



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

[*Arabidopsis thaliana*'DA KOMBİNE KURAKLIK VE AZOT AÇLIĞI İLE
İLİŞKİLİ MİKRORNALARIN TRANSKRİPTOMİK ANALİZLERİ]

[Emmanuela Lemnyuy WIRSIY]

[Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı]

[Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı]

DANIŞMAN
[Prof. Dr.] [Özgür ÇAKIR]

[Şubat, 2025]

İSTANBUL

Bu çalışma, 28.02.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Veysel SABRİ HANÇER
İstinye Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Sinan MERİÇ
T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Cenk KİĞ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin .FDK-2022-38952 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Wirsiy, E.L, Çakır Ö., 2024. *Distinctive features of plant microRNAs in response to abiotic stresses*, In: Maraklı, S and Yılmaz, M. (eds.), The Broad Spectrum of Biological Sciences. Gaziantep: Gaziantep University Press, ISBN: 978-975-7375-95-1, 521-545.

Wirsiy, E.L, Pulat, E, Arslantürk, A.H, Yaşar, S., Çakır, Ö. Small RNA sequencing reveals important miRNA function in *Arabidopsis thaliana* calli in response to combined drought and nitrogen deficiency, *Acta Botanica Brasilica*. [Article in press].

ÖNSÖZ

Bu tez, Moleküler Biyoloji ve Genetik doktora programının bir parçası olarak gerçekleştirildi ve iklim değişikliği nedeniyle bitkilerdeki abiyotik stresin artan etkisiyle, bunun sonucunda küresel gıda güvenliğine olan etkisi motivasyon kaynağım olmuştur.

Prof. Dr. Özgür ÇAKIR hocama, araştırma sürecimi hem zenginleştirici hem de tatmin edici kılan desteği, teşviki ve sıcak bir ortam yaratma yeteneği için derin teşekkürlerimi sunuyorum. Bu, sadece kendimi evimde gibi hissettirmede, aynı zamanda dil engelini aşmama yardımcı oldu.

Ayrıca, bu çalışmaya değerli geri bildirimleri ve rehberlikleriyle katkı sağlayan Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA, Prof. Dr. Veysel SABRİ HANÇER ve Araş Gör Dr. Burcu ARIKAN'a teşekkür ediyorum.

Laboratuvar arkadaşlarım Elif PULAT, Ali HARUN, Berfin ODABAŞI, Sedanur ŞEBİKBAY ve Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'ndaki diğer tüm üyelere, değerli tartışmalarınız ve teknik desteğiniz için çok teşekkür ederim.

Ayrıca, akademik ortamı oluşturan ve araştırma deneyimimi büyük ölçüde zenginleştiren Fakülte üyelerine ve Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ercan ARICAN'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın mümkün olmasını sağlayan mali destekleri için İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve Türk Bursları'na da teşekkür ederim.

Son olarak, bu doktora hayalini gerçekleştirmemde beni her zaman destekleyen eşim Emmanuel NGANYU'ya derin minnettarlığımı sunarım. Aramızdaki mesafeye rağmen bana verdiği destek çok değerliydi. Ayrıca aileme—Nora WIRSIY, Lilian NDUFE, Grace YISA, Emile WIRSIY, Karine WIRSIY, Blaise WIRSIY, Meekness MUCHUO'ya ve dostlarıma, bana olan inançları için teşekkür ederim, bu süreçte bana güç verdiler.

Herkesten önce, Allah'a hayat için sonsuz şükürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. BİTKİLERDE ABİYOTİK STRES	3
2.2. TEMEL ABİYOTİK STRESLER OLARAK KURAKLIK VE AZOT EKSİKLİĞİ	4
2.2.1. Kombine Kuraklık ve Azot Eksikliği Stres Düzenleyici Yolları	5
2.3. BİTKİLERDEKİ MİKRORNA'LAR (MiRNA'LAR)	7
2.3.1. Bitkilerde miRNA'nın Biyogenezi ve İşlenmesi	7
2.3.1. Bitki Stres Tepkisinde miRNA'ların Mekanizması.	8
2.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> 'da TRANSKRİPTOMİK ANALİZ	9
2.4.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> 'nın Stres Araştırmalarındaki Önemi.....	9
2.4.2. Abiyotik Strese Yanıt Olarak Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi	10
2.4.3. Abiyotik Stres Yanıtında Anahtar Yollar ve Sinyal Peptitleri	11
2.4.3.1. Absisik Asit (ABA) Sinyali	11
2.4.3.2. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Yolakları	12
2.4.3.4. Kalsiyum (Ca ²⁺) sinyali	12
2.4.3.5. Sinyal Peptitleri	13
2.5. TRANSKRİPTOMİK ANALİZ TEKNİKLERİ	15
2.5.1. RNA Dizileme	15
2.5.2. DNA Mikroarray	15
2.5.3. EST'ler	15
2.5.4. Gen Ekspresyonunun Seri Analizi (SAGE).....	16
2.5.5. Yeni Nesil Dizileme	16
2.6. miRNA DÜZENLENEN TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ VE STRES TEPKİSİ	16
3. MALZEME VE YÖNTEM	17

3.1. ÖRNEK HAZIRLAMA	17
3.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> Büyüme Koşulları	17
3.1.2. Tohumların Sterilizasyonu	17
3.1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> Kallus İndüksiyonu	17
3.1.4. Stres Ortamının Hazırlanması	18
3.1.4.1. Kuraklık Medyası Hazırlığı	18
3.1.4.2. Azot Eksiklik Uygulamasına Ait Besiyerlerinin Hazırlanması	18
3.1.4.3. Kombine Azot Eksiklik ve Kuraklık Uygulamasına Ait Besiyerlerinin Hazırlanması	18
3.1.5. Stres Uygulamaları; Kuraklık ve Azot Eksikliği	19
3.1.6. RNA İzolasyonu	19
3.1.7. RNA Saflığı ve Bütünlüğünün Belirlenmesi (Spektrofotometri ve Elektroforez)	20
3.2. KÜTÜPHANE OLUŞTURMA, KALİTE KONTROL VE DİZİLEME	20
3.2.1. Okuma Filtreleme	21
3.2.2. Okumaların Kalite Kontrolü	21
3.3. ANLATIMI DEĞİŞEN KÜÇÜK RNA'LARIN TANIMLANMASI	22
3.3.1. Okumaların <i>Arabidopsis thaliana</i> Referans Genomuna Hizalanması	22
3.3.2. Gen Anlatım Farkları	22
3.3.3. Küçük RNA'ların Tespiti Ve Hedef Genlerin Tanımlanması	22
3.4. GEN ONTOLOJİSİ ANALİZİ	23
3.5. YENİ MİRNA'LARIN BELİRLENMESİ	23
3.6. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF PCR ANALİZİ	23
3.6.1. Gen Anlatım Analizi	23
3.6.1.1. cDNA Sentezi	24
3.6.1.2. Hedef genlerin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25
4. BULGULAR	26
4.1. TOHUM ÇİMLENMESİ VE KALLUS KÜLTÜRÜNÜN BAŞLATILMASI	26
4.2. FARKLI STRES UYGULAMALARI	27
4.3. İZOLE EDİLEN RNA'NIN ANALİZİ	27
4.4. TRANSKRİPTOMİK SONUÇLAR	28
4.4.1. Dizileme Veri Kalitesi Özeti	28
4.4.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> Referans Genomuna Hizalanmış Okumalar	30
4.4.3. miRNA ve Hedef Genlerinin Tanımlanması	30
4.4.4. Gruplar Arasında miRNA Ekspresyon Farkları Analizi	32
4.4.5. Anlatım farklılıkları gözlenen miRNA'ların hedef genleri	39
4.4.6. Hedef Genlerin Zenginleştirme Analizi	43
4.4.7. Tespit Edilen Yeni miRNA'lar	57

4.5. Bazı miRNA Hedeflerinin Anlatım analizi	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	67
EKLER	82
ÖZGEÇMİŞ	83



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : Azot alımı	5
Şekil 2.2 : miRNA biyogenezi	8
Şekil 2.3 : Fitorotronda yetiştirilen <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
Şekil 2.4 : ABA sinyal yolağı Ali ve diğ uyarlanmıştır [78].....	12
Şekil 2.5 : Azot noksanlığı altında bitki tepkileri, Kim ve diğ.'den uyarlanmıştır [91].....	14
Şekil 2.6 : Kuraklık toleransında PSK ve CEP5'in rolü [91].....	14
Şekil 3.1 : Kütüphane oluşturulması iş akışı.....	21
Şekil 4.1 : 14 günlük <i>Arabidopsis thaliana</i> fideleri.	26
Şekil 4.2 : İzole edilen RNA'lar agaroz jel elektroforezin de görselleştirildi	28
Şekil 4.3 : Okumalara ait PHRED skoru dağılımı ve okumalarda tespit edilen RNA tiplerinin dağılımı.....	29
Şekil 4.4 : Bulunan miRNA'ların örnekler arası kesişimini gösteren venn diyagramı.....	31
Şekil 4.5 : Kontrol ve azot eksikliğinde farklı ifade edilen miRNA'ların volkan grafiğı.....	34
Şekil 4.6 : Kontrol ve kuraklığa karşı farklı ifade edilen miRNA'ların volkan grafiğı.....	34
Şekil 4.7 : Kontrol ve kombine volkan grafiğı farklı ifade edilen miRNA'lar.....	35
Şekil 4.8 : Azot ve kuraklığa karşı farklı ifade edilen miRNA'ların volkan grafiğı.....	35
Şekil 4.9 : Azot ve kombine volkan grafiğı farklı ifade edilen miRNA'lar.....	36
Şekil 4.10 : Kuraklık ve kombine volkan grafiğı farklı ifade edilen miRNA'lar.....	36
Şekil 4.11 : Örneklerin farklı ifade edilen genlerinin istatistikleri (A:kontrol, B: azot eksikliği, C: kuraklık. D: kombine).	39
Şekil 4.12 : Azot eksikliğine karşı kontrolün moleküler fonksiyon kategorisi.	44
Şekil 4.13 : Kuraklığa karşı moleküler fonksiyon kontrol kategorisi.	45
Şekil 4.14 : Kontrol ve kombine moleküler fonksiyon kategorisi.	46
Şekil 4.15 : Kuraklığa karşı biyolojik süreç kontrol kategorisi.....	47
Şekil 4.16 : Kontrol ve kombine moleküler kategorisi.	48
Şekil 4.17 : Biyolojik süreç kontrol ve kombine kategorisi	49
Şekil 4.18 : Kuraklığa karşı azot eksikliğinin moleküler fonksiyon kategorisi.	50
Şekil 4.19 : Kuraklığa karşı azot eksikliğininbiyolojik süreç kategorisi.....	51
Şekil 4.20 : Azot eksikliğine karşı kombine moleküler fonksiyon kategorisi.....	52
Şekil 4.21 : Azot eksikliğine karşı kombine moleküler fonksiyon kategorisi.....	53

Şekil 4.22 : Kuraklığa karşı kombine moleküler fonksiyon kategorisi.....	54
Şekil 4.23 : Kuraklık ve kombine biyolojik süreci.....	55
Şekil 4.24 : <i>A.thaliana</i> genlerin rölatif anlatım düzeyleri.	58



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 : Bitkilerde yaygın Abiyotik stres türleri [46,47].	3
Tablo 3.1 : qPCR ile gen anlatım analizi için kullanılan primer dizileri.	24
Tablo 3.2 : cDNA sentez reaksiyon koşulları.	24
Tablo 4.1 : Bazı örneklerin spektrofotometrik ölçümleri.	27
Tablo 4.2 : Veri kalitesi özeti.	29
Tablo 4.3 : Okumaların referans genoma hizalanma oranları.	30
Tablo 4.4 : Tüm örneklerde bazı ortak miRNA'lar.	32
Tablo 4.5 : Kombine Stresinde Koşulunda anlatımı artmış miRNA'lar.	37
Tablo 4.6 : Kombine Stres Koşulunda anlatımı azalmış miRNA'lar.	38
Tablo 4.7 : Anlatımı artan miRNA-hedef gen etkileşimlerine ve bölünme mekanizmalarına örnekler.	40
Tablo 4.8 : Anlatımı artan miRNA örnekleri hedef gen adları ve inhibisyon mekanizması.	41
Tablo 4.9 : Anlatımı azalan miRNA hedef genlerine örnekler, etkileşim ve inhibisyon mekanizmaları.	42
Tablo 4.10 : Farklı şekilde ifade edilen miRNA'ların belirlenen hedeflerinin Gen Ontoloji analizi.	56
Tablo 4.11 : Tahmin edilen yeni mikroRNA örneklerinin özellikleri.	57

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°C	: Derece Santigrat
µl	: Mikrolitre
atm	: Atmosfer
cm	: Santimetre
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
U	: Ünite
HCl	: Hidrojen Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
N	: Azot
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksiasetik asit
NO ₃ ⁻	: Azot nitrat
NH ₄ ⁺	:Amonyum

Kısaltmalar	Açıklama
ABA	: Absisik asit
AGO	: ARGONAT proteini
ARF	: AUXIN RESPONSE FACTOR
Ca ²⁺	: Kalsiyum iyonu
cDNA	: Komplementer DNA
CDPK	:Kalsiyuma bağımlı protein kinaz
Col-0	: Columbia ecotype
Ct	: Eşik döngüsü

DCL	: DICER-LIKE protein
DEG	: Farklı şekilde ifade edilen genler (“Differentially Expressed Genes”)
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleil Asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid Trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
FDR	: Yanlış keşif oranı (“False Discovery rate”)
g	: Rölatif Santrifüj Kuvveti, “RCF”
GA	: Gibberellin
GO	: Gen Ontoloji
GRL	: GROWTH REGULATION FACTOR
GZPZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HD-Zip	: Homeodomain-Leucine Fermuarı
HYL1	: “HYPONASTIC LEAVES 1”
Log₂ FC	: Log ₂ kat değişimi (“Log ₂ fold change”)
MAPK	: Mitojen-aktif protein kinaz
MES	: 2-(N-morfolino) etansülfonik asit
miRNA	: MikroRNA
MS	: Murashige ve Skoog
Mpa	: Ozmatik Potansiyel
MYB	: Myeloblastosis ailesi
Padj	: düzeltilmiş p değeri
PEG	: Polietilen Glikol
PCD	: Programlanmış hücre ölümü (“Programmed Cell death”)
pre-miRNA	: Öncül miRNA (“precursor miRNA”)
pri-miRNA	: Birincil miRNA (“primary miRNA”)
PHO2	: FOSFAT2 (“PHOSPHATE2”) proteini
PHRED	: “Phil’s Read Editor”
PP2C	: “Protein phosphatase 2C”
RISC	: RNA-İndüklenmiş Susturma Kompleksi
RNA	: Ribonükleik Asit
SnRK2	: “Sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2”

SPL	: SPL transkripsiyon faktörü (Squamosa Promoter Binding Protein-like)
TAE	: Tris-asetat EDTA
TCP	: Teosinte Branched1/Sikloidea/Proliferatif Hücre Faktörü
UV	: Ultra Viyole
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (“Reactive Oxygen Species”)
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (“Roation per minute”)



ÖZET

DOKTORA TEZİ

[*Arabidopsis thaliana*'DA KOMBİNE KURAKLIK VE AZOT AÇLIĞI İLE İLİŞKİLİ MİKRORNALARIN TRANSKRİPTOMİK ANALİZLERİ]

Emmanuela Lemnyuy WIRSIY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özgür ÇAKIR

Kuraklık ve besin eksikliği gibi abiyotik stres faktörleri, bitki büyümesi ve tarımsal üretkenlik için önemli kısıtlamalardır. İklim değişikliğinin çevresel dalgalanmaları yoğunlaştırmasıyla birlikte, bitkiler giderek daha fazla stres faktörüne maruz kalıyor ve bu da hayatta kalmalarını ve verimlerini önemli ölçüde etkiliyor. Stres tepkilerini yöneten moleküler mekanizmaları anlamak, gelişmiş esnekliğe sahip mahsuller geliştirmek için çok önemlidir. Bu mekanizmalar arasında, mikroRNA'lar ve transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve adaptif tepkilere aracılık edilmesinde çok önemli roller oynar. Bu çalışmada, *Arabidopsis thaliana* callus dokuları, miRNA'ların ve hedef genlerinin ekspresyon paternlerini araştırmak için Murashige ve Skoog kültür ortamı kullanılarak kombine kuraklık ve azot eksikliği stresine maruz bırakıldı. Dizileme sonuçları, birleşik koşullar için ortak olan 117 miRNA'yı ortaya çıkarmaktadır. Farklı şekilde ifade edilen bazı miRNA'lar, miR156j, miR157b, miR158b, miR166b'yi içermektedir. Bu miRNA'lar, uygulamalar arasında farklı gen anlatım modelleri sergiledi ve bu da kök gelişimi, hormon sinyalizasyonu ve transkripsiyonel düzenleme gibi stres adaptasyon mekanizmalarına dahil olduklarını düşündürdü. miR390, miR781, miR1543,

miR829, miR8155, miR5643 ve miR403 gibi daha önce karakterize edilmiş birkaç miRNA da tespit edildi. Gen hedefi tanımlaması doğrulandı miR165 ve miR166, meristem başlangıcını ve vasküler gelişimi kontrol eden PHABULOSA, PHAVOLUTA, REVOLUTA ve CORONA'yı düzenler. RH39, çoklu stres koşulları altında metabolik yolların etkileşiminde anahtar bir düzenleyici olarak tanımlanırken, miR319 tarafından hedeflenen TCP24'ün azot eksikliği durumunda ikincil hücre duvarı kalınlaşmasını modüle ettiği belirlenmiştir. Ek olarak, fosfat homeostazında yer alan UBC24, stres uygulamalar arasında farklı şekilde anlatım sergileyerek azot eksikliği tepkilerindeki düzenleyici rolünü vurguladı. Gen Ontolojisi analizi, stres adaptasyonunu yöneten karmaşık moleküler ağları yansıtan transkripsiyonel düzenleme, ATP'ye bağlı aktivite ve RNA helikaz fonksiyonlarında zenginleşmeyi vurguladı. Bu bulgular, birleşik streslere yanıt olarak miRNA aracılı düzenleyici mekanizmalar hakkında yeni bilgiler sağlayarak, genetik mühendisliğinin çevresel zorluklara karşı mahsul direncini artırması için potansiyel hedefler sunar.

Şubat 2025, 101 sayfa.

Anahtar kelimeler: Abiyotik stres, iklim değişikliği kuraklık, azot eksikliği, miRNA, *Arabidopsis thaliana*, gen ekspresyonu

SUMMARY

Ph.D. THESIS

[TRANSCRIPTOMIC ANALYZES OF MICRORNAS ASSOCIATED WITH COMBINED DROUGHT AND NITROGEN STARVATION IN *Arabidopsis thaliana*]

Emmanuela Lemnyuy WIRSIY

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Özgür ÇAKIR

Abiotic stress factors such as drought and nutrient deficiency are major constraints to plant growth and agricultural productivity. With climate change intensifying environmental fluctuations, plants are increasingly subjected to multiple stress conditions, which significantly impact their survival and yield. Understanding the molecular mechanisms governing stress responses is essential for developing crops with enhanced resilience. Among these mechanisms, microRNAs and transcription factors play pivotal roles in regulating gene expression and mediating adaptive responses. In this study, *Arabidopsis thaliana* callus tissues were subjected to combined drought and nitrogen deficiency stress using Murashige and Skoog culture medium to investigate the expression patterns of miRNAs and their target genes. Sequencing results revealed 117 miRNAs common to the combined conditions. Some differentially expressed miRNAs, included miR156j, miR157b, miR158b, miR166b. These miRNAs exhibited distinct expression patterns across treatments, suggesting their involvement in stress adaptation mechanisms such as root development, hormone signaling, and transcriptional regulation.

Several miRNAs that have been previously characterized were also detected, such as miR390, miR781, miR1543, miR829, miR8155, miR5643, and miR403. Gene target identification confirmed miR165 and miR166 regulate PHABULOSA, PHAVOLUTA, REVOLUTA, and CORONA, which control meristem initiation and vascular development. RH39 was identified as a key regulator in metabolic pathway crosstalk under multiple stress conditions, while TCP24, targeted by miR319, modulated secondary cell wall thickening under nitrogen deficiency. Additionally, UBC24, involved in phosphate homeostasis, exhibited differential expression across stress treatments, highlighting its regulatory role in nitrogen deficiency responses. Gene Ontology analysis highlighted enrichment in transcriptional regulation, ATP-dependent activity, and RNA helicase functions, reflecting the intricate molecular networks governing stress adaptation. These findings provide novel insights into miRNA-mediated regulatory mechanisms in response to combined stresses, offering potential targets for genetic engineering to enhance crop resilience against environmental challenges.

February 2025, 101 pages.

Keywords: Abiotic stress, climate change, miRNA, *Arabidopsis thaliana*, drought, nitrogen deficiency, gene regulation

1. GİRİŞ

İklim değışikliği, dünya yüzeyi üzerinde olumsuz etkileri olan küresel bir olgudur. Olumsuz iklim koşulları, kirlilik gibi insan faaliyetleri ile birlikte, abiyotik stresin daha sonra artmasının ana nedenidir [1,2]. Bitkilerin statik doğası, onları sürekli olarak bu streslere maruz bırakır ve bu da bitki veriminde bir azalmaya yol açar [1,2]. Kuraklık ve azot eksikliği, bitkilerin karşılaştığı baskın abiyotik stres arasındadır [3–5]. Kuraklık stresi, terleme ve buharlaşma yoluyla sürekli su kaybı nedeniyle su yetersizliğinden kaynaklanır ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile bitkide geniş hücresel hasara neden olur [5,6]. Azot noksanlığı ise bitkiye azotun yetersiz miktarda verilmesini ifade eder. Azot, amino asitlerin ve proteinlerin oluşumu için gerekli olan bir makro besindir [1,7]. Kuraklık, dünyanın hemen hemen tüm kıtalarını etkileyen küresel bir olgudur [8]. 2024 Küresel kuraklık raporuna göre [8], özellikle artan insan nüfusunda, diğer ihtiyaçların yanı sıra tarımsal kaygıların ele alınmasına acil bir ihtiyaç vardır. Kuraklık, besin maddelerini kökler tarafından alınmadan önce çözmek için su gerektiğinden toprak neminde bir azalmaya neden olur [9–11]. Tarımsal ekosistemi iyileştirmek için azotlu gübrelerin kullanılması, ekonomik ve ekolojik sorunlara neden olma eğilimindedir [12]. Bu nedenle, etkili bitki büyümesi için bu sistemlerin ayarlanmasına ihtiyaç vardır.

MikroRNA'lar (miRNA'lar) son zamanlarda çeşitli çevresel streslere yanıt olarak önemli moleküller olarak ortaya çıkmıştır [13–15,15–17]. Stres koşulları altında miRNA profilleri, tarımda mahsul ıslah programlarını ve genetik mühendisliği çabalarını geliştirmek için umut verici yollar sunar. MiRNA profilleri ile araştırmacılar, mahsul direncini ve üretkenliğini artırmak için temel genetik yolları belirleyebilir ve manipüle edebilir [1,12]. Pirinç, buğday gibi çeşitli bitkilerde abiyotik ve biyotik streslere karşı direnci artırmak için miRNA tabanlı teknolojiler uygulanmıştır [18–21]. Bu uygulamalar, miRNA'ların bitki tepkilerini yeniden programlama ve mahsul direncini artırma potansiyelini göstermektedir [22]. MiRNA'ların genom düzenlemede kullanılması, pirinç gibi mahsullerdeki özelliklerin iyileştirilmesinde başarı göstermiştir ve diğer bitki türlerinde daha geniş uygulamalar için potansiyeli vurgulamaktadır [23]. MiRNA'ların moleküler mekanizmasını anlamak, iklim değışen bir ortamda bitki ıslahı için etkili bir araç sağlayabilir.

Bu tezde, azot eksikliği ve kuraklığın model bitki *Arabidopsis thaliana* üzerindeki birleşik etkisini incelemek için RNA dizilemesi yapıldı. Bu iki stres koşulu, doğada bitkileri en çok

etkileyen stresler arasındadır ve birinin varlığı diğerini büyük ölçüde etkiler. İklim değişikliği ve kirlilik gibi insan faaliyetleri nedeniyle bitkileri etkileyen çevresel koşulların artan karmaşıklığı nedeniyle, bir veya iki strese odaklanan geleneksel çalışmalar yetersiz olduğundan, bitkilerde çok faktörlü stres koşullarının incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, araştırmalar, tek stres incelemesinin, çoklu stres koşullarına beklenen bitki tepkilerinin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamada başarısız olduğunu kesin olarak ortaya koymuştur.

Arabidopsis'teki transkriptom analizi, birleşik stresler altındaki gen ekspresyonu değişikliklerinin önemli bir kısmının benzersiz olduğunu ve bireysel stres koşulları altında gözlenmediğini, bu nedenle mahsulün çevresel streslere karşı direncini artırmak için düzenleyici ağları ve metabolik yolları anlamının önemini ortaya koymuştur.

Bu tezin amacı, birleşik kuraklık ve azot eksikliği stresi altında *Arabidopsis thaliana* callus'ta diferansiyel olarak ifade edilen ve yeni mikroRNA'ları (miRNA'lar) tanımlamak, hedef genleriyle ilişkili biyolojik süreçleri, moleküler işlevleri ve hücrel bileşenleri sınıflandırmak için gen ontolojisi analizini kullanmak ve stres yanıtında yer alan işlevsel rolleri, düzenleyici ağları ve potansiyel yolları ortaya çıkarmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİTKİLERDE ABİYOTİK STRES

Abiyotik stres, doğada bitkileri dolaylı olarak etkileyen faktörlerdir. Çevrede bir arada bulunan kuraklık ve azot eksikliği, bitki büyüme süreçlerini büyük ölçüde engeller [3,4]. Bu stresler çeşitli sebeplerden kaynaklanabilir; kirlilik, tuzlu su girişi, toprak sıkışması, aşırı sıcaklıklar, [24,25]. Ayrıca, iklim değişikliğinin artan sıklığı ve yoğunluğu, tarımsal uygulamaları etkileyen ve küresel gıda güvenliğini tehdit eden bu stresleri daha da karmaşık hale getirmektedir [1]. Bu tür stres koşullarında bitki büyümesi ve verimi, biyolojik çeşitlilik, besin döngüsü azalır ve bu nedenle bu stresleri inceleme ihtiyacı artmaktadır [7,24–26]. Aşağıdaki tablo (Tablo 2.1), abiyotik stres türlerinin ayrıntılı bir tanımını vermektedir.

Tablo 2.1: Bitkilerde yaygın Abiyotik stres türleri [46,47].

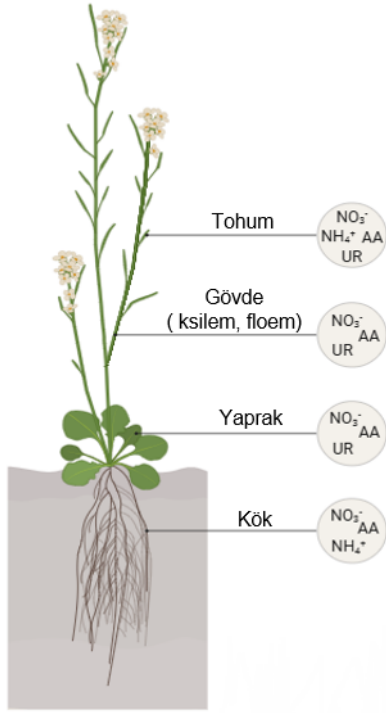
Abiyotik stres türleri	Özellikleri	Stresin nedenleri
Kuraklık Stresi	Sınırlı su mevcudiyeti ozmotik strese ve büyümenin azalmasına neden olur.	Kuru toprak, su kıtlığı.
Tuzluluk Stresi	Toprakta iyon toksisitesine ve ozmotik dengesizliğe yol açan yüksek tuz konsantrasyonu.	Tuzlu su girişi, tuzlu topraklar.
Sıcaklık Stresi	Metabolizmayı ve zar stabilitesini etkileyen aşırı sıcak veya soğuk.	Don, sıcak hava dalgaları.
Taşkın Stresi	Köklerde oksijen yoksunluğuna neden olan fazla su.	Su basması, yoğun yağış.
Besin Stresi	Büyümeyi bozan temel besin maddelerinin eksikliği veya toksisitesi.	Azot noksanlığı, fazla bor.
Ağır Metal Stresi	Hücrel süreçleri bozan toksik metallerin birikmesi.	Kurşun, kadmiyum kontaminasyonu.
Radyasyon Stresi	UV ve gama ışınları dahil olmak üzere yüksek düzeyde radyasyona maruz kalmanın neden olduğu hasar.	Ozon tabakasının incilmesi
Mekanik Stres	Dış kuvvetlerden kaynaklanan fiziksel hasar.	Şiddetli rüzgar, toprak sıkışması.

2.2. TEMEL ABİYOTİK STRESLER OLARAK KURAKLIK VE AZOT EKSİKLİĞİ

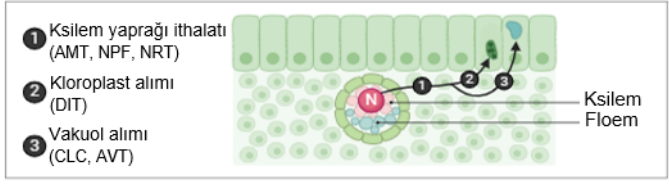
Çevredeki bitkilerin doğası onları, bazıları zararlı olan ve aslında bitki büyümesini ve gelişimini azaltabilen birçok çevresel etkene maruz bırakır. Kuraklık stresi, su kıtlığı koşulları yaratarak bitki büyümesini ve üretkenliğini etkileyen önemli bir çevresel sorundur. Öncelikle düşük yağış ve yüksek sıcaklıklar gibi faktörlerden kaynaklanır ve toprakta yetersiz su mevcudiyetine yol açar [5,27]. 2024 coğrafi raporu, dünyanın hemen hemen tüm kıtalarında kuraklığın yıkıcı etkisini vurgulamıştır [8]. Kuraklık stresi çeşitli bitki süreçlerini etkileyerek fizyolojik (gaz değişimi, fotosentez), morfolojik (azalmış yaprak boyutu, artan kök-sürgün oranı ve su kaybını en aza indirmek için değişen yaprak anatomisi) [26] ve biyokimyasal değişikliklere (enzim ve protein seviyelerindeki değişiklikler) neden olur ve bu da çoğu durumda bitkinin ölümüne yol açabilmiştir [18,28].

Azot eksikliği stresi, bitkilerin büyüme ve gelişimi için hayati öneme sahip bir makro besin elementi olan azotun, milimolar aralıkta yetersiz olduğu bir durumu ifade eder [7]. 71,4 mM, bitkilerde azot için taze doku konsantrasyonu için yeterli aralıktır [29]. Azot noksanlığı tipik olarak bitki boyunun ve biyokütlenin azalmasına, fotosentetik verimliliğin ve klorofil içeriğinin azalmasına, oksin ve gibberellin hormon seviyelerinde değişikliklere neden olur [30–32]. Azot taşıyıcıları ve ilgili genler, azot alımını artırmak için azot eksikliği altında anlatımı artmıştır. Örneğin, arpada, nitrat taşıyıcı genler HvNRT2'nin ekspresyonu, azot eksikliği olan koşullar altında arttırılmıştır [33]. Benzer şekilde, muz bitkileri, azot alımını iyileştirmek için azot taşınmasıyla ilgili proteinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin anlatımları artırmıştır [31]. Bu iki koşul bitkilerin büyümesi için ne kadar önemli olsa da, birbirlerine de bağlıdırlar. Bitki köklerinin emmesi için azotun suda çözülmesi gerekir. Su mevcudiyeti azot alımını etkiler çünkü bitki köklerinin emmesi için azotun suda çözülmesi gerekir. Bu nedenle, su mevcudiyetindeki değişiklikler topraktaki azot konsantrasyonunu değiştirerek bitkiler tarafından alımını etkileyebilir [10,11].

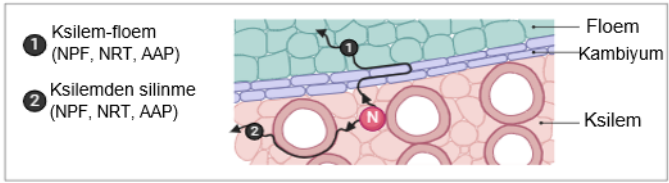
Arabidopsis türlerinde Azot Formları



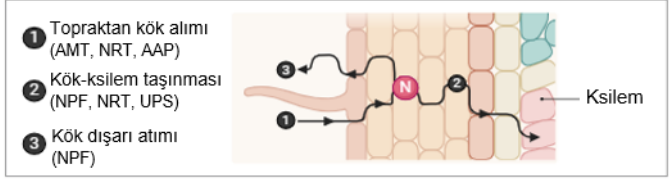
Azot yaprak alımı ve yaprakta dağılımı



Azot ksilem alımı ve ksilem-floem dağılımı



Azot kök alımı ve dışarı atımı



Şekil 2.1: Azot alımı

Biyorender'dan uyarlanmıştır (<https://biyorender.com>). *Arabidopsis* spp'de azot amonyum NH_4^+ , nitrat, NO_2^- amino asitler- AA, ureides-UR taşıyıcı aileleri: Nitrat Taşıyıcı 1 NRT1, nitrat atılım taşıyıcıl NAXT1 Nitrat Taşıyıcı 1 Peptid, NPF, Amonyum Taşıyıcı AMT, Amino Asit Vauolar Taşıyıcıl AVT, Klorür Kanalı CLC, Üreid Geçirgenliği, Amino Asit Geçirgenliği (AAP)

Kuraklık koşullarında, bitkiler emdikleri azot miktarını azaltırlar, böylece azot metabolizmasında yer alan genler anlatımı azaldı [10,34]. Kuraklık stresi ayrıca bitki içindeki azotun eski dokulardan yeni dokulara yaşlanması ve yeniden mobilizasyonunu tetikleyebilir [10]. Bu, kuraklık stresi sırasında tam tersidir, çünkü nitrojen taşınması ve asimilasyonundan sorumlu birçok gen transkripsiyonel düzeyde baskılanır.

2.2.1. Kombine Kuraklık ve Azot Eksikliği Stres Düzenleyici Yolları

Bitkilerin çeşitli stres faktörleri ile etkileşimi, ilgili bireysel stres faktörleri tarafından ortaya çıkanlardan potansiyel olarak bağımsız reaksiyonlar gerektirebilir. Kombine streslere yanıt olarak transkriptom değişikliklerinin % 61'i, tek stres uygulamaları verilen yanıtlardan bilinmez öngörülemez [35,36]. Bazı çalışmalar, stres tepkilerindeki faktörlerin bir kombinasyonunu gözlemlemiştir. Araştırmacılar, çeltik bitkisini kullanarak, azot ve su arasındaki sinerjik etkilerin

sürgün biyokütlesini önemli ölçüde etkilediği sonucuna varmışlardır [37]. Genlerin spesifik bir alt kümesi, yalnızca hem azot hem de suyun yeterli konsantrasyonlarda bulunduğu koşullar altında farklı anlatım yapmıştır [37]. Yapılan analizler [38], birleşik kuraklık ve azot eksikliği stresinin, *Arabidopsis*'te miR165a-3p, miR319a,b, miR396b-5p, miR399d ve miR827'nin miRNA ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu, bitkilerin çoklu streslerle başa çıkmak için karmaşık düzenleyici mekanizmalar geliştirdiğini gösterir ve bu da bitkilerin birleşik streslere dayanacak şekilde yetiştirilmesinin mümkün olabileceğini düşündürmektedir.

Askorbat Peroksidazlar (APX1) ekspresyonu azot eksikliği ve kuraklık altında daha yüksektir, bu da gelişmiş ROS süpürücülüğünün domates bitkisinde stres toleransına yardımcı olduğunu göstermektedir [39]. ROS homeostazı, kombine stres altında bitkinin hayatta kalmasında çok önemli bir rol oynar [40]. Yer fıstığında yapılan kapsamlı transkriptom ve metabolit analizi, kuraklıkla ilişkili anlatım farklılıkları gösteren genlerin (DEG) öncelikle glikoliz/glukoneogenez ve gliserolipid metabolizmasında rol oynadığını, N eksikliği DEG'lerinin ise nişasta, sükroz metabolizması ve amino asit biyosentezine odaklandığını ortaya koymuştur [41]. Bu, bitkilerin eşzamanlı abiyotik streslere etkili bir şekilde yanıt vermek için birden fazla metabolik yolu koordine etmesi gerektiğini gösterir. Azotlu su noksanlığı altında patates genotiplerinde örtüşen ve benzersiz proteomik yanıtlar bulunmuştur [42]. Hassas genotip 'Kiebitz' daha yüksek miktarda spesifik proteaz sergilerken, toleranslı genotip 'Tomba' farklı bir proteomik profil göstermiştir, bu da birleşik streslere yanıt olarak aktive edilen farklı başa çıkma stratejileri ve düzenleyici yollar önermiştir [42]. Ramie (*Bouhmeria nivea*) 'da fotosentez, etilen tepkisi, glikoliz ve nitrojen metabolizması gibi metabolik süreçler tanımlanmıştır [43]. Araştırmacılar [11] kuraklığın azot birikimini kısıtladığını ve serbest amino asit birikimine yol açtığını gözlemlemiştir. Kuraklık altında, poliamin sentaz genlerinin daha da anlatımı azaltmış, böylece nitrojen kullanımını zorlaştırmıştır [11]. Ekmeklik buğdayda benzer şekilde, bu birleşik stres, nitrat sinyalizasyonu ve asimilasyon genlerinin ekspresyonunu düzenleyen absisik asit birikimine yol açar. Bu streslerin etkileşimi, gen regülasyonunu önemli ölçüde etkiler [44]

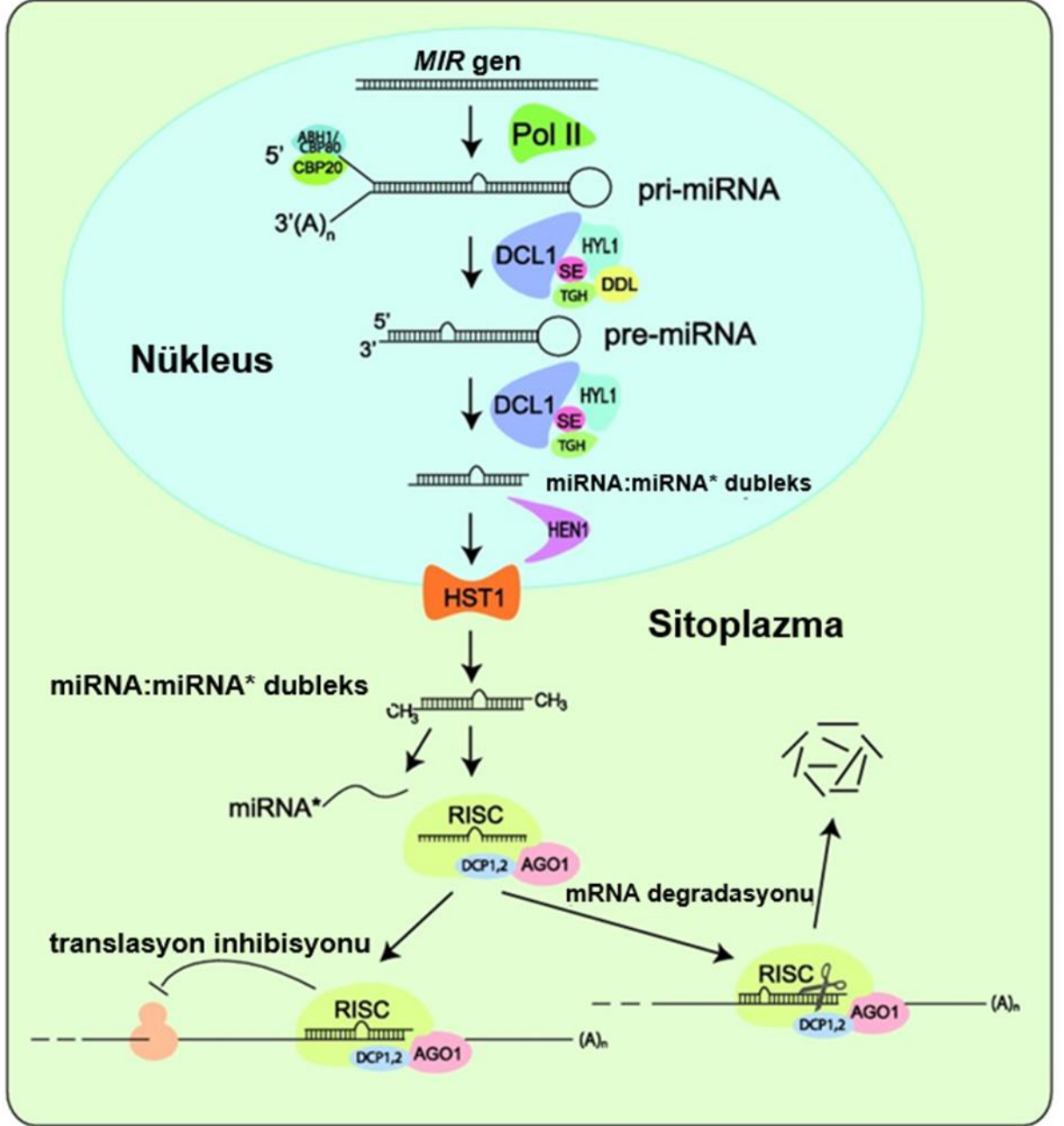
2.3. BİTKİLERDEKİ MİKRORNA'LAR (MiRNA'LAR)

MikroRNA'lar, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan tipik olarak 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük, kodlamayan RNA molekülleridir ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar. Esas olarak hedef haberci RNA'ları (mRNA'lar) parçalayarak veya translasyonlarını inhibe ederek işlev görürler, böylece transkripsiyon sonrası seviyede genlerin ekspresyonunu modüle ederler [45,46]. miRNA'lar, hem biyotik hem de abiyotik streslere bitki tepkilerinde çok önemlidir [47–49]. Ayrıca hormon sinyal yollarını, antioksidan savunmaları ve ozmotik regülasyonu etkileyerek stres tepkilerini modüle ederler [50–52]. Spesifik miRNA'lar, çevresel stres faktörlerine karşı bitki direncini artırmada kilit oyuncular olarak tanımlanmıştır ve bu da onları stres koşulları altında mahsul toleransını ve üretkenliğini artırmak için genetik mühendisliği için potansiyel hedefler haline getirmektedir [50,52].

2.3.1. Bitkilerde miRNA'nın Biyogenezi ve İşlenmesi

Bitki miRNA'ları, intergenik bölgelerde veya bazen protein kodlayan genlerin intronları içinde bulunan MIR genlerinden sentezlenir. MIR genleri, RNA polimeraz II (poli II) yoluyla transkripsiyona uğrar ve bu da pri-miRNA olarak adlandırılan birincil miRNA transkriptlerinin üretilmesine neden olur [53]. Bu transkriptler tipik olarak birkaç kilobaz uzunluğundadır ve pre-miRNA olarak adlandırılan miRNA'nın öncüsünü elde etmek için işlenen lokalize bir saç tokası konfigürasyonu sergiler [54]. Bitkilerde, DICER-LIKE1 (DCL1) enzimi, dsRNA bağlayıcı protein HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1), C2H2-çinko parmak proteini SERRATE (SE) ve kapak bağlayıcı protein kompleksi (CBC) gibi yardımcı proteinlerin yardımıyla pri-miRNA'nın pre-miRNA'ya dönüşümünü katalize eder [55,56]. HYL1 ve SE proteinleri, D-cisimleri olarak adlandırılan nükleer işleme merkezlerinde DCL1 ile etkileşime girer. Ek olarak, DAWDLE (DDL) olarak bilinen bir RNA bağlayıcı protein, pri-miRNA'ların stabilitesini arttırmak için DCL1 ile ilişkilendirilebilir [57]. Pre-miRNA, yardımcı proteinlerin yardımıyla DCL1 tarafından daha fazla işleme tabi tutulur ve miRNA/miRNA dupleksinin oluşumuyla sonuçlanır [58]. Metil grupları, üridilasyonu inhibe etmek ve sonraki bozulmayı önlemek için metiltransferaz Hua Enhancer 1 (HEN1) tarafından her iki ipliğin 3' terminal nükleotidlerinin 2' OH'sine eklenir [59,60]. Metillenmiş miRNA/miRNA dupleksinin, exportin HASTY'nin etkisiyle sitozole aktarıldığı varsayılmaktadır. [58]. Bazen miRNA/miRNA dupleksinin kılavuz ipliği tercihen Argonaute (AGO) proteinine dahil edilirken, diğer tamamlayıcı bileşen (yolcu

ipliği) bozunmaya uğrar. Bu süreç, RNA kaynaklı susturma kompleksinin (RISC) oluşumuna yol açar [58,61,62].



Şekil 2.2: miRNA biyogenezi

2.3.1. Bitki Stres Tepkisinde miRNA'ların Mekanizması.

miRNA'lar temel olarak iki ana mekanizma aracılığıyla işlev görür:

- i. Transkript kesilmesi: miRNA'lar, yüksek derecede dizi tamamlayıcılığı ile hedef haberci RNA (mRNA) moleküllerinin bölünmesine ve bozulmasına rehberlik eder. Kılavuz miRNA, tamamlayıcı baz eşleştirmesi yoluyla RISC'yi belirli hedef genlere yönlendirir ve hedefin bölünmesi yoluyla gen susturulmasını indükleyebilir [58,62].
- ii. Translasyonel baskılama: miRNA'lar, translasyon inhibisyonu veya ribozom hareketini engelleme yoluyla, genellikle mRNA bozulmasına neden olmadan hedef mRNA'ların translasyonunu inhibe eder [61].

Arabidopsis thaliana'da miRNA, promotörleri modüle edebilir ve genin promotörü ile doğrudan etkileşime girerek belirli genlerin anlatımını artırabilir [64]. miRNA'lar ayrıca epigenetik değişiklikleri yönlendirerek gen ekspresyonunu düzenleme yeteneğine de sahiptir. RNA'ya yönelik DNA metilasyonunu kullanarak, metilasyon mekanizmasını spesifik genomik lokuslara yönlendirebilirler. Yukarıdaki işlem, metilasyon modelleri oluşturmak için miRNA'ların diğer küçük RNA'lar ve proteinlerle etkileşimini içerir [65,66].

2.4. *Arabidopsis thaliana*'da TRANSKRİPTOMİK ANALİZ

2.4.1. *Arabidopsis thaliana*'nın Stres Araştırmalarındaki Önemi

Arabidopsis thaliana yaygın olarak thale teresi veya fare kulağı teresi olarak bilinen, bitki biyolojisi alanında model organizma olan küçük çiçekli bir bitkidir [67,68]. Yıllık bir bitki olarak, nispeten kısa bir yaşam döngüsüne sahiptir, bu da onu çiçeklenme de dahil olmak üzere çeşitli bitki süreçlerinin altında yatan moleküler mekanizmaları araştırmak için ideal bir konu haline getirir. *Arabidopsis thaliana*'nın model bir bitki olarak popülaritesi, sayısız avantajından kaynaklanmaktadır. Birincisi, sadece yaklaşık 135 milyon baz çifti ile küçük bir genom boyutuna sahiptir ve bu da onu çiçekli bitkiler arasında en küçük genomlardan biri yapar. Bu kompakt genom, hızlı yaşam döngüsü ile birleştiğinde, kapsamlı genetik ve genomik çalışmaları kolaylaştırmıştır. Ayrıca *Arabidopsis* iyi kurulmuş dönüşüm ve mutant tarama protokolleri ile laboratuvar ortamında yetiştirilmesi ve manipüle edilmesi nispeten basittir [69]. Genomik bilimin ilerlemesindeki rolü ve daha geniş bitki araştırmalarına uygulanabilirliği, model organizma olarak statüsünü daha da sağlamlaştırmaktadır [67,68].



Şekil 2.3: Fitorotronda yetiştirilen *Arabidopsis thaliana*.

2.4.2. Abiyotik Strese Yanıt Olarak Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Gen ekspresyonu sürecinde, DNA'da kodlanan genetik bilgi, fonksiyonel proteinlere dönüştürülür [69]. Abiyotik stres altındaki bitkilerde gen ekspresyonunun düzenlenmesi, çeşitli genetik, epigenetik ve moleküler mekanizmaları içeren çeşitli bir süreçtir. Bu mekanizmalar, bitkilerin stres sinyallerini algılamasına, bu sinyalleri iletmesine ve olumsuz çevresel koşullara uyum sağlamak için gen ekspresyonunu modüle etmesine olanak tanır. Bu yanıtların karmaşıklığı, bitki direncini artırmak için uyum içinde çalışan çok sayıda yolun ve düzenleyici ağın katılımıyla vurgulanmaktadır.

DREB (Dehidrasyona Duyarlı Element Bağlama), ERF AP2/ERF (APETALA2/etilene duyarlı element bağlama faktörleri, WRKY, NAC (Apikal meristem yok), bZIP (Temel Lösün Fermuarı), MYB (miyeloblastoz), Helix-Loop-Helix (bHLH) gibi Strese Özgü Transkripsiyon Faktörleri aileleri, RNA polimeraz II'nin çekirdek promotörlerine bağlanma afinitesini etkileyen spesifik DNA elementlerine bağlanır veya lokal kromatin erişilebilirliğini değiştirmek için histon asetiltransferazlar veya deasetillazlar gibi kromatin düzenleyicileri kullanır [70,71].

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, kromatin yapısını değiştirerek gen erişilebilirliğini ve ekspresyonunu etkiler. DNA metilasyonu, DNA'nın sitozin bazlarına metil gruplarının eklenmesini içerir ve genellikle transkripsiyonel baskılanmaya yol açar [72]. Bu modeller, bitkilerin değişen koşullara uyum sağlamasına izin veren çevresel faktörlerden etkilenebilir [73]. Öte yandan histon asetilasyonu, kromatin yapısını gevşeterek transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilidir ve DNA'yı transkripsiyon makineleri için daha erişilebilir hale getirir [74]. Ek olarak, fosforilasyon ve ubiquitinasyon, TF'lerin ve sinyal proteinlerinin aktivitesini ve stabilitesini düzenler [75].

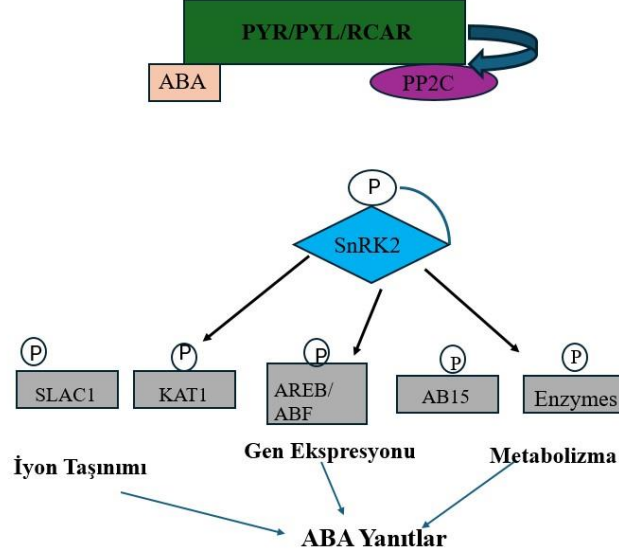
2.4.3. Abiyotik Stres Yanıtında Anahtar Yollar ve Sinyal Peptitleri

Bu temel mekanizmalar, bitkilerin olumsuz koşullara uyum sağlamasına yardımcı olur. Bu yollar, gen ekspresyonunu ve fizyolojik tepkileri düzenleyen çeşitli fitohormonları, protein kinazları ve sinyal peptitlerini içerir.

2.4.3.1. Absisik Asit (ABA) Sinyali

Bu, abiyotik bitki stres tepkisindeki en önemli yollardan biridir. Bitkinin stres algısı ABA biyosentezini tetikleyerek bitki dokularında ABA seviyelerini artırır. Bu, ABA'nın piraktin direncine benzer şekilde etkili olup, ABA reseptörleri (PYR/PYL/RCAR) üzerindeki düzenleyici bileşene bağlanarak Protein Fosfataz 2C (PP2C) fosfatazlarını inhibe eder [76,77]. Bu kompleks, sükroz fermente olmayan 1 ile ilişkili protein kinaz 2'yi (SnRK2 kinazlar) aktive eder. SnRK2 kinazlarının aktivasyonu, transkripsiyon faktörleri AREB/ABF ve iyon kanalları gibi aşağı yönlü hedefleri fosforile ederek strese duyarlı gen ekspresyonunu ve fizyolojik tepkileri modüle eder [77,78]. Bu düzenleme, kuraklık koşullarında su kaybını azaltmak için stoma kapanmasına yol açar ve ayrıca ROS süpürme ve ozmoprotektan üretimi (prolin, trehaloz) gibi strese dayanıklı yolları aktive eder. İlki, reaktif oksidatif stresi nötralize etmek için süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimleri aktive ederken, ikincisi, proteinleri

stabilize eden, hücre turgorunu koruyan ve stres altında su ve iyon seviyelerini dengeleyerek hücrel hasarı önleyen moleküller içerir [2,79,80].



Şekil 2.4: ABA sinyal yolağı, Ali ve diğ.'den uyarlanmıştır [78].

2.4.3.2. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Yolakları

Bu yol, bitkilerde hücre dışı stres sinyallerini hücre içi tepkilere ileten bir dizi fosforilasyon olayından oluşur. Çevresel stres reseptör proteinlerini aktive eder, bu reseptör proteini, MAPKK'yi (MAPK kinaz) fosforile eden ve daha sonra MAPK'yi fosforile eden MAPKKK (MAPK kinaz kinaz) kaskadını aktive eder. Genel olarak, MAPK kaskadı tipik olarak üç kinaz katmanından oluşur: fosforilasyon yoluyla birbirini sırayla aktive eden MAPKK'lar, MAPKK'lar ve MAPK'lar[81,82] Aktive edilmiş MAPK'lar, antioksidan savunmayı, osmokoruma ve diğer stresle ilgili enzimleri ve hormonları düzenlemek için gen ekspresyonunu değiştirerek transkripsiyon faktörlerini ve diğer proteinleri hedefler. Arabidopsis bitkilerinde MAPK'lar, genellikle absisik asit ve jasmonik asit gibi bitki hormonları ile birlikte kuraklığa, düşük sıcaklığa ve diğer stres faktörlerine verilen tepkileri düzenler [83].

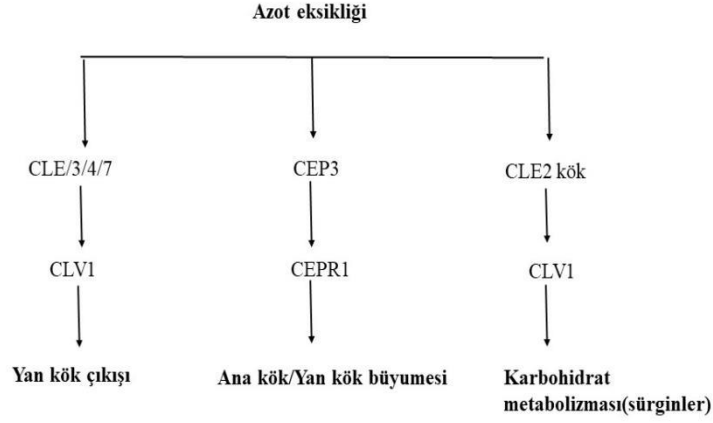
2.4.3.4. Kalsiyum (Ca^{2+}) sinyali

Ca^{2+} , çevresel uyarıları fizyolojik tepkilere çeviren evrensel bir ikinci haberci görevi görür. İşlem, hücre içi kalsiyum seviyelerini modüle eden ve aşağı akış savunma mekanizmalarını tetikleyen karmaşık bir kalsiyum kanalları ve sensörler ağını içerir. Hücrel zarlar üzerindeki

reseptör proteinleri tarafından stres tespiti, kalsiyum kanallarının açılmasına yol açar ve bu da vakuol, endoplazmik retikulum ve kloroplastlardan sitozole Ca^{2+} akışı ile sonuçlanır [84]. Bu infülks, kalmodulin, kalsiyuma bağımlı protein kinazlar ve kalsinörin B benzeri proteinlerin spesifik hücresel tepkilere aracılık etmesine neden olur [84,85]. Ca^{2+} , hücresel homeostazın korunmasına yardımcı olur ve sıcaklık dalgalanmaları, ozmotik stres ve besin eksiklikleri gibi abiyotik streslere verilen yanıtlara aracılık eder [85,86]. Ayrıca stres tepkilerini modüle etmek ve bitki direncini artırmak için fitohormonlarla etkileşime girerler [85].

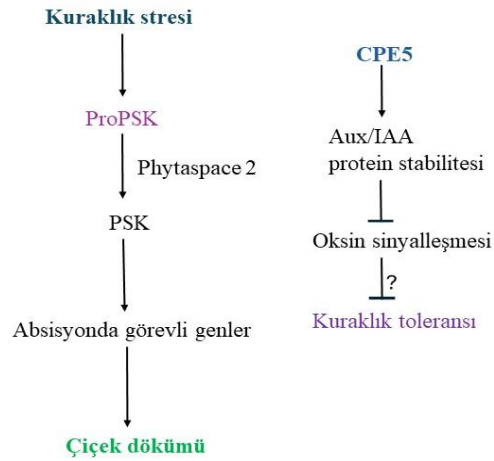
2.4.3.5. Sinyal Peptitleri

Sinyal peptitleri, hem biyotik hem de abiyotik stres adaptasyonlarına aracılık eden moleküler haberciler olarak işlev görür. Membrana gömülü reseptör benzeri kinazlara bağlanarak, ana fitohormonlar veya reaktif oksijen türlerini içeren aşağı yönlü sinyal kaskadlarını başlatırlar [87]. *Arabidopsis*'te, 1000'den fazla peptit ve çok sayıda reseptör kinaz tanımlanmıştır, bu da peptit aracılı sinyal yollarının karmaşıklığını ve çeşitliliğini vurgulamaktadır [88,89]. Çevresel stres faktörlerine bitki tepkilerini koordine etmek için çok önemli olan kökten çekime iletişim gibi uzun mesafeli sinyalizasyonda yer alırlar [87,90]. CLE1,3,4,5,7 gibi Clavata3 / Embriyo Çevresi Bölge ile İlgili peptitler (CLE), nitrojen eksikliği altında indüklenir. Kök büyümesini düzenlemek, yanal kök gelişimini engellemek ve nitrojen alımını optimize etmek için birincil kök büyümesini teşvik etmek için spesifik reseptörlere bağlanırlar [91]. Azot noksanlığı altındaki köklerden kaynaklanan CEP1 peptitleri, XIP1/CEPR1 ve CEPR2 reseptörleri ile etkileşime girdikleri sürgünlere taşınır [91,92]. Bu etkileşim, azot alımını artırmak için köklere geri dönen sinyaller üretir CLE3 peptitleri, CLV1 reseptörü yoluyla yanal kök büyümesini inhibe ederek, spesifik peptit-reseptör etkileşimlerinin besin stresi koşulları altında kök mimarisini nasıl etkileyebileceğini gösterir.



Şekil 2.5: Azot noksanlığı altında bitki tepkileri, Kim ve diğ.'den uyarlanmıştır [91].

Domateste, fitaspaz 2, kuraklık sırasında çiçek absisyonunu etkileyen PSK öncüsünü işler. CLE25 peptit sinyalizasyonu, yapraklarda absisik asit birikimine neden olur ve köklerden yapraklara uzun mesafeli sinyalleşme yoluyla kuraklık toleransını artırır [91,93].



Şekil 2.6: Kuraklık toleransında PSK ve CEP5'in rolü [91].

2.5. TRANSKRİPTOMİK ANALİZ TEKNİKLERİ

Gen ekspresyonu süreci genellikle transkripsiyon ve translasyon olmak üzere iki temel aşamadan oluşur. Transkriptomik analiz, RNA düzeyinde gen ekspresyonunu ve regülasyonunu anlamayı amaçlayan ve ayrıca çeşitli koşullar altında diferansiyel olarak ifade edilen genleri tanımlamak için kullanılan bir dizi tekniği içerir [94–96]. Kullanılan tekniklerden bazıları şunlardır:

2.5.1. RNA Dizileme

Transkriptomik analiz için bu birincil yöntem, gen problemlerine ihtiyaç duymadan gen ekspresyonunun kapsamlı ve hassas bir şekilde ölçülmesine izin vererek moleküler biyoloji alanında devrim yaratmıştır. RNA-Seq, belirli bir zamanda veya tedavi sırasında aktif olan genleri ortaya çıkarır ve okuma sayıları, göreceli ekspresyon seviyesini incelemek için kullanılır. Temel adımı, RNA ekstraksiyonu, hedef RNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması, cDNA sentezi, adaptör ligasyonu, kütüphane hazırlığı, parçalanma ve dizilemeden geçer. Elde edilen diziler, veri tabanlarında bulunan referans genom dizileri ile hizalanır. Geleneksel yöntemlere kıyasla daha geniş bir dinamik aralık ve daha yüksek çözünürlük sağlayarak düşük bolluktaki transkriptlerin ve alternatif birleştirme olaylarının algılanmasına olanak tanır [94,97].

2.5.2. DNA Mikroarray

DNA, RNA veya proteinler gibi binlerce biyolojik molekülün tek bir çip üzerinde aynı anda analiz edilmesini sağlar. Mikrodizilerin temel prensibi, tamamlayıcı nükleik asit ipliklerinin (örneğin, DNA-DNA, DNA-RNA) birbirine bağlandığı hibridizasyon tekniğine dayanır. Bu bağlanma, numunedeki belirli dizilerin varlığını ve miktarını belirlemek için tespit edilir ve ölçülür [98,99]. Bu etkileşim, gen veya protein ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için nicel veya nitel olarak analiz edilebilen sinyaller üretir.

2.5.3. EST'ler

Bunlar, gen transkriptlerini tanımlamak için kullanılan cDNA'nın kısa alt dizileridir. EST'ler, genomun kopyalanan kısımlarına odaklanarak gen ekspresyonu hakkında bilgi sağlar ve metabolik yolların ve genetik özelliklerin incelenmesini kolaylaştırır. EST'lerin prensibi, mRNA'yı dokulardan izole etmeyi, onu cDNA'ya dönüştürmeyi ve ifade edilen genlerden

oluşan bir kütüphane oluşturmak için bu parçaları sıralamayı içerir [94,100]. Bu, belirli koşullarla ilgili olarak karşılık gelen genin ekspresyonunu bulmaya yardımcı olur [101].

2.5.4. Gen Ekspresyonunun Seri Analizi (SAGE)

Büyük ölçekli gen ekspresyonu profillemesi için kullanılan bu teknik, ilgili genler hakkında önceden bilgi sahibi olmadan transkriptleri tanımlar ve nicelleştirir. SAGE, mRNA'dan benzersiz dizi etiketlerini izole ederek çalışır ve daha sonra bunları dizileme için uzun DNA moleküllerine bağlar [94,102]. Bu yöntem, gen ekspresyonu hakkında hem kalitatif hem de kantitatif veriler sağlar (karşılık gelen transkript verilerinin bolluğu ile ilişkili olan her bir etiketin sıklığını sayarak) ve bu da onu birçok çalışma için güçlü bir araç haline getirir.

2.5.5. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme (NGS), binlerce DNA molekülünün aynı anda dizilenmesini sağlayan ve tek bir deneyde büyük ölçekli genetik veriler üreten çığır açan bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. NGS, hem kısa okuma hem de uzun okuma dizileme tekniklerini barındırır, bu da onu çok çeşitli araştırma ve klinik uygulamalar için uygun hale getirir [103].

Konvensiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında, NGS, dizileme için gereken maliyeti ve zamanı büyük ölçüde azaltarak daha hızlı genom analizi sağlar [104]. Bu artan verimlilik, çok sayıda uygulamada Sanger dizilemeden NGS'ye geçişi sağlamıştır [105]. Dizileme adımları sırasında Illumina (Tersinir Sonlandırıcı Dizileme), İyon Torrent (pH Tabanlı Algılama), PacBio ve Nanopore (Uzun Okuma Teknolojileri) gibi farklı platformlar kullanılabilir [103,104].

2.6. miRNA DÜZENLENEN TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ VE STRES TEPKİSİ

Transkripsiyon faktörleri, gen ifadesini düzenleyerek bitkilerin abiyotik strese karşı tepkilerini koordine etmede önemli rol oynar [70,71]. Bu tezde, kombine kuraklık ve azot eksikliği stresi altındaki tepkilerini değerlendirmek için UBC24 ve TCP24 ile birlikte belirli HD-ZIP III transkripsiyon faktörlerini (PHAVOLUTA, PHABULOSA, REVOLUTA) analiz ettik. Bu genler, çeşitli işlevleri ve transkripsiyon faktörü aktivitesini etkileyen miRNA'lar tarafından düzenlenmeleri nedeniyle seçilmiştir. Büyüme ve gelişmeyi kontrol ederek doğrudan ya da daha geniş transkripsiyonel düzenleyici ağlar aracılığıyla dolaylı olarak abiyotik strese bitki adaptasyonunu modüle ettikleri bilinmektedir [179,181].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEK HAZIRLAMA

3.1.1. *Arabidopsis thaliana* Büyüme Koşulları

Tüm laboratuvar büyüme koşulları için *in vitro* bitki doku kültürü ortamı olan Murashige ve Skoog (MS)[Sigma M5519] besiyeri kullanılmıştır. MS besiyeri, makro besinler, mikro besinler, vitaminler, karbon kaynağı ve Ek 1'de listelenen diğer bileşenlerin kapsamlı bir karışımını içermektedir. MS ortamı, bileşenlerinin konsantrasyonu ayarlanarak veya farklı bitki dokularının ve gelişim aşamalarının gereksinimlerini karşılamak için spesifik büyüme düzenleyicileri eklenerek modifiye edilmiştir. MS ortamına 6-Benzylaminopurine (BAP) [Sigma B3274] eklenmesi sürgün başlangıcını arttırmak için kullanılmış ve 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)[Sigma 22F-04811] kallus oluşumunu etkilemiştir [106].

3.1.2. Tohumların Sterilizasyonu

Arabidopsis thaliana tohumları sterilizasyon için 1,5 mL'lik tüpe yerleştirilmiştir. İlk yıkama üç kez %70 etanol ve ardından %100 etanol ile yapılmıştır. Etanol, mini ScanSpeed kullanılarak 600 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Steril tohumlar laminar hava akış kabini içinde steril koşullarda kurutuldu ve %3 süzkroz ve %0,9 Agar ile desteklenmiş MS besiyeri içeren katı besiyeri plakalarına ekildi. Plakalar parafilm ile kapatılmış ve tohumlar bitki büyüme odasında 25±2 °C'de, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullarda çimlenmeye bırakılmıştır (MLR-352H-PE).

3.1.3. *Arabidopsis thaliana* Kallus İndüksiyonu

In vitro yetiştirilen *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin kök kısımları kallus kültürü için eksplant olarak seçilmiştir. Bir bistüri yardımıyla bu eksplantlar kesilmiş ve MS besiyeri içeren petri kaplarına yerleştirilmiştir. MS besiyerine ek olarak 0,5 mg/L, 2,4-D ve 7,5 g sukroz (Isolab BA2888605ANW) eklenmiştir. 250 ml MS'ye 125 µl 2,4-D eklenmiş ve karıştırılmıştır. Her bir petri kabına yaklaşık 20 ml besiyeri eklenmiş ve kontaminasyonu önlemek için parafilm ile kapatılmıştır.

3.1.4. Stres Ortamının Hazırlanması

3.1.4.1. Kuraklık Medyası Hazırlığı

Polietilen glikol 8000 (PEG 8000) [Aidrich P2139] 0,7Mpa ozmotik potansiyelde kuraklık ortamı oluşturmak için kullanılmıştır [107]. Bu çözeltiden 250 ml hazırlamak için 0,55 g MS tozu, 0,3 g (2-(N-morfolino) etansülfonik asit) (MES) [Sigma M-8250] ve 7,5 g sukroz manyetik karıştırıcı kullanılarak 100 ml distile su çözöldü. Çözeltinin pH'ı 5,7'ye ayarlandı ve hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Besiyeri 121°C'de, 1,2 atm basınçta 15 dakika süreyle otoklavlanmıştır. Besiyeri petri kaplarına dökölmeden önce 250 µl MS vitamini ve 125 µl 2,4-D büyüme hormonu eklenmiştir. Laminer hava akışlı bir kabinde, 20 ml yarı güçlü MS bir mezür kullanılarak ölçölmüş ve petri kaplarının üzerine dökölmüştür. Polietilen glikol kaplaması için 100 g PEG 8000 ölçölmüş ve 0,55 g MS ve 0,3 g MES içeren önceden otoklavlanmış çözeltiye eklenmiştir. 30 ml PEG çözeltisi ölçölmüş ve önceden hazırlanmış MS ortamının yarısının üzerine dökölmüştür. Petri kapları parafilm ile kapatılmış ve PEG'in agara yayılması için 15 saat boyunca 4°C'de bekletilmiştir.

3.1.4.2. Azot Eksiklik Uygulamasına Ait Besiyerlerinin Hazırlanması

Azot eksikliği stres ortamını hazırlamak için toz NH_4NO_3 içermeyen MS ortamı (Sigma M2909) kullanılmıştır. 250 ml azot açlığı ortamı hazırlamak için 7,5 g sukroz ve 0,675 g NH_4NO_3 içermeyen MS tozu manyetik bir karıştırıcı kullanılarak çözöldü. Çözeltinin pH'ı 5N NaOH ile 5,7'ye ayarlandı ve hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. 2,25 g agar (Duchefie Biochemie P1001.1000) eklendikten sonra besiyeri 121°C'de 15 dakika boyunca 1,2 atm basınçta otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Besiyeri soğuduktan sonra 125 µl MS vitamin (Sigma 3900) ve 250 µl 2,4-D eklenerek petri kaplarına aktarıldı. Petri kapları katılaştıktan sonra parafilm ile kapatıldı.

3.1.4.3. Kombine Azot Eksiklik ve Kuraklık Uygulamasına Ait Besiyerlerinin Hazırlanması

Kombine azot ve kuraklık stresi ortamı, alt faz için NH_4NO_3 içermeyen MS ve ardından kuraklık koşulunu oluşturmak için PEG kaplaması kullanılarak yapılmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımıyla 7,5 g sukroz, 0,34 g NH_4NO_3 içermeyen MS, 0,3 g MES 200 ml distile suda ölçöldü ve çözünene kadar karıştırıldı. Agar eklenmeden önce pH 5,7'ye ayarlanmış ve 121°C'de 1,2atm basınçta 15 dakika otoklavlanmıştır.

250 ml kaplama çözeltisi için 100 g PEG 8000 ölçölmüş ve NH_4NO_3 içermeyen 0,34 g MS ve 0,3 g MES içeren önceden otoklavlanmış çözeltiye eklenmiştir. 30 ml PEG çözeltisi bir ölçüm

silindiri kullanılarak ölçülmüş ve NH_4NO_3 içermeyen yarı güçlü MS üzerine dökülmüştür. Petri kapları parafilm ile kapatılmış ve PEG'in agara nüfuz etmesi için 4°C 'de 15 saat bekletilmiştir.

3.1.5. Stres Uygulamaları; Kuraklık ve Azot Eksikliği

Farklı stres ortamları hazırlandıktan sonra, 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamındaki kalluslar bir bistüri yardımıyla kontrol, azot eksikliği, kuraklık ve kuraklık ile azot eksikliği stresinin bir arada bulunduğu ortamlara aktarılmıştır. Kallus örnekleri bitki büyütme kabininde 7 gün bekletildikten sonra toplanmıştır. Kallus örnekleri 0,1 g'lık porsiyonlar halinde tartılmış, sıvı nitrojen içinde dondurulmuş ve ekstraksiyon ve ileri analizler için -80°C 'de saklanmıştır.

3.1.6. RNA İzolasyonu

RNA, Trizol (Hibrogen, Turkey) yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Trizol, bitki dokusunun homojenleştirilmesinde RNA'yı etkili bir şekilde çözen guanidin tiyosiyanat ve fenol karışımıdır.

- i. 0,1 g bitki örneği (kontrol, kuraklık, azot açlığı ve kombine) bir havana konmuş ve sıvı azot yardımıyla ezilmiş, ardından 1 ml Trizol eklenmiştir.
- ii. Örnekler Eppendorf tüplerine aktarılmış ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.
- iii. Faz ayrımı için 0,2 ml kloroform eklenmiş ve Eppendorf tüpü hafifçe ters çevrilerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletilmiştir.
- iv. Örnekler 12000 g, $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz başka bir Eppendorf tüpüne aktarılmıştır.
- v. Her 1 ml Trizol için 0,5 ml izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ve $+4^\circ\text{C}$ 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- vi. Pelet 1 ml %75'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır. Kısa bir süre vortekslendikten sonra 5 dakika santrifüj edildi ($+4^\circ\text{C}$ 7500g'de).
- vii. Etanol tamamen buharlaştıktan sonra, RNA peleti 20-50 μl RNase içermeyen su (37°C) içinde yeniden süspanse edildi.
- viii. İzole edilen RNA daha sonraki analizler için -80°C 'de saklanmıştır.

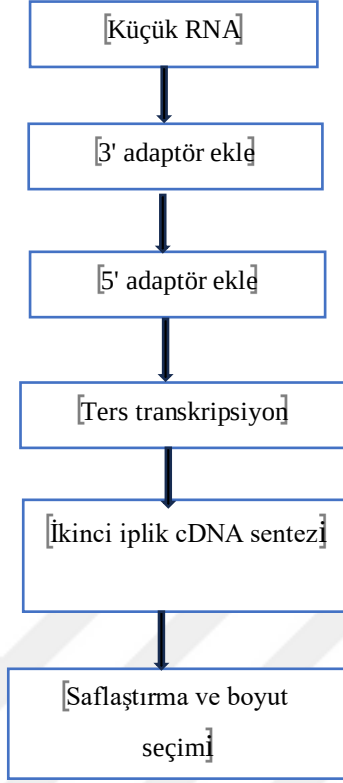
3.1.7. RNA Saflığı ve Bütünlüğünün Belirlenmesi (Spektrofotometri ve Elektroforez)

Izole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Thermo Scientific, Nanodrop 2000 Spectrophotometer cihazı ile ölçüldü. Ekstraksiyondan sonra RNA örnekleri DEPC-dH₂O içinde çözülmüştür. Çözünmüş RNA'dan 1 µl alikotu küvete aktarılmıştır. Ölçüm 10 saniye içinde alınmış ve analiz bilgisayar ekranında görüntülenmiştir. Ölçüm tamamlandığında örnekler küvetten çıkarılmıştır. Saf RNA'nın A260/A280 absorbansının 2,1 olması beklenir, ancak 1,8-2 arası da kabul edilir [108]. Tablo 4.1, elde edilen absorbansın bir listesini göstermektedir.

Ekstrakte edilen RNA'nın bütünlüğünü belirlemek için 40 ml 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM asetik asit ve 1 mM EDTA) tamponu ile Agaroz jel hazırlanmıştır. 0,48 g Agaroz tozu (Isolab MB3217010ALW) tartıldı ve TAE tamponuna eklendi. Bu bir mikrodalga fırında homojenize edildi. Jel soğuyunca 3 µl Etidyum bromür (Sigma E7637-1G) eklendi ve karıştırıldı. Jel daha sonra jel kasetine döküldü ve numuneler eklenmeden önce katılaşmasına izin verildi. 3,2µl numune 0,75µl yükleme jeli ile karıştırıldı ve 30 dakika boyunca 120mA 70V'de yüklendi. 30 dakika sonra jelin ultraviyole transillüminatör yardımıyla fotoğrafı çekilmiştir.

3.2. KÜTÜPHANE OLUŞTURMA, KALİTE KONTROL VE DİZİLEME

Ekzonükleazlar tarafından bozulmayı önlemek ve her iki ucun da sonraki işlemler için kullanılabilmesini sağlamak için küçük RNA fraksiyonunun 3' ve 5' uçlarına adaptörler eklenmiştir. Bu adaptörler, kütüphane hazırlama sırasında amplifikasyon için primer bağlanma bölgeleri olarak görev yapmıştır. Birinci sarmal cDNA sentezi, ters transkripsiyon primeri bağlanmadan sonra gerçekleştirilmiştir. Daha sonra cDNA, PCR amplifikasyonu yoluyla çift sarmallı bir kütüphaneye dönüştürülmüştür. Saflaştırma ve uygun boyuttaki parçaların seçilmesinden sonra, 18 ila 40 bp arasında eklere sahip kütüphaneler dizileme için son haline getirilmiştir. mRNA kütüphaneleri, 50bp uzunluğunda tek uçlu (SE) dizileme kullanılarak bir Illumina NextSeq 2000 üzerinde dizilenmiştir. Sekans kalitesi MiRTrace yazılımı (v1.0.1) kullanılarak değerlendirilmiştir [109]. Program, miRBase (v21) veritabanına dahil olan türler için kullanılabilen hızlı bir kalite kontrol aracıdır [110].



Şekil 3.1: Kütüphane oluşturulması iş akışı.

3.2.1. Okuma Filtreleme

Fastp (v0.23.2) [111] yazılımı, okumaları uzunluğa göre filtrelemek için kullanılmış ve yalnızca istenen boyut aralığındaki yüksek kaliteli okumaların aşağı yönlü analiz için tutulmasını sağlamıştır. Fastp, düşük kaliteli bazları, adaptör dizilerini ve aşırı kısa veya aşırı uzun okumaları etkili bir şekilde kaldırarak veri kümesinin genel kalitesini artırmıştır. Elde edilen okuma sayısı en kısa okuma 18 baz ve en uzun okuma 26 bazdır.

3.2.2. Okumaların Kalite Kontrolü

Okumalar, dizi kalitesi, okuma uzunluğu ve miRNA olmayan dizilerin bolluğuna göre filtrelenmiştir. Kontrol, azot eksikliği, kuraklık ve kombine stres koşulları için düşük kaliteli okuma sayıları ($Q < 20$) sırasıyla 7720, 2044, 1702 ve 2999 olarak belirlenmiştir.

Tüm okumaların 18-26 baz arasında olduğu tespit edilmiş ve doğrulama aşaması onaylanmıştır.

3.3. ANLATIMI DEĞİŞEN KÜÇÜK RNA'LARIN TANIMLANMASI

3.3.1. Okumaların *Arabidopsis thaliana* Referans Genomuna Hizalanması

Okumalar, bowtie yazılımı (v1.3.1) kullanılarak *Arabidopsis thaliana* referans genomuna hizalanmıştır [112]. Hizalamadan önce, her örnek için okumalar daraltılmıştır. Daraltılmış okumalar veri karmaşıklığını azaltır, hizalama kalitesini artırır. Hizalama sürecindeki ilk adım referans genom için bir indeks oluşturmaktır. Bowtie yazılımı ile indeksleme yapıldıktan sonra çeşitli boyut ve sayılarda .ebwt uzantılı indeks dosyaları oluşturularak hizalama işlemi başlatılmıştır. Hizalama işlemi sonrasında her bir örneğe ait .sam ('sequence alignment map') formatında hizalama dosyaları elde edilmiştir.

3.3.2. Gen Anlatım Farkları

DESeq2 (v1.38.3) [113] diferansiyel ekspresyon analizi gerçekleştirmek için kullanılmıştır. 4 farklı örnek grubu (A, B, C, D) için 6 farklı karşılaştırmanın (A vs. B, A vs. C, A vs. D, B vs. C, B vs. D, C vs. D) sonuçları incelendi. Örnekleri ve koşulları tanımlayan bir "meta" dosyası kullanılmıştır. Diferansiyel olarak ifade edilen genler için kullanılan filtreleme parametreleri düzeltilmiş p değeri (padj) < 0,05 ve log₂foldchange > 1 idi. padj < 0,05 ve log₂fold change > 1 kriterlerini karşılayan miRNA'lar anlatımı artan miRNA'lar olarak tanımlanırken, padj < 0,05 ve log₂foldchange < -1 kriterlerini karşılayan miRNA'lar anlatımı azalan miRNA'lar olarak tanımlandı.

3.3.3. Küçük RNA'ların Tespiti Ve Hedef Genlerin Tanımlanması

Bilinen küçük RNA'ları tespit etmek için miRDeep-P2 yazılımı (v1.1.4) [114] kullanılmıştır. Bu işlem için öncelikle okunan dosyalar.fastq formatından .fasta formatına dönüştürülmüş ve tekrarlanan diziler maskelenmiştir. Bu işlem için seqkit (v2.4.0) [115] ve fastx_toolkit (v0.0.14) yazılımları kullanılmıştır. Yukarıdaki prosedür her örnek için tekrarlanmış ve her örnek için bilinen miRNA'lar elde edilmiştir. Analiz sonucunda kontrol örneğinde 247, azot eksikliği örneğinde 322, kuraklık örneğinde 329 ve kombine stres örneğinde 324 miRNA tanımlanmıştır. 178 miRNA dört koşulda da ortak olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.4).

Tespit edilen miRNA'ların hedef genleri psRNATarget [116] web aracı kullanılarak belirlenmiştir. Bu programda *Arabidopsis thaliana* referans olarak belirlenmiş ve bilinen miRNA dizileri girdi olarak kullanılmıştır. Maksimum hedef parametresi 200, maksimum

yanlış baz eşleştirme parametresi 2 olarak ayarlandı. Hedef genler belirlendi ve Excel dosyaları olarak saklandı.

3.4. GEN ONTOLOJİSİ ANALİZİ

AmiGO2 veritabanı [117] yardımıyla diferansiyel olarak ifade edilen hedef genler için gen ontolojisi analizi yapılmıştır. Ana rolü, hedef genleri moleküler fonksiyon (mf), biyolojik süreç (bp) ve hücresel bileşen (cc) olarak sınıflandırmaktır. Yanlış keşif oranı (FDR) parametresi 0.05 ve maksimum yol parametresi 20 olarak ayarlandı. Zenginleştirme analizi sonuçları ggplot R paketi (v3.4.2) kullanılarak görselleştirilmiştir [118].

3.5. YENİ MiRNA'LARIN BELİRLENMESİ

Yeni küçük RNA'ların tespiti için miRDeep-P2 yazılımı kullanılmıştır. Yazılım, önceden oluşturulan Bowtie indeksi ve referans genomu kullanarak önce bilinen miRNA'ları tanımlamış, bunları analizden çıkarmış ve daha sonra mevcut miRNA'ları tespit etmek için kullanılan komutların aynısını kullanarak potansiyel yeni miRNA'ları tahmin etmiştir. Tespit edilen potansiyel yeni miRNA'lar Vienna RNA (v2.5.1) [119] yazılımının RNA katlama aracı kullanılarak görselleştirilmiştir.

3.6. GERÇEK ZAMANLI KANTİTATİF PCR ANALİZİ

3.6.1. Gen Anlatım Analizi

Bazı hedef genler için NCBI Primer BLAST (Tablo 3.1) kullanılarak primerler tasarlanmış ve PCR gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: qPCR ile gen anlatım analizi için kullanılan primer dizileri.

Gen Adı	Gen Kimliği	Primer Dizileri (5'-3')	Ürün boyu
REVOLUTA	AT5G60690	İleri CGACGGGTGGTCTACGATGC	116
		Ters AGAGCACGCCTCCAAGGAAC	
CORONA	AT1G52150	İleri AAACCAGGCGGGACTTGACA	135
		Ters GCGAAGCCCTGTTGCATGAT	
PHAVOLUTA	AT1G30490	İleri GGAAGTGGTGTCTCTGTGCC	100
		Ters CTGCCCATTTCAGCTCGGTGT	
PHABULOSA	AT2G34710	İleri CGACGGGTGGTCTACGATGC	119
		Ters AGAGCACGCCTCCAAGGAAC	
TCP24	AT1G30210	İleri CGGAGACTTTTGATGGTCGGC	172
		Ters ATGCTCAGGGCTGCACAAAC	
UBC24	AT2G33770	İleri AAAGGGTTGGCTCAGTCCCA	176
		Ters AGCCCATCGTGATATGGCGT	
RH39	AT4G09730	İleri ACCGTGTGGCGAAGTCCATA	128
		Ters ACCAGGGGTTCCAACAACCA	
ACTIN	AT1G49240	İleri GCCAGTGGTCGTACAACCG	
		Ters TCCATGAGGTAATCAGTAAGGTAC	

3.6.1.1. cDNA Sentezi

Tamamlayıcı DNA (cDNA), aşağıdaki bileşenler ve koşullar kullanılarak izole edilen RNA'dan sentezlenmiştir:

Tablo 3.2: cDNA sentez reaksiyon koşulları.

cDNA reaksiyon karışımı	Örnek başına konsantrasyon
10X RT Tamponu	2 µL
25X dNTPs karışımı	0,8 µL
10X RT Primer	2 µL
RNaz inhibitörü (20 U/ µl)	1 µL
Ters Transkriptaz enzimi 50 U/µl	1 µL
Nükleaz içermeyen su	3,2 µL

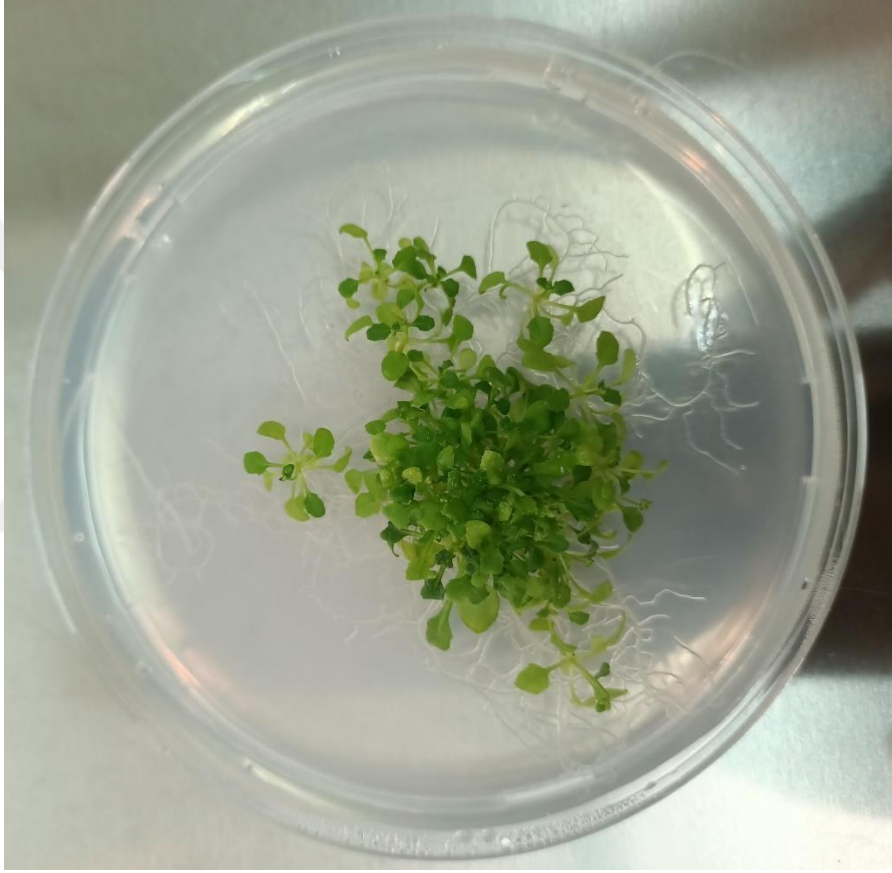
3.6.1.2. Hedef genlerin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Sentezlenen cDNA örneklerinden 2 µl, 1x SYBR Green Mix (Hibrogen, Türkiye) ve gene özgü primerler içeren 20 µl'lik son hacimde kalıp olarak kullanılmıştır. qPCR, CFX 96TM Real Time System (BIORAD, ABD) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları aşağıdaki gibidir: 1 dakika süreyle 95°C, 15 saniye süreyle 95°C ve farklı genler için aşağıdaki bağlama sıcaklıklarında [PHABULOSA, REVOLUTA, RH39 64°C; PHAVOLUTA, TCP24 63,5°C; CORONA, UBC24 62°C] 15 saniye süreyle 40 döngü ve 45 saniye süreyle 72°C'de son uzatma. qRT-PCR'yi takiben, gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, pozitif kontrol housekeeping geni Actin ile ortalama CT değerleri analiz edilerek değerlendirilmiştir. Göreceli gen ifadesi karşılaştırmalı $\Delta\Delta CT$ yöntemi kullanılarak ölçülmüştür [120].

4. BULGULAR

4.1. TOHUM ÇİMLENMESİ VE KALLUS KÜLTÜRÜNÜN BAŞLATILMASI

Arabidopsis thaliana Col-0 tohumları, yüzey sterilizasyonu yapılmış ve 14 gün boyunca 16 saat ışık ve 8 saat karanlık periyodunda bir bitki büyüme kabinine yerleştirilerek kök ve boy uzamasını sağlamak için yetiştirilmiştir.



Şekil 4.1: 14 günlük *Arabidopsis thaliana* fideleri.

Bitkiler MS ortamında 14 gün boyunca büyütüldükten sonra, kökler steril bir bisturi ile 1 cm'den kesilmiş ve kallus oluşumunu teşvik etmek için 2,4-D bitki düzenleyici içeren MS ortamına yerleştirilmiştir (Şekil 4.1). Bitkiler kallus oluşumunu teşvik etmek için bir ay boyunca 2,4-D'li MS ortamında tutuldu. Her ay bir kez alt kültüre alma işlemine devam edilmiştir.

4.2. FARKLI STRES UYGULAMALARI

Yeterli alt kültürler yapıldığında oluşan kalluslar 2,4-D'li MS'e aktarılmış ve farklı stres koşulları (kontrol, azot eksikliği, kuraklık ve kombine) uygulanmıştır. Azot eksikliği ve kuraklık, kallus renginde değişikliklere neden olmuştur. Kuraklık uygulanan kalluslar, kontrol grubuna kıyasla daha kuru bir görünüm sergilemiştir.

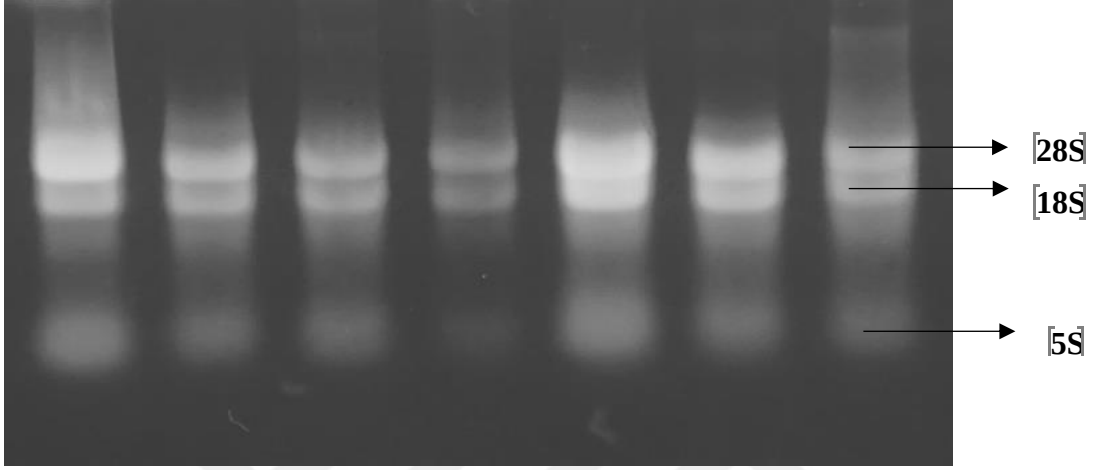
4.3. İZOLE EDİLEN RNA'NIN ANALİZİ

Transkriptomik analiz yapmak için azot eksikliği, kuraklık ve kombine streslerle muamele edilen kallus dokularından RNA izole edilmiştir. İzole edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri ile konsantrasyon ve saflık değerleri analiz edilmiş ve Tablo 4.1'de gösterilmiştir. A260/A280 oranı ~2.0 olan RNA'lar uygun saflıkta olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.1: Bazı örneklerin spektrofotometrik ölçümleri.

Örnek Kimliği	Konsant ng/μL	Absorbans 260/280	260/230
Kontrol			
3A21	2910,2	2,11	1,82
A12	476,1	2,06	2,08
A14	1145,4	2,05	1,87
6A19	6229,1	2,09	1,85
Azot eksikliği			
3B15	5552,9	2,12	1,95
3B16	6986,3	2,06	2,09
B6	4234,9	2,12	2,15
4B13	4022,6	2,11	1,68
Kuraklık			
3C13	4976,1	2,09	2,01
3C14	5125,4	2,13	2,19
C6	3807,3	2,12	1,88
C8	3316,5	2,04	1,87
Kombine			
SD30	5370,6	2,12	2,16
SD31	5374,9	2,12	2,20
D32	6431,1	2,04	1,83

RNA'lar ayrıca bütünlüklerini (RNA'ya özgü üç bandın varlığı) belirlemek için agaroz jel elektroforezi ile görselleştirilmiştir (Şekil 4.2). Elektroforez 120mA, 70 Volt güçte 30 dakika boyunca çalıştırıldı ve jel bir UV görüntüleyici (Avenegene-Xlite 30R) ile fotoğraflandı.



Şekil 4.2: İzole edilen RNA'lar agaroz jel elektroforezin de görselleştirildi

4.4. TRANSKRİPTOMİK SONUÇLAR

Kombine kuraklık ve azot eksikliği sırasında hangi genlerin aktif olarak ifade edildiğini belirlemek amacıyla RNA transkriptlerinin bolluğunu ölçmek için RNA dizilimi gerçekleştirilmiştir. Bu, *Arabidopsis thaliana* kallusundan izole edilen toplam RNA kullanılarak cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasını ve dizilemeyi içermektedir.

4.4.1. Dizileme Veri Kalitesi Özeti

Kontrol, azot eksikliği, kuraklık ve kombine stres koşullarında miRNA transkriptomik analizi için sekanslama veri kalitesi aşağıdaki gibidir (Tablo 4.2). Örnek başına toplam ham okuma sayısı yaklaşık 12,4 milyon ila 15,1 milyon arasında değişirken, ham veri boyutları 0,6 ila 0,8 GB arasındaydı. Hata oranları tüm numunelerde %0,01 ile tutarlı bir şekilde düşüktü ve bu da minimum dizileme hatalarına işaret ediyordu. GC içeriği örnekler arasında tutarlıydı ve %50,78 ile %51,73 arasında değişiyordu.

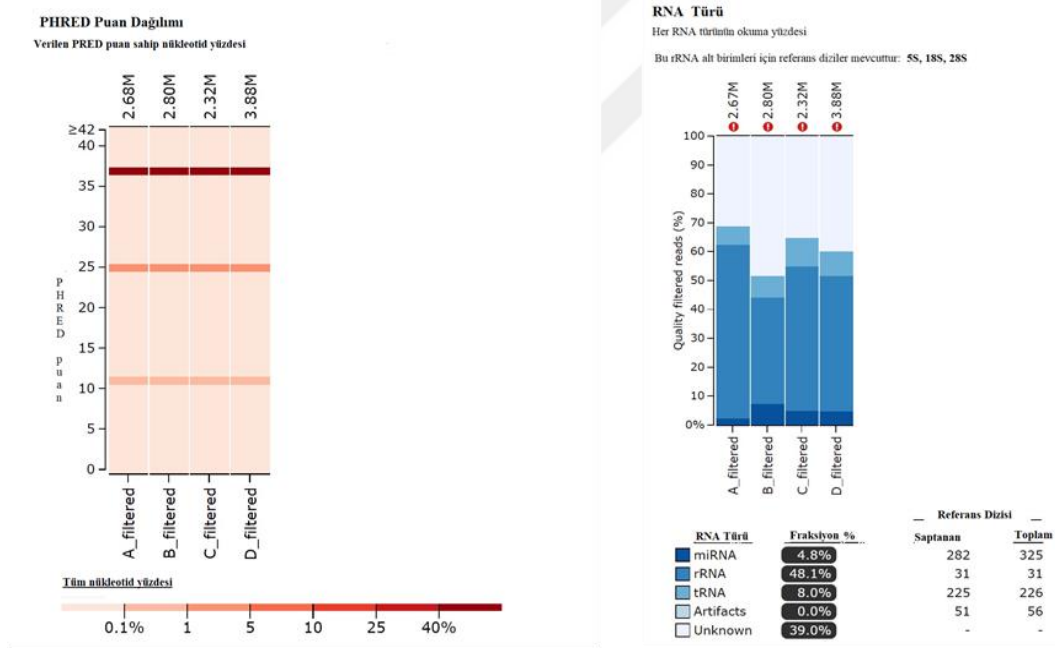
Tablo 4.2: Veri kalitesi özeti

Örnek	Ham okumalar	Ham veri (G)	Hata (%)	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
A	12606109	0,6	0,01	99,23	97,20	51,73
B	12863663	0,6	0,01	99,34	97,42	51,24
C	12381853	0,6	0,01	98,82	96,30	51,43
D	15118462	0,8	0,01	99,27	97,28	50,78

A:kontrol, B: azot eksiklik, C: kuraklık. D: kombine

Okumaların filtrelenmesi, örnekler için toplam 11,679216 ham okuma üretmiştir. Kontrol (2,682,187) azot eksikliği (2,800,201); kuraklık (2,318,413) ve kombine (3,878415). Dizileme sonuçları GEO Database Accession numarası ile kaydedilmiştir.

miRNA olmayan diziler incelendiğinde, okumaların yalnızca %4,8'inin miRNA türevi okumalar olduğu görülmüştür. Okumaların çoğu rRNA'dan (%48,1) oluşurken, okumaların %39,0'ı tanımlanamamıştır. Okumaların %8'i tRNA olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.3: Okumalara ait PHRED skoru dağılımı ve okumalarda tespit edilen RNA tiplerinin dağılımı.

4.4.2. *Arabidopsis thaliana* Referans Genomuna Hizalanmış Okumalar

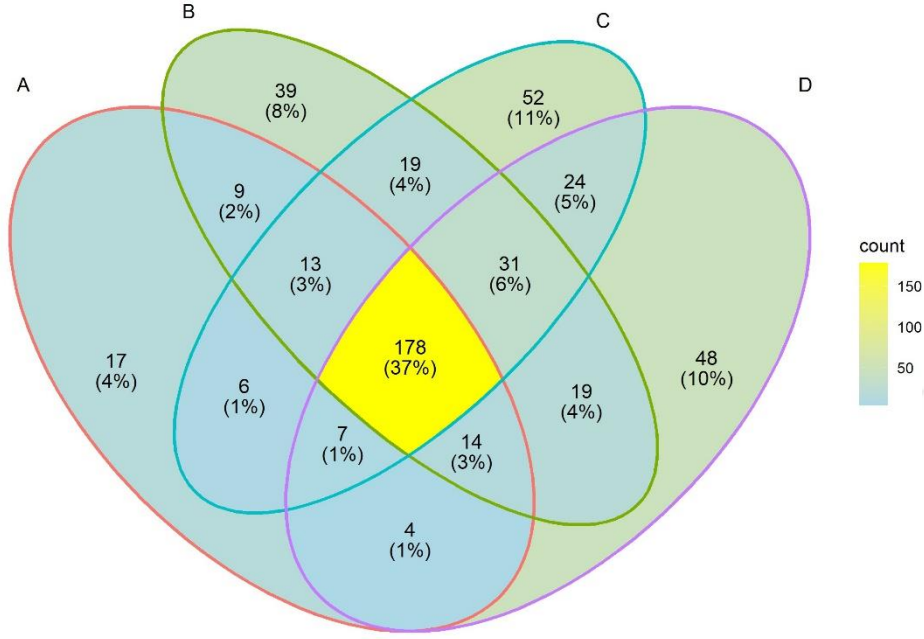
Hizalama işleminden sonra, her bir örneğin .sam (dizi hizalama haritası) formatında hizalama dosyaları elde edilmiştir. Elde edilen .sam dosyaları bolluk analizinde girdi olarak kullanılmıştır. Kontrol, azot eksikliği, kuraklık ve kombine stres örnekleri referans genomu sırasıyla %93,20, %94,15, %93,13 ve %93,21 oranlarında hizalanmıştır. Hizalama istatistikleri hakkında bilgi aşağıda verilmiştir (Tablo 4:3):

Tablo 4.3: Okumaların referans genomu hizalanma oranları.

	Kontrol_c	Azot eksikliği_c	Kuraklık_c	Kombine_c
Okuma Sayısı	708,936	737,950	588,979	836,976
Hizalanan	660,705	694,800	548,493	780,133
Okuma Sayısı				
Hizalanma (%)	93,20	94,15	93,13	93,21

4.4.3. miRNA ve Hedef Genlerinin Tanımlanması

Örnek başına ortalama 305 miRNA tanımlanmıştır. Örneklerin bilinen miRNA sayıları şu şekildedir: kontrol 247, azot eksikliği (322), kuraklık (329), kombine (324). Örnekler arasındaki miRNA'ları göstermek için aşağıdaki Venn diyagramı kullanılmıştır (Şekil 4. 3).



Şekil 4.4: Bulunan miRNA'ların örnekler arası kesişimini gösteren venn diyagramı

A:kontrol, B: azot eksiklik, C: kuraklık. D: kombine

Analizde, toplam 178 mikroRNA (miRNA) tüm örneklerde tutarlı bir şekilde tespit edilmiş ve incelenen koşullar altında anahtar düzenleyici moleküller olarak potansiyel rollerini göstermiştir. Bu 178 miRNA arasında, bir alt küme kuraklık ve azot eksikliği stresinin deneysel koşulları arasında önemli diferansiyel ifade gösterirken, diğerleri değişmeden kalmıştır.

Tablo 4.4: Tüm örneklerde bazı ortak miRNA'lar.

miR158-isoform5	miR319-isoform40	miR403-isoform7	miR158-isoform5
miR158-isoform5	miR158-isoform4	miR403-isoform9	miR158-isoform0
miR396-isoform30	miR158-isoform5	miR158-isoform5	miR159-isoform61
miR403-isoform7	miR319-isoform40	miR827-isoform5	miR396-isoform46
miR159-isoform61	miR158-isoform0	miR158-isoform5	miR158-isoform5
miR159-isoform62	miR403-isoform7	miR2916-isoform0	miR398-isoform32
miR403-isoform8	miR158-isoform5	miR396-isoform46	miR827-isoform5
miR403-isoform8	miR168-isoform1	miR158-isoform5	miR396-isoform47
miR319-isoform40	miR396-isoform45	miR158-isoform0	miR403-isoform9
miR159-isoform64	miR158-isoform7	miR158-isoform5	miR319-isoform29
miR173-isoform2	miR319-isoform40	miR396-isoform49	miR158-isoform5
miR408-isoform30	miR158-isoform5	miR2916-isoform0	miR319-isoform40
miR158-isoform5	miR396-isoform30	miR396-isoform48	miR396-isoform49
miR827-isoform5	miR159-isoform61	miR158-isoform5	miR158-isoform0
miR396-isoform49	miR845-isoform8	miR396-isoform49	miR158-isoform5
miR846-isoform2	miR158-isoform5	miR160-isoform36	miR166-isoform3
miR156-isoform96	miR846-isoform2	miR403-isoform7	miR158-isoform0
miR396-isoform48	miR403-isoform7	miR158-isoform0	miR161-isoform6
miR161-isoform6	miR403-isoform8	miR319-isoform41	miR845-isoform2
miR2916-isoform0	miR396-isoform36	miR846-isoform2	miR403-isoform8
miR845-isoform2	miR158-isoform0	miR396-isoform47	miR166-isoform51
miR166-isoform3	miR396-isoform48	miR319-isoform40	miR2916-isoform0
miR827-isoform5	miR161-isoform6	miR398-isoform2	miR846-isoform2
miR158-isoform5	miR159-isoform62	miR403-isoform8	miR6478-isoform0
miR2916-isoform0	miR396-isoform49	miR403-isoform8	miR403-isoform8
miR165-isoform2	miR403-isoform7	miR158-isoform4	miR403-isoform7
miR159-isoform64	miR5663-isoform1	miR161-isoform6	miR6478-isoform0
miR6478-isoform0	miR161-isoform5	miR159-isoform61	miR167-isoform44
miR396-isoform47	miR159-isoform60	miR2916-isoform0	miR161-isoform5
miR398-isoform32	miR845-isoform2	miR403-isoform8	miR158-isoform4

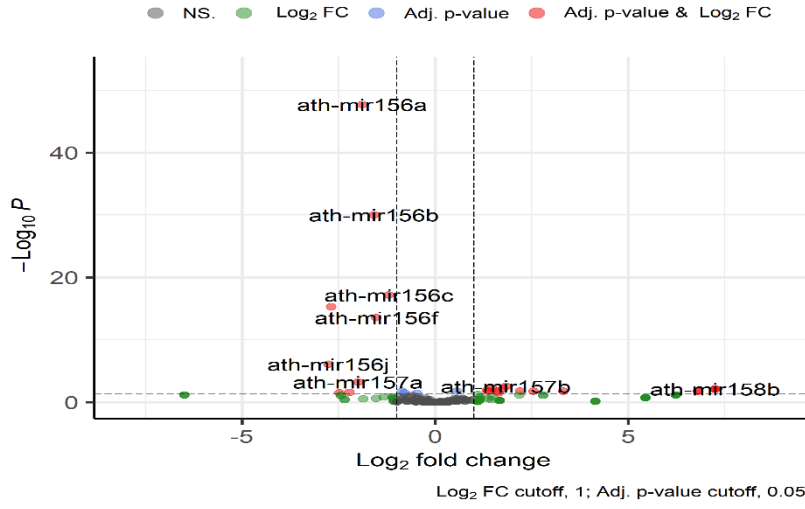
4.4.4. Gruplar Arasında miRNA Ekspresyon Farkları Analizi

Ekspresyon analizi, gruplar arasında önemli ölçüde anlatımı artan veya azalanyukarı veya aşağı regüle edilen bir dizi miRNA'yı ortaya çıkarmıştır. Karşılaştırmalarda 12 farklı miRNA ailesi (miR156, miR167, miR158, miR159, miR160, miR161, miR162, miR163, miR164, miR165,

miR166 ve miR167) tespit edilmiştir. miR156, miR157, miR158 aileleri tüm koşullarda tutarlı şekilde anlatım yapmıştır. Tüm 12 aile sadece azot eksikliği ve kombinasyon karşılaştırmasında ifade edilmiştir (Şekil 4.9). miR156 ailesi, miR156J'nin 8,12 log₂ kat, miR156d'nin 7,49 log₂ kat değişime sahip olmasıyla en önemli şekilde düzenlenmiş miRNA'lara sahip; miR159b ve miR158b, 7,26'lık benzer kat değişikliklerine sahip. A ve D karşılaştırması için miR157c (7,40), miR166e (7,77) en önemli ölçüde düzenlenmiş, B ve C karşılaştırması için miR156j (8,12), miR159c (7,08), A ve B karşılaştırması için miR158b, miR159a, miR159b için 7,26 kat değişiklikleri, A ve C arasında ise miR156b, miR156f, miR162b, miR159c 7,56, 8,24 ve 7,11, miR156b, miR163, miR164'ün tümü B ve D karşılaştırması için 6,85 kat değişikliğe sahipken, miR156d, C ve D karşılaştırması için 7,49 kat değişiklikle önemli ölçüde anlatım farklı bulunmuştur.

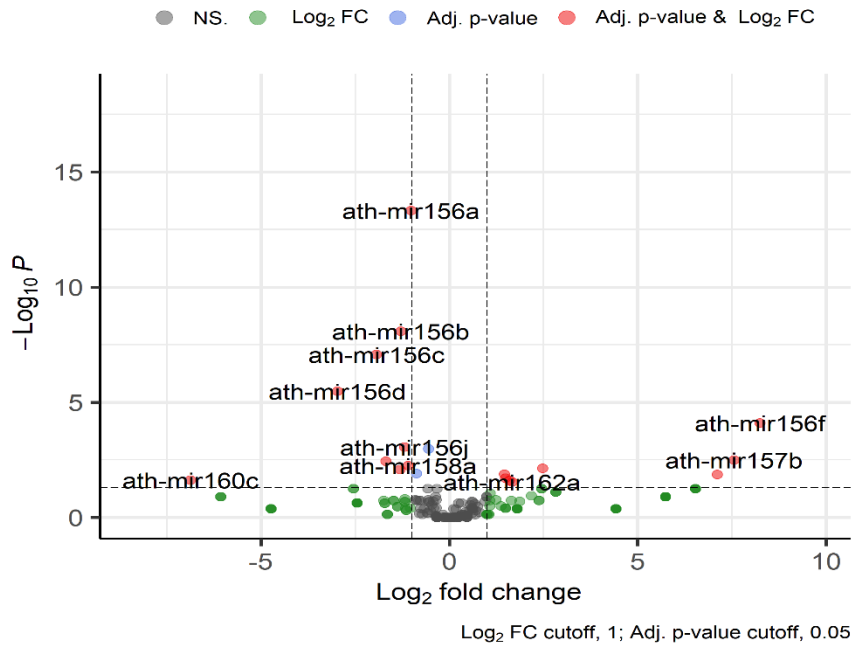
miR159a ve miR159c -7,54 log₂ kat değişiklikle anlatımı azalmıştır (Şekil 4.5). Karşılaştırmalarda şu sonuçlara ulaşıldı: miR156d (-2,68), miR157j (-2,76), miR156b (-2,47), A vs B için A vs D için miR159c (-7,66), miR156b (-5,17), miR159b (-4,21). miR160c (-6,87) A vs C için; miR156d (-8,26) ve miR167b (-6,55) B vs D için, miR160a ve miR156b -6,95 kat farklılık bulundu. B vs C için; miR157a (-7,54) ve miR160a miR160b, C vs D karşılaştırmasında 6,96'lık benzer kat değişiklikleri bulunmuştur.

Genel olarak, miR157b, miR157c, miR158a, miR158b, miR159a, miR159b, miR159c, miR160b, miR160c, miR162a, miR160c, miR163, miR164a, miR164b, miR166b sadece azot eksikliği için anlatımı arızalan, bu durum için anlatımı azalan miRNA'lar dahil edilmiştir: miR157a, miR165a, miR165b, miR156a, miR156f, miR156d, miR156c, miR156j, miR156b (Şekil 4.5). miR156f, miR160a, miR160b dışında, azot eksikliği uygulaması sırasında düzenlenen bu miRNA genleri (miR157b, miR158b, miR159a, miR159c, miR161, miR162a) kuraklık uygulaması için de düzenlenmiştir. Ancak miR156d, miR156j, miR156a, miR156b, miR156c'ye ek olarak miR157c, miR158a, miR160c kuraklık uygulamasında anlatımı azaldı göstermiştir.

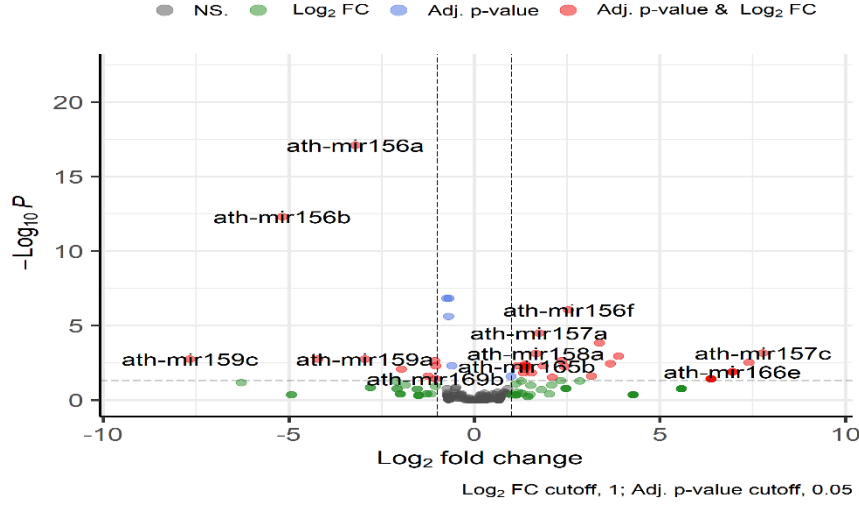


Şekil 4.5: Kontrol ve azot eksikliğinde farklı ifade edilen miRNA'ların volkan grafiği.

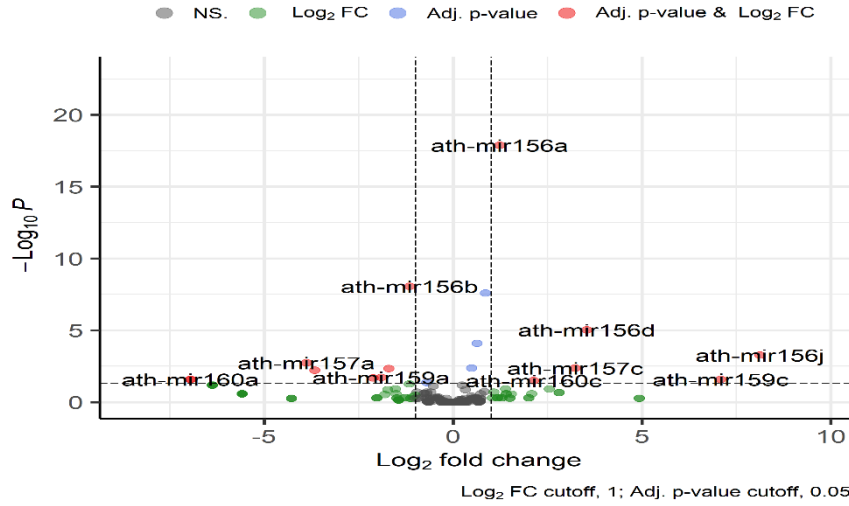
Y eksenini miRNA ifadesindeki değişikliklerin istatistiksel önemini göstermektedir. Daha yüksek $-\log_{10} p$ daha büyük istatistiksel anlamlılığa işaret eder. X eksenini kat değişim ifadelerini göstermektedir.



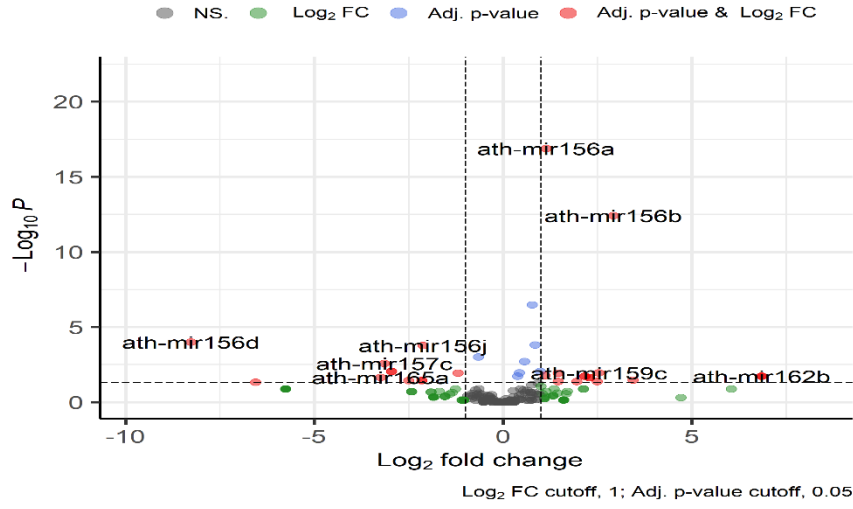
Şekil 4.6: Kontrol ve kuraklığa karşı farklı ifade edilen miRNA'ların volkan grafiği.



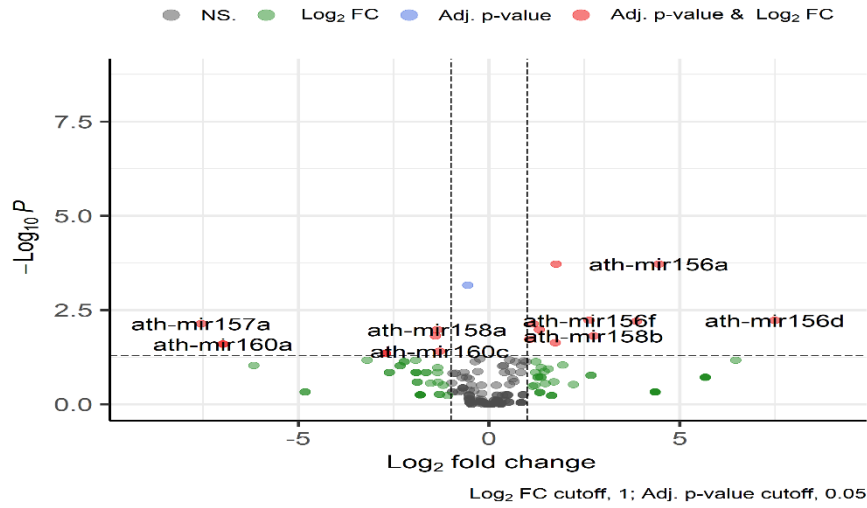
Şekil 4.7: Kontrol ve kombine volkan grafiği farklı ifade edilen miRNA'lar.



Şekil 4.8: Azot ve kuraklığa karşı farklı ifade edilen miRNA'ların volkan grafiği.



Şekil 4.9: Azot ve kombine volkan grafiği farklı ifade edilen miRNA'lar.



Şekil 4.10: Kuraklık ve kombine volkan grafiği farklı ifade edilen miRNA'lar.

Tablo 4.5: Kombine Stresinde Koşulunda anlatımı artmış miRNA'lar.

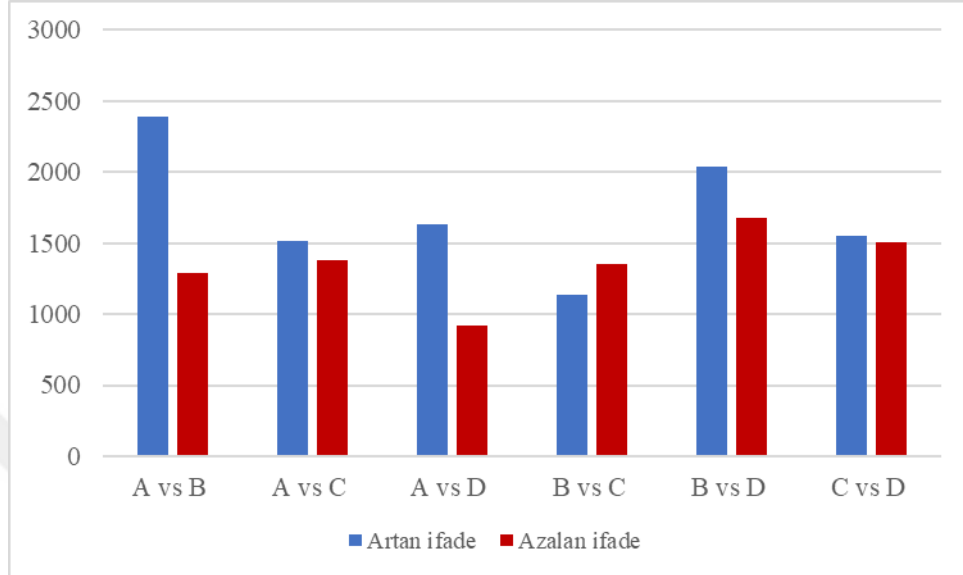
miRNA	Düzeltilmiş p değeri	log ₂ kat değişimi	P değeri	Kat değişimi	log ₁₀ düzeltilmiş p
miR162b	0.00494137810516168	1.16865616959766	0.000470607438586827	2.24802202369455	2.30615191342436
miR162a	0.00413220915460288	1.37866874451096	0.000373866542559308	2.60028317662662	2.38381770448276
miR158a	0.00076478172351149	1.6649989738955	0.0000364181773100711	3.17113429099821	3.11646249922692
miR157a	0.0000325845215580	1.74711236002433	0.00000108615071860191	3.35685997732885	4.48698865141293
miR160b	0.00233122932637835	2.36106338584379	0.000177617472485969	5.13748895026963	2.63241500220579
miR156f	9.0307179990919e-7	2.53464300205642	2.15017095216474e-8	5.79433462042939	6.04427771916076
miR157b	0.000146535430831065	3.37594178948609	0.0000055823021268977	10.3814912499449	3.8340573544634
miR161	0.00363569234804145	3.66911953999145	0.000311630772689267	12.7208180033339	2.43941287385515
miR158b	0.00113978954940095	3.8850705845348	0.0000597032621114785	14.7748398199888	2.94317532934
miR160c	0.00301968515290901	7.40359987079077	0.000244450702854539	169.318977442336	2.52003833634166
miR157c	0.0007134686055793	7.773160600807	0.000030577225953402	218.7532439228	3.146625132182

Tablo 4.6: Kombine Stres Koşulunda anlatımı azalmış miRNA'lar.

miRNA	Düzeltilmiş p değeri	log ₂ kat değışımi	P değeri	Kat değışımi	log ₁₀ düzeltilmiş p
mi R160a	0.00233122932637835	-1.06802010976469	0.000168550501653248	0.476973126686294	2.63241500220579
mi R159a	0.00183376811160451	-2.94427840858006	0.000116700713421906	0.129922354805488	2.73665558372477
mi R156a	7.88986382218691e-18	-3.2048196026699	3.75707801056519e-20	0.108455896577619	17.1029304925806
mi R159b	0.00183376811160451	-4.21308074027285	0.000121421691382841	0.0539183164166953	2.73665558372477
mi R156b	5.1158769780959e-13	-5.17107417753992	4.87226378866276e-15	0.0277556602496737	12.2910799075821
mi R159c	0.00183376811160451	-7.66531022558264	0.000122251207440301	0.004926196099608	2.73665558372477

4.4.5 Anlatım farklıları gözlenen miRNA'ların hedef genleri

Aşağıdaki şekil (Şekil 4.4), tespit edilen miRNA'ların hedef genlerini göstermektedir. Bu, artan ifade ve azalan ifade açısından ifade edilmektedir.



Şekil 4.11: Örneklerin farklı ifade edilen genlerinin istatistikleri (A:kontrol, B: azot eksikliği, C: kuraklık, D: kombine).

Y ekseni hedef genlerin sayısını temsil ederken X ekseni karşılaştırmayı temsil eder.

Tablo 4.7:Anlatımı artan miRNA-hedef gen etkileşimlerine ve bölünme mekanizmalarına örnekler.

miRNA	Hedef gen	Genomik konum	Bağlanma bölgesi (nt)	miRNA dizisi	Inhibisyon türü
miR156f-5p	Squamosa Promoter Binding Protein-Like 3- SPL3 (AT2G33810.1)	chr :14305001-14306072 FL=981	787-806	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	Kesim
miR160b	Auxin response factor 17- ARF17 (AT1G77850.1)	chr1:29272313-29275419 FL=2076	1409- 1429	UGCCUGGCUCCUGUAUGCCA	Kesim
miR161.2	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein (AT1G63150.1)	chr1:23419396-23421579 FL=2049	986- 1006	UCAAUGCAUUGAAAGUGACUA	Kesim
miR157a-5p	Squamosa promoter binding protein-like 15-SPL15 (AT3G57920.1)	chr3:21444321-21446035 RL=1377	845-865	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	Kesim
miR157c-5p	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein STRS2, ATRH25 (AT5G08620.1)	chr5:2794457-2797660 FL = 1887	1424-1444	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	Kesim
miR158a-3p	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein BUB3.2 (AT1G49910.1)	chr1:18479025-18481475 FL=1224	784- 803	UCCCCAAUGUAGACAAAGCA	Translasyon
miR158a-5p	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein (AT5G22080.1)	chr5:7310378-7313619 RL=1042	755-775	CUUUGUCUACAAUUUUGGAAA	Kesim

Tablo 4.8: Anlatımı artan miRNA örnekleri hedef gen adları ve inhibisyon mekanizması

miRNA	Hedef gen adı	Gen kimliği	Inhibisyon türü
miR158a-5p	Ankyrin repeat family protein / BTB/POZ domain-containing protein	AT4G26120.1	Kesim
miR158a-5p	Wall associated kinase-like 1 (WAKL1)	AT1G16120.1	Kesim
miR161	RNA processing factor 2 (RPF2)	AT1G62670.1	Translasyon
miR162a-3p	cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 1 (CYP96A1)	AT2G23180.1	Kesim
miR156f-5p	ECT6 evolutionarily conserved C-terminal region 6	AT3G17330.2	Kesim
miR156f-5p	Receptor like protein 12 (AtRLP12, RLP12)	AT1G71400.1	Kesim
miR157a-3p	F-box and Leucine Rich Repeat domains containing protein (FBD)	AT1G55660.1	Kesim
miR157a-5p	Photosystem II reaction center (PSB28 protein)	AT4G28660.1	Translasyon
miR157a-5p	F-box family protein	AT1G32140.1	Kesim
miR157b-5p	Transposable element gene	AT2G05020.1	Kesim
miR156f-5p	Galactosyltransferase family protein	AT1G53290.1	Kesim
miR156f-5p	Homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein (REV, IFL, IFL1)	AT5G60690.1	Kesim
miR157a-5p	Calcium-dependent lipid-binding family protein	AT1G48090.1	Kesim
miR157c-3p	Small GTP-binding protein	AT5G08650.1	Kesim
miR158a-3p	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein (DAG2)	AT2G46590.2	Translasyon
miR158a-5p	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein	AT1G32810.2	Kesim
miR158a-5p	Vegetative storage protein 1 (VSP1)	AT5G24780.1	Kesim
miR158a-5p	Myb domain protein 89 (MYB89)	AT5G39700.1	Kesim
miR156f-5p	PLATZ transcription factor family protein	AT1G32700.2	Translasyon
miR156f-5p	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	AT3G25890.1	Kesim
miR157a-3p	TEOSINTE BRANCHED 1, cycloidea and PCF transcription factor 2 TCP2	AT4G18390.2	Kesim
miR162b-5p	Fucosyltransferase 1 (FT1, ATFUT1, ATFT1, MUR2)	AT2G03220.1	Translasyon
miR162b-5p	BED zinc finger ; hAT family dimerization domain	AT3G42170.1	Translasyon
miR161.1	Thioredoxin 3 (ATTRX3, ATH3, ATTRXH3)	AT5G42980.1	Kesim

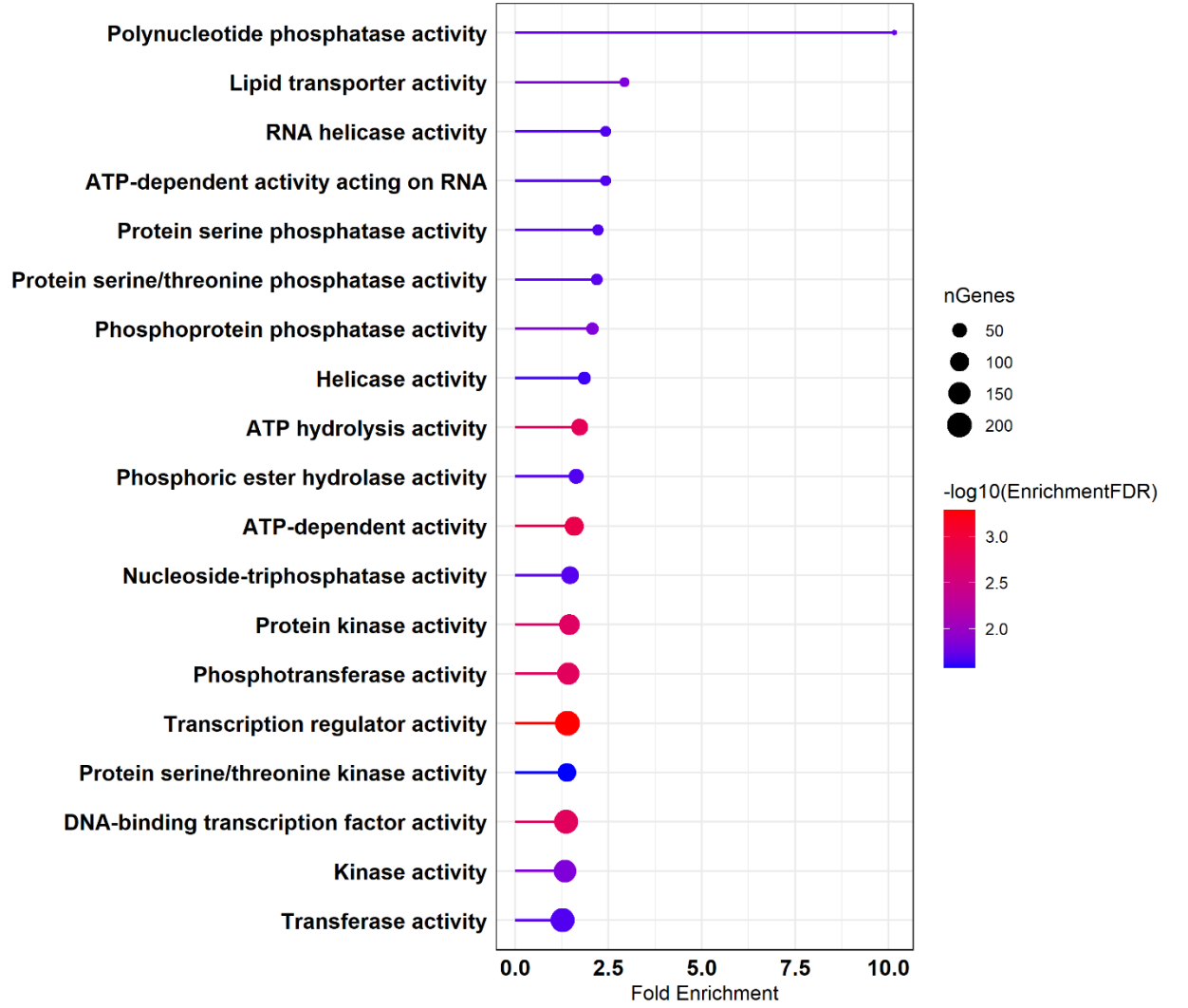
Tablo 4.9:Anlatımı azalan miRNA hedef genlerine örnekler, etkileşim ve inhibisyon mekanizmaları.

miRNA	Hedef gen	Genomik konum	Bağlanma bölgesi (nt)	miRNA dizisi	Inhibisyon türü
miR156b-5p	Protein kinase superfamily protein (AT3G28690.1)	chr3:10755039-10757868 FL=2468	838-857	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	Kesim
miR159a	1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 8 - ACS8 (AT4G37770.1)	chr4:17752084-17754157 FL=1780	453-473	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	Kesim
miR159a	Myb domain protein 101 MYB101 (AT2G32460.2)	chr2:13782208-13784471 RL=1760	972-992	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	Kesim
miR159b-3p	Myb-like HTH transcriptional regulator family protein -DUO1 (AT3G60460.1)	chr3:22342429-22343491 RL=894	97-117	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUU	Kesim
miR156a-5p	receptor like protein 12- RLP12 AT1G71400.1	chr1:26909835-26912597 FL=2763	2250-2269	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	Kesim
miR159b-5p	AGAMOUS-like 8- AGL8 (AT5G60910.1)	chr5:24502482-24506143 RL=1113	485-505	GAGCUCCUUGAAGUCAAUGG	Translasyon
miR159c	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein - BIM1 (AT5G08130.1)	chr5:2606200-2609606 RL=2043	1081-1101	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU	Kesim

4.4.6. Hedef Genlerin Zenginleştirme Analizi

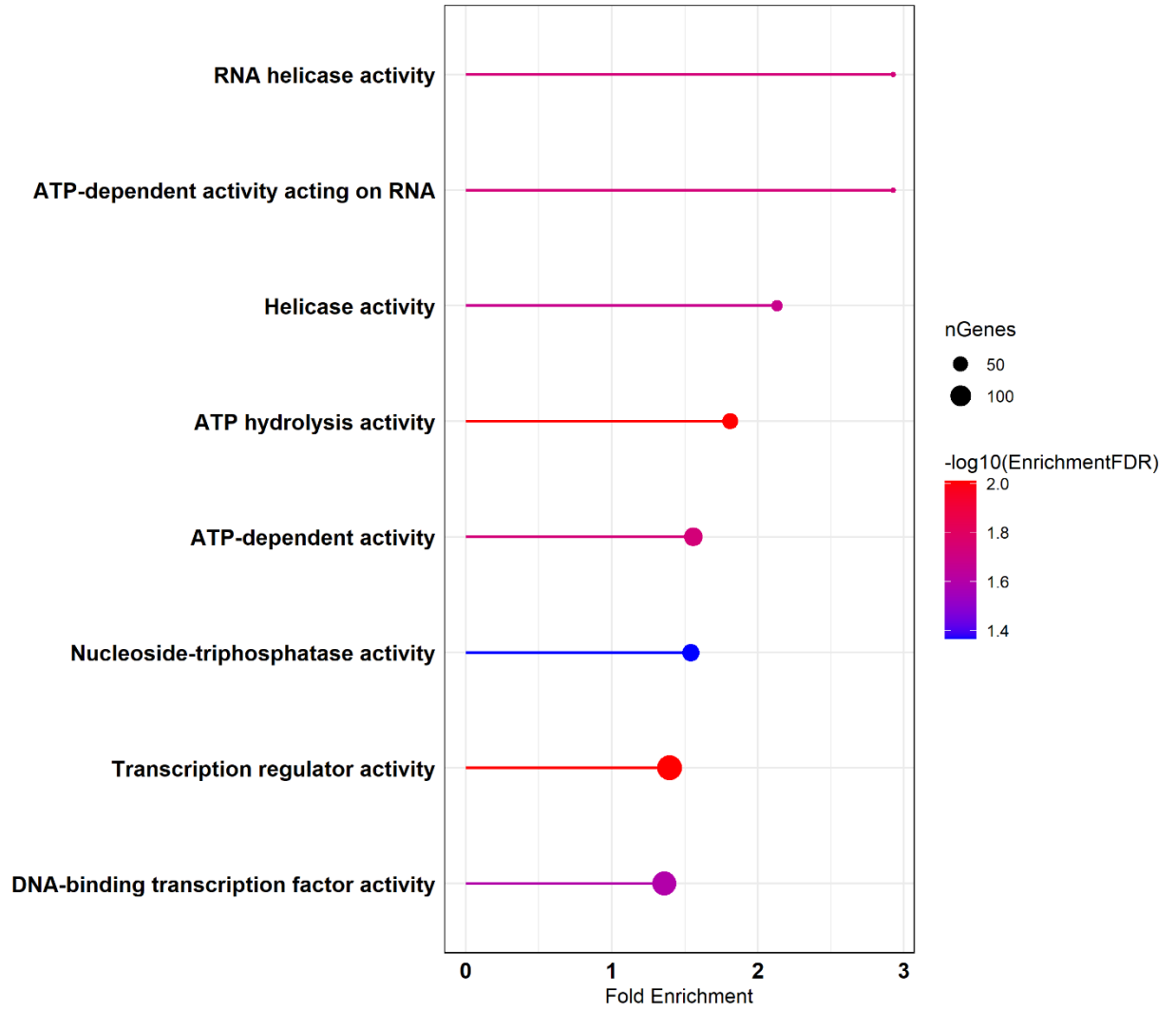
AmiGO2 veri tabanı kullanılarak miRNA'ların farklı şekilde ifade edilen hedef genleri üzerinde yapılan gen ontolojisi (GO) aracılığıyla fonksiyonel açıklama ve zenginleştirme analizi için yaygın olarak benimsenen bir kriter, bunları Moleküler fonksiyon (MF), biyolojik süreç (BP), hücresel bileşen (CC) olarak kategorize etmiştir. Moleküler işlev altında en yaygın alt kategoriler transkripsiyon düzenleyici aktivite (GO:0140110), DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi (GO:0003700), RNA helikaz aktivitesi (GO:0003724), ATP bağımlı aktivite (GO:0140657) olmuştur. En zenginleştirilmiş GO genleri aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 4:12-23). Moleküler fonksiyon kategorisinde A ile B arasındaki en iyi 19 DEG arasında Polinükleotid fosfataz (GO:0098518), lipid taşıyıcı aktivitesi (GO:0005319) ve RNA helikaz (GO: 0003724) aktivitesi sırasıyla 4, 15, 18 unigen sayısı ile ilk 3 kategori olmuştur; RNA helikaz aktivitesi (GO:0003724), RNA üzerinde ATP bağımlı aktivite (GO:0008186) ve A ile C karşılaştırması için Helikaz aktivitesi (GO:0004386) (Şekil 4.13). A ve D karşılaştırması için miRNA bağlanması (GO:0035198), Düzenleyici RNA bağlanması (GO:0061980), lipid taşıyıcı aktivitesi (GO:0005319) önemli ölçüde zenginleşmiştir.

Biyolojik süreçte, en yaygın ve en zengin terimler stamen gelişimi (GO:0048443), gelişimin pozitif düzenlenmesi (GO:0045962), androcium gelişimi (GO:0048466), floral whorl gelişimi (GO:0048438), floral organ gelişimi (GO:0048437), polen gelişimi (GO:0009555) içindi. Ancak, bu alt kategoriler aşağıdaki şekillerde gösterildiği gibi karşılaştırmalarda değişiklik göstermiştir.



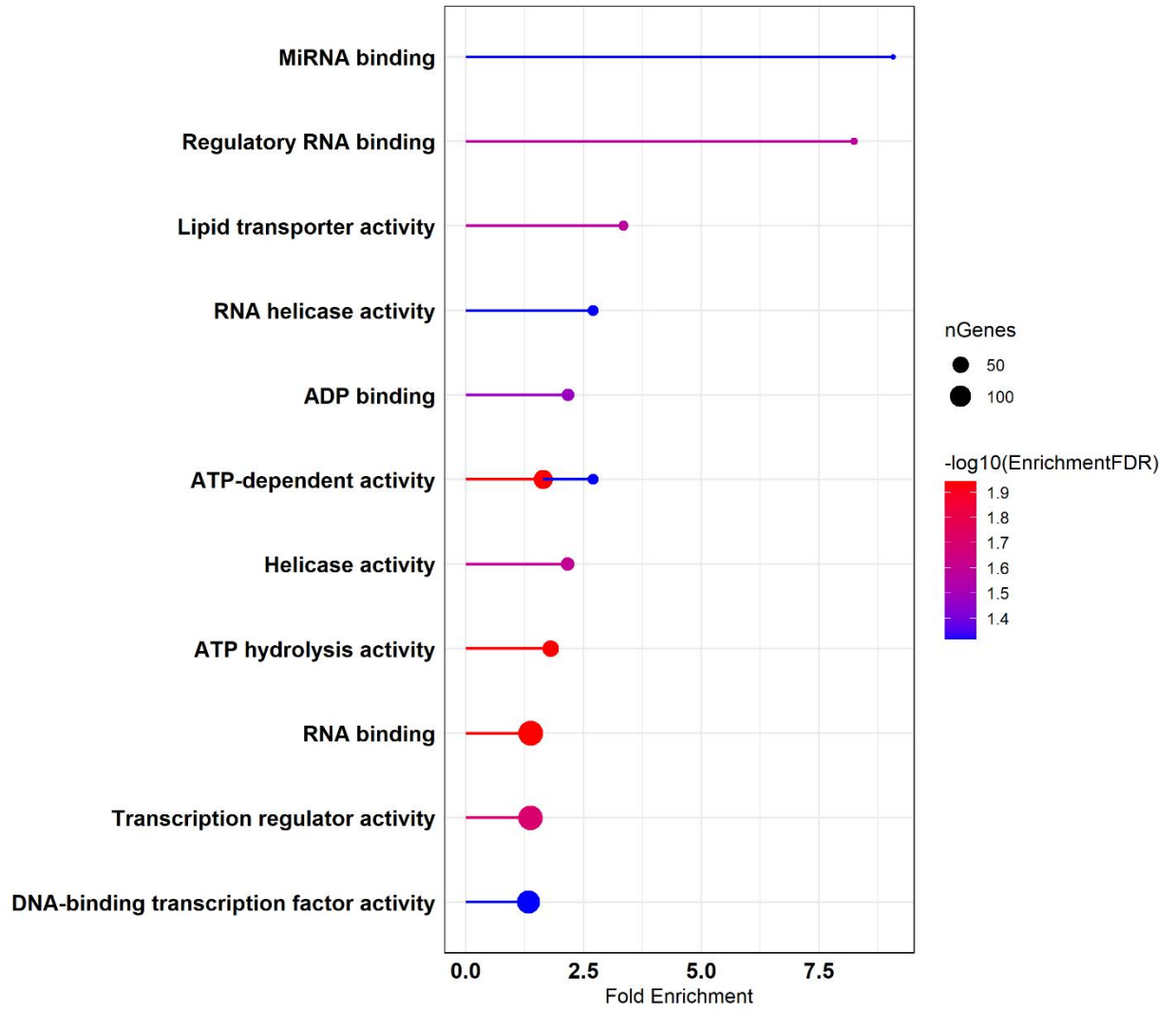
Şekil 4.12: Azot eksikliğine karşı kontrolün moleküler fonksiyon kategorisi.

Kırmızı (daha yüksek $-\log_{10}$ değerleri) istatistiksel olarak daha anlamlı zenginleşmeyi gösterir. Mavi (daha düşük $-\log_{10}$ değerleri) daha az anlamlı zenginleşmeyi gösterir. FDR parametresi 0.05 ve maksimum yol parametresi 20 olarak ayarlanmıştır.



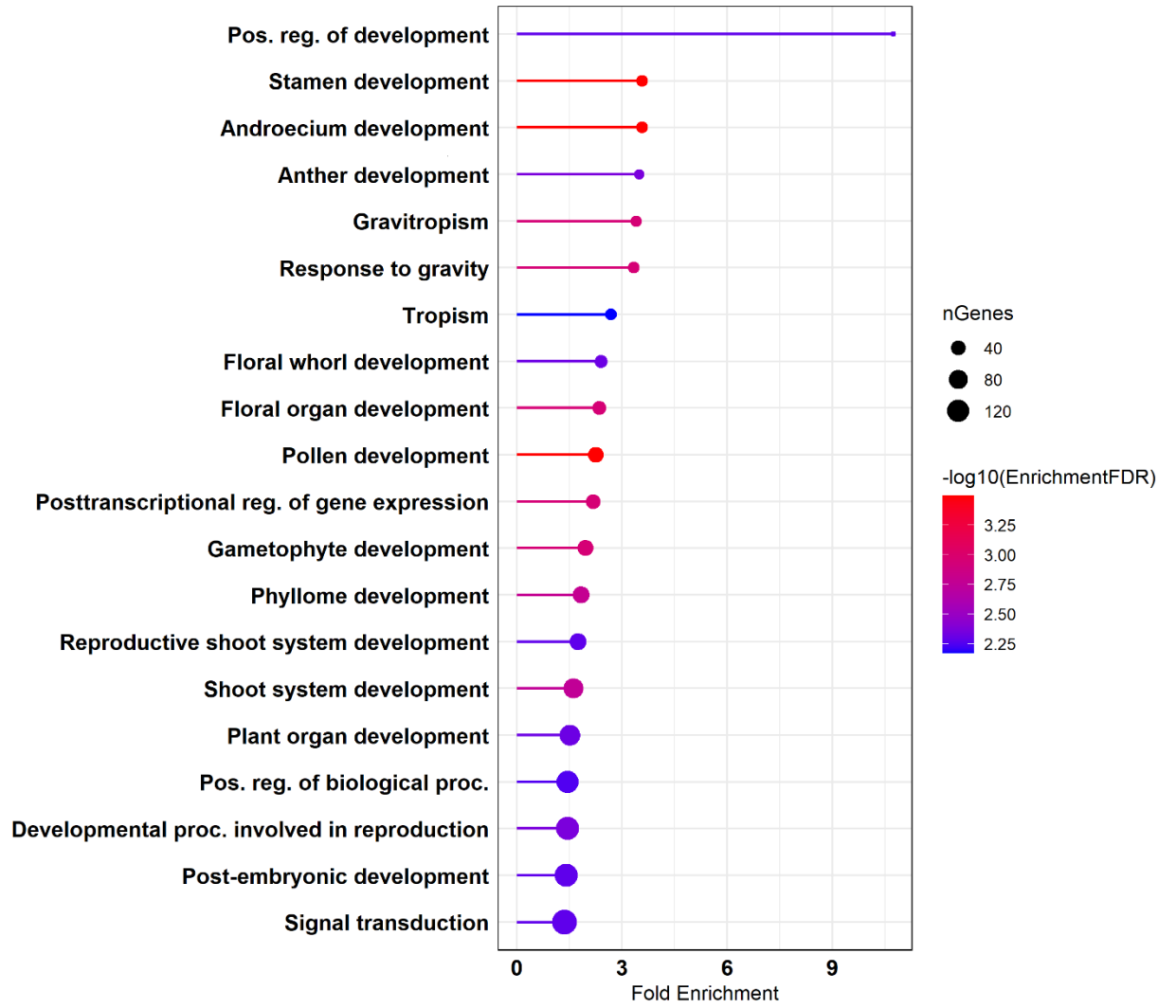
Şekil 4.13: Kuraklığa karşı moleküler fonksiyon kontrol kategorisi.

Kırmızı (daha yüksek $-\log_{10}$ değerleri) istatistiksel olarak daha anlamlı zenginleşmeyi gösterir. Mavi (daha düşük $-\log_{10}$ değerleri) daha az anlamlı zenginleşmeyi gösterir. FDR parametresi 0.05 ve maksimum yol parametresi 20 olarak ayarlanmıştır.



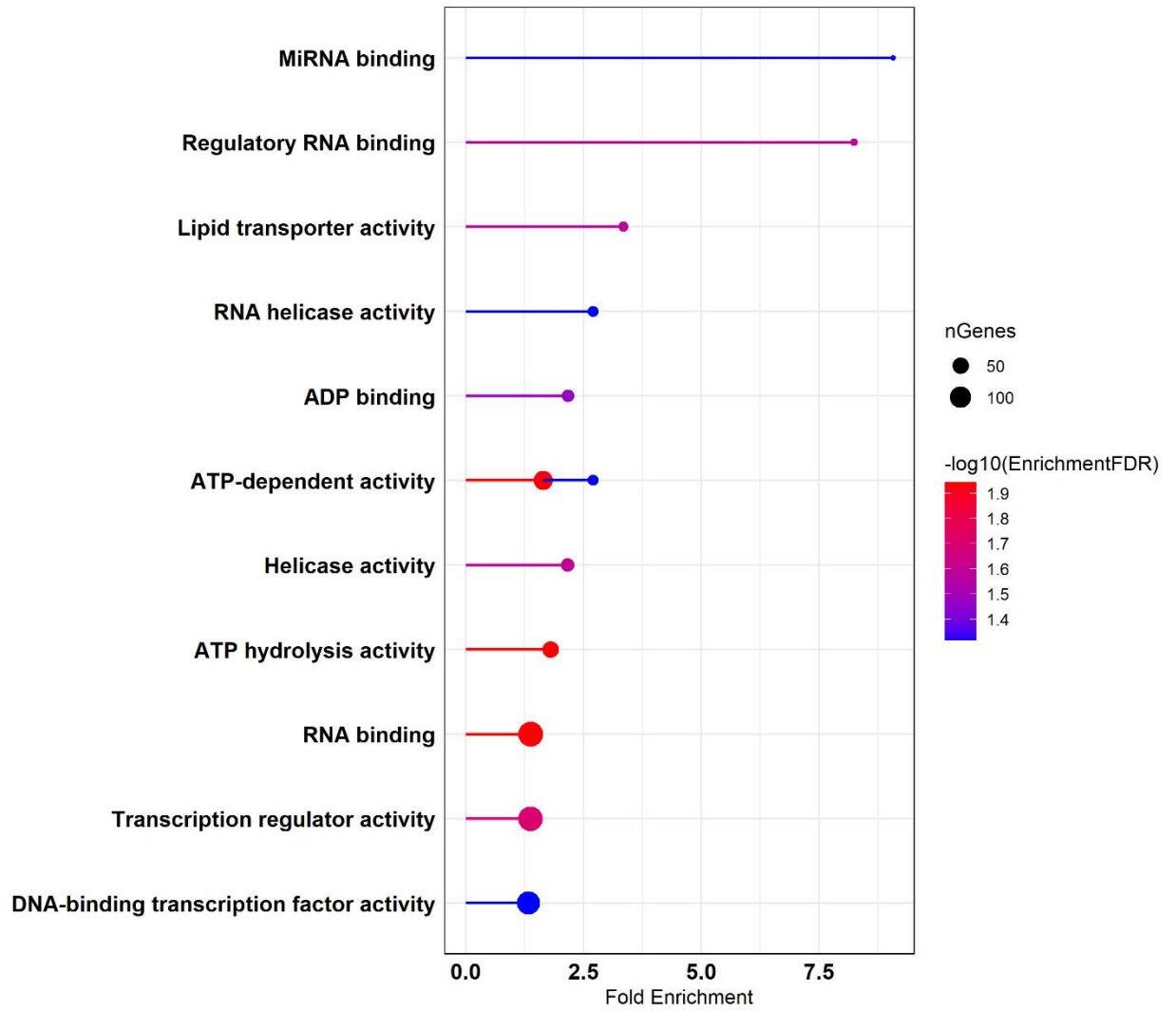
Şekil 4.14: Kontrol ve kombine moleküler fonksiyon kategorisi.

Kırmızı (daha yüksek $-\log_{10}$ değerleri) istatistiksel olarak daha anlamlı zenginleşmeyi gösterir. Mavi (daha düşük $-\log_{10}$ değerleri) daha az anlamlı zenginleşmeyi gösterir. FDR parametresi 0.05 ve maksimum yol parametresi 20 olarak ayarlanmıştır.



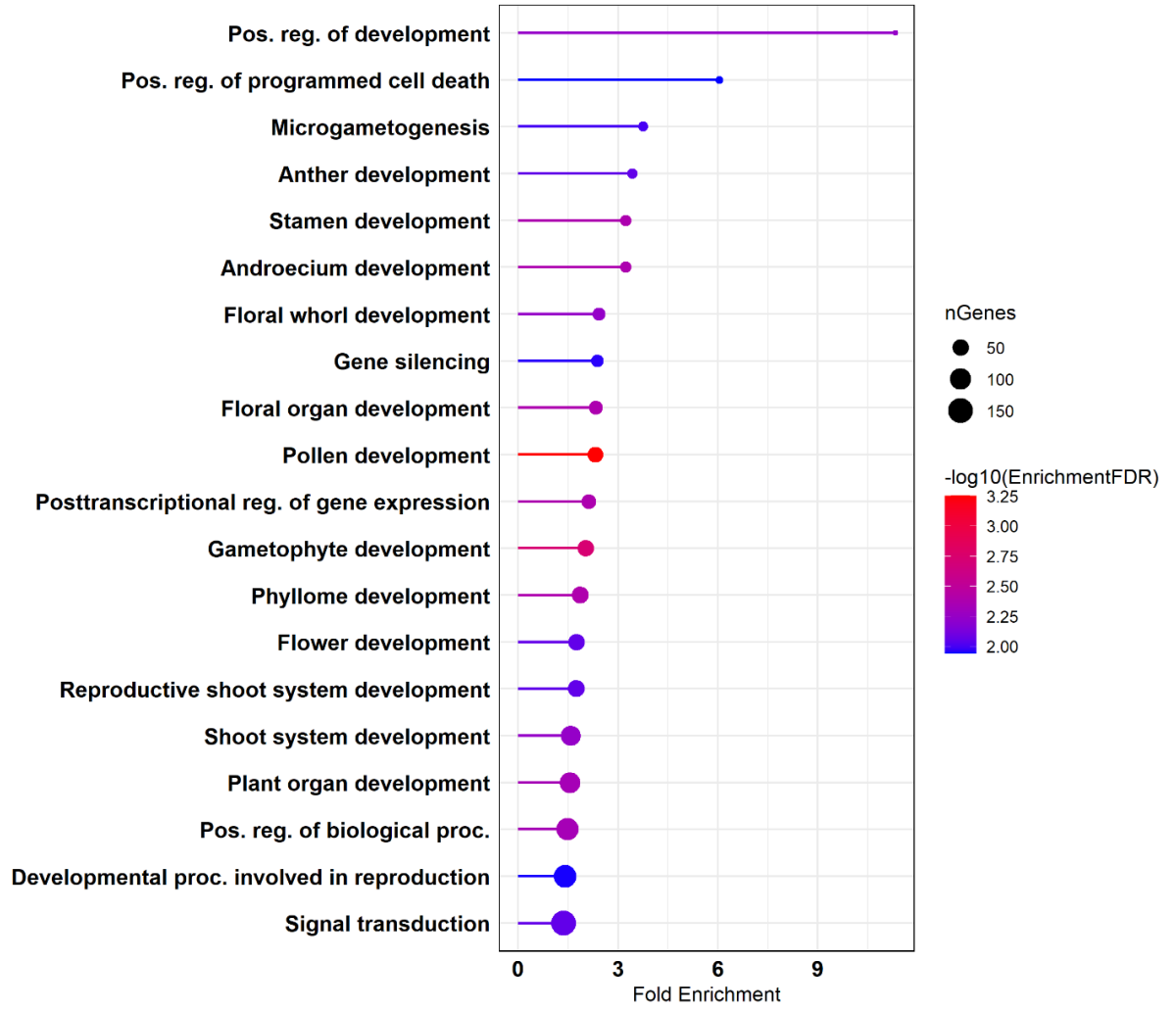
Şekil 4.15: Kuraklığa karşı biyolojik süreç kontrol kategorisi

Renk gradyanı $-\log_{10}(\text{zenginleştirme FDR})$ 'yi temsil eder, burada kırmızı daha yüksek önemi gösterir. Noktaların boyutu her bir işlevle ilişkili gen sayısını temsil eder.



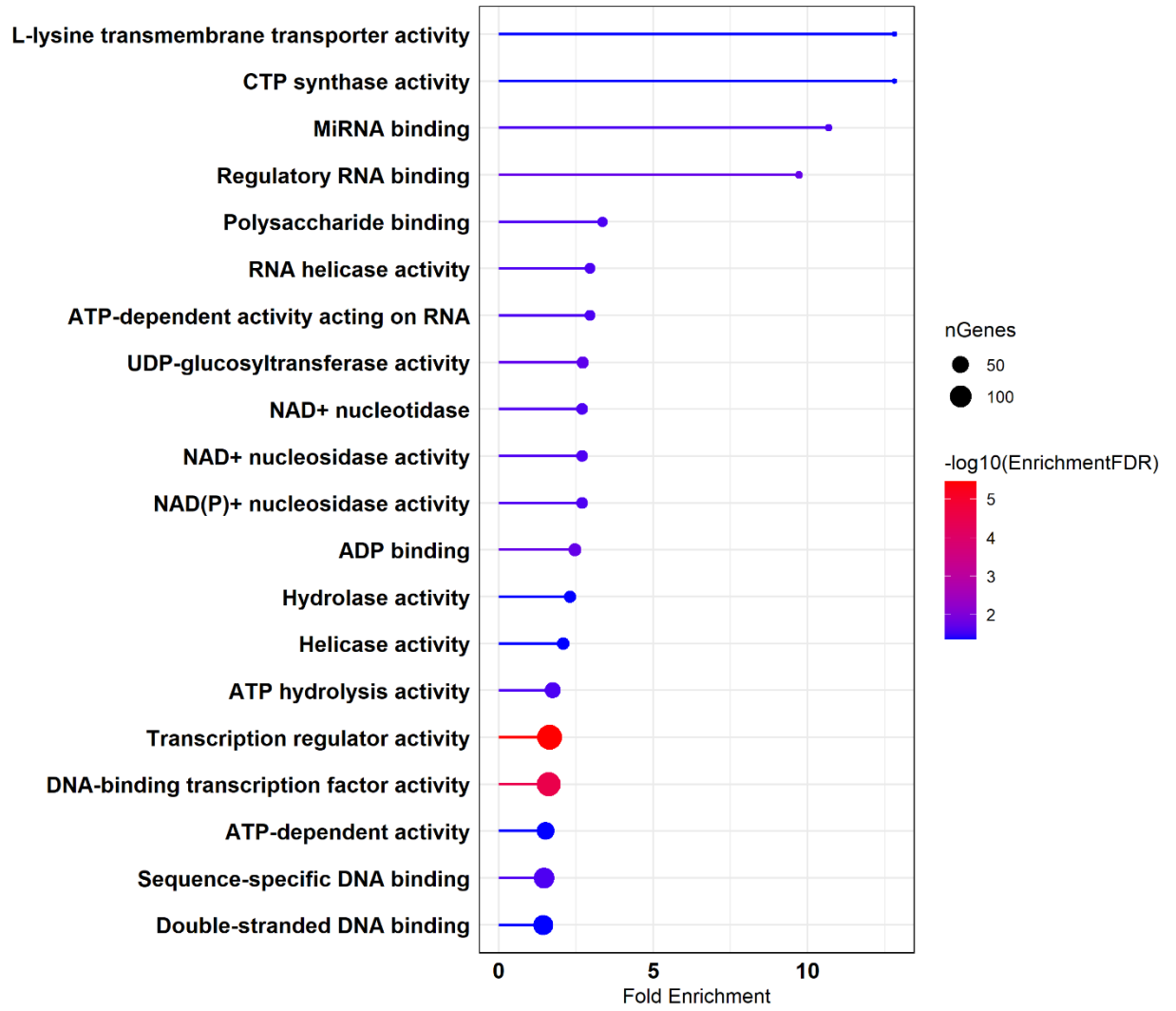
Şekil 4.16: Kontrol ve kombine moleküler kategorisi.

Kırmızı (daha yüksek $-\log_{10}$ değerleri) istatistiksel olarak daha anlamlı zenginleşmeyi gösterir. Mavi (daha düşük $-\log_{10}$ değerleri) daha az anlamlı zenginleşmeyi gösterir. FDR parametresi 0.05 ve maksimum yol parametresi 20 olarak ayarlanmıştır.



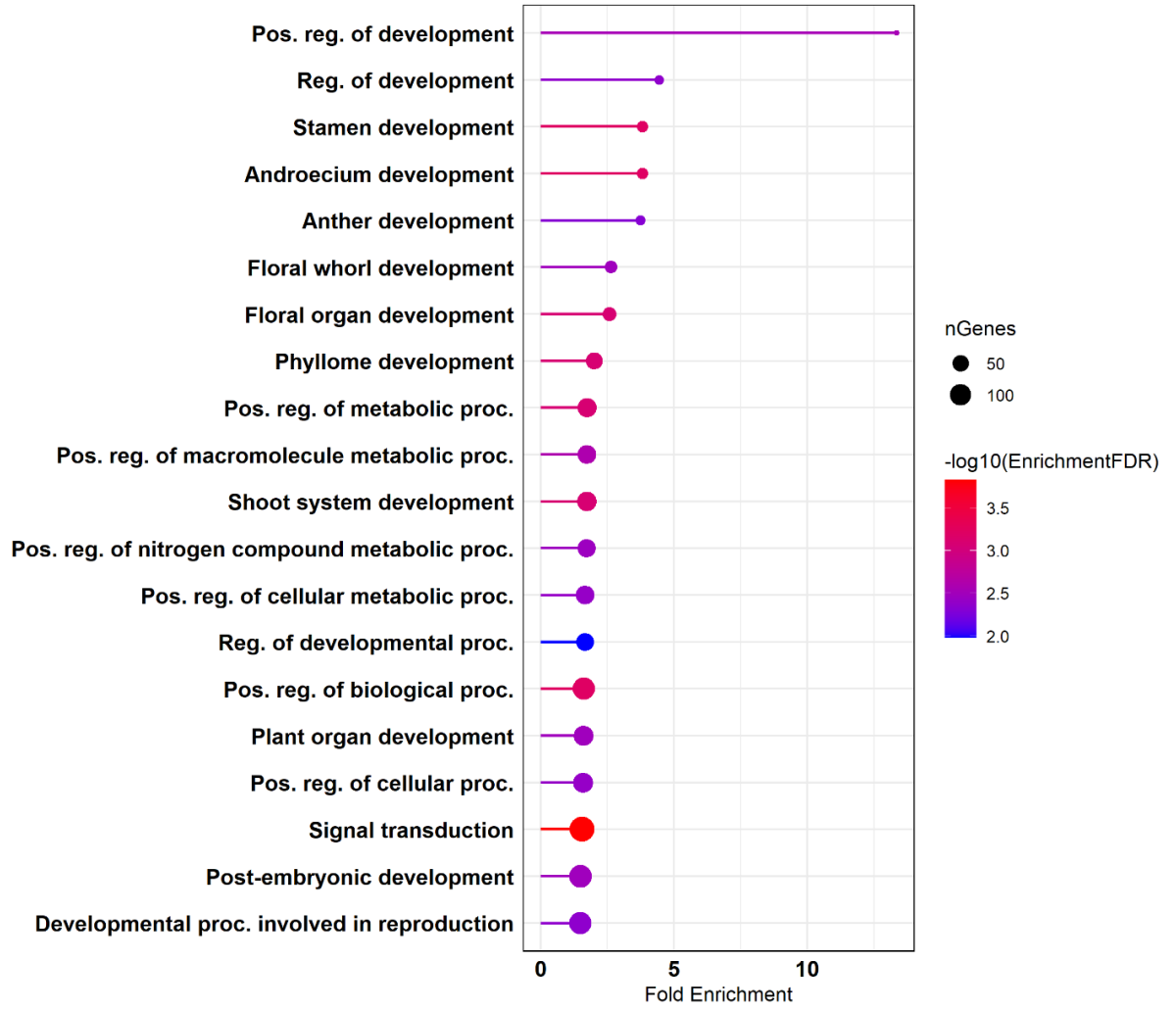
Şekil 4.17: Biyolojik süreç kontrol ve kombine kategorisi

Renk gradyanı $-\log_{10}$ (zenginleştirme FDR)'yi temsil eder, burada kırmızı daha yüksek önemi gösterir. Noktaların boyutu her bir işlevle ilişkili gen sayısını temsil eder.



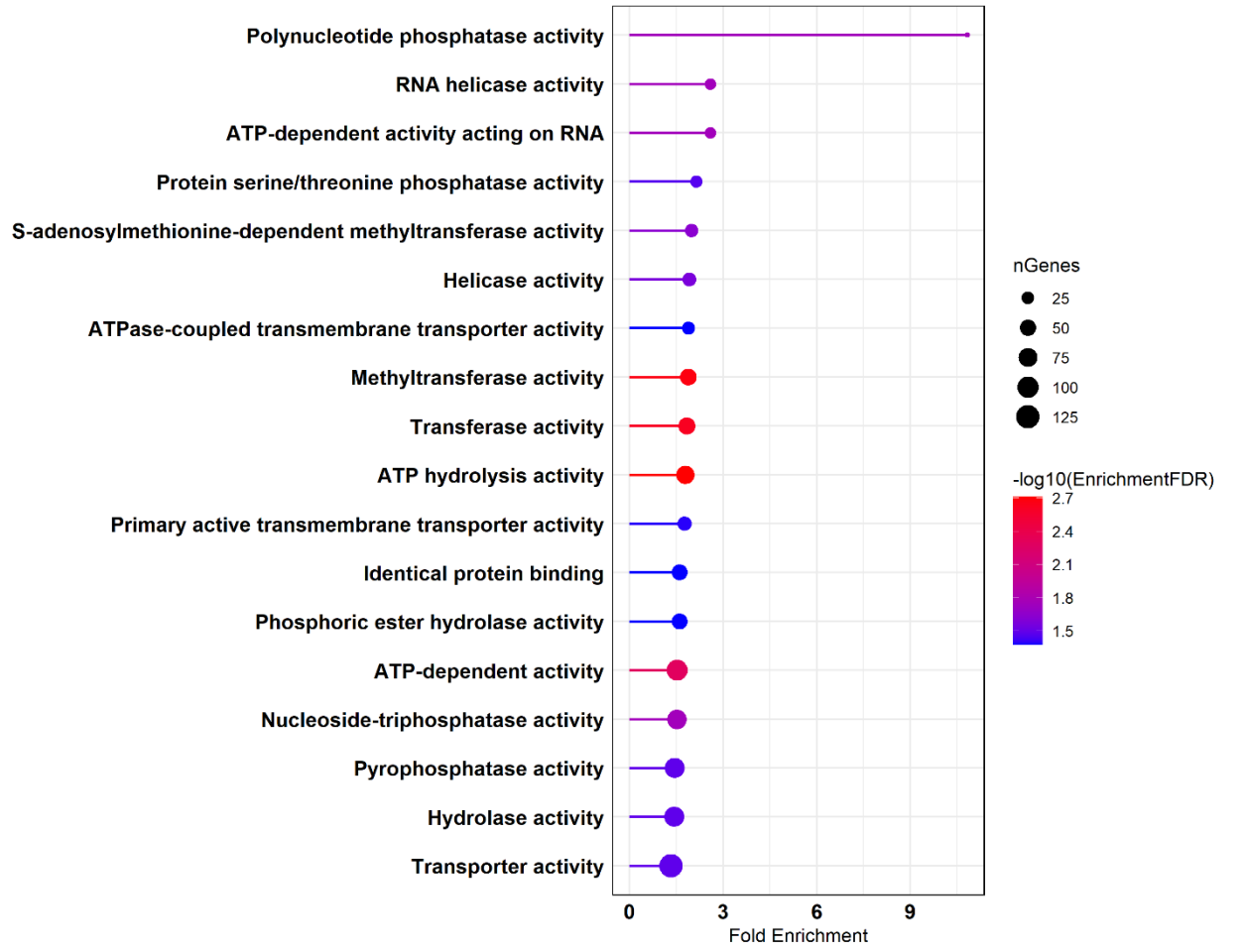
Şekil 4.18: Kuraklığa karşı azot eksikliğinin moleküler fonksiyon kategorisi.

Kırmızı (daha yüksek $-\log_{10}$ değerleri) istatistiksel olarak daha anlamlı zenginleşmeyi gösterir. Mavi (daha düşük $-\log_{10}$ değerleri) daha az anlamlı zenginleşmeyi gösterir. FDR parametresi 0.05 ve maksimum yol parametresi 20 olarak ayarlanmıştır.



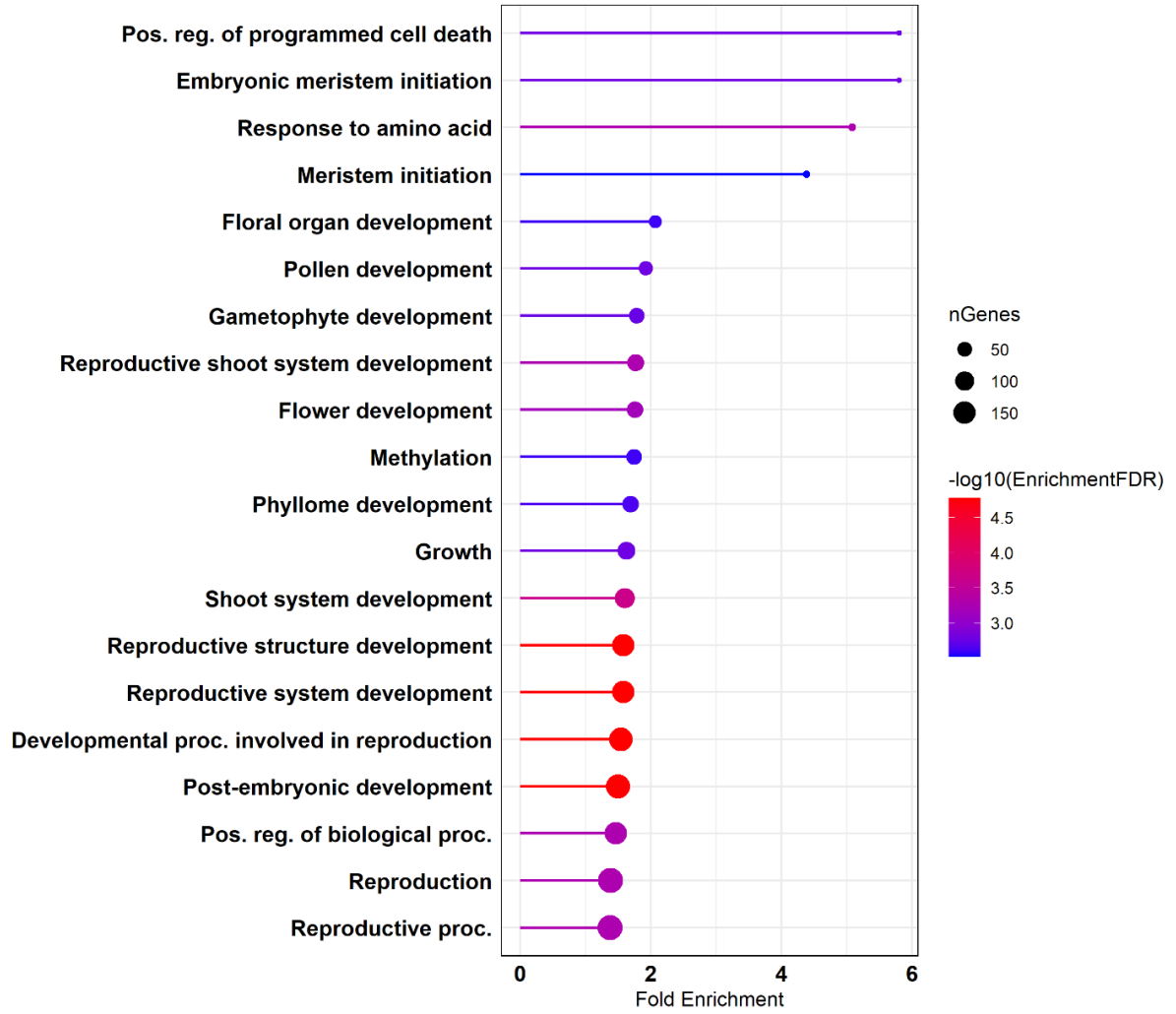
Şekil 4.19: Kuraklığa karşı azot eksikliğininbiyolojik süreç kategorisi.

Renk gradyanı $-\log_{10}$ (zenginleştirme FDR)'yi temsil eder, burada kırmızı daha yüksek önemi gösterir. Noktaların boyutu her bir işlevle ilişkili gen sayısını temsil eder.



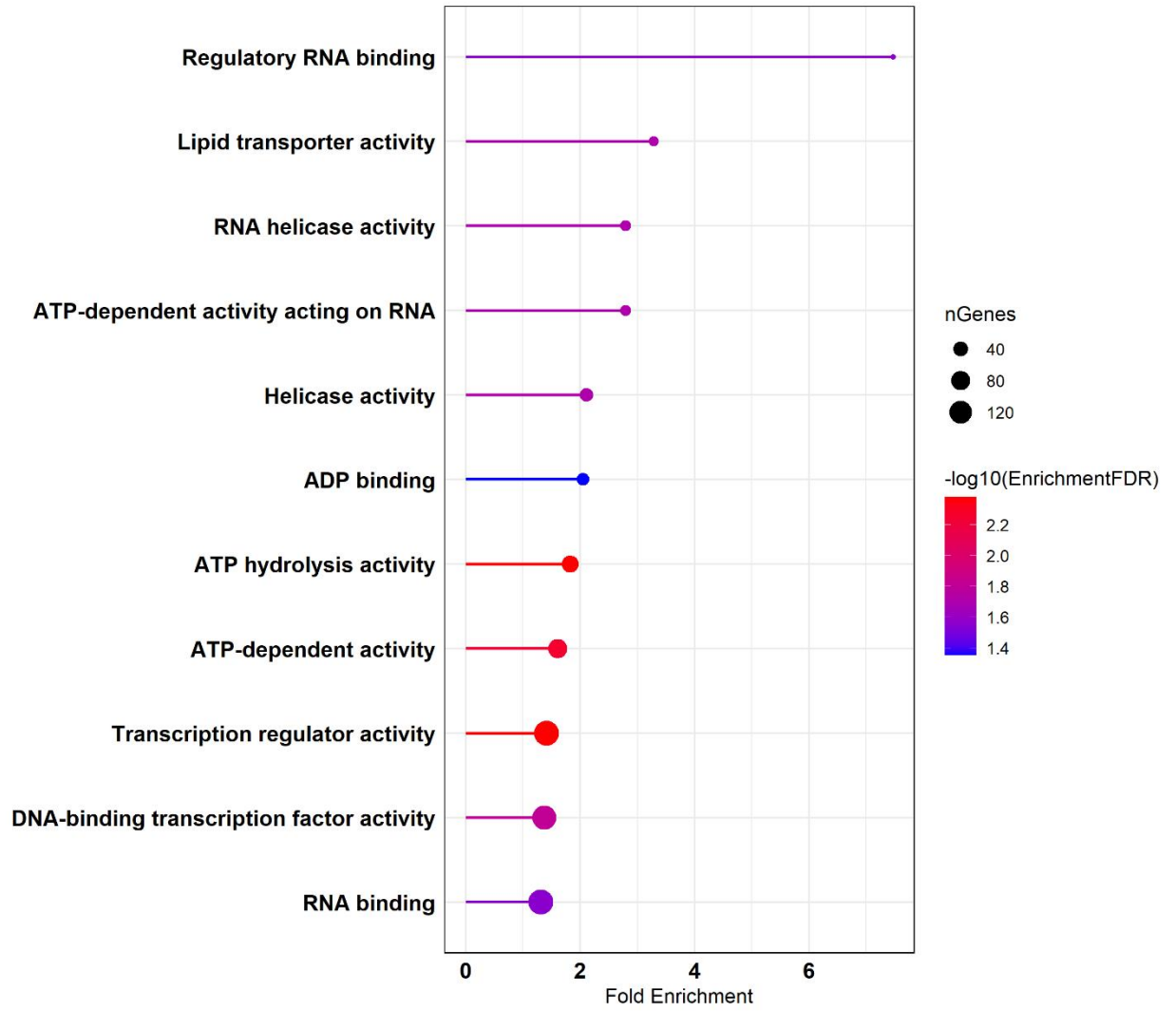
Şekil 4.20: Azot eksikliğine karşı kombine moleküler fonksiyon kategorisi.

Kırmızı (daha yüksek $-\log_{10}$ değerleri) istatistiksel olarak daha anlamlı zenginleşmeyi gösterir. Mavi (daha düşük $-\log_{10}$ değerleri) daha az anlamlı zenginleşmeyi gösterir. FDR parametresi 0.05 ve maksimum yol parametresi 20 olarak ayarlanmıştır.



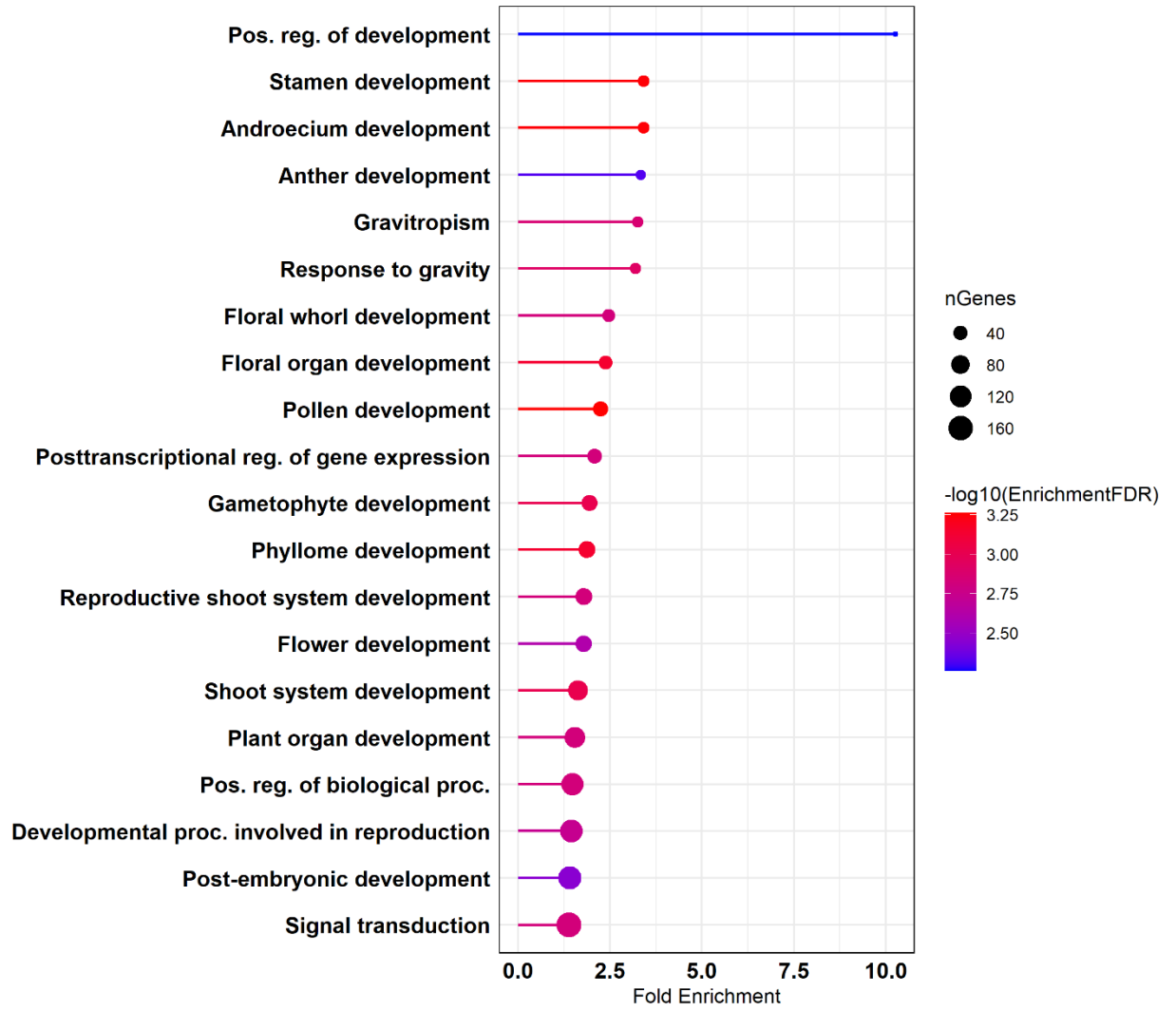
Şekil 4.21: Azot eksikliğine karşı kombine moleküler fonksiyon kategorisi.

Renk gradyanı $-\log_{10}$ (zenginleştirme FDR)'yi temsil eder, burada kırmızı daha yüksek önemi gösterir. Noktaların boyutu her bir işlevle ilişkili gen sayısını temsil eder.



Şekil 4.22: Kuraklığa karşı kombine moleküler fonksiyon kategorisi.

Kırmızı (daha yüksek $-\log_{10}$ değerleri) istatistiksel olarak daha anlamlı zenginleşmeyi gösterir. Mavi (daha düşük $-\log_{10}$ değerleri) daha az anlamlı zenginleşmeyi gösterir. FDR parametresi 0.05 ve maksimum yol parametresi 20 olarak ayarlanmıştır.



Şekil 4.23: Kuraklık ve kombine biyolojik süreci.

Renk gradyanı $-\log_{10}(\text{zenginleştirme FDR})$ 'yi temsil eder, burada kırmızı daha yüksek önemi gösterir. Noktaların boyutu her bir işlevle ilişkili gen sayısını temsil eder.

Tablo 4.10: Farklı şekilde ifade edilen miRNA'ların belirlenen hedeflerinin Gen Ontoloji analizi.

Dönem	Yolak	Kat zenginleştir	nGenler	Yolak Genleri	Gen örnekleri
GO:0098518	Polinükleotid fosfataz aktivitesi	10.16	4	5	AT3G09100.2 AT3G14890.2 AT4G36050.1 AT5G28210.1
GO:0005319	Lipid taşıyıcı aktivitesi	2.93	15	65	AT1G13170.2 AT1G13210.1 AT1G27695.1 AT1G54280.1 AT1G54350.1 AT1G68710.1 AT2G04940.1 AT2G41700.2 AT3G20320.2 AT3G47740.1 AT3G47750.1 AT3G47790.1
GO:0087880	RNA helikaz aktivitesi	2.43	18	94	AT1G20960.2 AT1G31970.1 AT1G32490.1 AT1G35530.1 AT1G48650.1 AT1G58050.1 AT1G63250.1 AT2G06990.1 AT2G42270.1 AT2G45810.1 AT3G27730.1 AT3G46960.1
GO:0181079	RNA üzerinde etkili olan ATP'ye bağlı aktivite	2.43	18	94	AT1G20960.2 AT1G31970.1 AT1G32490.1 AT1G35530.1 AT1G48650.1 AT1G58050.1 AT1G63250.1 AT2G06990.1 AT2G42270.1 AT2G45810.1 AT3G27730.1 AT3G46960.1
GO:0274278	Protein serin fosfataz aktivitesi	2.21	22	126	AT1G22280.2 AT1G48040.1 AT1G59830.1 AT1G68410.1 AT1G72770.1 AT2G20050.2 AT2G30020.1 AT2G33700.1 AT2G39840.1 AT2G40180.1 AT3G05580.1 AT3G06270.1
GO:1206268	Transkripsiyon düzenleyici aktivite	1.40	201	1823	AT1G01160.1 AT1G04240.1 AT1G06040.2 AT1G06070.1 AT1G06150.1 AT1G07640.3 AT1G09040.1 AT1G09060.2 AT1G13260.1 AT1G13300.1 AT1G14440.1 AT1G15780.1
GO:0003700	DNA-bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi	1.39	132	1670	AT1G04240.1 AT1G06040.2 AT1G06150.1 AT1G07640.3 AT1G13260.1 AT1G17590.1 AT1G18750.1 AT1G19700.2 AT1G20640.2 AT1G20710.1 AT1G27360.2 AT1G27370.4
GO:0035198	miRNA bağlanması	9.07	4	8	AT1G48410.2 AT2G27040.1 AT2G28350.1 AT4G30080.1
GO:0061980	Düzenleyici RNA bağlanması	8.24	5	11	AT1G48410.2 AT2G27040.1 AT2G28350.1 AT4G30080.1 AT5G21150.1
GO:0043531	ADP bağlanması	2.05	25	200	AT1G15890.1 AT1G31540.2 AT1G50180.1 AT1G61180.2 AT1G72860.1 AT1G72900.1 AT1G72910.1 AT1G72950.1 AT2G28350.1 AT3G12780.1 AT3G14460.1 AT3G44400.2

4.4.7. Tespit Edilen Yeni miRNA'lar

Daha önce bilinen ve korunmuş *Arabidopsis thaliana* miRNA'ları ile homoloji göstermeyen diziler yeni miRNA'lar olarak belirtilmiştir. Sonuçlarımız kontrol için 55, azot eksikliği için 68, kuraklık için 63 ve kombine stres örneği için 60 miRNA öngörmüştür.

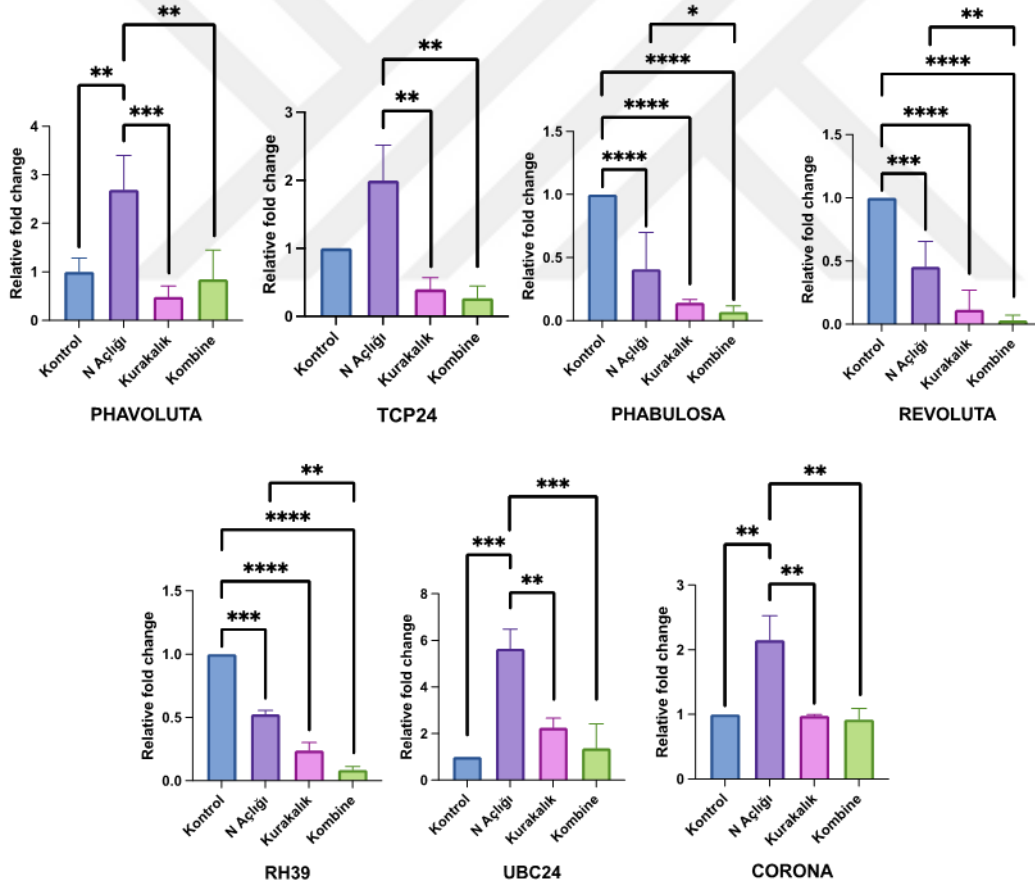
Tablo 4.11: Tahmin edilen yeni mikroRNA örneklerinin özellikleri.

miRNA kimliği	Kr	Strand	Benzersiz tanımlayıcı	Dizi (olgun)
novel_miR1A	1	-	dizi_461_x2149	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA
novel_miR2A	1	+	dizi_1032_x1195	TTTGGATTGAAGGGAGCTCT
novel_miR3A	5	-	dizi_158013_x15	ACAAAATCCGTCTTTGAAGA
novel_miR4A	5	+	dizi_26858_x79	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
novel_miR5A	5	-	dizi_7578_x294	TCGATAAACCTCTGCATCCAG
novel_miR6A	5	-	dizi_26858_x79	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
novel_miR7A	5	-	dizi_7578_x294	TCGATAAACCTCTGCATCCAG
novel_miR8A	5	-	dizi_37092_x49	TGTGCAAATGCTTTCTACAGG
novel_miR9A	1	-	dizi_25028_x115	TCGGACCAGGCTTCATCCCCC
novel_miR1B	1	+	dizi_135040_x20	TTGGCATTCTGTCCACCTCC
novel_miR2B	4	+	dizi_314_x953	TTGTTGATCTCAATAGCATTG
novel_miR3B	4	+	dizi_58006_x131	TGCCTGGCTCCCTGTATGCC
novel_miR4B	4	+	dizi_9609_x65	TAGTCCGGTTTGGATACGTG
novel_miR5B	4	+	dizi_385_x901	TTGGACTGAAGGGAGCTCCCTC
novel_miR6B	1	+	dizi_70697_x12	TTTTCGATGTCTAGCAGTGCC
novel_miR7B	4	+	dizi_11394_x376	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
novel_miR8B	5	+	dizi_343_x2139	TTCCACAGCTTTCTTGAAGT
novel_miR9B	5	+	dizi_8836_x582	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC
novel_miR1C	1	-	dizi_3746_x1759	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA
novel_miR2C	5	-	dizi_27538_x128	CCCGTCTTGTATCAACTGAA
novel_miR3C	5	-	dizi_4530_x265	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC
novel_miR4C	5	-	dizi_14892_x121	TTGGACTGAAGGGAGCTCCCT
novel_miR5C	5	-	dizi_54399_x26	ACAAAATCCGTCTTTGAAGA
novel_miR6C	5	-	dizi_6174_x673	TCGATAAACCTCTGCATCCAG
novel_miR7C	5	-	dizi_57347_x9	TTGGCTGATTCTATTATTTTG
novel_miR8C	5	-	dizi_27175_x199	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
novel_miR9C	5	-	dizi_6174_x673	TCGATAAACCTCTGCATCCAG
novel_miR1D	1	+	dizi_1608_x4171	TTCAAGGACTTCTATTGAGA
novel_miR2D	1	-	dizi_98139_x39	ACTTTGAAGCTTTGATTGAA
novel_miR3D	4	+	dizi_11141_x402	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
novel_miR4D	5	+	dizi_2393_x706	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC
novel_miR5D	5	+	dizi_121843_x15	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC
novel_miR6D	5	+	dizi_2393_x706	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC
novel_miR7D	5	-	dizi_176_x5224	GGGGATGTAGCTCAGATGGT
novel_miR8D	5	-	dizi_31470_x95	TGCCTGGCTCCCTGTATGCC
novel_miR9D	1	+	seq_10818_x1609	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTT

kr: kromosome

4.5. Bazı miRNA Hedeflerinin Anlatım analizi

Çeşitli stres koşulları altında hedef genlerin analizi, birkaç genin (PHAVOLUTA, TCP24, PHABULOSA, REVOLUTA, RH39, CORONA ve UBC24) düzenleyici tepkileri hakkında aydınlatıcı bulgular sağlamıştır. Dört genin tamamı temel lörin fermuar transkripsiyon alanı (HD-Zip III) tarafından kodlanmaktadır: PHAVOLUTA, PHABULOSA, REVOLUTA, CORONA tüm stres koşullarına dahil olmuştur. Sonuçlar, PHABULOSA ve REVOLUTA genlerinin azot eksikliği, kuraklık ve kombine stres koşullarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalan ifade seviyeleri gösterdiğini ortaya koymuştur. Öte yandan, PHAVOLUTA ve CORONA genleri azot eksikliği koşullarında anlamlı bir artış sergilerken, PHAVOLUTA geni kuraklık ve kombine stres koşullarında azalan bir ifade düzeyi göstermiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: *A.thaliana* genlerin rölatif anlatım düzeyleri.

Değerler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. kontrol grubunun katlanma değişimi 1 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık ANOVA ve Tukey testleri ile hesaplanmıştır. p değeri 0,0332'den küçük olan değerler anlamlı kabul edilmiştir. (p değerleri: * <0,0332; ** <0,0021; *** <0,0002; **** <0,0001).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

miRNA'lar *Arabidopsis thaliana*'da gen ifadesinin düzenleyicileri olarak, özellikle kuraklık ve azot eksikliği gibi abiyotik streslere yanıt olarak hayati rol oynamaktadır [38,121]. Bu tezin temel amacı, birleşik stres koşulları altında farklı şekilde ifade edilen miRNA'ları ve hedef genlerini belirlemek ve birleşik stres tepkisinde yer alan biyolojik süreçleri sınıflandırmak ve karakterize etmek için gen ontoloji analizini kullanmaktır. Farklı stress koşullarına odaklanılmış tek bir çalışma kapsamında değerlendirilmiştir; Toplam 18 miRNA, bitkilerdeki azot eksikliği stres tepkileri ile ilişkilendirilmiştir [122]. Yousof [123] bir derlemede 70'in üzerinde miRNA'nın bitki azot açlığındaki rolünü özetlemiştir. Benzer şekilde, kuraklık stresindeki çalışmaların çoğu tahıl [14], buğday [20,124] ve pirinç [125] gibi diğer bitkilerde gerçekleştirilmiştir. *Arabidopsis*'te kombine azot eksikliği ve kuraklık stresinin etkisini karakterize eden çok az çalışma vardır. *Arabidopsis Col 0* kullanılarak RNA dizilimi ile gerçekleştirilen bu çalışmada, azot eksikliği için 322, kuraklık için 329 ve kombine stres durumu için 324 miRNA bulunmuştur. Ek olarak, 178 miRNA kombine azot eksikliği ve kuraklık stresi koşullarında yaygın olarak gözlemlenmiştir. Kombine azot eksikliği ve kuraklık stresine verilen yanıt, farklı *Arabidopsis* aksesyonları arasında önemli ölçüde değişebilir. Xue ve meslektaşları [126] *Arabidopsis*'in genetik olarak farklı 5 erişim numarası'nda değişkenlik göstermiştir. Transkriptomik ve metabolomik profillemeye kullanarak düşük azot için 228, kuraklık için 1376 DEG ve kombine stres için 1008 DEG elde etmişlerdir. Bu durum, miRNA aracılı stres tepkilerinin kapsamını ve doğasını belirlemede genetik faktörlerin önemini vurgulamaktadır [126].

Bu tez çalışmasında farklı şekilde ifade edilen miRNA'lar arasında miR156a, miR156b, miR156f, miR157a, miR157c, miR158a, miR159a, miR159c, miR165b, miR166e, kombine stres koşullarında yaygın olarak ifade edilmiştir. Bunların çoğunluğunun *Arabidopsis* ve *Oryza sativa* bitki türleri arasında korunduğu daha önce bildirilmiştir [127,128]. Bu miRNA'ların kombine karmaşık tepkilere aracılık etme kabiliyeti, çoklu stres faktörlerine karşı daha fazla dayanıklılığa sahip biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen için hedef olarak potansiyellerini vurgulamaktadır [21]. Kombine stres koşulları altında miR156f, miR157a, miR158a, miR157c, miR166e, tek bir stres koşulu dikkate alındığında (azot eksikliğinde miR157b ve miR158b ve kuraklık uygulamasında miR162a, miR157b, miR156f) daha düşük ifadenin aksine önemli ölçüde anlatımları artmıştır.

Azot eksikliği ve kuraklık stresi altında miR156a ve miR156b'nin anlatımı azalan, gelişimsel süreçleri değiştirerek büyümeden ziyade hayatta kalmaya öncelik vererek kaynak tahsisinde potansiyel bir değişime işaret edebilir [38,129]. Literatürde, miR156'nın çeşitli bitkisel biyolojik süreçlerde ve stres tepkilerinde hayati bir mikroRNA olarak sınıflandırıldığı bildirilmiştir [130]. Ayrıca bitkilerde juvenil evreden yetişkin evreye geçişte rol oynar ve ifadesi çevresel ipuçları tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir [131]. Chen ve diğ [132] göre, *Arabidopsis*'te miR156'nın aşırı ekspresyonu, kök mimarisini modüle ederek ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) atılmasına yardımcı olan flavonoid sentezini teşvik ederek kuraklık toleransının artmasına neden olmuş ve miR156'nın kuraklık stresi adaptasyonunda olumlu bir rol oynadığını göstermiştir. Benzer şekilde [133], *Arabidopsis*'te miR156 tarafından hedeflenen kuraklığa duyarlı genleri tanımlayarak, kuraklık stresi sinyal yollarındaki düzenleyici rolünü göstermiştir. Soya fasulyesinde, miR156 ailesinin üyeleri kuraklık stresine yanıt olarak anlatımı artan edilmiştir [134]. Çay bitkilerinde (*Camellia sinensis*) [135], miR156'nın kuraklık stresi tarafından aktive edilen düzenleyici yollara dahil olduğunu da göstermiştir. *Arabidopsis* 'te miR156f ve miR156j'yi özellikle azot eksikliğine bağlayan sınırlı araştırmaya rağmen, çalışmalar miR156'nın mısırdaki azot mevcudiyetine duyarlı olduğunu ortaya koymuş ve azot metabolizmasında potansiyel bir rol olduğunu düşündürmüştür [136,137]. Bu çalışma, miR156f'nin azot eksikliği koşullarında ekspresyonunun azaldığını, kuraklık ve kombine stres koşullarında ise arttığını bildirmiştir.

miR157b, kuraklık için yüksek bir kat değişikliği ile tüm stres koşullarında anlatımı artmıştır. Kavun tohumlarında, Squamosa Promoter Bağlayıcı Protein Benzeri transkripsiyon faktörlerini hedef alan miR157, birleşik streslere katkısız olmayan bir yanıt sergiledi. miR157, bireysel stresler altında gözlemlenen yanıtları geliştirmek yerine, eş zamanlı stres koşulları altında bitki yanıtlarını düzenleyen karmaşık bir düzenleyici ağa katkıda bulunabilir [138].

Mikroarray analizi, *Arabidopsis* 'te kuraklık stresinde anlatımı artan diğerleri miRNAların yanı sıra miR158, miR159, miR165, miR167, miR168, miR169, miR171'i tanımlamıştır [139]. Kullanılan farklı deneysel teknikler, bu çalışmada miR158 ve miR159'un azalan anlatımı açıklayabilir. miR159 ifadesi kuraklık koşulları altında indüklenir ve böylece hedef geni olan MYB33'ü negatif olarak düzenler [140]. Liang [141] tarafından yapılan bir çalışmada, *Arabidopsis* köklerinde azot eksikliği altında miR165'in ifadesi artmıştır. Bu durum miR160 [142] için de benzerdir ve azot metabolizmasında veya besin stresi tepkilerinde potansiyel bir

rolü olduğunu düşündürmektedir. Pirinç [19] ve mısır [143] gibi diğer bitkilerde miR166 kuraklık stresine yanıt olarak farklı şekilde ifade edilmiştir. Yaşar ve diğ., kallus dokularının kombine azot eksikliği ve kuraklık stresi koşulları altında 7 ve 14 günlük uygulamadan sonra miR165a-3p'nin önemli ölçüde anlatımının azaldığını bildirmiş ve hedefinin ekspresyonunu modüle ederek strese uzun vadeli adaptasyon önermektedir [38].

Bu çalışmada, miRNA'ların farklı stres koşullarına maruz kaldıklarında farklı ekspresyon seviyeleri gösterdiği gözlemlenmiştir. Kombine stres koşullarında ekspresyonu önemli ölçüde artan miR160c (7,49 log₂ kat değişim), kuraklık stresinde ise önemli ölçüde azalmıştır (-6,87 log₂ kat değişim). Benzer şekilde, miR160a'nın kuraklıkta anlatımı artmış ve kombine streste anlatımı azalmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçların aksine, Fischer ve diğ. [144] azot eksikliği altında miR160 hedeflerinin anlatımının arttığını kaydetmiştir. Azot eksikliği ve kuraklık stresi altında miR160a ve miR160b'nin önemli ölçüde anlatımı azalan, bu streslere yanıt olarak düzenleyici aktivitelerinin baskılanması anlamına gelebilir. Bu durum, miR156d'nin kombine streste anlatımı artmış olması (7,49 log₂ kat değişim) ancak azot eksikliğinde anlatımının azalmış olması (-2,68 log₂ kat değişim) ile aynıdır. İlginç bir şekilde, aynı miRNA ailesinin üyeleri bile uygulamalar içinde farklı ifade modelleri sergilemiştir. Gurtan ve Rani ve diğ. göre [145,146], bunun nedeni farklı transkripsiyon faktörleri veya sinyal yolları tarafından düzenlenmeleridir. miR157a, SPL13, NAC, ATHB-5, TCP2, MYB57, ATRH25, RLP9, PRR8 ve bZIP transkripsiyon faktör ailesi proteini gibi hedef genlerle birlikte kombine stres koşullarında ekspresyonu artan bir miRNA olarak belirlenmiştir. Öte yandan, miR157b izoformunun ekspresyonu yalnızca kuraklık koşullarında artmıştır. Tanımlanan tüm miRNA'ların en az 50 hedef geni olduğu saptanmıştır. Farklı protein alanlarını kodlayan diğer miRNA'ların aksine, miR156j yalnızca Squamosa promotor bağlayıcı protein benzeri (SPL) genlerine özgüdür (Tablo 3).

Bu çalışmada, miR159 ailesinin MYB domainleri 33, 65,81,97,101,104 ve 120, TCP transkripsiyon faktörü 4, TCP2, PCF 24, k-box ve MADS box transkripsiyon faktörü ailesi, protein kinaz C benzeri çinko parmak proteini, homeodomain benzeri süper aile proteini, mitokondriyal iç membran translokaz kompleksi, aktin ile ilgili protein C3 bitki düzenleyicisi RWP-RK ailesi proteini ve diğer bazı proteinleri hedeflediği ortaya konmuştur (Tablo S1). Bu arada miR158b, MYB domain protein 16, Fosfata duyarlı 1 aile proteini, remorin aile proteini, MYST ailesinin histon asetiltransferaz 1, flavin-monooksijenaz glukozinolat S-oksijenaz 2,

FYVE çinko parmak domainli kromozom kondensasyonunun düzenleyicisi (RCC1) ailesini hedefler. Alt aileler; miR160a ve miR160b, bitki büyümesi, gelişimi ve stres adaptasyonunda önemli roller oynayan oksin sinyal yanıtında yer alır [147,148]. Bu miRNA'ların ekspresyonundaki azalma, büyüme uyarımı yerine stres direncine öncelik vererek oksinle ilgili yolların yeniden düzenlendiğini gösterebilir. ARF10 ve ARF17, *Arabidopsis* 'te miR160'ın spesifik hedefleridir [149,150] ve muhtemelen transkripsiyonel baskılama ve hormon sinyallemede işlev görürler [151,152]. ARF10 ve ARF17 ile birlikte, daha önce rapor edilmemiş başka bir -ARF16 bu çalışmada tanımlandı. ARF genlerinin 5p türevi miRNA'lar tarafından hedeflendiğini, özellikle miR160c-5p'nin iplikçik spesifik hedeflemeyi önerdiğini ortaya koymuştur. miR157b, azot eksikliği ve kuraklığa yanıt olarak ayrı ayrı anlatımı artmış, ifadesi kombine stres bağlamında farklı şekilde modüle edilmiştir. Stres sinyal yolları arasındaki çapraz etkileşim, miRNA'ların ifade modellerini etkileyen sinerjik veya antagonistik etkileşimlerle sonuçlanabilir [153]. 'Crosstalk', bitkilerde eş zamanlı gelişim süreci ve stres tepkilerinde (hem abiyotik hem de biyotik) yer alan çoklu sinyal yollarının etkileşimidir [16,49,148]. miRNA'lar hormonal sinyal yollarının temel bileşenleri ile etkileşime girerek bitkilerin hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı tepkilerini dengelemelerini sağlar. Örneğin, miR166/165 ailesi, çeşitli fitohormonlar tarafından da modüle edilen HD-ZIP III genlerini hedefleyerek kök büyümesini düzenler [154]. miR398, çeşitli stres yollarında ortak bir sinyal molekülü olan reaktif oksijen türlerinin seviyelerini modüle ederek hem oksidatif strese hem de patojen enfeksiyonuna tepkileri düzenler [17]. miR159, ABA sinyalini (kuraklık stresinde rol oynar) etkiler ve aynı zamanda patojen savunmasını da etkileyebilir, bu da çatışan stresler arasındaki tepkileri dengelemedeki rolünü gösterir [155]. Benzer şekilde miR156 ve miR160, oksin ve jasmonik asit sinyalizasyonunda yer alan transkripsiyon faktörlerini hedef alarak bitkilerin kombine stresler altında büyüme ve stres tepkilerini ayarlamalarına olanak tanır [148].

Gen Ontoloji analizi aşağıdaki zenginleştirilmiş süreçleri ortaya çıkarmıştır: Transkripsiyon düzenleyici aktivite (GO:0140110), DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi (GO:0003700), RNA helikaz aktivitesi (GO:0003724). ATP bağımlı aktivite (GO:0140657). Hem DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesinin hem de transkripsiyon düzenleyici aktivitesinin önemli ölçüde zenginleşmesi, tanımlanan DEG'lerin doğrudan DNA'ya bağlanan ve hedef genlerin transkripsiyonunu modüle eden transkripsiyon faktörlerini ve diğer düzenleyici proteinleri içerdiğini göstermektedir. Bu faktörler ve diğer RNA/DNA bağlayıcı

proteinler, düzenleyici ağlarda kilit düğümler olarak işlev görür, strese duyarlı genlerin ifadesini düzenler ve strese karşı uyarlanabilir tepkileri koordine eder [156]. RNA-bağlayıcı proteinler (RBP'ler) miRNA biyogenezi ve regülasyonunun merkezinde yer alır ve stres koşulları altında gen ekspresyonunu etkileyen miRNA'ların modifiye edilmesinde rol oynar. Spesifik olarak, RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler), mikroRNA (miRNA) biyogenezi, döngüsünü ve hücrel lokalizasyonunu düzenleyerek bitkinin birleşik azot eksikliği ve kuraklık koşullarına verdiği yanıtları hassas bir şekilde modüle eder ve bu süreçte hücrel homeostazın korunmasını sağlamak amacıyla enerji kullanımını ve kaynak tahsisini optimize eder [157,158]. Zenginleştirme analizine göre, 138 gen kombine stres uygulamasında transkripsiyon düzenleyici aktivite ile ilişkilendirilmiştir. [Transkripsiyon faktör genlerinden bazıları; SPL (Squamosa Promoter Binding Protein-Like), MYB (Myeloblastosis) ailesi, Homeodomain benzeri süper aile proteini, Çinko Parmak ailesi, AP2/ERF (APETALA2/Etilen Tepki Faktörü) ailesi ile kuraklık uygulamasına özgü DREB/CBF (Dehydration-Responsive Element-Binding/C-repeat Binding Factor) ailesi. NAC (No Apical Meristem) domain transkripsiyonel düzenleyici süper aile proteini, basic helix-loop-helix (bHLH), Mannose-binding lectin süper aile proteini [16]. Absisik asit sinyalizasyonunda yer alan transkripsiyon faktörlerinin azot metabolizması ve nitrat sinyallerine verilen yanıtlar üzerinde etkisi vardır [4]. Kombine kuraklık ve azot stresi koşullarında, polinükleotid fosfataz aktivitesi, RNA üzerinde etkili ATP bağımlı aktivite, RNA helikaz aktivitesi zenginleşmiştir. Polinükleotid fosfatazlar, hedeflenen defosforilasyon olayları yoluyla kodlamayan RNA'lar gibi belirli RNA moleküllerinin stabilitesini veya işlenmesini etkileyerek gen ifadesini modüle edebilir [159]. Bu çalışmada tanımlanan hedef proteinler arasında fosfodiesteraz, APE2 ve mRNA kapama enzim ailesine ait proteinler yer almaktaydı. ATPazlar kuraklık koşullarında ozmotik düzenlemede işlev görür [160]. RNA helikaz, stres koşulları altında DNA/RNA metabolizmasını düzenler [161]. RNA helikaz aktivitesi ve ATP'ye bağlı mekanizmalar, mevcut enerji kaynaklarına dayalı olarak transkripsiyon ve protein sentezi süreçlerini modüle ederek hücrenin adaptasyonunu kolaylaştırır [160,162]. Bitki lipit metabolizmasında, taşıyıcılar özellikle kuraklık stresi altında membran stabilitesinde rol oynar, çünkü hücrel membranlar ozmotik değişikliklere dayanmak için spesifik lipit bileşimlerine ihtiyaç duyar, enerji yoğun süreçlerde ATP hidrolizini düzenleyen ADP ve ATP bağlayıcı proteinler aracılığıyla besin tahsisini ve hücrel enerjiyi yönetir [158,163]. Lizin Histidin Taşıyıcı 1 gibi L-lizin taşıyıcıları,

lizinin ve histidine özgü yüksek afiniteli bir taşıyıcıdır ve amino asit alımı ve azot kullanım verimliliğinde önemli bir rol oynar [164].

Biyolojik süreçlerden pozitif gelişim düzenlemesi (kat zenginleşmesi: 11,33) kombine stres uygulaması altında anlamlı düzeyde zenginleşmiştir. Yüksek zenginleşme, topraktaki su ve besin maddelerine erişim için çok önemli olan kök büyümesini ve yaprak genişlemesini artırarak stres koşulları sırasında kaynak kullanımını optimize eden bir mekanizma olabilir [165]. Programlı hücre ölümünün pozitif düzenlenmesi de zenginleşmiştir. Programlanmış hücre ölümü (PCD) özellikle bitkilerin kaynakları korumak için hücreleri seçici olarak ortadan kaldıracakları kuraklık koşullarında önemlidir. miRNA'lar, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz genleri gibi oksidatif stres tepkilerinde yer alan genleri düzenleyerek PCD'de rol oynar [166–168]. miR159 ailesi, GAMYB benzeri genleri, özellikle R2R3 MYB alanı transkripsiyon faktörleri MYB33 ve MYB65'i baskılayarak gibberellin (GA) sinyallemede kritik bir düzenleyici role sahiptir. MiR159'un yokluğunda, bu MYB genleri vejetatif dokularda düzensiz hale gelir ve tipik olarak aleurone tabakasında aktif olan ve tohum çimlenmesi sırasında GA tarafından indüklenen genlerin uygunsuz şekilde yukarı regülasyonuna yol açar. Bu yanlış düzenleme, başarılı tohum çimlenmesi için gerekli olan GA'ya bağlı bir PCD süreci olan aleurone vakuolasyonunu etkiler. Böylece miR159, GA'ya duyarlı gen ekspresyonunu yöneterek PCD'nin uygun zamanlamasını ve dokuya özgü yürütülmesini sağlayan moleküler bir anahtar olarak işlev görür [166]. Bu çalışmada görüldüğü gibi miRNA'lar, çiçek ve üreme organı gelişimi için çok önemli olan oksin ve gibberellin gibi hormon yollarındaki genlerin ifadesini modüle ederek mikrogametogenez, anter ve stamen gelişimi, androecium ve çiçek gelişimi gibi üreme gelişim aşamalarını etkilemektedir. miR156, özellikle stres altında çiçeklenme süresini ve üreme yapısı sağlamlığını etkileyen oksin ve gibberellin yollarının ifadesini modüle ederek SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE) genlerini hedefler [130,169]. miRNA'ya yönelik gen susturma, özellikle besin yoksunluğu koşullarında önemli bir düzenleyici mekanizmadır. Azot stresi altında miR169, NF-YA ekspresyonunu azaltarak azota duyarlı yolları modüle eder ve besin stresi sırasında kaynak korunumu ile metabolik ayarlamaya katkıda bulunur [142,170]. Bitki organı ve sürgün gelişimi bağlamında, miR160 ve miR167, kök mimarisindeki değişiklikleri düzenleyerek kuraklık koşullarında kök derinliğini ve yoğunluğunu artırır. Bu adaptasyon, özellikle azot kıtlığı durumunda bitkinin besin alım verimliliğini artırarak avantaj sağlar [171,172].

Arabidopsis kalluslarında kuraklık ve azot eksikliği stres uygulamaları altında transkripsiyon faktör genleri ve ilişkili miRNA'lar farklı ifade sonuçları göstermiştir. miR165 ve miR166 PHABULOSA, PHAVOLUTA, REVOLUTA, CORONA ve ATHB-8'in aktivitesini kontrol ederken [173], UCB24 ve TCP24 miR319'a bağımlıdır [174–176]. PHAVOLUTA ve CORONA genlerinin tüm stres koşullarında gözlemlenen ifade modelleri, *Arabidopsis thaliana* stres düzenleyici yollarına dahil olduklarını göstermektedir [177,178]. REVOLUTA ve PHABULOSA ile birlikte meristem başlangıcını ve vasküler gelişimi düzenlerler ve genlerin farklı alt kümeleri her sürece dahil olur [177,179]. Bununla birlikte, CORONA geni azot eksikliği altında daha yüksek ifade seviyeleri göstermiştir. [177] yanal sürgün meristeminde REVOLUTA gen fonksiyonu ile antagonistik bir rol göstermiştir. Sonuç olarak, diğer genlerle paylaşılan paralel ifade dinamikleri, potansiyel düzenleyici ilişkisini ve diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşimini vurgulamaktadır [180,181].

Azot eksikliğine ve kuraklığa yanıt olarak PHAVOLUTA sırasıyla anlatımı artmış azalmıştır. PHAVOLUTA, psödo palindromik diziye yüksek bağlanma afinitesi ile HD-Zip bölgesi ve lösün fermuar alanı ile dimerler oluşturur [182]. Yalancı palindromik dizi genellikle kuraklığa duyarlı genlerin promotörlerinde diğer düzenleyici unsurlarla birlikte bulunduğundan, bu koşullar altında, aktive edilmiş lösün fermuar transkripsiyon faktörleri, kuraklığa duyarlı genlerin promotör bölgelerinde bulunan spesifik DNA dizilerini (C-kutusu elemanları) tanır ve bunlara bağlanır [183].

Benzer şekilde, kombine stres koşulları altında, bireysel stres faktörlerine yanıt olarak farklı sinyal yolları aktive olur. Yollar arasındaki çapraz etkileşim, streslerin spesifik kombinasyonuna bağlı olarak ortak veya farklı olabilen temel lösün fermuar transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu etkileyebilir [184]. Bu, tüm stres koşullarında gözlemlenen etkiyi açıklayabilir. Bazı genler birden fazla transkripsiyon faktörü için bağlanma bölgelerine sahip olabileceğinden, temel lösün transkripsiyon faktörlerinin kombine stres koşullarında strese yanıt veren genlerin sinerjik aktivasyonunun daha koordineli bir tepkiye yol açma olasılığı vardır. Prigge ve diğ göre [177], bu genlerin *Arabidopsis* gelişiminde işbirlikçi, zıt ve bazen de bağımsız roller oynadığı bilinmektedir. REVOLUTA ve RH39 için ortak bir ifade modeli gözlemlenmiştir.

RH39, Ribulose-1,5-bisphosphate karboksilaz/oksijenaz [185,186] yardımıyla fotosentetik proteinleri kodlar ve bunlar çeşitli stres biçimlerine dayanmak için çeşitli metabolik yollar arasındaki sinyal ağlarına aracılık etmede önemli bileşenlerdir. Sonuç olarak, bu süreçler suyun korunmasını kolaylaştırır, stomaların kapanmasını düzenler ve besin alımını teşvik eder. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgulara dayanarak, RH39'un çoklu stres koşulları altında çeşitli metabolik yollar arasındaki çapraz sinyalleşmede önemli bir rol oynadığını ve mahsulün iyileştirilmesi için potansiyel bir hedef olabileceğini öngörülmüştür.

Daha önce, Fang ve diğ [176], mir319'un kolza bitkilerinde kuraklık ve tuz stresinde TCP genlerinin ekspresyonunu düzenleme olasılıklarını tartışmıştı. Azot eksikliği dönemlerinde, TCP24 ikincil hücre duvarı kalınlaşmasını modüle eder [187,188]. TCP24'ün transaktivasyon alanı, *Arabidopsis*'teki transkripsiyonel makine ile etkileşimi teşvik eden belirli DNA dizilerini tanır ve bunlara bağlanır. Kuraklık ve azot eksikliği koşulları arasında gözlemlenen farklılıklar, bu stres faktörlerine yönelik farklı transkripsiyonel düzenlemeleri ortaya çıkarabilir. Özellikle, bu genlerin azot eksikliği altında birleşik strese kıyasla daha yüksek ifade seviyeleri, ikinci koşul altında düzenleyici bir önceliğe işaret etmektedir. UBC24 geninin zıt tepkisi, azot eksikliğine olan duyarlılığını vurgular. UBC24 geni, protein-protein etkileşimlerinde ve azot eksikliği koşullarında bitki yaprağı yaşlanması gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar [189]. Fosfat homeostaz rolüne, bitki miRNA'ları aşırı eksprese edildiğinde ekspresyonu aşağı regüle edilen miR399 aracılık eder [174].

Belirlenen miRNA profilleri, kuraklığa ve azot eksikliğine dayanıklı bitkilerin seçilmesi için potansiyel biyobelirteçler olarak hizmet edecektir. Bu miRNA verilerini, geleneksel ıslah ve genomik seçilimin yanı sıra genetik mühendisliğine entegre etmek, zorlu iklim ortamlarında stres direncini artırabilir. Birleşik stres tepkilerini incelemek, bitki adaptasyonu konusundaki anlayışımızı derinleştirecektir.

Ayrıca, bu bulgular diğer fonksiyonel analizlerle doğrulanmalıdır. Bu bitkilerin gerçek tarım dünyasında uygulanabilirliğini ve sürdürülebilirliğini değerlendirmek için tarla denemeleri şarttır.

KAYNAKLAR

- [1]. Oshunsanya, S.O. Nwosu, N.J. and Li, Y., 2019, *Abiotic Stress in Agricultural Crops Under Climatic Conditions*, In: Jhariya, M.K. Banerjee, A. Meena, R.S and Yadav, D. K. (eds.), 3, Sustainable Agriculture, Forest and Environmental Management, Singapore: Springer Singapore, ISBN: 10.1007/978-981-13-6830-1, 71–100.
- [2]. Kumar, S., 2020, Abiotic Stresses and Their Effects on Plant Growth, Yield and Nutritional Quality of Agricultural Produce, *International Journal of Food Science and Agriculture*, 4(4), 367–378.
- [3]. Araus, V. Swift, J. Alvarez, J.M. Henry, A. and Coruzzi, G.M., 2020, A balancing act: how plants integrate nitrogen and water signals, *Journal of Experimental Botany*, 71, 4442–4451.
- [4]. Cerda, A. and Alvarez, J.M., 2024, Insights into molecular links and transcription networks integrating drought stress and nitrogen signaling, *New Phytologist*, 241, 560–566.
- [5]. Seleiman, M.F. Al-Suhaibani, N. Ali, N. Akmal, M. Alotaibi, M. Refay, Y. Dindaroglu, T.Abdul-Wajid, H.H. and Battaglia, M.L., 2021, Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects, *Plants*, 10, 259.
- [6]. Zhang, H. Sun, X. and Dai, M., 2022, Improving crop drought resistance with plant growth regulators and rhizobacteria: Mechanisms, applications, and perspectives, *Plant Communications*, 3, 100228.
- [7]. Jangam, A.P. and Raghuram, N., 2015, *Nitrogen and Stress*, In: Pandey, G.K. (ed.), Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants, Springer, New York, ISBN: 10.1007/978-1-4939-2540-7_12, 323–339.
- [8]. Group on Earth Observations, (GEO), 2024, Global Drought Report highlights urgent need for action to protect ecosystems, agriculture, and livelihoods. <https://earthobservations.org/news/may-2024>, [Ziyaret tarihi: 12 Kasım 2024].
- [9]. Chapman, N. Miller, A.J. Lindsey, K. and Whalley, W.R., 2012, Roots, water, and nutrient acquisition: let's get physical, *Trends in Plant Science*, 17, 701–710.
- [10]. Sajjad, N. Bhat, E.A. Shah, D. Manzoor, I. Noor, W. Shah, S. Hassan, S. and Ali, R., 2021, *Nitrogen uptake, assimilation, and mobilization in plants under abiotic stress*, In Transporters and Plant Osmotic Stress, Elsevier, ISBN: 10.1016/B978-0-12-817958-1.00015-3, 215–233.
- [11]. Li, J. Li, Q. Guo, N. Xian, Q. Lan, B. Nangia, V. Mo, F. and Liu, Y., 2024, Polyamines mediate the inhibitory effect of drought stress on nitrogen reallocation and utilization to regulate grain number in wheat, *Journal of Experimental Botany*, 75, 1016–1035.
- [12]. Anas, M. Liao, F. Verma, K.K. Sarwar, M.A. Mahmood, A. Chen, Z.-L. Li, Q. Zeng, X.-P. Liu, Y. and Li, Y.-R., 2020, Fate of nitrogen in agriculture and environment:

- agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency, *Biological Research*, 53, 47.
- [13]. Zhang, B., 2015, MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress, *Journal of Experimental Botany*, 66, 1749–1761.
 - [14]. Singroha, G. Sharma, P. and Sunkur, R., 2021, Current status of MICRORNA -mediated regulation of drought stress responses in cereals, *Physiologia Plantarum*, 172, 1808–1821.
 - [15]. Chaudhary, S. Grover, A. and Sharma, P.C., 2021, MicroRNAs: Potential Targets for Developing Stress-Tolerant Crops, *Life (Basel)*, 11(4), 289.
 - [16]. Sunkar, R. Li, Y.-F. and Jagadeeswaran, G., 2012, Functions of microRNAs in plant stress responses, *Trends in Plant Science*, 17, 196–203.
 - [17]. Zhang, F. Yang, J. Zhang, N. Wu, J. and Si, H., 2022, Roles of microRNAs in abiotic stress response and characteristics regulation of plant, *Frontiers in Plant Science*, 13, 919243.
 - [18]. Gupta, A.K. Agrawal, M. Yadav, H. Mishra, G. Gupta, R. Singh, A. Katiyar, D. Singh, P. and Srivastava, A., 2024, Drought Stress and its Tolerance Mechanism in Wheat, *International Journal of Environment and Climate Change*, 14, 529–544.
 - [19]. Zhang, J. Zhang, H. Srivastava, A.K. Pan, Y. Bai, J. Fang, J. Shi, H. and Zhu, J.-K., 2018, Knockdown of Rice MicroRNA166 Confers Drought Resistance by Causing Leaf Rolling and Altering Stem Xylem Development, *Plant Physiology*, 176, 2082–2094.
 - [20]. Zhao, Y.-Y. Guo, C.-J. Li, X.-J. Duan, W.-W. Ma, C.-Y. Chan, H.-M. Wen, Y.-L. Lu, W.-J. and Xiao, K. 2015, Characterization and expression pattern analysis of microRNAs in wheat under drought stress, *Biologia plantarum*, 59, 37–46.
 - [21]. Patil, S. Joshi, S. Jamla, M. Zhou, X. Taherzadeh, M.J. Suprasanna, P. and Kumar, V., 2021, MicroRNA-mediated bioengineering for climate-resilience in crops, *Bioengineered*, 12, 10430–10456.
 - [22]. Nogoy, F.M. Niño, M.C. Song, J.Y. Jung, Y.J. Kang, K.K. Nou, I. and Cho, Y.-G., 2018, Plant microRNAs in molecular breeding, *Plant Biotechnology Report*, 12, 15–25.
 - [23]. Mangrauthia, S.K. Maliha, A. Prathi, N.B. and Marathi, B., 2017, MicroRNAs: potential target for genome editing in plants for traits improvement, *Indian Journal of Plant Physiology*, 22, 530–548.
 - [24]. Bartas, M., 2024, Abiotic Stresses in Plants: From Molecules to Environment, *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 8072.
 - [25]. Zhang, Y., Xu, J., Li, R., Ge, Y., Li, Y., and Li, R., 2023, Plants' Response to Abiotic Stress: Mechanisms and Strategies, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 10915.

- [26]. Liu, B. Hu, Y. Li, M. Xue, H. Wang, Y. and Li, Z., 2024, Effects of drought stress on the functional traits and rhizosphere microbial community structure of *CYPERUS ESCULENTUS*, *Grassland Science*, 70, 109–120.
- [27]. Reddy, A.N. Rajeev, and Kumar, P., 2024, Adaptation of Drought Stress by use of Silicon Element in Wheat (*Triticum aestivum* L.), *International Journal of Environment Climate Change*, 14, 55–66.
- [28]. Jaleel, C.A. Manivannan, P. Lakshmanan, G.M.A. Gomathinayagam, M. and Panneerselvam, R., 2008, Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61, 298–303.
- [29]. Buchaman, R. Wilhem, G. Jones, R. and Vickers, K., 2000, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd ed., Wiley & Sons, Limited, ISBN: 978-0-470-71421-8.
- [30]. Liu, X. Wang, S. Deng, X. Zhang, Z. and Yin, L., 2020, Comprehensive evaluation of physiological traits under nitrogen stress and participation of linolenic acid in nitrogen-deficiency response in wheat seedlings, *BMC Plant Biology*, 20, 501.
- [31]. Zhao, L. Cai, B. Zhang, X. Zhang, B. Feng, J. Zhou, D. Chen, Y. Zhang, M. Qi, D. Wang, W. Xie W. and Wei Y., 2024, Physiological and Transcriptional Characteristics of Banana Seedlings in Response to Nitrogen Deficiency Stress, *Horticulturae*, 10, 290.
- [32]. Lv, X. Zhang, Y. Hu, L. Zhang, Y. Zhang, B. Xia, H. Du, W. Fan, S. and Kong, L., 2021, Low-Nitrogen Stress Stimulates Lateral Root Initiation and Nitrogen Assimilation in Wheat: Roles of Phytohormone Signaling, *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 436–450.
- [33]. Hajibarat, Z. Saidi, A. Ghazvini, H. and Hajibarat, Z., 2024, Investigation of morpho-physiological traits and gene expression in barley under nitrogen deficiency, *Science Report*, 14, 8875.
- [34]. Goel, P. and Singh, A.K., 2015, Abiotic Stresses Downregulate Key Genes Involved in Nitrogen Uptake and Assimilation in *Brassica juncea* L, *PLoS ONE*, 10, e0143645.
- [35]. Rasmussen, S. Barah, P. Suarez-Rodriguez, M.C. Bressendorff, S. Friis, P. Costantino, P. Bones, A.M. Nielsen, H.B. and Mundy, J., 2013, Transcriptome Responses to Combinations of Stresses in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 161, 1783–1794.
- [36]. Zandalinas, S.I. Peláez-Vico, M.Á. Sinha, R. Pascual, L.S. and Mittler, R., 2024, The impact of multifactorial stress combination on plants, crops, and ecosystems: how should we prepare for what comes next?, *The Plant Journal*, 117, 1800–1814.
- [37]. Swift, J. Adame, M. Tranchina, D. Henry, A. and Coruzzi, G.M., 2019, Water impacts nutrient dose responses genome-wide to affect crop production, *Natural Communications*, 10, 1374.

- [38]. Yaşar, S. Pulat, E. and Çakır, Ö., 2024, Effects of nitrogen deficiency and drought stresses on miRNA expressions in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 157, 42.
- [39]. Safavi-Rizi, V. Uellendahl, K. Öhrlein, B. Safavi-Rizi, H. and Stöhr, C., 2021, Cross-stress tolerance: Mild nitrogen (N) deficiency effects on drought stress response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), *Plant Environmental Interactions*, 2, 217–228.
- [40]. Jing, Z. Liu, N. Zhang, Z. and Hou, X., 2024, Research Progress on Plant Responses to Stress Combinations in the Context of Climate Change, *Plants*, 13, 469.
- [41]. Ding, H. Dai, L. Guo, Q. Chen, X. Zhang, G. Feng, H. Qin, F. Gao, H. Xu, Y. and Zhang, Z., 2023, Comprehensive Transcriptome and Metabolome Analyses Reveal Primary Molecular Regulation Pathways Involved in Peanut under Water and Nitrogen Co-Limitation, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 13308.
- [42]. Wellpott, K. Jozefowicz, A.M. Meise, P. Schum, A. Seddig, S. Mock, H.-P. Winkelmann, T. and Bündig, C., 2023, Combined nitrogen and drought stress leads to overlapping and unique proteomic responses in potato, *Planta*, 257, 58.
- [43]. Chen, J. Gao, G. Chen, P. Chen, K. Wang, X. Bai, L. Yu, C. and Zhu, A., 2020, Integrative Transcriptome and Proteome Analysis Identifies Major Molecular Regulation Pathways Involved in Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaudich) under Nitrogen and Water Co-Limitation, *Plants*, 9, 1267.
- [44]. Mahmoud, D. Pandey, R. Sathee, L. Dalal, M. Singh, M.P. and Chinnusamy, V., 2020, Regulation of expression of genes associated with nitrate response by osmotic stress and combined osmotic and nitrogen deficiency stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Physiology. Report*, 25, 200–215.
- [45]. Valencia-Sanchez, M.A. Liu, J. Hannon, G.J. and Parker, R., 2006, Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs, *Genes & Development*, 20, 515–524.
- [46]. Kato, M., 2018, Target RNA-directed microRNA degradation; which controls which? *Non-coding RNA Investigation*, 2, 62–62.
- [47]. Yadav, V. Arif, N. Singh, V.P. Deshmukh, R. Sahi, S. Shivaraj, S.M. Tripathi, D.K. and Chauhan, D.K., 2020, Roles of microRNAs in plant development and stress tolerance, In *Plant Life Under Changing Environment* Elsevier, ISBN: 10.1016/B978-0-12-818204-8.00031-X, 719–733
- [48]. Kar, M.M. and Raichaudhuri, A., 2021, Role of microRNAs in mediating biotic and abiotic stress in plants, *Plant Gene*, 26, 100277.
- [49]. Samynathan, R. Venkidasamy, B. Shanmugam, A. Ramalingam, S. and Thiruvengadam, M., 2023, Functional role of microRNA in the regulation of biotic and abiotic stress in agronomic plants, *Frontiers in Genetics*, 14, 1272446.

- [50]. Ma, Z. and Hu, L., 2023, MicroRNA: A Dynamic Player from Signalling to Abiotic Tolerance in Plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 11364.
- [51]. Liang, Y. Yang, X. Wang, C. and Wang, Y., 2024, miRNAs: Primary modulators of plant drought tolerance, *Journal of Plant Physiology*, 301, 154313.
- [52]. Li, Z. Yang, J. Cai, X. Zeng, X. Zou, J.-J. and Xing, W., 2024, A REVIEW ON THE FUNCTION OF miRNAs IN PLANT RESPONSES TO STRESSES, *Plant Stress*, 100347.
- [53]. Lee, Y. Kim, M. Han, J. Yeom, K.-H. Lee, S. Baek, S.H. and Kim, V.N., 2004, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *European Molecular Biology Organisation Journal*, 23, 4051–4060.
- [54]. Ha, M. and Kim, V.N., 2014, Regulation of microRNA biogenesis, *Natures Review Molecular Cell Biology*, 15, 509–524.
- [55]. Fang, Y. and Spector, D.L., 2007, Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living *Arabidopsis* Plants, *Current Biology*, 17, 818–823.
- [56]. Liu, Q. Shi, L. and Fang, Y., 2012, Dicing Bodies, *Plant Physiology*, 158, 61–66.
- [57]. Yu, B. Bi, L. Zheng, B. Ji, L. Chevalier, D. Agarwal, M. Ramachandran, V. Li, W., Lagrange, T. Walker, J.C., 2008, The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis, *Proceedings of the National Academy of Science*, U.S.A, 105, 10073–10078.
- [58]. Voinnet, O., 2009, Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs, *Cell*, 136, 669–687.
- [59]. Yang, Z., 2006, HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide, *Nucleic Acids Research*, 34, 667–675.
- [60]. Li, J. Yang, Z. Yu, B. Liu, J. and Chen, X., 2005, Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in *Arabidopsis*, *Current Biology*, 15, 1501–1507.
- [61]. Wang, J. Mei, J. and Ren, G., 2019, Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation, *Frontiers in Plant Sciences*, 10, 360.
- [62]. Rogers, K. and Chen, X., 2013, Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs, *The Plant Cell*, 25, 2383–2399.
- [63]. Yang, X. and Li, L., 2012, Analyzing the microRNA Transcriptome in Plants Using Deep Sequencing Data, *Biology*, 1, 297–310.

- [64]. Yang, G. Li, Y. Wu, B. Zhang, K. Gao, L. and Zheng, C., 2019, MicroRNAs transcriptionally regulate promoter activity in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Intergrative Plant Biology*, 61, 1128–1133.
- [65]. Jia, X. Yan, J. and Tang, G., 2011, MicroRNA-mediated DNA methylation in plants, *Frontiers in Biology*, 6, 133–139.
- [66]. Teotia, S. Singh, D. and Tang, G., 2017, *DNA Methylation in Plants by microRNAs*, In: Rajewsky, N. Jurga, S. and Barciszewski, J. (eds.), *Plant Epigenetics RNA Technologies*, Cham: Springer International Publishing, ISBN: 10.1007/978-3-319-55520-1_13, 247–262.
- [67]. Ferjani, A. Tsukagoshi, H. and Vassileva, V., 2023, Model organisms in plant science: *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers in Plant Science*, 14, 1279230.
- [68]. Koornneef, M. and Meinke, D., 2010, The development of *Arabidopsis* as a model plant, *The Plant Journal*, 61, 909–921.
- [69]. Shen, C.-H., 2023, *Gene expression*, Diagnostic Molecular Biology, Elsevier, 2nd edition, ISBN: 9780323986090, 57–89.
- [70]. Spitz, F. and Furlong, E.E.M., 2012, Transcription factors: from enhancer binding to developmental control, *Natures Reviews Genetics*, 13, 613–626.
- [71]. Hu, Y. Chen, X. and Shen, X., 2022, Regulatory network established by transcription factors transmits drought stress signals in plant, *Stress Biology*, 2, 26.
- [72]. Shi, M. Wei, Z. Zhang, P. Guan, C. Chachar, S. and Zhang, J., 2024, Epigenetic Modifications and Breeding Applications in Horticultural Plants, *Horticulturae*, 10, 143.
- [73]. Huang, F. and He, Y., 2024, Epigenetic control of gene expression by cellular metabolisms in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 81, 102572.
- [74]. Żabka, A. Gocek, N. Polit, J.T. and Maszewski, J., 2023, Epigenetic modifications evidenced by isolation of proteins on nascent DNA and immunofluorescence in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Vicia faba*, *Planta*, 258, 95.
- [75]. He, Z. Huang, T. Ao, K. Yan, X. and Huang, Y., 2017, Sumoylation, Phosphorylation, and Acetylation Fine-Tune the Turnover of Plant Immunity Components Mediated by Ubiquitination, *Frontiers in Plant Sciences*, 8, 1682.
- [76]. Lee, S.C., 2017, Plant Defense Response to Abiotic Stress via Absciscic Acid Signaling Pathway, Agriculture and Life Sciences Research Institute, *Environmental Science Biology*, 29. 10.12972/jales.20170002.
- [77]. Zhang, J. Hafeez, M.T. Di, D. Wu, L. and Zhang, L., 2019, Precise control of ABA signaling through post-translational protein modification, *Plant Growth Regulator*, 88, 99–111.

- [78]. Ali, S. Hayat, K. Iqbal, A. and Xie, L., 2020, Implications of Abscissic Acid in the Drought Stress Tolerance of Plants, *Agronomy*, 10, 1323.
- [79]. Hasanuzzaman, M. Bhuyan, M.H.M. Zulfiqar, F. Raza, A. Mohsin, S. Mahmud, J. Fujita, M. and Fotopoulos, V. 2020, Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator, *Antioxidants*, 9, 681.
- [80]. Hayat, S. Hayat, Q. Alyemeni, M.N. Wani, A.S. Pichtel, J. and Ahmad, A. 2012, Role of proline under changing environments: A review, *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1456–1466.
- [81]. Majeed, Y. Zhu, X. Zhang, N. ul-Ain, N. Raza, A. Haider, F.U. and Si, H., 2023, Harnessing the role of mitogen-activated protein kinases against abiotic stresses in plants, *Frontiers in Plant Sciences*, 14, 932923.
- [82]. Manna, M. Rengasamy, B. and Sinha, A.K., 2023, Revisiting the role of MAPK signalling pathway in plants and its manipulation for crop improvement, *Plant Cell & Environment*, 46, 2277–2295.
- [83]. Jagodzik, P. Tajdel-Zielinska, M. Ciesla, A. Marczak, M. and Ludwikow, A., 2018, Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling, *Frontiers in Plant Sciences*, 9, 1387.
- [84]. Gani, S. Nabi, A. Rather, T.R. Wani, T.A. Anwar, A. Noor-ul-Ain, Mr. Sheeba, Ms. Iqbal, I. Tawkeer-un-Nisa, Mr. and Zahoor, H., 2024, *Role of calcium signaling in plant defense mechanism*, In Senthilvalavan, P. Langyan S, Anwar, A and Sharma, S (eds.), 3 Futuristic Trends in Agriculture Engineering & Food Sciences Book 22, Iterative International Publisher, Selfy page Developers Pvt Ltd, ISBN: 10.58532/V3BCAG22CH16, 183–194.
- [85]. Shi, X. Bao, J. Lu, X. Ma, L. Zhao, Y. Lan, S. Cao, J. Ma, S. and Li, S., 2023, The mechanism of Ca²⁺ signal transduction in plants responding to abiotic stresses, *Environmental and Experimental Botany*, 216, 105514.
- [86]. Naz, M. Afzal, M.R. Raza, M.A. Pandey, S. Qi, S. Dai, Z. and Du, D. 2024, Calcium (Ca²⁺) signaling in plants: A plant stress perspective, *South African Journal of Botany*, 169, 464–485.
- [87]. Datta, T. Kumar, R.S. Sinha, H. and Trivedi, P.K. 2024, Small but mighty: Peptides regulating abiotic stress responses in plants, *Plant Cell & Environment*, 47, 1207–1223.
- [88]. Oh, E. Seo, P.J. and Kim, J. 2018, Signaling Peptides and Receptors Coordinating Plant Root Development, *Trends in Plant Science*, 23, 337–351.
- [89]. Shi, C.-L. and Wu, L., 2022, Ligand deprivation activates receptor signaling, *Molecular Plant*, 15, 1827.
- [90]. Pandita, D. Bhat, J.A. Wani, S.H. ElSayed, A.I. Nawaz, G. Mukherjee, S. Reyes, V.P. Kumar, A. Shen, Q. Ganie, S.A, 2023, Mobile Signaling Peptides: Secret Molecular

- Messengers with a Mighty Role in Plant Life, *Journal of Plant Growth Regulator*, 42, 6801–6834.
- [91]. Kim, J.S. Jeon, B.W. and Kim, J., 2021, Signaling Peptides Regulating Abiotic Stress Responses in Plants, *Frontiers in Plant Science*, 12, 704490.
 - [92]. Delay, C. Chapman, K. Taleski, M. Wang, Y. Tyagi, S. Xiong, Y. Imin, N. and Djordjevic, M.A., 2019, CEP3 levels affect starvation-related growth responses of the primary root, *Journal of Experimental Botany*, 70, 4763–4774.
 - [93]. Takahashi, F. Suzuki, T. Osakabe, Y. Betsuyaku, S. Kondo, Y. Dohmae, N. Fukuda, H. Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K., 2018, A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling, *Nature*, 556, 235–238.
 - [94]. Magar, D.N. Shah, P. Harish, K. C. Bosamia, T. M. Barbadikar, K. M. Shukla, Y. Phule, A. N. Zala, H. Sheshu, M. and Kumar MS., 2022, *Gene Expression and Transcriptome Sequencing*: In: Uchiumi, F. (ed.), Basics, Analysis, Advances, Gene Expression, IntechOpen, ISBN: 978-1-80355-621-5.
 - [95]. Wang, Z. Gerstein, M. and Snyder, M., 2009, RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Natures Review Genetics*, 10, 57–63.
 - [96]. McGettigan, P.A., 2013, Transcriptomics in the RNA-seq era, *Current Opinion in Chemical Biology*, 17, 4–11.
 - [97]. Zhu, X.-T. Sanz-Jimenez, P. Ning, X.-T. Tahir Ul Qamar, M., and Chen, L.L., 2024, Direct RNA sequencing in plants: Practical applications and future perspectives, *Plant Communications*, 5, 101064.
 - [98]. Chugh, H. Dhawan, G. Chandra, R. and Dhawan, U. 2021, Microarrays: *A Road Map to Uncover Host Pathogen Interactions*, In: Hameed, S and Fatima, Z. (eds.), *Integrated Omics Approaches to Infectious Diseases*, Springer, Singapore, ISBN: 978-981-16-0690-8. 125–137.
 - [99]. Gonzalo, R. and Sánchez, A., 2018, *Introduction to Microarrays Technology and Data Analysis*, In Jaumot, J. Bedia, C. Tauler, R. (eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, ISBN 9780444640444, 37–69.
 - [100]. Joshi, A.G. and Pathak, A.R., 2019, *EST (Expressed Sequence Tag): A Technique for Identification of Plant Secondary Metabolite Genes*, In Ozturk, M. and Hakeem, K. R (eds.) *Plant and Human Health*, Volume 2, Cham: Springer International Publishing, ISBN: 978-3-030-03344-6_8, 207–225.
 - [101]. Hatey, F. Tosser-Klopp, G. Clouscard-Martinato, C. Mulsant, P. and Gasser, F. 1998, Expressed sequence tags for genes: a review, *Genetics Selection Evolution*, 30, 521.
 - [102]. Velculescu, V.E. Zhang, L. Vogelstein, B. and Kinzler, K.W., 1995, Serial Analysis of Gene Expression, *Science*, 270, 484–487.

- [103]. Church, A.J. 2020, *Next-Generation Sequencing*, In: Tafe, L.J. and. Arcila, M. E. (eds.), *Genomic Medicine*, Cham: Springer International Publishing, ISBN: 978-3-030-22922-1_2, 25–40.
- [104]. Singh, L.S. Iqbal, G. Singh, A. Limbola, M. and Kumar, A.V. 2024, The Impact of Next-generation Sequencing on Biotechnology: A Review of Current Applications, *Journal of Scientific Research and Reports*, 30, 91–97.
- [105]. Nguyen, D.H. Thi, Y.V.N. and Chu, D.-T., 2024, Next Generation Sequencing in Healthcare, In V. Singh, V. and Kumar, A (eds.), *Advances in Bioinformatics*, Springer Nature Singapore, ISBN: 10.1007/978-981-99-8401-5_6, 137–147.
- [106]. Dar, S.A. Nawchoo, I.A. Tyub, S. and Kamili, A.N., 2021, Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl, *Biotechnology Reports*, 32.
- [107]. van der Weele, C.M. Spollen, W.G. Sharp, R.E. and Baskin, T.I., 2000, Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media, *Journal of Experimental Botany*, 51, 1555–1562.
- [108]. Lieb, B., 2003, Quantification of DNA and RNA: *A Spectrophotometric Method*, In Margaret Brown (ed.) *Encyclopedia of Life Sciences*, Apple Academic Press, ISBN: 047001617510.
- [109]. Kang, W. Eldfjell, Y. Fromm, B. Estivill, X. Biryukova, I. and Friedländer, M.R., 2018, miRTrace reveals the organismal origins of microRNA sequencing data, *Genome Biology*, 19, 213.
- [110]. Kozomara, A. Birgaoanu, M. and Griffiths-Jones, S., 2019, miRBase: from microRNA sequences to function, *Nucleic acids research*, 47, D155–D162.
- [111]. Chen, S. Zhou, Y. Chen, Y. and Gu, J. 2018, fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics Oxford, England*, 34, i884–i890.
- [112]. Langmead, B. Trapnell, C. Pop, M. and Salzberg, S.L. 2009, Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome, *Genome Biology*, 10, R25.
- [113]. Love, M.I. Huber, W. and Anders, S., 2014, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biology*, 15, 550.
- [114]. Kuang, Z. Wang, Y. Li, L. and Yang, X., 2019, miRDeep-P2: accurate and fast analysis of the microRNA transcriptome in plants, *Bioinformatics Oxford, England*, 35, 2521–2522.
- [115]. Shen, W. Le, S. Li, Y. and Hu, F., 2016, SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation, *PloS one*, 11, e0163962.
- [116]. Dai, X. and Zhao, P.X., 2011, psRNATarget: a plant small RNA target analysis server, *Nucleic Acids Research*, 39, W155–W159.

- [117]. Ge, S.X. Jung, D. and Yao, R., 2020, ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants, *Bioinformatics*, 36, 2628–2629.
- [118]. Villanueva, R.A.M. and Chen, Z.J., 2019, *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (2nd ed.), Measurement: Interdisciplinary Research and Perspectives, 17, 160–167.
- [119]. Lorenz, R. Bernhart, S.H. Höner zu Siederdissen, C. Tafer, H. Flamm, C., Stadler, P.F. and Hofacker, I.L. 2011, ViennaRNA Package 2.0, *Algorithms for Molecular Biology*, 6, 26.
- [120]. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* (San Diego, Calif.), 25, 402–8.
- [121]. Gao, S. Yang, Y. Yang, Y. Zhang, X. Su, Y. Guo, J. Que, Y. and Xu, L., 2022, Identification of Low-Nitrogen-Related miRNAs and Their Target Genes in Sugarcane and the Role of miR156 in Nitrogen Assimilation, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 13187.
- [122]. Jagadhesan, B. Das, S. Singh, D. Jha, S.K. Durgesh, K. and Sathee, L., 2022, Micro RNA mediated regulation of nutrient response in plants: the case of nitrogen, *Plant Physiology Report*, 27, 345–357.
- [123]. Yousuf, P.Y. Shabir, P.A. and Hakeem, K.R., 2021, miRNAomic Approach to Plant Nitrogen Starvation, *International Journal of Genomics*, 1–14.
- [124]. Yue, W. Zhang, H. Su, N. Sun, X. Song, W. Nie, X. and Yue, H., 2024, Integrative small RNA and degradome sequencing reveal drought memory stress-responsive miRNAs and their targets in wheat (*Triticum aestivum* L.), *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5917.
- [125]. Fantao, Z. Yuan, L. Meng, Z. Yi, Z. Hongping, C. Biaolin, H. and Jiankun, X., 2018, Identification and Characterization of Drought Stress- Responsive Novel microRNAs in Dongxiang Wild Rice, *Rice Science*, 25, 175–184.
- [126]. Xue, Z. Ferrand, M. Gilbault, E. Zurfluh, O. Clément, G. Marmagne, A. Huguet, S. Jiménez-Gómez, J.M. Krapp, A. Meyer, C., 2024, Natural variation in response to combined water and nitrogen deficiencies in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 36, 3378–3398.
- [127]. Wang, X.-J., Reyes, J.L., Chua, N.-H., and Gaasterland, T., 2004, Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets, *Genome Biology*, 5, R65.
- [128]. Shah, S.M.S. and Ullah, F., 2023, A comprehensive overview of miRNA targeting drought stress resistance in plants, *Brazilian Journal of Biology*, 83, e242708.
- [129]. Singh, A., Gandhi, N., Mishra, V., Yadav, S., Rai, V., and Sarkar, A.K., 2020, Role of abiotic stress responsive miRNAs in *Arabidopsis* root development, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29, 733–742.

- [130]. Wang, Y., Luo, Z., Zhao, X., Cao, H., Wang, L., Liu, S., Wang, C., WangWang, Liu, M., Wang, L., 2023, Superstar microRNA, miR156, involved in plant biological processes and stress response: A review, *Scientia Horticulturae*, 316, 112010.
- [131]. Xu, M. Hu, T. Smith, M.R. and Poethig, R.S., 2016, Epigenetic Regulation of Vegetative Phase Change in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 28, 28–41.
- [132]. Chen, G. Wang, Y. Liu, X. Duan, S. Jiang, S. Zhu, J. Zhang, Y. and Hou, H., 2023, The MdmiR156n Regulates Drought Tolerance and Flavonoid Synthesis in Apple Calli and *Arabidopsis*, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 6049.
- [133]. Ding, Y., Tao, Y., and Zhu, C., 2013, Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants, *Journal of Experimental Botany*, 64, 3077–3086.
- [134]. Zheng, Y., Hivrale, V., Zhang, X., Valliyodan, B., Lelandais-Brière, C., Farmer, A.D., May, G.D., Crespi, M., Nguyen, H.T., and Sunkar, R., 2016, Small RNA profiles in soybean primary root tips under water deficit, *BMC Systems Biology*, 10, 126.
- [135]. Wen, S., Zhou, C., Tian, C., Yang, N., Zhang, C., Zheng, A., Chen, Y., Lai, Z., and Guo, Y., 2024, Identification and Validation of the miR156 Family Involved in Drought Responses and Tolerance in Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), *Plants*, 13, 201.
- [136]. Xu, Z., Zhong, S., Li, X., Li, W., Rothstein, S.J., Zhang, S., Bi, Y., and Xie, C., 2011, Genome-Wide Identification of MicroRNAs in Response to Low Nitrate Availability in Maize Leaves and Roots, *PLoS ONE*, 6, e28009.
- [137]. Zhao, M., Tai, H., Sun, S., Zhang, F., Xu, Y., and Li, W.-X., 2012, Cloning and Characterization of Maize miRNAs Involved in Responses to Nitrogen Deficiency, *PLoS ONE*, 7, e29669.
- [138]. Villalba-vermell, P., Marquez-Molins, J., Marques-Romero, M.C., Hernandez-Azurdia, A., Sierra, J.C., Pico-Sirvent, M.B., Monforte, A., Elena, S., and Gomez, G., 2024, Exploring the miRNA-mediated response to combined stress conditions in melon plants, *Frontiers in Plant Science*, 12.
- [139]. Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A., and Zheng, C.-C., 2008, Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*, *RNA*, 14, 836–843.
- [140]. Reyes, J.L. and Chua, N., 2007, ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination, *The Plant Journal*, 49, 592–606.
- [141]. Liang, G. Ai, Q. and Yu, D. 2015, Uncovering miRNAs involved in crosstalk between nutrient deficiencies in *Arabidopsis*, *Science Report*, 5, 11813.
- [142]. Liang, G., He, H., and Yu, D., 2012, Identification of Nitrogen Starvation-Responsive MicroRNAs in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS ONE*, 7, e48951.

- [143]. Li, N. Yang, T. Guo, Z. Wang, Q. Chai, M. Wu, M. Li, X. Li, W. Li, G. Tang, J., 2020, Maize microRNA166 Inactivation Confers Plant Development and Abiotic Stress Resistance, *International Journal of Molecular Science*, 21, 9506.
- [144]. Fischer, J.J. Beatty, P.H. Good, A.G. and Muench, D.G. 2013, Manipulation of microRNA expression to improve nitrogen use efficiency, *Plant Science*, 210, 70–81.
- [145]. Gurtan, A.M. and Sharp, P.A. 2013, The Role of miRNAs in Regulating Gene Expression Networks, *Journal of Molecular Biology*, 425, 3582–3600.
- [146]. Rani, V., and Sengar, R.S., 2022, Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation, *Biotech & Bioengineering*, 119, 685–692.
- [147]. Yang, J. Zhang, N. Zhang, J. Jin, X. Zhu, X. Ma, R. Li, S. Lui, S. Yue, Y. and Si, H., 2021, Knockdown of MicroRNA160a/b by STTM leads to root architecture changes via auxin signaling in *Solanum tuberosum*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 939–949.
- [148]. Luo, P. Di, D. Wu, L. Yang, J. Lu, Y. and Shi, W., 2022, MicroRNAs Are Involved in Regulating Plant Development and Stress Response through Fine-Tuning of TIR1/AFB-Dependent Auxin Signaling, *International Journal of Molecular Science*, 23, 510.
- [149]. Liu, P. Montgomery, T.A. Fahlgren, N. Kasschau, K.D. Nonogaki, H. and Carrington, J.C., 2007, Repression of *AUXIN RESPONSE FACTOR10* by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages, *The Plant Journal*, 52, 133–146.
- [150]. Dai, X. Lu, Q. Wang, J. Wang, L. Xiang, F. and Liu, Z., 2021, MiR160 and its target genes ARF10, ARF16 and ARF17 modulate hypocotyl elongation in a light, BRZ, or PAC-dependent manner in *Arabidopsis*, *Plant Science*, 303, 110686.
- [151]. Mallory, A.C. Bartel, D.P. and Bartel, B., 2005, MicroRNA-Directed Regulation of *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17* Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes, *The Plant Cell*, 17, 1360–1375.
- [152]. Sanan-Mishra, N., Varanasi, S.P.R.M., and Mukherjee, S.K., 2013, Micro-regulators of auxin action, *Plant Cell Rep*, 32, 733–740.
- [153]. Shriram, V., Kumar, V., Devarumath, R.M., Khare, T.S., and Wani, S.H., 2016, MicroRNAs As Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants, *Frontiers in Plant Science*, 7.
- [154]. Singh, A., Roy, S., Singh, S., Das, S.S., Gautam, V., Yadav, S., Kumar, A., Singh, A., Samantha, S., and Sarkar, A.K., 2017, Phytohormonal crosstalk modulates the expression of miR166/165s, target Class III HD-ZIPs, and KANADI genes during root growth in *Arabidopsis thaliana*, *Science Report*, 7, 3408.
- [155]. Kumar, R. Mall, M. and Akhtar, Md.Q., 2021, Crosstalk between miRNA and plant abiotic stresses, In *Stress Tolerance in Horticultural Crops*, Elsevier, 137–153.

- [156]. Suter, D.M., 2020, Transcription Factors and DNA Play Hide and Seek, *Trends in Cell Biology*, 30, 491–500.
- [157]. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C., 2018, Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation, *Frontiers of Endocrinology*, 9, 402.
- [158]. Hynes, C. and Kakumani, P.K., 2024, Regulatory role of RNA-binding proteins in microRNA biogenesis, *Frontiers in Molecular Bioscience*, 11, 1374843.
- [159]. Bandyra, K.J. Sinha, D. Syrjanen, J. Luisi, B.F. and De Lay, N.R., 2016, The ribonuclease polynucleotide phosphorylase can interact with small regulatory RNAs in both protective and degradative modes, *RNA*, 22, 360–372.
- [160]. Li, X. Li, C. Zhu, J. Zhong, S. Zhu, H. and Zhang, X., 2023, Functions and mechanisms of RNA helicases in plants, *Journal of Experimental Botany*, 74, 2295–
- [161]. Singha, D.L. Tuteja, N. Boro, D. Hazarika, G.N. and Singh, S., 2017, Heterologous expression of PDH47 confers drought tolerance in indica rice, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 130, 577–589.
- [162]. Pandey, S, Prasad, A., Sharma, N., and Prasad, M., 2020, Linking the plant stress responses with RNA helicases, *Plant Science*, 299, 110607.
- [163]. Sharma, P, Lakra, N, Goyal, A, Ahlawat, Y.K, Zaid, A, and Siddique, K.H.M, 2023, Drought and heat stress mediated activation of lipid signaling in plants: a critical review, *Frontiers in Plant Sciences*, 14, 1216835.
- [164]. Hirner, A. Ladwig, F. Stransky, H. Okumoto, S. Keinath, M. Harms, A. Frommer, W.B. and Koch, W., 2006, *Arabidopsis* LHT1 Is a High-Affinity Transporter for Cellular Amino Acid Uptake in Both Root Epidermis and Leaf Mesophyll, *The Plant Cell*, 18, 1931–1946.
- [165]. Krouk, G. Crawford, N.M. Coruzzi, G.M. and Tsay, Y.-F., 2010, Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments, *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 265–272.
- [166]. Alonso-Peral, M.M. Li, J. Li, Y. Allen, R.S. Schnippenkoetter, W. Ohms, S., White, R.G. and Millar, A.A., 2010, The MicroRNA159-Regulated *GAMYB-like* Genes Inhibit Growth and Promote Programmed Cell Death in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 154, 757–771.
- [167]. Petrov, V. Hille, J. Mueller-Roeber, B. and Gechev, T.S., 2015, ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants, *Frontiers in Plant Science*, 6, 69.
- [168]. Mohsenifard, E. Ghabooli, M. Mehri, N., and Bakhshi, B., 2017, Regulation of miR159 and miR396 mediated by *Piriformospora indica* confer drought tolerance in rice, *Journal of Plant Molecular Breeding*, 5(1), 10-18 .

- [169]. Li, Y., He, Y., Qin, T., Guo, X., Xu, K., Xu, C., and Yuan, W., 2023, Functional conservation and divergence of miR156 and miR529 during rice development, *The Crop Journal*, 11, 692–703.
- [170]. Zhao, M. Ding, H. Zhu, J. Zhang, F. and Li, W., 2011, Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*, *New Phytologist*, 190, 906–915.
- [171]. Gautam, V., Singh, A., Verma, S., Kumar, A., Kumar, P., Mahima, Singh, S., Mishra, V., and Sarkar, A.K., 2017, Role of miRNAs in root development of model plant *Arabidopsis thaliana*, *Indian Journal of Plant Physiology*, 22, 382–392.
- [172]. Hao, K. Wang, Y. Zhu, Z. Wu, Y. Chen, R. and Zhang, L., 2022, miR160: An Indispensable Regulator in Plant, *Frontiers in Plant Science*, 13, 833322.
- [173]. Rhoades, M.W. Reinhart, B.J. Lim, L.P. Burge, C.B. Bartel, B. and Bartel, D.P., 2002, Prediction of Plant MicroRNA Targets, *Cell*, 110, 513–520.
- [174]. Fujii, H. Chiou, T.-J. Lin, S.-I. Aung, K. and Zhu, J.-K., 2005, A miRNA Involved in Phosphate-Starvation Response in *Arabidopsis*, *Current Biology*, 15, 2038–2043.
- [175]. Kuo, H.-F. and Chiou, T.-J., 2011, The Role of MicroRNAs in Phosphorus Deficiency Signaling, *Plant Physiology*, 156, 1016–1024.
- [176]. Fang, Y. Zheng, Y., Lu, W. Li, J. Duan, Y. Zhang, S. and Wang, Y. 2021, Roles of miR319-regulated TCPs in plant development and response to abiotic stress, *The Crop Journal*, 9, 17–28.
- [177]. Prigge, M.J. Otsuga, D. Alonso, J.M. Ecker, J.R. Drews, G.N. and Clark, S.E. 2005, Class III Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family Members Have Overlapping, Antagonistic, and Distinct Roles in *Arabidopsis* Development, *The Plant Cell*, 17, 61–76. 10.1105/tpc.104.026161.
- [178]. Mao, H. Yu, L. Li, Z. Liu, H. and Han, R., 2016, Molecular evolution and gene expression differences within the HD-Zip transcription factor family of *Zea mays* L, *Genetica*, 144, 243–257.
- [179]. Hrmova, M. and Hussain, S.S., 2021, Plant Transcription Factors Involved in Drought and Associated Stresses, *International Journal of Molecular Science*, 22, 5662.
- [180]. Gong, S. Ding, Y. Hu, S. Ding, L. Chen, Z. and Zhu, C., 2019, The role of HD-Zip class I transcription factors in plant response to abiotic stresses, *Physiologia Plantarum*, 167, 516–525.
- [181]. Qiu, X. Wang, G. Abou-Elwafa, S.F. Fu, J. Liu, Z. Zhang, P. Xie, X. Ku, L. Ma, Y., Guan, X., 2022, Genome-wide identification of HD-ZIP transcription factors in maize and their regulatory roles in promoting drought tolerance, *Physiology of Molecular Biology Plants*, 28, 425–437.

- [182]. Sessa, G. Steindler, C. Morelli, G. and Ruberti, I., 1998, The *Arabidopsis* Athb-8, -9 and genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant Molecular Biology*, 38, 609–622.
- [183]. Sornaraj, P. Luang, S., Lopato, S. and Hrmova, M., 2016, Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors involved in abiotic stresses: A molecular model of a wheat bZIP factor and implications of its structure in function, *Biochimica et Biophysica Acta* , 1860, 46–56.
- [184]. Viswanath, K.K. Kuo, S.-Y. Tu, C.-W. Hsu, Y.-H. Huang, Y.-W. and Hu, C.-C., 2023, The Role of Plant Transcription Factors in the Fight against Plant Viruses, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 8433.
- [185]. Asakura, Y. Galarneau, E. Watkins, K.P. Barkan, A. and Van Wijk, K.J. 2012, Chloroplast RH3 DEAD Box RNA Helicases in Maize and Arabidopsis Function in Splicing of Specific Group II Introns and Affect Chloroplast Ribosome Biogenesis, *Plant Physiology*, 159, 961–974.
- [186]. Yang, X. Lu, M. Wang, Y. Wang, Y. Liu, Z., and Chen, S. 2021, Response Mechanism of Plants to Drought Stress, *Horticulturae*, 7, 50.
- [187]. Wang, H. Mao, Y. Yang, J. and He, Y., 2015, TCP24 modulates secondary cell wall thickening and anther endothecium development, *Frontiers in Plant Science*, 6.
- [188]. Rivai, R.R. Miyamoto, T. Awano, T. Takada, R. Tobimatsu, Y. Umezawa, T., and Kobayashi, M., 2021, Nitrogen deficiency results in changes to cell wall composition of sorghum seedlings, *Science Report*, 11, 23309.
- [189]. Park, B.S. Yao, T. Seo, J.S. Wong, E.C.C. Mitsuda, N. Huang, C.-H. and Chua, N.-H., 2018, Arabidopsis NITROGEN LIMITATION ADAPTATION regulates ORE1 homeostasis during senescence induced by nitrogen deficiency, *Nature Plants*, 4, 898–903.

EKLER**Constituents of Murashige and Skoog Medium**

Macronutrients (10X)		100mL/L
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	16.5
Potassium nitrate	KNO_3	19
Calcium chloride	CaCl_2	4.4
Magnesium sulfate	MgSO_4	3.7
Monopotassium phosphate	KH_2PO_4	1.7
Micronutrients (100X)		10mL/L
Boric acid	H_3BO_3	0.62
Cobalt chloride	CoCl_2	0.0025
Ferrous sulphate	FeSO_4	27.8
Manganese(II) sulfate	MnSO_4	2.23
Potassium iodide	KI	0.083
Sodium molybdate	Na_2MoO_4	0.025
Zinc sulphate	ZnSO_4	0.86
Iron source		10mL/L
Sodium EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$	2.78
Ferrous sulphate	FeSO_4	3.72
Vitamin (100X)		10mL/L
Nicotinic acid	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.05
Thiamine hydrochloride	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$	0.01
Pyridoxine hydrochloride	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3$	0.05
Glycine	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	0.2

ÖZGEÇMİŞ

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

;

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Buea Üniversitesi
Fakülte	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Bölümü	Tıbbi Laboratuvar Bilimleri
Mezuniyet Yılı	23.10.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	Buea Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji
Programı	Moleküler Parazitoloji ve Vektör Biyoloji

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

Makale ve Bildiriler
Chlamydia infection as one of the causes of Infertility (February 2012).
The effects of Climate Variability on Malaria cases in the Buea Health District (July 2012)
Amvongo-Adjia, N., Wirsy, E.L., Riveron, J.M. Winston P. Chounna Ndongmo, W.P., Riveron, J.M., Enyong, P.A., Njiokou, F., Wondji, C.S., Wanji, Bionomics and vectorial role of anophelines in wetlands along the volcanic chain of Cameroon. <i>Parasites Vectors</i> 11, 471 (2018). https://doi.org/10.1186/s13071-018-3041-z .
Wirsy, E.L, Çakır Ö., 2024. <i>Distinctive features of plant microRNAs in response to abiotic stresses</i> , In: Maraklı, S and Yılmaz, M. (eds.), <i>The Broad Spectrum of Biological Sciences</i> . Gaziantep: Gaziantep University Press, ISBN: 978-975-7375-95-1, 521-545.

Wirsiy, E.L, Pulat, E, Arslantürk, A.H, Yaşar, S., Çakır, Ö. Small RNA sequencing reveals important miRNA function in *Arabidopsis thaliana* calli in response to combined drought and nitrogen deficiency, *Acta Botanica Brasilica*. [Article in press].

