- Pence, N. S., Larsen, P. B., Ebbs, S. D., Letham, D. L., Lasat, M. M., Garvin, D. F., & Kochian, L. V. (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 97(9), 4956-4960.
- Qiu, Z., Hai, B., Guo, J., Li, Y., & Zhang, L. (2016). Characterization of wheat miRNAs and their target genes responsive to cadmium stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 60-67.
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180(2), 169-181.
- Raskin, I., Smith, R. D., & Salt, D. E. (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(2), 221-226.
- Redondo-Gómez, S. (2013). Abiotic and biotic stress tolerance in plants. In *Molecular Stress Physiology of Plants* (pp. 1-20). Springer, India.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, 16(13), 1616-1626.
- Remans, T., Opdenakker, K., Guisez, Y., Carleer, R., Schat, H., Vangronsveld, J., & Cuypers, (2012). Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature. *Environmental and Experimental Botany*, 84, 61-71.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *cell*, 110(4), 513-520.
- Rizwan, M., Ali, S., Rizvi, H., Rinklebe, J., Tsang, D. C., Meers, E., & Ishaque, W. (2016). Phytomanagement of heavy metals in contaminated soils using sunflower:

- a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(18), 1498- 1528.
- Ryan, L., Thondre, P. S., & Henry, C. J. K. (2011). Oat-based breakfast cereals are a rich source of polyphenols and high in antioxidant potential. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 929-934.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L., & Polle, A. (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology*, 127(3), 887-898.
- Shahid, M., Khalid, S., Abbas, G., Shahid, N., Nadeem, M., Sabir, M., & Dumat, C. (2015). Heavy metal stress and crop productivity. *In Crop Production and Global Environmental Issues (pp. 1-25)*. Springer, Cham
- Shavrukov, Y. (2013). Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 119-127.
- Sheoran, I. S., Singal, H. R., & Singh, R. (1990). Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research*, 23(3), 345-351.
- Singh, A., Sharma, R. K., Agrawal, M., & Marshall, F. M. (2010). Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the waste water irrigated site of a dry tropical area of India. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 611-619.
- Srivastava, S., Srivastava, A. K., Suprasanna, P., & D'souza, S. F. (2013). Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in *Brassica juncea*. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 303-315.
- Stroiński, A., Kubiś, J., & Zielezińska, M. (1999). Effect of cadmium on glutathione reductase in potato tubers. *Acta Physiologiae Plantarum*, 21(3), 201-207.
- Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2001-2019.
- Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of

- miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 18(8), 2051-2065.
- Takahashi, R., Bashir, K., Ishimaru, Y., Nishizawa, N. K., & Nakanishi, H. (2012). The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 7(12), 1605-1607.
- Tang, M., Mao, D., Xu, L., Li, D., Song, S., & Chen, C. (2014). Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles in response to Cd exposure in rice seedlings. *BMC Genomics*, 15(1), 1-17.
- Tiryaki, İ. (2018). Bazı Tarla Bitkilerinin Tuz Stresine Gösterdikleri Adaptasyon Mekanizmaları. *Tarım ve Doga Dergisi*, 21(5), 800.
- Valdés-López, O., Yang, S. S., Aparicio-Fabre, R., Graham, P. H., Reyes, J. L., Vance, C. P., Hernández, G. (2010). MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytologist*, 187(3), 805-818.
- Van Hoof, N. A., Hassinen, V. H., Hakvoort, H. W., Ballintijn, K. F., Schat, H., Verkleij, J. A., Tervahauta, A. I. (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiology*, 126(4), 1519-1526.
- Villiers, F., Ducruix, C., Hugouvieux, V., Jarno, N., Ezan, E., Garin, J., & Bourguignon, J. (2011). Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics*, 11(9), 1650-1663.
- Wang, L., Mai, YX, Zhang, YC, Luo, Q. ve Yang, HQ (2010). MicroRNA171c hedefli SCL6-II, SCL6-III ve SCL6-IV genleri, Arabidopsis'te sürgün dallanmasını düzenler. *Moleküler Bitki*, (5), 794-806.
- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q., & Zhang, W. H. (2011). Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 12(1), 1-11.

- Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R., & Jin, L. (2011). Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, *159*(12), 3627-3633.
- Wei, W., Chai, T., Zhang, Y., Han, L., Xu, J., & Guan, Z. (2009). The *Thlaspi caerulescens* NRAMP homologue TcNRAMP3 is capable of divalent cation transport. *Molecular Biotechnology*, *41*(1), 15-21.
- Williams, L. E., Pittman, J. K., & Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1465*(1-2), 104-126.
- Worms, I., Simon, D. F., Hassler, C. S., & Wilkinson, K. J. (2006). Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie*, *88*(11), 1721-1731.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timini in Arabidopsis. *Cell*, *138*(4), 750-759.
- Wu, L., & Zhatova, H. (2020). Basis for the breeding of low-Cd wheat varieties.
- Xie, Z., Zhang, P., Zhao, J., Wang, R., Gao, J., & Xu, J. (2017). Identification of microRNAs from Zn-treated *Solanum nigrum* roots by small RNA sequencing. *Acta Physiologiae Plantarum*, *39*(1), 32.
- Xin, J., Huang, B., Dai, H. Characterization of cadmium uptake, translocation, and distribution in young seedlings of two hot pepper cultivars that differ in fruit cadmium concentration. *Environ Sci Pollut Res* *21*, 7449–7456 (2014).
- Xu, L., Wang, Y., Zhai, L., Xu, Y., Wang, L., Zhu, X., ... & Liu, L. (2013). Genome-wide identification and characterization of cadmium-responsive microRNAs and their target genes in radish (*Raphanus sativus* L.) roots. *Journal of Experimental Botany*, *64*(14), 4271-4287.
- Xu, Y., Chu, L., Jin, Q., Wang, Y., Chen, X., Zhao, H., & Xue, Z. (2015). Transcriptome wide identification of miRNAs and their targets from *Typha angustifolia* by RNA-Seq and their response to cadmium stress. *PLoS One*, *10*(4), e0125462.

- Yang, T., Wang, Y., Teotia, S., Wang, Z., Shi, C., Sun, H., ... & Tang, G. (2019). The interaction between miR160 and miR165/166 in the control of leaf development and drought tolerance in Arabidopsis. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-13.
- Yang, X. E., Jin, X. F., Feng, Y., & Islam, E. (2005). Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *47*(9), 1025-1035.
- Zemanová, V., Pavlík, M., Pavlíková, D., & Tlustoš, P. (2014). The significance of methionine histidine and tryptophan in plant responses and adaptation to cadmium stress. *Plant, Soil and Environment*, *60*(9), 426-432.
- Zhou, J., Cheng, Y., Yin, M., Yang, E., Gong, W., Liu, C., & Zhang, Y. (2015). Identification of novel miRNAs and miRNA expression profiling in wheat hybrid necrosis. *PloS One*, *10*(2), e0117507.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., & Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, *61*(15), 4157-4168.
- Zhou, Z. S., Huang, S. Q., & Yang, Z. M. (2008). Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *374*(3), 538-542.

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı:** Meryem

**Soyadı:** ÇETİNKAYA

## ÖĞRENİM DURUMU

**Lise:** Cumhuriyet Anadolu Lisesi-Eskişehir (2008-2012)

**Üniversite:** Anadolu Üniversitesi-Eskişehir (2012-2017)

**Yüksek Lisans:** Eskişehir Teknik Üniversitesi (2018-2021)

## İŞ TECRÜBELERİ

Özel Ümit Hastanesi -ESKİŞEHİR

Biyokimya Laboratuvarı-Biyolog

Melahat Ünügür Ortaokulu-Fen ve Teknoloji

Stajer Öğretmen

## YABANCI DİL

**İngilizce:** Orta Düzey (B)

**Almanca :** Temel Düzey (A)

---

## BİLGİSAYAR

Word, Excel, Power point

## SERTİFİKA ve BELGELER

Anadolu Üniversitesi Uygulama Projeleri Katılım Belgesi (05.05.2017)

Anadolu Üniversitesi Pedagojik Formasyon Sertifikası (2016-2017)

**HOBİLER:** Satranç, müzik, araştırma yapmak