



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BUĞDAYDA KÖK VE KÖK BOĞAZI ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞI VE
TUZA KARŞI DAYANIKLILIK SAĞLAYAN MİKRORNA'LARIN
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Abdül Hakan EREN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**HATAY
HAZİRAN-2014**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BUĞDAYDA KÖK VE KÖK BOĞAZI ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞI VE
TUZA KARŞI DAYANIKLILIK SAĞLAYAN MİKRORNA'LARIN
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Abdil Hakan EREN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**HATAY
HAZİRAN-2014**

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BUĞDAYDA KÖK VE KÖK BOĞAZI ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞI VE TUZA
KARŞI DAYANIKLILIK SAĞLAYAN MİKRORNA'LARIN AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ**

A.Hakan EREN
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 25.06.2014 tarihinde
aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN
(Başkan)

Prof.Dr. Yüksel BÖLEK
(Üye)

Doç. Dr. Ahmet İLÇİM
(Üye)

Doç. Dr. Mehmet ATAK
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Hayri BABA
(Üye)

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İsmail Hakkı KARAHAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK - TOVAG tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 113O546

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Abdil Hakan EREN

ÖZET

BUĞDAYDA KÖK VE KÖK BOĞAZI ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞI VE TUZA KARŞI DAYANIKLILIK SAĞLAYAN miRNA (MİKRORNA)'LARIN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Abiyotik (tuz) ve biyotik (patojen) stresler, ekonomik önemi olan tahıllar dâhil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır. Buğday (*Triticum aestivum* L.) yaşamı süresince birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadır. Bu stres faktörleri, buğday üzerinde nadiren de olsa tek başlarına etki yapabilirken, genellikle etkilerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedirler. Bu tez çalışmasında gen ifadesi analizi yaklaşımı olan mikroarray uygulaması ile buğdayın çoklu stres faktörleri ile yaprak ve kök dokularına ait örnekler alınarak buğdayda dayanıklı (R) ve hassas (S) genotiplerindeki miRNA'lara ait ifade düzeyi saptanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* patojenleri seçilerek R ve S genotiplerine bu patojenlerin aşılması yapılarak aşırı nemli ortamda gelişmesi sağlanmıştır. Ayrıca tuz uygulaması için stres grubu örnekleri 5 gün süre ile 200 mM NaCl çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bu doğrultuda 11.861 adet miRNA probu içeren geniş çaplı mikroarray hazırlanarak R ve S genotiplerine ait 4 kütüphane oluşturularak mikroarray taraması yapılmıştır.

Çalışmada toplamda kontrol uygulamasına göre kat değişimi (fold change) 1,45'den fazla olan 131 miRNA tespit edilmiştir. *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* patojenlerinin uygulanması sonucu 87 miRNA, tuz uygulamasında ise 44 miRNA'nın ifade seviyelerinde değişim tespit edilmiştir. İfade seviyelerindeki değişimler hem kontrol ve stres uygulanmış aynı çeşitler arasında, hem de dayanıklı ve hassas çeşitler arasında gözlenmiştir. Çalışmamız sonucunda biyotik ve abiyotik uygulamaların etkileri sonucu ifade olan miRNA'lar tespit edildiği gibi genotipik farklılıklar nedeniyle de ifade değişimleri gözlenmiştir. Elde edilen bu miRNA'lara karşılık gelen hedef genlerin de ifadelerinde benzer değişimler belirlenmiştir.

Sonuçta R ve S genotiplerinde tespit edilen 87 miRNA'nın kök ve kök boğazı çürüklüğüne, 44 miRNA'nın ise tuz stresine yanıtta görev aldığı ve bu miRNA'ların yaklaşık 1200 üzerinde gen ailesini hedef aldığı tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçları biyotik ve abiyotik stres şartlarına dayanıklı çeşitlerin ıslahında seleksiyon için yeni markörlerin elde edilmesine imkân sağlayacak potansiyelde olduğu öngörülmektedir.

2014, 165 sayfa

Anahtar Kelimeler: miRNA(microRNA), *Fusarium culmorum*, *Bipolaris sorokiniana*, Tuz stresi, Mikroarray

ABSTRACT

**DETERMINATION OF MIRNA ACTIVITIES FOR RESISTANCE AGAINST
FOOT AND ROOT ROT DISEASE AND SALT STRESS IN WHEAT**

Abiotic and biotic stresses cause dramatical changes in physiology of most of the crop plants including wheat. During its life cycle, wheat (*Triticum aestivum* L.) encounters many stress factors. These stress factors less frequently show their effects singly but mostly they occur simultaneously. In this dissertation thesis, using micro array approach, one of the gene expression analyses, we attempted to assess gene expression levels of miRNAs on roots and leaves of wheat cultivars previously identified as resistant (R) and susceptible (S). For this purpose, we chose *F. culmorum* and *B. sorokiniana* causing foot and root rot which are inoculated on R and S genotypes of wheat. In addition, wheat plants underwent salt stress for 5 d in 200 mM NaCl.

Afterwards, four libraries belonging to R and S genotypes were screened with microarrays containing 11,861 miRNA probes. A total of 131 miRNAs, whose fold change values are bigger than 1.45, was obtained in this study. Significant changes were observed on levels of 87 miRNAs after fungus inoculations and 44 miRNAs after salt treatment. Changes in expression levels were observed both between control and treated plants, and between resistant and susceptible plants. Our results showed that expression differences of miRNAs dependent upon not only treatments but also genotypic differences. Additionally target gene analyses also showed similar expression differences were obtained on target genes corresponding to the miRNAs assessed in this study.

As a result, a total of 87 miRNAs related to foot and root rot disease as well as 44 miRNAs related to salt stress were identified and they are observed to target more than 1200 gene families. It is considered that results of this study are expected to breeding of wheat cultivars resistant to biotic and abiotic stress conditions by utilizing potentially useful new marker systems.

2014, 165 pages

Keywords: miRNA(microRNA), *Fusarium culmorum*, *Bipolaris sorokiniana*, Salt stress, Mikroarray

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının ve projenin yürütülmesi sırasında bana bilgi ve önerileri ile yol göstererek tecrübelerini esirgmeden paylaşan saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN'a,

Projenin ve tezin yürütülmesi sırasında bana laboratuvarını açarak bu çalışmanın Devamını sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi saygıdeğer hocam Doç. Dr. Turgay ÜNVER'e, Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda bulunan Arş. Gör. Behçet İNAL ve diğer arkadaşlar 'a

Projenin ve tezin yürütülmesi sırasında tecrübelerini esirgmeden paylaşan ayrıca Tohumların elde edilmesinde bana yardımcı olan Atatürk Üniversitesi Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Kamil HALİLOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a,

Çalışmamın her aşamasında değerli katkı ve enerjisini esirgemeyen fedakâr, yaptığı bu fedakârlıktan feragat edebilme sevgisini gösteren can arkadaşım Mustafa Kemal Üniversitesi Öğretim Görevlisi Sayın Dr. Emre İLHAN'a,

Labaratuar çalışmasında yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi Emre İSHAKOĞLU ve Sevda ÖZGÜR'e

Tez çalışmasında bana laboratuvarlarını kullanma izni veren Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi ve Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet ATAK'a,

İzolatların elde edilmesinde bana yardımcı olan On Dokuz Mayıs Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Berna TUNALI'ya,

Bu tez çalışmasının ve projesinin maddi yükümlülüklerini üstlenen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Başkanlığı'na (TÜBİTAK TOVAG 113 O 546 nolu proje),

Eğitim ve öğretimim süresince göstermiş olduğu sabırdan ayrıca maddi ve manevi destek sağlayan ve saygıyı hak eden eşim Fatma EREN'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
KISALTMALAR.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Buğdayda Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğüne Neden Olan Fungal Ajanlar	5
1.1.1. <i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Smith) ve <i>Bipolaris sorokiniana</i> (Saccardo)	8
1.2. Tuz Stresinin Bitkilere Etkileri	10
1.3. MikroRNA (miRNA).....	12
1.3.1. Bitki miRNA'larının Biyogenezi.....	14
1.3.2. DICER (DCL) Enzimi	16
1.3.3. RISC (RNA-indüklenmiş gen susturma kompleksi)	19
1.3.4. Argonat Proteini.....	20
1.4. miRNA Keşfi ve Buğdayda Korunmuş miRNA'lar	21
1.5. miRNA'ları Tesbit Etme Yöntemleri	23
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	26
2.1. Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalığı ve Dayanıklılık Tipleri	26
2.2. Biyotik Stres Yanıtlarında Bitki miRNA'larının Fonksiyonları.....	28
2.3. Abiyotik Stres Yanıtlarında Bitki miRNA'ların Fonksiyonları.....	31
2.4. Tuz Stresinin Moleküler Temelleri.....	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM	37

3.1.	Bitki Materyalinin Elde Edilmesi	37
3.1.1.	<i>F. culmorum</i> ve <i>B. Sorokiniana</i> Uygulama Materyalinin Elde Edilmesi ..	37
3.1.2.	Tuz Uygulama Materyalinin Elde Edilmesi	39
3.2.	Bitkilerin Büyütülmesi.....	40
3.2.1.	<i>F. culmorum</i> ve <i>B. sorokiniana</i> Uygulaması için Bitkilerin	
	Büyütülmesi	40
3.2.2.	Arnon ve Hoagland Çözeltilisinin Hazırlanması	40
3.3.	İzolatların Temini ve PDA Ortam Hazırlanması	41
3.4.	Fungus Solüsyonlarının Hazırlanması ve İnokülasyonu	42
3.5.	<i>F. culmorum</i> ve <i>B. sorokiniana</i> Uygulanan Bitkilerin Hasat Edilmesi	45
3.6.	Tuz Stresi Uygulaması ve Bitkilerin Hasat Edilmesi	46
3.7.	Toplam RNA İzolasyonu ve Konsantrasyon Tesbiti	47
3.8.	<i>F. culmorum</i> ve <i>B. sorokiniana</i> Uygulaması için miRNA	
	Mikroarray Çalışması.....	50
3.9.	Tuz Uygulaması için miRNA Mikroarray Çalışması	53
3.9.1.	miRNA Mikroarray Deney Prosedürü	54
3.10.	<i>F. culmorum</i> , <i>B. sorokiniana</i> ve Tuz Uygulaması için miRNA	
	Saptama ve qRT – PCR ile Değerlendirme.....	57
3.11.	miRNA’ların Hedeflediği Genlerin Saptanması ve qRT – PCR	
	ile Hedef Genlerin İfadelerinin Doğrulanması.....	63
3.12.	Bazı miRNA’ların Hedef Genlerinin qRT – PCR ile İfade Analizi	63
3.12.1.	qRT – PCR Verilerinin Değerlendirilmesi	65
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	66
4.1.	<i>F. culmorum</i> ve <i>B. sorokiniana</i> İnokülasyon Sonuçları	66
4.2.	<i>F.culmorum</i> Uygulanan Buğday Çeşitlerinin RNA Konsantrasyonları	67
4.3.	<i>B. sorokiniana</i> Uygulanan Buğday Çeşidinin RNA Konsantrasyonu	68

4.4.	Tuz Uygulanan R ve S genotiplerinin RNA Konsantrasyonu ve Jel Görüntüsü.....	70
4.5.	MikroRNA Mikroarray Analizi.....	71
4.5.1.	Biyotik Stres Faktörlerinin Analizi.....	71
4.5.2.	Abiyotik Stres Faktörünün Analizi.....	78
4.6.	Biyotik stres altındaki R ve S genotipinde tesbit edilen miRNA'larının Hedef Gen Analizi.....	81
4.7.	Abiyotik stres altındaki R ve S genotipinde tesbit edilen miRNA'larının Hedef Gen Analizi.....	83
4.8.	Biyotik stres uygulaması ile tesbit edilen bazı miRNA'ların qRT-PCR ve mikroarray ekspresyon analizleri.....	84
4.9.	Abiyotik stres uygulamasında tesbit edilen bazı miRNA'ların qRT-PCR ve mikroarray ekspresyon analizleri.....	90
4.10.	<i>F.culmorum</i> uygulamasındaki miRNA ve Hedef gen analiz sonuçları	93
4.10.1.	miR159 ve tar159.....	94
4.10.2.	miR1869 ve tar1869.....	94
4.10.3.	miR901 ve tar901.....	95
4.10.4.	miR169b-3p ve tar169b-3p.....	96
4.10.5.	miR482c-5p ve tar482c-5p	96
4.11.	<i>B. sorokiniana</i> uygulamasındaki miRNA ve Hedef gen analiz sonuçları	97
4.11.1.	miR1169-3p ve tar1169-3p.....	97
4.11.2.	miR319a-3p.2-3p ve tar319a-3p.2-3p.....	98
4.11.3.	miR398 ve tar398.....	99
4.11.4.	miR164g-3p ve tar164g-3p.....	99
4.12.	Tuz Uygulaması Hedef Gen Analizleri	100
4.12.1.	miR5655 ve tar5655.....	100
4.12.2.	mdm-miR159c ve tar159c	101

4.12.3. Osa-miR172b ve tar172b	102
4.12.4. rgl-miR164 ve tar164.....	102
4.12.5. cca-miR6108f ve tar6108f	103
4.12.6. hci-miR156a ve tar156a.....	104
4.12.7. Zma-miR482-5p ve tar482-5p	104
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	106
KAYNAKLAR	115
ÖZGEÇMİŞ	129
EKLER.....	130

KISALTMALAR

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
AGO	Argonat Proteini
BLAST	Temel Lokal Hiza Tarama Aracı
CAPS	Bölünerek Çoğaltılmış Polimorfik Dizi
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Ct	Eşik Döngü Değeri
DEPC	Dietilpirokarbonat
DLC	Dicer enzimi
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Dinükleotidtrifosfat
dsDNA	Çift İplikli DNA
EST	Dizisi Etiketlenmiş Dizi
EtBr	Etidyum bromür
EtOH	Etanol
HSTY	miRNA'yı sitoplazmaya taşıyan protein
HEN	Hua Enhancer
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HYL	Hyponastic leaves
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
Ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Patates dekstroza agaroz
PR	Patojen ile bağlantılı protein
PTGS	Transkripsiyon Sonrası Gen Susturma
pre-miRNA	Öncül microRNA
pri-miRNA	Primer microRNA
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi
RdRp	RNA polimeraz

RNA	Ribon�kleikasit
RNAi	RNA interferans
RISC	�nd�kleyici baskılama kompleksi
rRNA	Ribozomal RNA
miRNA	mikroRNA
ITS	�� transkripsiyon bo�lu�u
siRNA	K���k sessizle�tirci RNA
RT-PCR	Ters transkriptaz enzimi ile polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	Kantitatif e� zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SİMGELER

rpm	Santrifuj işleminde dk daki devir sayısı
ng	Nanogram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
L	Litre
SE	Serrate protein
TE	Tris EDTA
T _m	Erime Sıcaklığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Buğday kökündeki <i>Fusarium culmorum</i> 'un neden olduğu	
kök ve kök boğazı lezyonları.....	10
Şekil 1.2. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinden Bezostaja-I, Seri-82 ,	
Kıraç bitki büyümesinde değişimler.....	12
Şekil 1.3. Translasyon engellenmesi veya mRNA'nın parçalanması	13
Şekil 1.4. Bitki miRNA'larının biyogenezi	14
Şekil 1.5. Dicer proteininin domen yapısı.....	17
Şekil 1.6. a) RISC ve olgun miRNA b) Asimetrik yapıli RISC kompleksi modeli	19
Şekil 1.7. miRNA nın, hedef mRNA'daki 3' UTR veya 3' ORF 'ye bağlanması.....	20
Şekil 1.8. Argonaute proteininin domen yapısı	20
Şekil 1.9. TaqMan ve SYBR Green ile olgun miRNA'nın RT-PCR ölçme metotları ..	25
Şekil 2.1. Farklı buğday çeşitlerinde <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium graminearum</i>	
ve <i>Bipolaris sorokiniana</i> 'nın oluşturduğu hastalık şiddetleri.....	26
Şekil 2.2. Biyotik strese yanıtta bitki miRNA'ları.....	29
Şekil 2.3. SOS sinyal ile iyon dengesi ve tuzluluğa toleransın kalsiyum	
tarafından düzenlenmesi.....	35
Şekil 2.4. Tuz stresine maruz bırakılan bitkide artış gösteren miR165a.....	36
Şekil 3.1. Farklı buğday çeşitlerinde kök ve kök boğazı hastalığına	
..sebebi olan etmenlerin oluşturduğu hastalık şiddeti.....	38
Şekil 3.2. Buğdayın viyollere ekimi.....	40
Şekil 3.3. PDA ve sterillizasyonu sağlayan otoklav	42
Şekil 3.4. PDA ortamında geliştirilen <i>Fusarium culmorum</i> ve	
<i>Bipolaris sorokiniana</i> izolatları.....	43
Şekil 3.5. Solüsyon haline getirilmiş <i>Fusarium culmorum</i> ve	
.. <i>Bipolaris sorokiniana</i> spor ve miselleri.....	43
Şekil 3.6. Spor konsantrasyon ölçümü yapılan Thoma deep	44
Şekil 3.7. <i>Fusarium culmorum</i> sporları ve miseller	44
Şekil 3.8. <i>Bipolaris sorokiniana</i> sporları ve miselleri.....	45
Şekil 3.9. İklimlendirme dolabı ve hasata hazır R ve S genotip çeşitleri	46

Şekil 3.10. İklimlendirme dolabında büyütülen buğday çeşitleri	47
Şekil 3. 11. EZ-RNA Total RNA Isolation Kiti ile RNA izolasyonu	49
Şekil 3.12. Thermo nanodrop 2000C spektrofotomere.....	50
Şekil 3.13. <i>Fusarium culmorum</i> ve <i>Bipolaris sorokiniana</i> uygulaması ve.....	
ikişer tekrarlı miRNA-mikroarra.....	52
Şekil 3.14. Tuz uygulaması ve ikişer tekrarlı miRNA –mikroarray	54
Şekil 4.1. Mızrak ve Bezostaja-I çeşitlerine fungus uygulama öncesi ve Mızrak	
çeşitinde fungus uygulamasının 48. Saat sonrası genel görünüşü.	66
Şekil 4.2. Patojen uygulamasının 48. saatinde kontrol ve <i>Fusarium culmorum</i>	
uygulama örnekleri.....	67
Şekil 4.3. <i>Fusarium culmorum</i> Stresi RNA’lar Agaroz Jel görüntüsü	68
Şekil 4.4. <i>Bipolaris sorokiniana</i> Stresi RNA’lar Agaroz Jel görüntüsü	69
Şekil 4.5. Tuz Uygulamasındaki RNA’lar ve Agaroz Jel görüntüsü	70
Şekil 4.6. R ve S buğday genotiplerinde <i>Fusarium culmorum</i> ile <i>Bipolaris</i>	
<i>sorokiniana</i> uygulaması sonucu oluşan miRNA grupları.....	75
Şekil 4.7. Biyotik stres faktörleri ile yapılan miRNA-mikroarray ısı grafiği.	77
Şekil 4.8. Abiyotik stres faktörleri ile yapılan miRNA-mikroarray ısı grafiği.	81
Şekil 4.9. <i>Fusarium culmorum</i> uygulamasında tesbit edilen miRNA’ların.....	
biyolojik fonksiyonları.....	82
Şekil 4.10. <i>Bipolaris sorokiniana</i> uygulamasında tesbit edilen miRNA’ların	
biyolojik fonksiyonları.....	83
Şekil 4. 11. Tuz uygulamasında tesbit edilen miRNA’ların biyolojik fonksiyonları.....	84
Şekil 4.12. ppt-miR901’nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği.....	85
Şekil 4.13. bdi-miR159’un mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği.....	85
Şekil 4.14. osa-miR1869’nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği	86
Şekil 4.15. ptc-miR169b-3p’nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği	86
Şekil 4.16. ptc-miR482c-5p’nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği.....	87
Şekil 4.17. cre-miR319a-3p.2-3p’nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği	87
Şekil 4.18. ssl-miR398’in mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği	88
Şekil 4.19. zma-miR164g-3p’nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafikleri	89
Şekil 4.20. cre-miR1169-3p’nin mikroarray ve qRT-PCR grafiği	89
Şekil 4.21. ath-miR5655’in mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği.....	90

Şekil 4.22. mdm-miR159c'nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği.....	90
Şekil 4.23. hci-miR156a'nın mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği	91
Şekil 4.24. cca-miR6108f 'in mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği	91
Şekil 4.25. rgl-miR164'nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği	92
Şekil 4.26. osa-miR172b'nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği	92
Şekil 4.27. zma-miR482'nin mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon grafiği	93
Şekil 4.28. miR159 ve tar159'in ifade analizi.....	94
Şekil 4.29. miR1869 ve tar1869'un miktar analizi	95
Şekil 4.30. miR901 ve tar901'in miktar analizi	95
Şekil 4.31. miR169b-3p ve tar169b-3p'nin miktar analizi	96
Şekil 4.32. miR482c-5p ve tar482c-5p'nin miktar analizi	97
Şekil 4.33. miR1169-3p ve tar1169-3p'nin miktar analizi	98
Şekil 4.34. miR319a-3p.2-3p ve tar319a-3p.2-3p'nin miktar analizi	98
Şekil 4.35. miR398 ve tar398'in miktar analizi	99
Şekil 4. 36. miR164g-3p ve tar164g-3p'nin miktar analizi	100
Şekil 4.37. miR5655 ve tar5655'nin miktar analizi	101
Şekil 4. 38. mdm-miR159c ve tar159c'nin miktar analizi	101
Şekil 4. 39. Osa-miR172b ve tar172b'nin miktar analizi.....	102
Şekil 4. 40. rgl-miR164 ve tar164'un miktar analizi	103
Şekil 4.41. cca-miR6108f ve tar6108f'in miktar analizi.....	103
Şekil 4.42. hci-miR156a ve tar156a'nın miktar analizi	104
Şekil 4.43. zma-miR482-5p ve tar482-5p'nin miktar analiz.....	105
Şekil 5.1.Tuz stresindeki buğdayın genotipinde oluşan bazı miRNA.....	
biyoenformatik olarak tespit edilen hedef genleri.....	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Proteine dönüşebilen ve dönüşemeyen RNA molekülleri	2
Çizelge 1.2. Çeşitli stres şartlarında ortaya çıkan miRNA ve hedef genleri.....	3
Çizelge 1.2. (devamı) Çeşitli stres şartlarında ortaya çıkan miRNA ve hedef genleri....	4
Çizelge 1.3. DCL enzim çeşitleri, domen yapısı ve fonksiyonları.....	17
Çizelge 1.4. Buğdayda korunmuş miRNA'lar ve Fonksiyonları	22
Çizelge 2.1. Mızrak ve Bezostaja-I buğday çeşitlerinde <i>B. sorokiniana</i> 'nın	
oluşturduğu kök ve kök boğazı hastalığının % şiddetleri.....	27
Çizelge 2.2. Biyotik streste düzenlenmiş bazı miRNA'lar ve hedef proteinleri.....	30
Çizelge 2.3. Abiyotik streste düzenlenmiş mRNA'lar ve hedef aileleri.....	34
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılacak ekmeklik buğday çeşitleri ve	
.. geliştiren kurumlar.....	37
Çizelge 3.2. Biyotik stres koşullarına dayanıklı ve hassas olan buğday	
çeşitleri ile pedigrileri.....	37
Çizelge 3.3. Abiyotik stres koşullarına dayanıklı ve hassas olan buğday	
çeşitleri ile pedigrileri.....	39
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılacak olan <i>Fusarium culmorum</i> ve	
<i>Bipolaris sorokiniana</i> izolatları.....	41
Çizelge 3.5. <i>Fusarium culmorum</i> uygulamasında tesbit edilen sap-ilmik ve	
spesifik miRNA primerleri.....	61
Çizelge 3.6. <i>Bipolaris sorokiniana</i> uygulamasında tesbit edilen sap-ilmik ve	
spesifik miRNA primerleri.....	62
Çizelge 3.7. Tuz uygulamasında tesbit edilen sap-ilmik ve spesifik miRNA.....	
primerleri.....	62
Çizelge 3.8. qRT-PCR ile ifade düzeyleri belirlenmeye çalışılan hedef	
miRNA'ların primerleri.....	64
Çizelge 4.1. <i>Fusarium culmorum</i> kontrol ve uygulama örneklerine	
ait RNA konsantrasyon değerleri	67
Çizelge 4.2. <i>Bipolaris sorokiniana</i> kontrol ve uygulama örneklerine	
ait RNA konsantrasyon değerleri.....	69

Çizelge 4.3. Tuz stresi kontrol ve uygulama örneklerine ait RNA	
konsantrasyon değerleri.....	70
Çizelge 4.4. Fungus uygulaması sonucu elde edilen kat değişim değerleri.....	71
Çizelge 4.4. (devamı) Fungus uygulaması sonucu elde edilen kat değişim değerleri....	73
Çizelge 4.4. (devamı) Fungus uygulaması sonucu elde edilen kat değişim değerleri. ...	73
Çizelge 4.4. (devamı) Fungus uygulaması sonucu elde edilen kat değişim değerleri. ...	74
Çizelge 4.5. Abiyotik stres faktörü kat değişim değerleri.....	78
Çizelge 4.5. (devamı) Abiyotik stres faktörü kat değişim değerleri.	79
Çizelge 4.5. (devamı) Abiyotik stres faktörü kat değişim değerleri.	80
EK.1. <i>F. culmorum</i> miRNA'ları, hedef gen ID ve hedef gen adı	130
EK. 2. <i>B. sorokiniana</i> miRNA'lar, Hedef gen ID ve Hedef gen adı.....	134
EK. 3. Tuz stresi miRNA'lar, Hedef gen ID ve Hedef gen adı	143
EK. 4. Biyotik ve abiyotik stres miRNA'ları GO numarası ve genel işlevleri.....	164

1. GİRİŞ

Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L. AABBDD, $2n = 42$) insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan önemli tahıllardan biridir. Buğday üretimi kuzey kutbundan ekvatora kadar geniş bir alanda (deniz seviyesinden 3000 m yükseğe kadar) yapılmaktadır. Diğer besinlere göre adaptasyon sınırı çok geniştir (Scofield ve ark., 2005). Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de gerek ekim alanı gerekse üretim miktarı bakımından buğdayın önemi büyüktür. Buğday üretimini etkileyecek biyotik ve abiyotik faktörlerden herhangi biri tüm toplumları etkileyecektir. Çünkü buğday uluslararası ticarete yer alan, tüm dünyadaki bitkisel üretimin büyük bir kısmını oluşturmaktadır (Gill ve ark., 2004).

Ülkemiz, buğday üretiminde yıllar itibari ile kendine yeterli durumdadır. Ancak özellikle hava koşullarının elverişsiz olduğu yıllarda üretimde düşüşler olurken, bazı yıllar hastalıklar özellikle pas, süne, kök boğazı çürüklüğü hastalığı ve kuraklık buğdayın kalitesini büyük oranda düşürdüğünden, kaliteli ürün gereksinimi dış alımla karşılanmaktadır (FOA, 2013). Biyotik ve abiyotik stres faktörleri buğday üretiminde tahıl kalitesi ve verimi için önemli sınırlayıcı etkenlerdir.

Bitkiler biyotik ve abiyotik streslere tolerans sağlamak için birden fazla mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Hücre zarında bariyer oluşturulması ve zar yapısının değişmesi (Yakıt ve Tuna, 2006),
- İyonların hücre zarından geçişi durdurmak veya vakuollerde depolamak (Parida ve Das, 2005),
- Reaktif oksijen türevleri (ROT) ve antioksidan enzimlerin sentezinin artırılması (Zhu, 2005),
- Absisik asit (ABA) gibi bitki hormonlarının sentezinin artırılması (Borsani ve ark., 2003),
- Tuza aşırı duyarlılık (SOS) yolunun aktifleştirilmesi (Yılmaz ve ark., 2011),
- Strese bağlı olarak RNAi (RNA interferans= RNA müdahalesi) mekanizması ve MYB (myeloblastosis) gibi transkripsiyon faktörlerinin (Borsani ve ark., 2003) etkisi ile düzenleyici proteinlerin sentezlenmesidir (Yılmaz ve ark., 2011).

Bitkilerin strese karşı koyma mekanizmalarından biri de RNA temelli savunma mekanizması olarak bilinen RNA interferans (RNAi)'dır. Müdahaleci RNA veya RNAi olarak bilinen bu teknoloji ile biyotik veya abiyotik stres etmenine spesifik, hedef gen bölgeleri miRNA' (mikro RNA)'lar ile susturularak, gerek patojen zararının gerekse kuraklık, tuz ve soğuk gibi abiyotik stres faktörünün etkisinin azaltılması amaçlanmaktadır (Kang ve ark., 2012).

Biyotik ve abiyotik streslerin yol açtığı hasarı RNAi sistemine bağlı olarak azaltmak için bitkilerde;

- 1) transkripsiyonel (RNA sentezi sırasında)
- 2) transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyon: RNA sentezi sonrası)
- 3) translasyon sonrası (post-translasyon: protein üretimi sonrası) düzeylerde gen ifadesini yeniden programlamak için uyumlu yanıt mekanizmaları gelişmiştir (Xin ve ark., 2010).

Stres şartlarına bağlı olarak bu metabolik salgıların değişmesinde doğrudan miRNA'lar ya da dolayısıyla *MIR* genleri rol oynamaktadır (Khraiwesh ve ark., 2012). RNA molekülleri nükleotidlerden oluşan ve hücrede protein sentezini üstlenerek genin ifade edilmesini sağlayan işlevsel moleküllerdir. miRNA'lar ise hücrede proteine dönüştürülmeyen küçük RNA molekülleridir. Hücrede mRNA proteine dönüştürülebilirken tRNA, rRNA ve daha küçük RNA'lar (Çizelge 1. 1) proteine dönüştürülemez (Buckingham, 2003).

Çizelge 1. 1. Proteine dönüşebilen ve dönüşemeyen RNA molekülleri

RNA Çeşitleri	
Proteine dönüşen	Proteine dönüşmeyen
mRNA (mesajcı RNA)	tRNA (taşıyıcı RNA)
	rRNA (ribozomal RNA)
	snoRNA (küçük nükleolar RNA)
	miRNA (mikro RNA)
	snRNA (küçük nüklear RNA)
	siRNA (küçük sessizleştirici RNA)

Bitki miRNA'ları genellikle protein kodlamayan genomik bölgelerde bulunurlar ve kendi gen bölgelerinden üretildikleri düşünülmektedir (Eldem ve ark., 2013). miRNA'ların ökaryotik genomların %30'unu kontrol ettiği düşünülmektedir (Vaziri ve ark., 2012). miRNA'ların intron bölgelerinde bulunmasından dolayı proteine dönüşmedikleri belirtilmektedir (Kidner ve Martienssen, 2005). Kimyasal ve fonksiyonel olarak siRNA'lara (kısa sessizleştirici RNA'lar) benzemektedirler. siRNA'lar gibi miRNA'larda PTGS (Post transcriptional gene silencing = transkripsiyon sonrası gen sessizleştirme) olarak bilinen bir mekanizmayla genlerin transkripsiyonunu kontrol ederler (Bartel, 2004). Bugüne kadar, bitki miRNA'ları gelişimsel geçişler, yaprak büyümesi, organ polaritesi, oksin sinyalizasyon ve RNA metabolizması dahil olmak üzere birçok süreçte işlev göstermiştir (Xin ve ark., 2010). Bitkilerde gelişmeyi düzenlemenin yanında miRNA ve küçük diğer RNA'lar aynı zamanda transpozon, retrotranspozon ve virüsler gibi genetik materyali baskılamak sureti ile genom bütünlüğünün korunmasına yardımcı olurlar (Tomari ve ark., 2004). Özellikle ticari öneme sahip bitkilere ait biyotik ve abiyotik stres şartlarında ifade edilen miRNA'lar ve onların etkileşimde bulunduğu hedef genlerin belirlenmesi ve bu genlerin bitki çeşitlerinde modifikasyonu yerel ve ulusal kalkınma açısından önemli olacaktır. Ayrıca, TÜBİTAK Vizyon 2023 raporunda biyotik ve abiyotik stres kaynaklarının saptanmasına ve gen kaynaklarının kullanımına yönelik çalışmaların hızlandırılması öncelikli konular arasında yer almaktadır. Çeşitli bitkilerde biyotik ve abiyotik stres şartlarında ortaya çıkan miRNA ve hedef gen aileleri Çizelge 1. 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. 2. Çeşitli stres şartlarında ortaya çıkan miRNA ve hedef genleri (Eldem ve ark., 2013'den kısaltılmıştır)

Bitkiler	Stres	miRNA	Hedef gen ve protein
Arabidopsis, Arpa, Çeltik, Populus	Kuraklık, Tuz, soğuk, Fungus patojeni	miR156	Sbp ailesi TF
Arabidopsis, soya fasulyesi	Kuraklık, ABA, Tuz, Bakteri patojeni	miR159	Myb33 ve Myb101, Myb33 ve Myb65 Tf
Populus, mısır, Çeltik	Kuraklık, Tuz	miR162	Dcl1
Populus	Mekanik stres	miR164	Nac Tf

Çizelge 1. 2. (devamı) Çeşitli stres şartlarında ortaya çıkan miRNA ve hedef genleri (Eldem ve ark., 2013'den kısaltılmıştır)

Arabidopsis, Arpa, Soya fasulyesi, Buğday, mısır	Tuz, Soğuk, Kuraklık Sıcaklık, Fungus ve Bakteri patojeni	miR165/ miR166	Hd-ZIP III Tf, Phabulosa, homeobox genleri Nf alt birim Y, ccaat-box bağlayıcı faktör
Arabidopsis, Çeltik	Kuraklık, Tuz, Soğuk	miR169	
Arabidopsis, Populus, Arpa, Çeltik	Kuraklık, Mekanik, Tuz, Soğuk	miR171	Scl Tf
Arabidopsis, Populus, Arpa, Çeltik	Soğuk, Kuraklık	miR172	Ap2 Tf
Arabidopsis, Çeltik	Tuz, Kuraklık, Soğuk, Bakteri patojeni	miR319	Tcp ailesi Tf
Arabidopsis, Çeltik, Buğday	Tuz, Isı, Soğuk, Kuraklık, Bakteri ve Fungus patojeni	miR393	F-box protein, Tir1protein, afb2 ve afb3 genleri

Buğdayda biyotik ve abiyotik strese dayanıklılık birçok biyokimyasal çalışmanın yanında fenotipik gözlemlere de dayanmaktadır (Demirci, 2003). Buğday stres savunmasını bazı metabolik salgılarla düzenlemektedir (Özeker, 2005). Bu savunma sırasında patojen, hidrolitik enzim, toksin gibi kimyasal bileşikler kullanırken, bitkiler ise fiziksel bariyerlerin yanı sıra, savunma peptitleri, antioksidanlar, sekonder metabolitler ve antimikrobiyal özellikteki proteinlerin (Patojen ile bağlantılı proteinler; PR proteinleri) dâhil olduğu çok sayıda savunma unsurlarına sahiptirler. Antioksidanlar hücrel hasarların engellenmesinde görev yapmaktadırlar. Bu savunmada görev yapan bileşikler patojenlerin neden olacağı zararı minimum düzeye indirmektedirler (Koç ve ark., 2008). Bitkide stres ile mücadelede en etkili yollardan bir tanesi o strese karşı dayanıklı bitkilerin kullanılmasıdır. Dayanıklı bitkilerde, bitkinin bir stresle karşılaşması durumunda stres bitki ilişkisinin bitkinin lehine değişerek bitkinin bu strese karşı koyabilmesi gerekmektedir. Bitkilerde dayanıklılık sadece bitkinin genetik yapısına bağlı değildir (Agrios, 2005). Bu durumda strese neden olan patojenin kalıtsal özellikleri de önemli rol oynamaktadır. Burada bitkideki dayanıklılığı, konukçu ile patojenin genetik özellikleri arasındaki interaksiyon belirlemektedir. Bitkide enfeksiyonun gelişmesinde ve enfeksiyon sonrası gelişmelerde bitkinin dokusal ve biyokimyasal yapısı önemlidir (Değirmenci ve Ertunç, 2012). Yapılan çalışmalarda bitkiler patojenlere karşı birçok savunma mekanizması geliştirmiş olduğu ortaya

çıkıştır (Kantar ve ark., 2011). Bu savunma mekanizmaları patojenleri caydırıcı rol oynarken, kendi metabolizmasını düzenleyerek patojene karşı koyarlar. Eğer bu etkileşim patojenler için etkisiz kalırsa buna bağlı olarak hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Görüldüğü gibi bitkiler, yaşadığı ortamı patojen veya simbiyotik canlılarla paylaşmak bazen de bu canlılarla rekabet etmek zorunda kalabilirler. Bu yüzden bitkiler ortama adapte olma işlevini çeşitli moleküler ve fizyolojik olaylar sayesinde gerçekleştirmektedirler (Koç ve Üstün, 2008). Bitkilerde abiyotik streslere karşı moleküler kontrol mekanizmaları stresle ilgili bazı genlerin aktivasyonuna ve ifadesine (regülasyon) dayanmaktadır. Bu genlerin ürünleri hücrenin iç ve dış ortamla iletişimde (signaling), genlerin transkripsiyonel kontrolünde, hücre zarı ve proteinlerin korunmasında, serbest radikallerin ve toksinlerin temizlenmesinde rol oynamaktadır (Wang ve ark., 2003).

1.1. Buğdayda Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğüne Neden Olan Fungal Ajanlar

Buğday yetiştiriciliğindeki en önemli sorunlardan biri *Fusarium* türleri tarafından oluşturulan kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığıdır. Buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğünü oluşturan türler arasında *Fusarium culmorum* (W.G. Smith), *Fusarium graminearum* (Schwabe) ve *Bipolaris sorokiniana* (Saccardo) başta gelmektedir (Cook ve Christensen, 1976).

Dünyada tahıl üretimindeki kayıpların ortalama %34'ü hastalık, zararlı ve yabancı otlardan kaynaklanırken buğday ve arpada kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı nedeniyle % 10-40 arasında ürün kaybı olmaktadır (Değirmenci ve Ertunç, 2012). Bu hastalıklara neden olan etmenlerden biri olan *F. culmorum* türü buğday, arpa, mısır ve çeltikte kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalıklarını oluşturmaktadır. *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının baş etmenlerinden biridir. *F. culmorum* buğday yetiştiriciliğinin yoğunlaştığı kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının görüldüğü Ankara, Konya ve Eskişehir yörelerinde yaygın bir patojendir (Tunalı ve ark., 2008).

Kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının en önemli belirtisi kök dokusunun zayıflamasıyla tahılın erken yatmasıdır. Buğdayın gelişip iyi verimi vermesi için sağlıklı

bir kök sistemine sahip olması gerekir. Kök ve kök boğazı hastalığı bitkinin su ve besin (ksilem ve floem tıkanmasını sağlar) iletim düzenini bozarak verimi olumsuz etkilemektedir (Erdurmuş ve Katırcıoğlu, 2008). Fungus yayılmasına bağlı olarak dokularda yoğun bir misel tabakası oluşturarak, trikotesen grubunda bulunan bazı mikotoksinleri üretir ve yayılımını sürdürerek verim ve kalite kaybına neden olurlar (Tunalı ve ark., 2008). Verim ve kalitenin artırılması için bitki ıslahı çalışmaları geçmişten günümüze kadar yapılmaktadır. Klasik bitki ıslahı ile bu hastalık etmenleriyle mücadele edilebileceği gibi bitki fizyologları ise biyoteknolojinin gelişmesi ile biyotik strese dayanıklılığın moleküler temellerini açıklamaya çalışmaktadır (Soldatini ve ark., 1985; Edreva, 1998). Bitkiler sadece bir strese maruz kalmazlar aynı anda birçok stres faktörü ile karşı karşıya kalabilirler. Gerek buğday gerekse diğer bitkilerin üretimi açısından sorun olan *F. culmorum*, *B. sorokiniana* ve diğer patojenlere karşı iki türlü önlem alınabilmektedir. Bunlardan ilki 'Kaçınma' olarak açıklamaktadır. Bu amaçla bitkiler, yapılarında morfolojik ve kimyasal değişiklikler gerçekleştirirler. İkinci dayanıklılık mekanizması ise 'Tolerans' olarak bilinmektedir. Diğer bir ifade ile stres faktörünün etkisini azaltma çabasıdır ve bu amaçla hücre ve doku seviyesinde değişiklikler gerçekleştirilir (Poljakoff-Mayber ve Gale, 1975). Örneğin, hücre duvarının güçlendirilmesi (Zar Dayanıklılığı), sekonder metabolit üretimi ve prolin gibi stres proteinlerinin sentezlenmesi tolerans mekanizmasının başında gelmektedir (Koç ve ark., 2008).

Kök ve kök boğazı çürüklüğü etmeni olan *Fusarium*'a dayanıklılık, çevresel bir çok faktörü içine alan özellik göstermektedir (Caroline ve ark., 2007). Aktaş ve ark. (1999)'a göre Konya ilinde buğday ve arpa ekiminde kalite ve verimi etkileyen hastalıkların başında kök ve kök boğazı çürüklüğü gelir ki bu hastalığı oluşturan 7 tür içinde *F. culmorum* en önemlisidir. Demirci (2003), 10 ekmeklik buğday çeşidiyle yaptığı çalışmada *F. culmorum*'a karşı Bezostoja ve Gün 91'in orta derecede dayanıklı olduğunu ve *F. graminearum*'a ise 10 buğday çeşidinin hiçbirinin dayanıklı bulunmadığını belirtmiştir. Tunalı ve ark. (2008), ülke genelinde yapılan en kapsamlı sörvey çalışmalarından birinde kök ve kök boğazı çürüklüğü etmeni fungusların yaygınlığının bulunuş oranları ve ekolojik şartlarla ilişkileri ortaya koymuştur. Bu çalışma sonuçlarına göre, tahıl yetiştiriciliğinin yapıldığı Orta Anadolu, Marmara ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde özellikle sulanabilir alanlarda *Fusarium*

enfeksiyonları yaygındır (Arslan ve Baykal, 2002; Demirci, 2003; Hekimhan ve ark., 2005). Yukarıda da kısmen ifade edildiği gibi kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının birçok patojeni bulunmaktadır. Ülkemizde buğdayla yapılan çalışmalarda yaygın (dominat) patojen bölgeden bölgeye göre değişebilmektedir. Toprak kökenli olan *B. sorokiniana*, *Fusarium spp.* ve *Rhizoctonia* gibi funguslar kök ve kök boğazı hastalığı patojeni olarak tanımlanır (Erdurmuş, 2000). Trakya, Marmara ve Ege bölgesinde kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına neden olan patojenler arasında *B. sorokiniana*’ya da sıkça rastlanmaktadır (Erdurmuş ve Katırcıoğlu, 2008).

Biyoteknolojik çalışmalarla hastalık etmenlerinin buğday kromozomları üzerindeki yeri tespit edilerek markör destekli seleksiyon yöntemiyle, yeni dayanıklı çeşitlerin meydana getirilmesine yardımcı olunabilir (Bai ve Shaner, 1999). Tüm bunların yanında bu hastalık etmenlerine karşı dayanıklı çeşitlerden dayanıksız çeşitlere klasik ıslah yöntemleriyle gen aktarımı da yapılabilir. *Fusarium spp.*’ye dayanıklılığın buğdayda kantitatif lokuslar (Quantitative trait loci: QTLs) tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (Pritsch ve ark., 2000). Patojen-bağılantılı (PR) proteinlerin bazıları duyarlılık reaksiyonu süresince uyarılmaktadır. Patojenlere yanıtla ilişkili olduğu belirlenen bazı genler [(Peroksidaz, PR-1, PR-2 (β -1,3-glukonaz), PR-3 (kitinaz), PR-4 ve PR-5 taumatin benzeri proteinler)] (Pritsch ve ark., 2000) bilinmektedir.

Son yıllarda RNA üretimi (transkriptomik) üzerine yapılan çalışmalar RNA’ların özellikle stres şartlarına dayanıklılıkla ilgili düzenleyici görevler üstlendiğini göstermiş ve özellikle miRNA’lardan bazılarının strese dayanıklılık mekanizmasında aktif rol oynadığı belirlenmiştir (Bartel, 2004; Ambros ve Chen, 2007; Khraiweh ve ark., 2012).

Bu çalışmada ekmeklik buğday çeşitlerine *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* patojenlerinin uygulaması yapılarak buğday çeşitlerinde miRNA’ya bağlı savunma mekanizmasında hangi miRNA’ların görev aldığını tespit etmek amaçlanmıştır. Çünkü savunma amaçlı miRNA’ların bitkiler âleminde gen dizileri korunmuş birçok miRNA gen ailesine dahil olduğu ve bunlardan bazılarının birbirinden oldukça uzak olan karayosunları ve çiçekli bitkiler arasında evrimsel olarak korunduğu gözlemlenmiştir (Axtell ve ark., 2011).

1.1.1. *Fusarium culmorum* (W.G.Smith) ve *Bipolaris sorokiniana* (Saccardo)

Fusarium cinsinin 100'ün üzerinde türü bulunmaktadır (Gerlach ve ark., 1982). *Fusarium* cinsi oldukça heterojen bir gruba sahip olduğundan morfolojik ve biyokimyasal kriterlere göre türlerin teşhisi oldukça zordur (Edel ve ark., 1995). Buğday yaşam döngüsünün her aşamasında *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un veya *B. sorokiniana*'nın neden olduğu kök ve kök boğazı hastalığına yakalanabilir. Ancak özellikle nemli ortam koşullarında çiçeklenme ve tohum oluşumunun görüldüğü generatif evrede hastalık riskini daha da artırmakta ve bulunduğu ortamda fungal organizmanın rekabetinde avantaj sağlayan mikotoksinler ise hastalığın yayılmasında oldukça etkili olduğu bilinmektedir (Albayrak ve Yörük, 2012). Kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı patojenleri olan fungusların morfolojik ve morfolojik olmayan özelliklerindeki yüksek çeşitlilikten dolayı tanımlanması oldukça zordur. Fakat bu patojenler izolasyon, stereomikroskop, kültür çalışmaları, mikroskop incelemeleri ve patojenite testleri sonucunda ancak tanımlanabilmektedir (Aktaş, 2001; Erdurmuş ve Katırcıoğlu, 2008). Fungusun temel özellikleri makrokonidi'nin şekli, mikrokonidi'nin olup olmaması, mikrokonidi'nin zincir yapısının olup olmaması ve konidiyoforlarının tipidir. Sekonder özellikler ise klamidyosporların varlığı, bunların yapılanması (konfigürasyon) ve pozisyonu, skleroti ya da sporodokiya'nın varlığıdır (Tunalı ve ark., 2008). Tanımlama ayrıca, koloni morfolojisi, besi yerindeki renklenmesi ve büyüme oranına bakılarak yapılmaktadır (Burgess ve ark., 1988). Günümüzde *Fusarium* izolatlarında kemotiplendirme kapsamında; HPLC (high performance liquid chromatography), GC/MS (gas chromatography-mass spectrometry) gibi yöntemler kullanılarak, üretilen mikotoksin tipi ve miktarı, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile de trikotesen biyosentezinde görev alan enzimleri şifreleyen genlerin ve transkriptlerinin varlığı ve miktarları belirlenebilmektedir (Chandler ve ark., 2003). Moleküler biyolojideki gelişmelere bağlı olarak daha çok hastalığa dirençli bitki eldesi, hastalık etmenlerinin tür ve cins düzeyinde tanısı, genetik çeşitliliğin ortaya çıkarılması, kemotiplerin belirlenmesi veya mikotoksin üretimi ile ilişkili gen ifade profillerinin üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Goswami ve ark., 2004; Albayrak ve Yörük, 2012).

Son yapılan çalışmalarda özellikle *F. culmorum* ve *F. graminearum* türlerini ayırt edebilmek için iç transkripsiyon boşluğu (ITS= Internal transcribed spacer)

bölgesinin dizi varyasyonlarından yararlanılmaktadır. *F. culmorum* ve *F. graminearum*'da ITS bölgesi türe özgü primerler elde etmeye olanak sağlayacak derecede polimorfiktir (Abdel-Satar ve ark., 2003). Ayrıca çeşitli organizmalar arasında polimorfizmi değerlendirmek amacıyla çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem daha çok funguslarda tür içi ve türler arası genetik varyasyonun belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. AFLP her bir reaksiyonun çözünürlük seviyesi ve tekrarlanabilirliği açısından tesadüfi çoğaltılmış polimorfik DNA polimorfizmi (RAPD)'ne göre daha avantajlıdır. Ayrıca AFLP yöntemi özellikle tür içi seviyede birçok fungus arasındaki varyasyonların ortaya çıkarılmasında büyük potansiyele sahiptir (Kılıçoğlu ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada *Fusarium* DNA'sı EcoRI ve *MseI* restriksiyon endonükleazlarla kesilerek AFLP kalıpları ile birlikte, dört primer kombinasyonundan toplam 80 polimorfik AFLP profili elde edilmiştir. Bu sonuçlar gösteriyor ki *Fusarium*'un moleküler karakterizasyonu için AFLP iyi bir yöntemidir (Abdel-Satar ve ark., 2003; Kılıçoğlu ve ark., 2008).

F. culmorum konidia adı verilen ve fungusun yayılımında esas rol oynayan eşeysiz (aseksüel) sporları üretmektedir. *F. culmorum*, kısa, sağlam, kalın-duvarlı ve hafifçe kıvrık uca doğru bariz incelmış bir makrokonidi oluşturmaktadır (Nelson ve ark., 1983). Fungus, bitki üzerinde yoğun bir misel tabakası oluşturur, kısa bir hücresel büyümeden sonra hücre içine ve dışına yayılan hifler oluşturarak konukçu dokuya zarar vermeye başlar. Buğday kök ve kök boğazı hastalığı doku üzerinde açık-koyu kahverenginden siyaha kadar değişen lezyonlar görünür (Şekil 1. 1). Funguslardaki ve bitkilerdeki morfolojik belirtiler hastalığın erken tanınmasında oldukça önemlidir. Bu belirtilerin moleküler yöntemlerle daha erken fark edilmesi hastalığa karşı önlem almada oldukça önemli olacaktır.



Şekil 1. 1. Buğday kökündeki *F.culmorum*'un neden olduğu kök ve kök boğazı lezyonları

1.2. Tuz Stresinin Bitkilere Etkileri

Abiyotik stres faktörlerinden biri olan topraktaki tuz artışı, hem tarım yapılan araziye hem de o bölgede yetişen bitkileri olumsuz etkilemektedir. Toprakta tuz yoğunluğunun artmasına bağlı olarak bitkilerde su alım potansiyelinin azalmasına neden olurken bitki hücrelerinde bir dizi tepkinin oluşmasına neden olmaktadır (Yılmaz ve ark., 2011). Abiyotik faktörlerden olan kuraklık ve tuz stresleri hücre zarı düzensizliğine, reaktif oksijen türlerinin oluşmasına, fotosentez kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır (Bartel ve ark., 2005).

Ülkemizin genelinde kurak iklim koşulları, tuzluluk ve çoraklığın oluşumu için ideal ortamı oluşturmaktadır. Yağışlar ile eriyen tuzlar, fazla sıcaklığın etkisi ile bitkilerin etkin olarak kullandığı alanlarda çökelmekte veya toprak yüzeyinde birikerek tuz tabakaları oluşturmaktadır. Bu nedenle ülkemize toprak kalitesi yönünden tarıma en elverişli alanlar, tuzluluk sorunundan dolayı kullanılamaz hale gelmektedir (Eyüpoğlu, 1999). Yeryüzünde yıllık 10 milyon ha tarım arazisi tuz etkisiyle kullanılamaz hale gelmesi tuzlulukla ilgili sorunun boyutunu daha iyi göz önüne sermektedir. Özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yetersiz yağış ve yüksek buharlaşma tuzluluğun başta gelen sebeplerindendir (Yılmaz ve ark., 2011). Diğer yandan yanlış sulamalar ile özellikle drenaj koşullarının kötü olduğu yerlerde tuzluluk olabilmektedir (Woods, 1996). Sıklıkla kuraklık stresi ile birlikte yüksek sıcaklığında eklenmesiyle tuzluluk aşırı verim kaybına neden olur ve kalitede azalma kaçınılmaz olur. Son yıllarda bitki fizyologları ve ıslahçıları, kültür bitkisi çeşitlerinin tuza dayanıklılık açısından

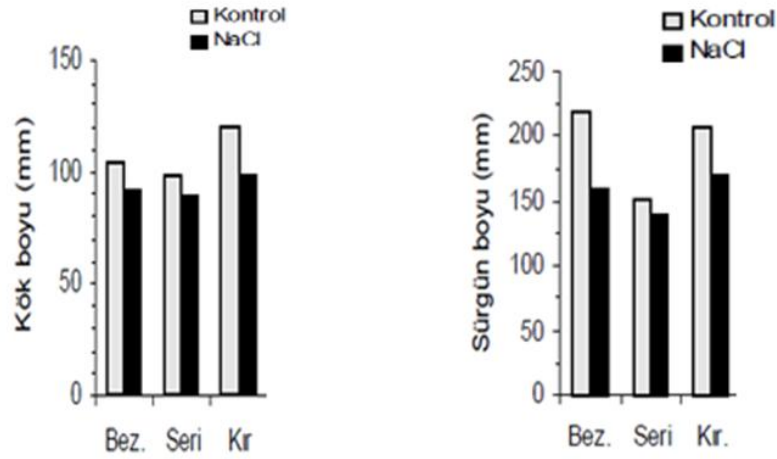
varyasyonlarına eğilmiş ve saptadıkları farklılıklardan yararlanarak, tuza dayanıklı çeşitler ortaya koymuşlardır (Parida ve ark., 2005; Öncel ve ark., 2002).

Moleküler çalışmalar sayesinde tuz ve kuraklık streslerinde ifadeleri değişen birçok gen tanımlanmıştır (Ramanjulu ve ark., 2002). Buğdaya tuz stresi uygulanması sonucu PKABA1 geninin aktif hale geçtiği ve dayanıklılık için protein kinazları kodladığı daha önce belirlenmiştir (Winicow, 1998). Tuz stresine dayanıklılığın önemli bir göstergesi olan ‘zar dayanıklılığı’, stres koşullarında bitki dokularında açığa çıkan serbest iyon miktarı saptanarak ölçülebilmekte, bu açıdan doku ekstraksiyonlarının elektriksel geçirgenliğini, mmhos/cm cinsinden ölçmek en sağlıklı göstergeyi oluşturmaktadır (Poljakoff-Mayber ve Gale, 1975).

Toprak çözeltisinde tuz yoğunluğunun artması ve su potansiyelinin azalması, bitki hücrelerinin ozmotik potansiyelini düşürmekte ve bitkilerde bir dizi tepkinin oluşmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla, tuz stresi yoğunluk ve süresine bağlı olarak bitkilerde büyüme, gelişme, çimlenme, hücre bölünmesi, fotosentez gibi pek çok biyolojik olayı etkilemekte ve tuzluluk, tarımsal alanlarda bitki verimliliği ile ürün kalitesini sınırlamaktadır (Bressan, 2008). Tuz stresi, bitkilerde çeşitli gelişim süreçlerinin yanında morfolojik, fizyolojik ve moleküler seviyede pek çok aksaklıklara neden olmaktadır (Yılmaz ve ark., 2011). Tuz stresine dayanıklılıkla ilgili olarak birçok bitki türünde çalışmalar mevcuttur (Parida ve ark., 2005). Sairam ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada osmotik stresin buğday fidelerinin kök büyümesini azalttığını ve bunun sonucunda bitkilerin topraktan yeterli besini alamadıklarını tesbit ettiklerini belirtmektedirler.

Buğdayda, Öncel ve Keleş (2002) ‘Bezostaja-I’, ‘Seri-82’ ve ‘Kıraç-66’ çeşitlerine tuz stresinin uygulanması ile yapılan çalışmada kök ve sürgün büyümesi, fidelerdeki turgor değişimi ile klorofil içeriğinin değişimi incelenmiştir. Bu çalışmada tuz uygulaması kök ve sürgün büyümesi 200 mM NaCl uygulaması altında 5 gün gibi kısa bir süre kalmasına rağmen önemli ölçüde engellendiği görülmüştür. Sürgün büyümesi ise tuz uygulama süresince kontrol fidelerine oranla %10 ile %27 arasında azalma göstermiştir ($P<0.05$; Şekil 1. 2).

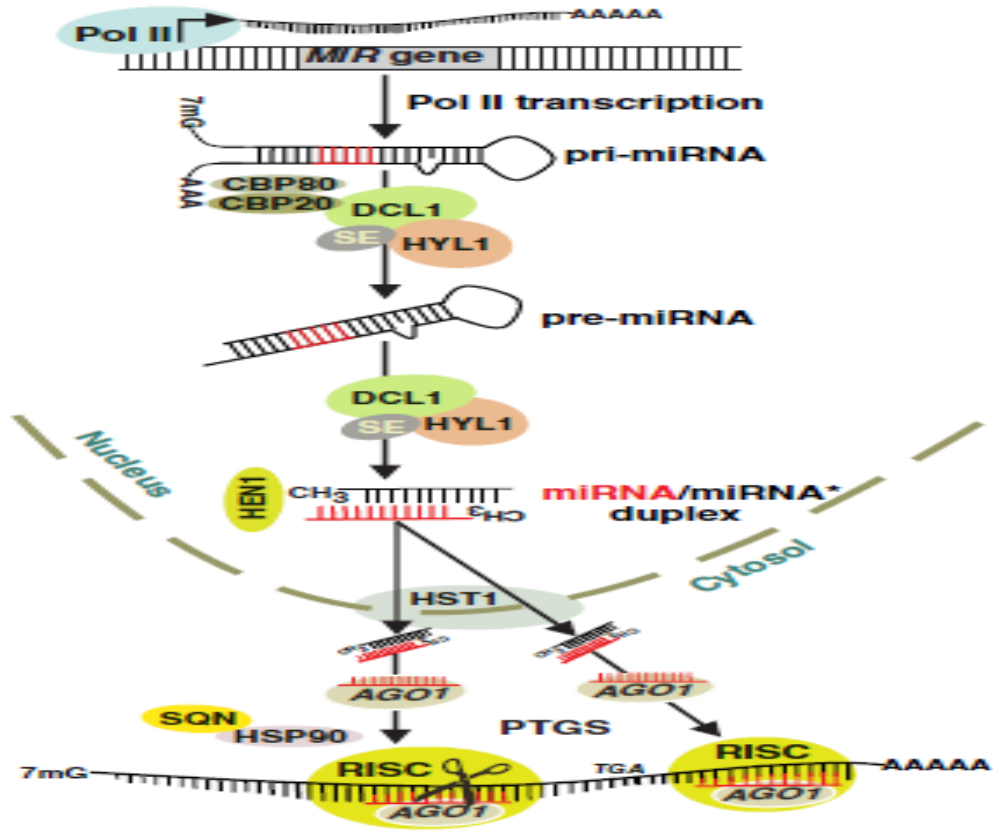
Diğer bitkilerde olduğu gibi buğdayda da tuz stresinin erken dönemde teşhis edilmesi verim ve kalitedeki zararı azaltma veya önlemede oldukça etkili olacaktır.



Şekil 1. 2. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinden Bezostaja-I(Bez), Seri-82 (Seri), Kırac (Kır.) bitki büyümesinde değişimler. [Kök boyu (genotip $P=0.004$, tuz $P=0.008$), sürgün boyu (tuz $P=0.01$)(Öncel ve Keleş, 2002)].

1.3. MikroRNA (miRNA)

Genomdan kopyalanan mikroRNA'lar, küçük kodlanmayan ve düzenleyici olarak işlev yapan RNA moleküllerinden biridir (Kang ve ark., 2012). miRNA'lar birçok organizmanın genlerinin ifade edilmesinde önemli roller oynamaktadırlar (Bartel, 2004). miRNA'lar ~21 nukleotid uzunluğunda olup, DICER-(DCL) benzeri nükleaz enzimler tarafından öncü (precursor) sap-ilmik (stem-loop) yapısındaki pre-miRNA'ların kalıp olarak kullanılması ile işlev kazanırlar. Olgun (mature) miRNA ise RNA ile bütünleşmiş (indüklenmiş) gen susturma kompleksine [RNA-induced silencing complex (RISC)] katılarak hedefteki mRNA transkriptini parçalar veya durdurur. Dolayısıyla hedef gen ifadesinin bu sayede baskılanarak transkripsiyon sonrası susturma gerçekleşmiş olur (Atalay, 2007; Hammond, 2000; Reinhart, 2002). miRNA'lar bitkilerde oldukça korunmuş (conserved) halde bulunurlar ve spesifik hedef mRNA'ları ile yüksek seviyede eşleşme sağlarlar (Vaziri ve ark., 2012). Bu miRNA'lar eşleşme veya tamamlayıcılık durumu ile ilgili hedef mRNA'yı parçalamak ya da baskılamak amacıyla işlev görmektedir (Şekil 1. 3) (Khraiwesh ve ark., 2012).



Şekil 1. 3. Translasyon engellenmesi veya mRNA'nın parçalanması (Khraiwesh ve ark., 2012)

Yukarıda da bahsedildiği gibi bitki miRNA'ları 3 mekanizmayla gen ifadesini düzenler.

- Tamamlayıcı hedef mRNA'nın bölünmesi,
- Hedef mRNA'nın translasyonunun baskılanması,
- Hedef mRNA'nın transkripsiyonel sessizleştirilmesi (Khraiwesh ve ark., 2012).

Bitki miRNA'ları hedef mRNA'larına çok yüksek tamamlayıcılar olduğu için, miRNA'ların aktivitesinin protein sentezi mekanizmasını kısmen veya tamamen etkiler. Bu düşünce *Arabidopsis* AGO1 (Argonat), HEN1 (Hua enhancer) ve HYL1 (Hyponastic leaves1) mutantlarındaki hedef mRNA'ların yükseltilmiş transkrip düzeyleriyle desteklenmiştir (Atalay, 2007; Hammond, 2000; Khraiwesh ve ark., 2012).

1.3.1. Bitki miRNA'larının Biyogenezi

Bitki miRNA'ları genellikle protein kodlamayan intron bölgelerde bulunurlar ve kendi genlerinden üretildikleri (Eldem ve ark., 2013) düşünülmektedir (Şekil 1.4). Bazen miR395 kümesindeki gibi miRNA genleri pek çok miRNA'nın tek temel transkriptten kopyalandığı ve kümeler olarak bulunduğu görülmüştür (Bartel, 2004).

miRNA'lar çeşitli olgunlaşma aşamasının sonucunda öncü miRNA olan pri miRNA'lardan elde edilir (Song ve ark., 2004).

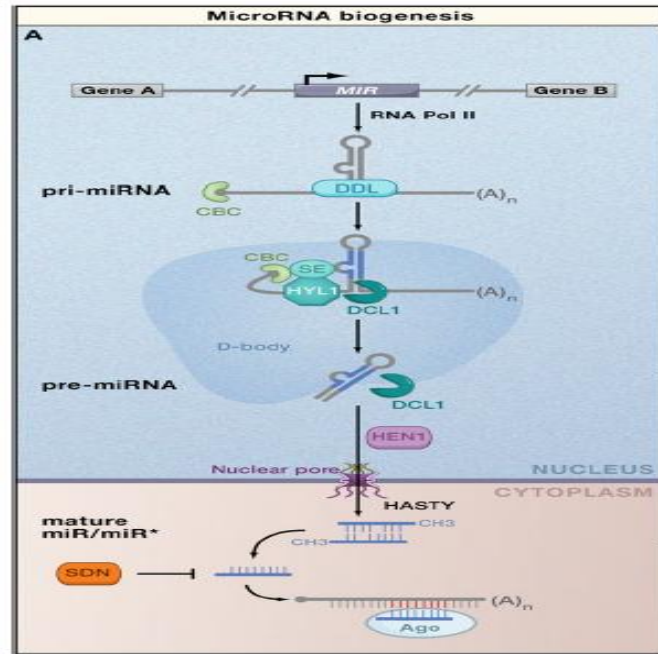
Fonksiyonel miRNA'nın oluşumu 3 temel adım içermektedir:

1-Çift iplikli RNA (ds-RNA)'yla miRNA işleminin başlatılması,

2-miRNA'ların işlenmesi ve miRNA'nın 3'-O-metilasyonu

3-miRNA'nın stoplazmaya taşınması ve RISC ile metillenmiş miRNA'nın birleşmesi.

miRNA'lar ile birleşen efektör kompleks kısmi veya bütünüyle tamamlayıcı bir yaklaşımla hedefleriyle etkileşmektedir (Jones-Rhoades ve ark., 2006; Khraiweh ve ark., 2012).



Şekil 1. 4. Bitki miRNA'larının biyogenezi. (Jones-Rhoades ve ark., 2006). Başlangıç miRNA'ları RNA polimeraz II tarafından transkript edilir ve cap ve poli - A kuyruk eklemesiyle işlevlenir. Başlangıç miRNA DCL1'in aktivitesiyle miRNA/miRNA* dupleksine işlevlenir. miRNA/miRNA* dupleksine

5' fosfotaz ve 2 nükleotit uzunluğunda 3' çıkıntılara (overhang) sahiptir. miRNA/miRNA* dupleksinin 3' şekerleri HEN1 ile metillenir. miRNA duplexi HST ve bazı ilave faktörlerle (olgun miRNA RISC içeren AGO1'le birleşir) sitoplazmaya taşınır. Diğer tarafta, miRNA* ekzonükleazlarla parçalanır. Sessizleştirme kompleksindeki miRNA hedef bölme yeteneğine sahiptir ve traslasyonu baskılar

Birinci aşamada çift iplikli RNA (ds-RNA)'yla miRNA işleminin başlatılması için bitki miRNA transkriptleri RNA polimeraz II'yle oluşturulur ve öncül transkriptler (pri – miRNA) sap-ilmik yapısıyla karakterize edilir. Bu transkriptlerin bazıları şapkalı (capped), poliadenilatlı ve tıraşlanmış (spliced) olarak bulunmuş ve diğerleriyle benzer bir yapıda işlev gördüğü düşünülmüştür (Eldem ve ark., 2013; Kang., 2012; Vazquez ve ark., 2008). Yani miRNA, intron bölgeden veya genomik DNA'dan RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. Buradan ilk olarak oluşan öncü miRNA olarak bilinen pri-miRNA [500 - 3000 baz çifti (bp)] sentezlenirken 5' ucunda "cap" ve 3' ucunda "poli A" kuyruğu bulunur (Şekil 1. 7). pri-miRNA gövdelerindeki baz eşleşmeleri Guanin/Urasil eşleşmesinde olduğu gibi düzensiz olduğunda kendine özgü bir ikincil yapı düzeni oluşur (Tomari ve ark., 2004; Karakurt ve ark., 2007). Pri-miRNA dizisi öncü korunmuş diziler ve sap-ilmik içeren pre-miRNA dizisinden daha uzundur (Saydam ve ark., 2011). Pri-miRNA'lar RNA polimeraz II transkriptlerinin yanında; dsRNA, viral RNA'lar veya RNA'ya bağlı RNA polimeraz 1 – 6'dan (RdRP) üretilir (Tang ve ark., 2003). RdRP'lerin kalıpları atipikal miRNA'lar veya bitkiye özel RNA polimeraz IV'ün transkriptlerini içerir.

İkinci aşama ise bir kb'ye kadar uzunlukta sap-ilmik içeren pri – miRNA'lar Dicer gibi RNase III tipi endonükleazların aktivitesiyle başlar (Sunkar ve Zhu, 2007; Kang, 2012). Pri-miRNA mikroişlemci adı verilen DICER benzeri-I tipi RNAz III, SE [serrate, nükleer cap bağlama kompleksi (CBC)] ve HYL1 (Hyponastic leaves1) içeren kompleks yardımı (Bolongna ve ark., 2013) ile pre-miRNA oluşturur (Park ve ark., 2002; Reinhart ve ark., 2002; Hiraguri ve ark., 2005; Dong ve ark., 2008). SE ve HYL1 proteinleri DCL1 yardımının yanı sıra pri-miRNA tanınması ve yönlendirilmesinde önemli bir rol oynayabilmektedir (Yang ve ark., 2006). Bitkilerde bu olay çekirdekte gerçekleşirken pri-miRNA, DDL (dawdle) proteiniyle etkileşir bu sayede pri-miRNA'nın ikincil yapısı stabilize edilir (Eldem ve ark., 2013).

miRNA üretimindeki üçüncü aşamada olgun miRNA'ya HEN1 (Hua Enhancer) tarafından metil takılıp HST proteini tarafından sitoplazmaya gönderilir. Bu aşama aynı

zamanda olgun miRNA dupleksinin 3' –O – metilasyonudur. Sülfür –adenosilmetiyonin – bağımlı metiltransferaz, HEN1 ile birlikte bitkilerde tüm küçük boyutlu RNA'ların metilasyonunu katalizleyerek susturma işlemini gerçekleştirir. Metilasyon işlemi 3' üridilasyonunu ve küçük RNA'ların nihai bozunmasını önler (Yang ve ark., 2006).

miRNA'nın son aşamasında olgun ve metillenmiş miRNA'ların sitoplazmaya taşınması ve sessizleştirme kompleksinin (RISC) bir araya gelmesidir (Bartel, 2004). Sitoplazmaya miRNA taşımak için HST (Hasty) proteini gerekli olduğu belirtilmekte ancak miRNA taşınımının tam mekanizması bilinmemektedir. Bununla birlikte HST hayvansal taşıma exporting 5'in bir homologudur ve bazı miRNA'ların HST ile temasta olduğu bilinmektedir (Yang ve ark., 2006; Wijnhoven ve ark., 2007). Öte yandan miRNA birikimi HST'nin null mutantlarında gözlemlenmiştir. miRNA/miRNA* dupleksinin bir ipliği efektör fonksiyonunu göstermek için RISC ile birleşir (Reinhart ve ark., 2002). İplik seçimi miRNA/miRNA* dupleksi olup olmayan enerjistik asimetrisine bağlıdır. miRNA ipliklerinin 5'ucu miRNA 3' ucundan çok daha az kararlıdır ve bu 5' ucunu içeren iplikler RISC'le birleşir. İlişkilendirilmemiş miRNA ipliği RISC üzerinde miRNA'nın yüklenmesinden sonra hızlıca parçalanır (Reinhart ve ark., 2002; Kidner ve Martienssen, 2005). miRNA'nın hem 5'ucu hem de 3'ucuna RISC kompleksine bağlanabilir. Buna göre miRNA'nın 5'ucu RISC kompleksine bağlandığında 3'ucu parçalanmakta, miRNA'nın 3'ucu RISC kompleksine bağlandığında ise 5'ucu parçalanmaktadır. Parçalanan bu miRNA, miRNA* olarak adlandırılmaktadır (Guo ve Lu, 2010).

1.3.2. DICER (DCL) Enzimi

DICER enzimi (DLC) RNAaz III ailesinin üyesidir. DLC fungus, bitki ve memelilerde evrimsel olarak korunmuştur (Henderson ve ark., 2006). DLC dört farklı yapıya (domene) sahip olup (Şekil 1. 5) bunlar N-bölgesinde (terminal) helikaz domeni, PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille proteinlerini içeren bir domen) domeni, iki katalitik RNase III domeni ve C-bölgesinde ise dsRNA bağlama domeni (dsRBD) bulunmaktadır (Bernstein ve ark., 2001). DLC'nin tıraşlama (spliced) aktivitesi iki katalitik RNase III domeni tarafından sağlandığı öngörülmektedir (Karagüzel ve ark., 2007; Bernstein ve

ark., 2001; Szweykowska- Kulinska ve ark., 2003; Agrawal ve ark., 2003; Khanna ve ark., 2007).



Şekil 1. 5. DICER proteininin domen yapısı (Bernstein ve ark., 2001)

DCL'nin sahip olduğu helikaz yapısı (domeni) ise, bu kesim aşamasından ziyade siRNA zincirinin açılması ve tek zincirinin RISC kompleksine aktarılması sırasında rol almaktadır. PAZ domeni nükleotide bağlanma ve dsRNA'nın enzime bağlanmasında rol almaktadır (Bernstein ve ark., 2001). Bitkilerde DICER genlerinin farklılığı hücre kopyalanmasında farklı stratejilerin kullanıldığını göstermektedir (Henderson ve ark., 2006). DCL geni bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır. Farklı bitki çeşitlerinde farklı miktarda DCL bulunabilir (Kang ve ark., 2012). *Arabidopsis thaliana* L. genom yapısında dört adet, *Populus trichocarpa* genomlarında beş adet ve Çeltik (*Oryza sativa* L.) genomlarında altı adet DCL geni bulunmaktadır. DCL enzimlerinin fonksiyonları *A. thaliana*'da tanımlanmıştır. Bütün DCL enzimleri dört tipte sınıflandırılmıştır (Çizelge 1. 3) (Margis ve ark., 2006)

Çizelge 1. 3. DCL enzim çeşitleri, domen yapısı ve fonksiyonları

DCL çeşitleri	DCL protein domen yapısı	Fonksiyonu
DCL1	DEAD kutusu ile Raz III, dsRNA'yı- bağlama, Helikaz, PAZ, DUF 283	miRNA sentezi
DCL2	RNase III dsRNA-bağlanma	21 nt si-RNA sentezi
DCL3	RNase III dsRNA-bağlanma	24nt si-RNA sentezi
DCL4	RNase III dsRNA bağlanma, helikaz, paz	21 nt si-RNA sentezi

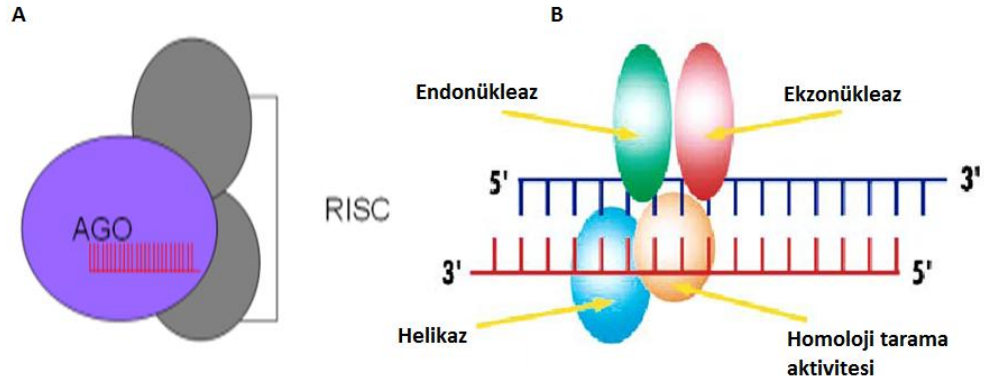
Arabidopsis'de 4 tip DICER like (DCL) protein vardır. Her bir enzimin ürünleri farklı boylara sahiptir. DCL1; 18 – 21 nükleotid uzunluğunda ürünlere sahiptir ve miRNA üretiminde kullanılmaktadır (Vazquez ve ark., 2008). DCL2; 22 nükleotid uzunluğunda ve viral dsRNA'lardan siRNA üretiminde kullanılmaktadır. DCL3; 24

nükleotid uzunluğunda, kromatinlerin modifikasyonunda kullanılmaktadır ve DCL4 ise 21 nükleotid uzunluğunda ürünlere sahip trans-acting siRNA (ta-siRNA) üretiminde rol oynamaktadır. DCL1, DCL2, DCL3 ve DCL4 genleri genomda tek kopya olarak bulunmaktadır (Henderson ve ark., 2006). DCL proteinlerinin ürünleri 3' çıkıntılarla (overhang) karakterize edilir (Yao ve Sun, 2012). Bu özellik asıl (öz = putative) miRNA'ların belirlenmesi için derin sekanslama verisini analiz etmede yaygın bir şekilde kullanılır.

Bitkilerde sadece DCL1 aktivitesi olgun miRNA'nın çekirdekte oluşumu ve miRNA birikimi için yeterlidir (Baumberger ve Baulcombe, 2005). Hayvanlarda ise bu işlemler dizisi iki aşamalı olup pri-miRNA çekirdekte, pre-miRNA sitoplazmada oluşur. Hayvanların aksine pre – miRNA bitkilerde nadiren belirlenir ve her iki bölünme reaksiyonu çekirdekte meydana gelir. Bölünme spesifitesi temelde sap-ilmik yapısı değişmeksizin pri – miRNA dizisinin modifikasyonu ile doğrulanan pri -miRNA'nın ikincil yapısına bağlıdır (Baumberger ve Baulcombe, 2005). DCL1 aktiviteyi keseceğini göstermek için HYL1 ve SE (serrate) ile etkileşir (Dong ve ark., 2008) ve bu genlerin mutantları DCL1 mutantları gibi öldürücüdür. Sonuç olarak DCL1, RNA bağlayıcı protein olan DDL (dawdle) proteiniyle etkileşir. pri-miRNA'nın ikincil yapısı DDL tarafından stabilize edilir (Vazquez ve ark., 2008; Kruszka ve ark., 2012; Eldem ve ark., 2013; Yu ve ark., 2008). Bitki hücresi için DCL1'in önemi araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır. DCL1 sadece miRNA'nın gelişimine bağlı değil aynı zamanda sitoplazmik RNA toplanmasının düzenlenmesinde de rol oynar. DCL2, DCL3 ve DCL4 proteinleri tam anlamda DCL1'in yerine kullanılamaz (Margis ve ark., 2006). Pri-mi RNA'lar ve uzun sitoplazmik RNA'lar hücresel hairpinler içerirler. Hairpinler ise DCL1'in reaksiyona girmesinde etkilidir (Bollman ve ark., 2003).

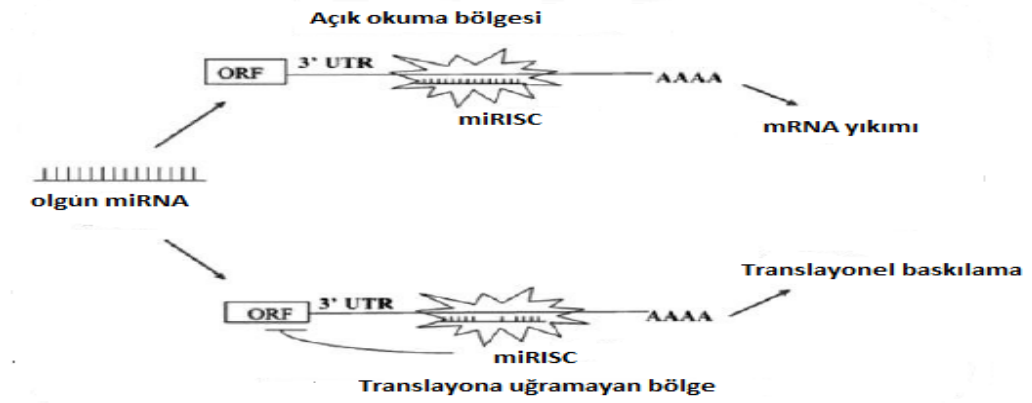
1.3.3. RISC (RNA-indüklenmiş gen susturma kompleksi)

RISC, nükleaz aktiviteli ve asimetrik yapılı RNA-çoklu protein kompleksidir (Şekil 1. 6- a) Yapısında endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzimlerini içermektedir (Şekil 1. 6- b) (Karagüzel ve ark., 2007).



Şekil 1. 6. a) RISC ve olgun miRNA b) Asimetrik yapılı RISC kompleksi modeli (Karagüzel ve ark., 2007)

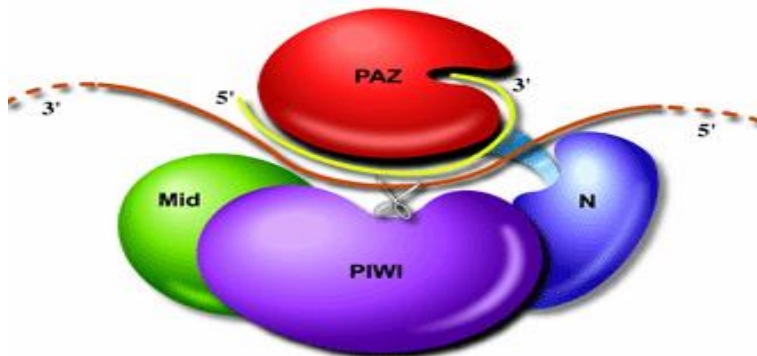
miRNA'ların RISC kompleksine tam entegrasyonundan sonra Argonat (Ago) proteinleri ile ya hedef mRNA'nın kesilmesi ya da protein translasyonunun baskılanması gerçekleşmektedir. miRNA, hedef mRNA'nın 3'deki UTR (translasyona uğramayan bölgeye) veya mRNA'nın ORF (açık okuma çerçevesi)'ye bağlanmaktadır (Shomon ve Levy, 2009). mRNA'nın 3' UTR bölgesine miRNA'nın bağlanması kusurlu, tam olmayan veya eksik eşleşme gösterdiğinden translasyonun baskılanması gerçekleşirken ORF bölgesine bağlanma ise tam eşleşme gösterdiğinden dolayı Ago 2 proteinleri tarafından mRNA'nın parçalanması gerçekleştirilir (Şekil 1. 7) (Shomon ve Levy, 2009; Sun ve ark., 2010)



Şekil 1. 7. miRNA nın, hedef mRNA'daki 3' UTR veya 3' ORF'ye bağlanması (Görür ve Tamer, 2011)

1.3.4. Argonat Proteini

Argonat (Ago) proteinleri sadece RISC kompleksine özel proteinlerdir. RISC'in temel komponenti olan ago proteini mRNA kesimi için katalitik bölgedir (Gündoğdu ve Çelik, 2009). Ago proteinleri iki korunmuş domen yapısı içermektedir. Ago proteinleri tek iplikli RNA'yı bağlayan Paz ve RNaseH'a benzer aktiviteye sahip Piwi domenine sahiptir (Şekil 1. 8). Paz yapısı aynı zamanda DLC'de de bulunurken Piwi yapısı(domen) ise bu proteinlere özgüdür (Baumberger ve Baulcombe, 2005; Karagüzel ve ark., 2007; Filipowicz ve ark., 2008).



Şekil 1. 8. Argonat proteininin domen yapısı (Karagüzel ve ark., 2007)

Arabidopsis’de belirlenen 4’ü fonksiyonel olarak karakterize edilen 10 argonat proteini vardır. AGO proteinlerinin bazıları transpozonların metilasyonunda fonksiyonel iken AGO7 ve AGO10 Arabidopsis’in normal gelişimi için istenir, fakat aktivite mekanizması henüz bilinmemektedir (Baumberger ve Baulcombe, 2005). AGO7 fonksiyonu ta-siRNA (trans – acting küçük müdahaleci RNA) biyogeneziyle alakalıdır. AGO 6 epigenetik mekanizma için sitozin metilasyonunda fonksiyonel olup 24 nükleotit uzunluğundaki heterokromatin alakalı sRNA’la ilişkilidir. miRNA aktivasyonunda rol alan tek AGO proteini AGO1’dir. AGO1 düzenlenmesinin iki aşamada gerçekleşmektedir. Bunlardan birinci aşama Ago 1 ve miR168 genlerinin birleşmesi, ikinci aşama ise Ago1’in sentezlenmesi yoluyla miR168 gen birikmesinin dengelenmesidir (Baumberger ve Baulcombe, 2005). AGO1 miRNA hedeflerinin bölünmesini katalize eder ve AGO1 mutantları miRNA hedeflerinin daha yüksek düzeylerine sahiptir.

1.4.miRNA Keşfi ve Buğdayda Korunmuş miRNA’lar

mikroRNA’lar ilk olarak Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında keşfedilmiştir. Bu çalışmada ilk miRNA olarak bilinen lin-4 tesbit edilmiştir (Lee ve ark., 1993). Daha sonra yine hiçbir protein kodlamayan let-7 *Caenorhabditis elegans*’da Reinhart ve ark., (2000) tarafından tesbit edildikten bir yıl sonra küçük ve protein kodlamayan bu moleküller mikroRNA (miRNA) olarak adlandırılmıştır (Koptekin ve ark., 2013). Bundan bir yıl sonra ise bitkilerdeki ilk miRNA *Arabidopsis*’de tesbit edilmiştir (Park ve ark., 2002). Daha sonra miRNA’lara bağlı çalışmalar giderek artmış ve PTGS (Transkripsiyon sonrası gen sessizleştirilmesi) olarak bilinen bir mekanizmayla genlerin transkripsiyonunun kontrol edildiği buğdaygillerde tesbit edilmiştir (Ünver ve ark., 2009). miRNA’ların keşfinden sonra yapılan araştırmalarda özellikle korunmuş miRNA’ların bitki savunma sisteminde rol aldığı belirlenmiştir (Gupta ve ark., 2012).

Bilindiği üzere angiospermiler dikotil ve monokotil olarak ikiye ayrılırlar dikotil bitkilerde görülen miRNA’lara bağlı savunma mekanizmaları, son zamanlarda özellikle Çeltik (*Oryza sativa*), *Aegilops tauschii*, Arpa (*Hordeum vulgare* L.), *Brachypodium*

distachyon L., *Elaeis guineensis*, Akdarı (*Sorghum bicolor*), *Festuca arundinacea*, *Saccharum officinarum*, Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum L.*), Mısır (*Zea mays L.*) ile yapılan çalışmalarda monokotil bitkilerde de görülmektedir (Zhang ve ark., 2009; Yao ve ark., 2007; Dryanova ve ark., 2008; Kantar ve ark., 2008). Gupta (2012) *Arabidopsis*, buğday, arpa, mısır ve çeltik’de yaptığı çalışmada biyotik enfeksiyona karşı miRNA düzenlenmesinde genelde aynı miRNA’ların görev aldığını gözlemlemiştir (Çizelge 1. 4).

Çizelge 1. 4. Buğdayda korunmuş (conserved) miRNA’lar ve Fonksiyonları (Gupta ve ark., 2012)

miRNA	Akseyon No	Arabidopsis	Sorgum	Çeltik	Mısır	Buğday	Özellik	Hedef Protein	Hedef Unigen/EST	İşlev
TamiR159a	CA731881	+	++	++	++	++	Hormonal sinyal	MYB, GAMYB	Ta.38051	GA ve ABA sinyali
TamiR164a	CA704421	++	++	++	++	++		NAC1	Ta.12537	oksin sinyali
TamiR167a	CK209908	++	++	++	++	++		ARFs	Ta.9550	oksin sinyali
TamiR171a	CD910903	++	++	++	++	++		SCL	Ta.39354	Çiçek desenlen dirmesi
TamiR444	CK200584	–	–	++	–	++		MADS box	Ta.38864	Çiçek gelişimi
TamiR1129	BJ260462	–	–	–	–	++		–	Ta6068	–
TamiR1138	DR733919	–	–	–	–	++		eIF-4b	Ta12590	Protein sentezi

++ buğday ve diğer türlerde miRNA ve dizileri tam olarak benzer olduğuna işaret etmektedir

1.5.miRNA'ları Tesbit Etme Yöntemleri

Yapılan çalışmalara bağlı olarak başta bitkiler olmak üzere hayvanlarda, virüslerde ve küflerde miRNA tanımlama ve karakterizasyon artarak devam etmektedir. Tesbit edilen bazı miRNA'lar miRBase v20 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) ve PMRD (http://pmted.agrinome.org/images/second_logo.png) verilmiştir. Tesbit edilen bu miRNA'lardan bazıları tamamen biyoinformatik (bilgisayar dayalı) yöntemlerle bazıları ise deneysel metodlardan yararlanılarak saptanmıştır. Biyoinformatik yöntem, miRNA'lardaki dizi ve yapı korunmuşluğunu (conservation) arama ve bu homolojileri saptama üzerine kuruludur. Bugüne kadar Reinhart ve ark. (2002), Jonnes-Rhoades ve ark. (2004) ve Sammanani ve ark. (2004) bitki miRNA'larının saptanması hususunda bilgisayar tabanlı metotlar kullanarak birçok miRNA tesbit etmişlerdir. Diğer metod da ise örneğin, 58 buğday miRNA'sı deneysel olarak saptamıştır (Yao ve ark., 2007).

miRNA'ları spesifik dönem, doku ya da hücreye göre tanımlama ve kantitatif olarak ölçme metodları onların işlevlerinin anlaşılması için çok önemlidir. Deneysel yöntemlerle miRNA tesbitinde Northern hibridizasyonu, klonlama ve küçükRNA kütüphanelerinin dizilenmesi, mikroarray analizleri, SYBR Green 1 analizi ve miRNA TaqMan URL prob deneyi gibi metodlar oldukça yaygındır (Eldem ve ark., 2013).

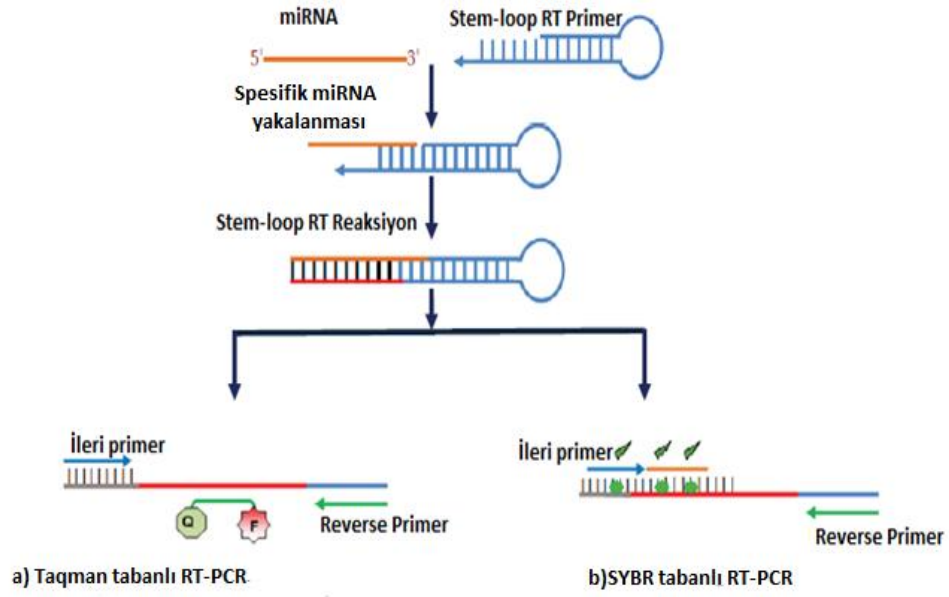
Fakat bu metodların etkinliği ve hassasiyeti düşük olup çok miktarda örnekleme için uygun değildirler. Bunların yerine daha etkin, hassasiyeti yüksek ve sayısal olarak ölçüm olanağı sağlayan qRT-PCR metodu kullanılmaktadır. miRNA'ları ölçebilmek için hücrelere yönelik birçok metod geliştirilmiştir (Park ve ark., 2002). qRT-PCR metoduyla 25 pg (pikogram) kadar total RNA kullanarak doğru sonuçlar almak mümkündür (Park ve ark., 2002). Fakat buna rağmen qRT-PCR'in kullanımında bazı problemlerde mevcuttur.

Bunlar miRNA'nın doğal yapısından Guanin (G) / Sitozin (S) miktarına bağlı olarak erime sıcaklıklarının farklı olması ve miRNA ailesinde birkaç baz farkının olmasından kaynaklanmaktadır. Buna rağmen RT reaksiyonu ürünleri ise amaçlanan özel miRNA'nın sayısal olarak ölçümü için qRT-PCR ile SYBR Green I ya da Taqman tabanlı RT-PCR deneyleri (Şekil 1.9) yaygın olarak kullanılmaktadır (Eldem ve ark., 2013).

qRT-PCR temelde iki aşamadan oluşur. İlk aşamada, bir sap-ilmik RT primeri tasarlanır, bu primer ise ölçülmesi amaçlanan miRNA'ya yapışarak onun üzerinden cDNA sentezlenir. İkinci aşamada ise spesifik olarak miRNA için hazırlanan ileri primeri ve sap-ilmik'e uygun olan universal geri primeri (5'GTGCAGGGTCCGAGGT-3') ile spesifik bir qRT-PCR reaksiyonu yapılır (Yanık ve ark., 2013). SYBR Green I yönteminde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlanır. Çift zincirli DNA, RT-PCR cihazında konulur sonra DNA zinciri ayrışmaya başladığında araya girmiş olan boya serbest hale geçerek floresan ışıma yapar. Bu ışımanın miktarından elde edilen erime eğrisinden faydalanılarak spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında Tm derecesi arasında farklılıkla belirlenmektedir.

Bu erime sıcaklığı DNA parçacığındaki bulunan GC/AT oranına bağlıdır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra sıcaklığı belli aralıklarla ve belli oranda yükseltilerek floresan miktarı belirlenmektedir (Varkonyi-Gasic ve ark., 2007).

Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olduğunu anlayabilmek için SYBR Green I yönteminde özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin ve primer dimerlerinin kontrolü için agaroz jel elektroforezinden yararlanılmaktadır. Ayrıca bu sorunların tesbiti için başka bir analiz daha yapılabilir. Erime eğrisi (Melting curve) analizinde her çift zincirli DNA'nın kendine özgü bir erime sıcaklığına (melting temperature, Tm) sahiptir (Kubista ve ark., 2006).



Şekil 1. 9. TaqMan ve SYBR Green ile olgun miRNA'nın RT-PCR ölçme metotları (Eldem ve ark., 2013)

Bu tez çalışmasında besin olarak tüketilen ve dünyada geniş alanda yayılım gösteren buğdayda fungal hastalık ve tuz stresinde ifade olan tüm miRNA'ların mikroarray analizleri yöntemi ile karakterizasyonu yapılmaktadır. Bu çalışma kapsamında göz önünde bulundurulacak başka bir nokta ise *Triticum aestivum*'a ait olan miRNA'ların ifade düzeylerinin profilinin çıkarılmasıdır. İfade düzeylerinin bu organizmadaki farklı stres şartlarında aynı dokuda araştırılmasının;

a) *Triticum aestivum*'daki miRNA ların ve onların hedeflediği genlerin daha kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi,

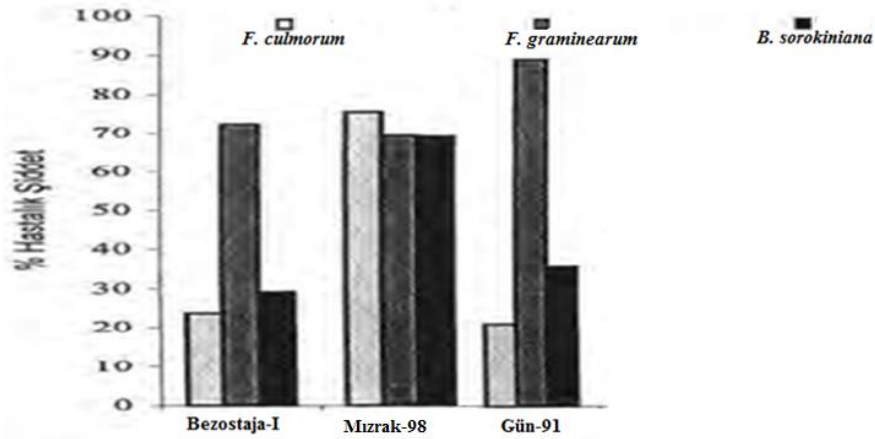
b) miRNA'ların ifade düzeylerinin aynı doku ve organlarda farklı stres faktörleri altında karşılaştırmalı olarak analiz edilmesiyle biyotik strese bağlı olarak organlarda hangi miRNA'ların aşırı ifade edildiğine ve/veya aşırı miktarda baskılandığına bakarak streste rol alan miRNA'ların birde bu açıdan tartışılması,

c) miRNA mikroarray analizleri sonunda ulaşılan ve önemli görülen miRNA'ların ifade düzeylerini, hedefledikleri genlerin ifade düzeyleri ile birlikte analiz edilmesiyle miRNA'ların hedef genlerin ifadelerini ne ölçüde düzenlediği tesbit edilerek stres mekanizmasının bir başka açıdan daha yorumlanması, gibi sonuçları olacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalığı ve Dayanıklılık Tipleri

Kök ve kök boğazı hastalığı erken devrede oluşmuşsa hassas çeşitlerde hastalıktan kısa bir süre sonra fide ölümleri meydana gelmektedir. *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* bitkinin ksilem borularını tıkar ve toprakla ilişkisini keserek, bitkide solgunluk ve daha sonra akbaşak oluşumuna da neden olabilir (Aktaş ve ark., 1995). Bitki zayıfladığından bu durum tahılların yatmasına neden olur. Genel olarak, *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* toprak ve tohumla yayılır (Aktaş ve ark., 1995). Ekmeklik buğday çeşitlerinin önceki çalışmalarda kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına hassas ve dayanıklılığı tesbit edilmiştir. Demirci (2003) 10 çeşitle yaptığı çalışmada *F. culmorum*'a karşı Bezostaja-I ve Gün-91'in orta derecede dayanıklı olduğunu ve *F. graminearum*'a ise 10 buğday çeşidinin hiçbirinin dayanıklı olmadığını belirtmektedir. Kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı ile ilgili yapılan bu çalışmada farklı buğday çeşitlerinde *F. culmorum*'un oluşturduğu hastalık (%) şiddetleri incelenmiş, çeşitler arasında fungusaya dayanıklılıkta varyasyon belirlenmiş ve hastalık şiddetine en yüksek hassasiyet Mızrak çeşidinde %75,46, en düşük hassasiyet ise Bezostaja-I çeşidinde % 23,54 olarak rapor edilmiştir (Şekil 2.1; Demirci, 2003).



Şekil 2. 1. Farklı buğday çeşitlerinde *F.culmorum*, *F.graminearum* ve *B. sorokiniana*'nın oluşturduğu hastalık şiddetleri oranları (Demirci, 2003).

Çizelge 2. 1. Mızrak ve Bezostaja-I buğday çeşitlerinde *B. sorokiniana*'nın oluşturduğu kök ve kök boğazı hastalığının % şiddetleri (Demirci, 2003).

Çeşitler	% Hastalık Şiddeti ve Tekerrür				Ortalama	Reaksiyon tipi
Çeşitler	1	2	3	4		
Bezostaja-I	24.00	28.00	35.00	30.00	29.00±2.29	MR
Mızrak-98	55.00	62.00	80.00	80.00	69.25±6.37	MS
Gün-91	30.00	42.00	36.67	43.33	38.00±3.03	MR

* Farklı harf alan ortalamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur (P=0.05). MR (Orta dayanıklı), MS (Orta hassas), S (Hassas).

Günümüzde klasik ıslah çalışmaları, enfeksiyon başlangıcına ve enfeksiyonun yayılmasına dayanıklılığı olan buğdaylardan faydalanılarak yapılmaktadır. Fakat bu tip dayanıklılıkta bitki hastalığa karşı kısmen toleranslıdır ve biyotik etmenlerle başa çıkmada yetersiz kalırlar. Aynı zamanda *F. culmorum* tarafından da oluşturulan başak yanıklığı enfeksiyonun yayılma düzeyinde dayanıklılıkla ilişkili olarak buğdayda 1B, 2AL, 3BS, 3A, 5A ve 6B kromozomları üzerinde lokuslar tesbit edilmiştir (Bai ve ark., 1999). Bitkilerde *Fusarium* enfeksiyonuna dayanıklılık mekanizmaları 5 gruba ayrılır:

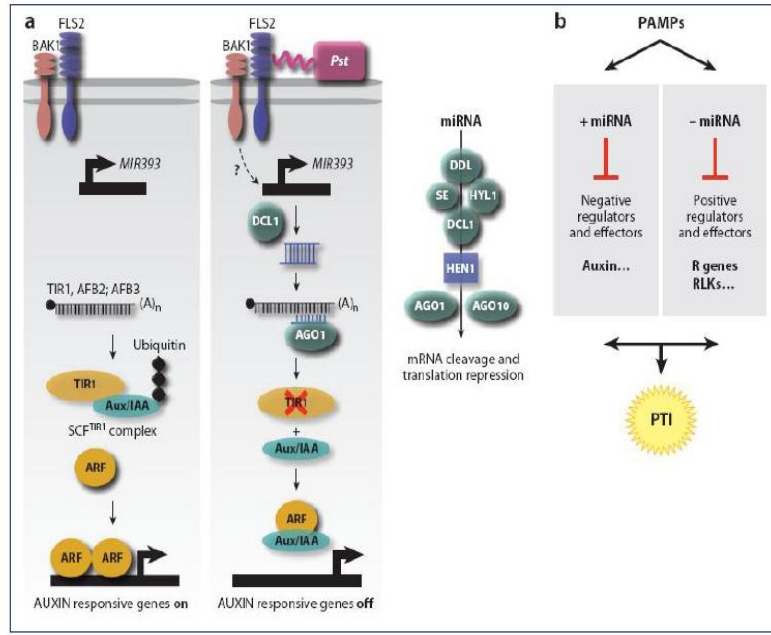
- Enfeksiyon başlangıcına dayanıklılık (Tip 1),
- Enfeksiyonun yayılmasına dayanıklılık (Tip 2),
- Tohum/tane enfeksiyonuna dayanıklılık (Tip 3),
- Hastalığa dayanıklılık (Tip 4),
- Mikotoksinlere dayanıklılık (Tip 5).

Şu anda *Fusarium* türlerine yüksek düzeyde dayanıklılık gösteren bir çeşit bulunmamakta, ancak yapılmakta olan bazı çalışmalarda toleranslı çeşitlerin enfeksiyon ve yayılım süresince *F. culmorum*'a aktif savunma yanıtları verdikleri bilinmektedir (Kang ve ark., 2000). Patojen enfeksiyonuna maruz bırakılan bitkilerde savunma yanıtı genleri olarak bilinen ve PR (Pathogenesis-related proteins) proteinlerini kodlayan bir grup genin, patojen-bitki etkileşiminde temel rol oynadığı bilinmektedir (Koç ve ark., 2008). *Fusarium*'a dayanıklılığın moleküler düzeyde incelenmesinde, hassas ve

dayanıklı genotiplerde gen-bağılantılı miRNA'ların tesbiti ve patojen-konak ilişkilerine dair daha fazla bilginin elde edilmesi önem taşımaktadır.

2.2. Biyotik Stres Yanıtlarında Bitki miRNA'larının Fonksiyonları

Gelişimde ve abiyotik strese miRNA'ların rolü yoğun bir şekilde çalışılmasına rağmen, biyotik strese yanıtta miRNA'ların fonksiyonları çok yakın zamanlarda çalışılmaya başlanmıştır. Bununla alakalı ilk çalışma *Arabidopsis*'de yapılmıştır. PAMP (patojen ilişkili moleküler numune) yaygın bir şekli de bilinen *Pseudomonas syringae* (Pst)'un respörü olan flg22, peptitden elde edilen bir bakteri F – box proteindir. flg22 ise TIR1'i hedefleyen miR393'ün ifade edilmesini başlatmıştır (Şekil 2. 2; Navarro ve ark., 2006). TIR1 (transport inhibitorü yanıt proteinleri), oksin kaynaklı fizyolojik yanıtlarda işlev gören bir oksin reseptörüdür. Benzer bir çalışma Pst DC3000 (*Pseudomonas syringae* fonksiyonel tip III salgı sistemi) ile enfekte edilmiş *Arabidopsis*'te gözlemlenmiştir (Eldem ve ark., 2013). *Arabidopsis* TIR1 mutantta miR393 dirençli TIR1'in overekspresyonu (aşırı ekspresyonu) baskılanarak Pst DC3000'e hassasiyeti arttırmıştır (Navarro ve ark., 2006). Bu sonuçlar miRNA'ların PTI (PAMP teşvikli bağışıklık) mekanizmasında kritik bir yerdedir. miR393 bitkilerin antibakteriyel yanıt mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır. miR393 bitkilerde transkripsiyon faktörüne etki ederek patojenle ilişkili proteinin ekspresyonunu düzenleryerek patojenin yayılmasına engel olabilmektedir (Khraiwesh ve ark., 2012).



Şekil 2. 2. Biyotik strese yanıtta bitki miRNA'ları (Vionnet, 2009). (A) Düşük miR393 düzeyleri altında, TIR1 F – box proteinleri oksin faktörlerinin ubiquitin kaynaklı degradasyonunu başlatır ve savunma yanıtlarını baskılayan oksin yanıt genlerinin girişini düzenler. Orta panelde, flg22'ye sahip FLS2'nin aktivasyonu oksin yanıt genlerinin baskılanmasıyla sonuçlanan TIR1'in bölünmesine yol açar. (B) miRNA'nın üretimi pozitif ve negatif düzenleyicilerle bir dengede devam ettirilir

Bitki-mikroorganizma etkileşim sırasında mikroRNA'lar önemlidir. Örneğin, *Rhizobium* bakterisinin azot (N) fiksasyonunu ve *Agrobacterium*'ların tümör oluşumunun düzenlenmesinde miRNAların görev aldığı bilinmektedir (Combie ve ark., 2006). Ayrıca, oksin (IAA) stresine yanıt faktörleri olan ARF'ler rhizobial enfeksiyon sonucunda yapraklarda (ARF10, ARF16 ve ARF17) miR160, miR393, miR164 ve miR168'i hedef ve ifade düzeylerini değiştirir (Zhou ve ark., 2008; Khraiweh ve ark., 2012).

Bitkilerde, *Arabidopsis*'de bitkisel antibakteriyel (PTI) miRNA olarak ilk miR393 teşhis edilmiştir (Khraiweh ve ark., 2012). Tütünde, miR156, miR160 ve miR164 mozaik virüs enfeksiyonu sonrası uyarılmış olup çeşitli miRNA aileleri farklı tepki ifadeleri ortaya koyabilmektedirler (Khraiweh ve ark., 2012). Çam da pas mantarı fusiforme pas hastalığına neden olur. Örneğin fusiform enfeksiyonunda miR156 ve

miR160 tepki ifadesi olarak artış göstermektedir (Bazzini ve ark., 2007; Subramanian ve ark., 2008). En son veriler göstermektedir ki miRNA'lar buğday'da külleme (powdery mildew) enfeksiyonuna karşı tepkiyi etkilemektedir. Korunmuş miRNA'ların bazıları göstermiştir ki küllemeye tepki olarak miR156, miR159, miR164, miR171 ve miR396 ifadesinde azalma (down regüle) olurken miR393, miR444 ve miR827 sırasıyla ifadesinde artma (up regüle) olduğu görülmüştür (Xin ve ark., 2010). Fungal strese maruz kalmış bitkilerde miR160 ifadesi artış gösterirken GH-3 gen ifadesini (gen ekspresiyon) ve ARF10 engellenerek tohum çimlenmesini ve bitki örtüsünün oluşumunu durdurarak tepki vermiştir (Lui ve ark., 2007).

miR156 ailesi, bitkilerde çiçeklenme peryodunu, yaprak gelişim süreci ve tohum gelişimi gibi evrelerde yer alan SBP (squamosa promoter bağlayıcı protein) transkripsiyon faktörü kontrol etmektedir. miR156 hem abiyotik (kuraklık, tuzluluk) hem de biyotik (fungal, bakteriyel) streslerde görev alarak ifade seviyesi değişmektedir (Lui ve ark., 2008). Khraiwesh ve ark, (2012) yaptığı çalışmada biyotik (Fungal) strese görev alan bazı miRNA'lar Çizelge 2. 2 verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Biyotik streste (Fungal) düzenlenmiş bazı miRNA'lar ve hedef proteinleri (Khraiwesh ve ark., 2012)

Fungal stresteki miRNA	Hedef proteinleri
Pta-miR156-	SBP-LIKE
Pta-miR160-	ARF
Ta-miR156-	SBP-LIKE
Ta-miR159-	MYB
Ta-miR164-	NAC
Ta-miR171-	SCL
Ta-miR393-	TIR1
Ta-miR393-	GRF

Buğdayda, strese yanıt olarak miRNA'ların fonksiyonları halen tam olarak bilinmemekte, ancak yapılan birçok araştırmalarda abiyot ve biyotik strese tepki olarak buğdayda küçük RNA'ların ifade seviyeleri incelenmiştir. Strese yanıt olarak

miRNA'ların önemli rolleri hakkında ipuçları sağlanmıştır (Yao ve Sun, 2012). Xin ve ark. (2010) külleme enfeksiyonu ve ısı stresine duyarlılığı belirlemek için gerçekleştirilen yüksek verimli sekanslamada toplamda 22 miRNA'nın küf enfeksiyonuna önemli ölçüde duyarlı olduğunu tesbit etmiştir (Yao ve Sun, 2012). Örneğin, külleme enfeksiyonunda yakın- izogenik dayanıklı hat JD8 - PM30 göre duyarlı JD8 buğday çeşidinde miR156'nın ifadesi azalmıştır. Küf stresine maruz bırakılan buğdaylarda, miR156 ifadesi ile hedef genler (Ta3711 ve Ta7012) arasında negatif bir ilişki belirtilmiştir (Xin ve ark., 2010). Patojene duyarlı miRNA başka örneğinde ise, JD8 buğday çeşidindeki küf enfeksiyonunda sentezi artan miR393 görülmektedir. Çalışmanın ilginç olan yanı oksin sinyal yolu ile ilgili miR393 salgılanma modelleri belirgin olmasıdır. Bu modelde yakın izogenik JD8 ve JD8 - PM30 arasında oksin sinyalinin farklı olduğu görülmüştür, bu nedenle, miRNA'dan etkilenen oksin yollarının külleme hastalık direncini de önemli ölçüde etkilediği görülmüştür (Xin ve ark., 2010; Yao ve Sun, 2012). Buna ek olarak, Bu çalışmada 9 miRNA'nın istatistiksel olarak sıcaklık stresine karşı önemli derecede duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, miR172 ifadesi önemli ölçüde (1,5 kat) azalırken miR156, miR159, miR160, miR166, miR168, miR169, miR827 ve miR2005 dahil 8 miRNA'nın ifadesi önemli ölçüde artış göstermiş, miR168 ise 2.9 misli ifade artışı sağlamıştır.

Khraiwesh ve ark. (2012) yaptığı çalışmalarda fungal ve bakteriyel enfeksiyonda miR160 ve miR393 görev alırken viral ve yine fungal enfeksiyonda miR156, miR160 ve miR164 görev aldığı görülmüştür. Bundan başka fonksiyonel analizler göstermektedir ki abiyotik direnç gibi biyotik dirençte de bu hayati roller için önemli ölçüde miRNA'lara ihtiyaç vardır. Bu anlayış miRNA'ların eşliğinde bitkilerin strese genetik toleransları için yeni araçlar sağlamaktadır (Yao ve Sun, 2012).

2.3. Abiyotik Stres Yanıtlarında Bitki miRNA'ların Fonksiyonları

Tuz stresi hücre içinde birçok farklı mekanizmanın uyarılmasına neden olduğu tahmin edilen stres koşulları ve bunların etkileri mikroarray teknikleri ile derinlemesine incelenebilmekte ve bu mekanizmaların etkileşimleri ile ilgili önemli bilgiler elde edilebilmektedir (Khan ve ark., 2007). Aşırı sıcaklık, tuzluluk, besin eksikliği ve

kuraklığı içeren abiyotik stres yanıtlar bitkilerde binlerce genin ifadesini kontrol ettiği ve bu genlerin bazılarının ise miRNA'lar tarafından düzenlenmiş olduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2010; Reyes ve Chua, 2007). Özellikle transkripsiyon sonrası gen susturulmasında küçük RNA'ların önemli rolleri göz önüne alındığında, abiyotik stres düzenleyici gen ifadesi bunların katılımı gibi görülebilmektedir (Yao ve Sun, 2012). Sunkar ve Zhu (2004) yaptığı çalışmada soğuk, dehidrasyon, yüksek tuz ve absisik asit gibi farklı abiyotik strese maruz kalmış *Arabidopsis* fidelerinde abiyotik strese duyarlı birkaç yeni miRNA ve küçük RNA'ların kütüphanesini teşhis etmişlerdir (Khraiwesh ve ark., 2012).

Bitkilerde çok sayıda genler ve transkripsiyon faktörleri tuz stresinden etkilenirken miRNA'lar *Arabidopsis*'de abiyotik streste mineral eksikliğine karşı duyarlıdırlar (Yao ve Sun, 2012). Besin noksanlığında miRNA'nın rolü miR399'u çalışılarak tesbit edilmiştir. miR399 fosfat eksikliği durumunda UBC (ubiquitin bağlayıcı enzimi)'nin çalışmasını hedeflemiştir. Dahası, miR399'u aşırı ifade eden transgenik *Arabidopsis* bitkileri yabancı tip bitkilerden daha fazla fosfat biriktirmiş ve birincil köklerde fosfat raportör geninin daha yüksek düzeyine sahip olduğu görülmüştür. Mineral eksikliğinde miRNA'ları rolü ATP sülfürlaz (APS) proteinlerinin etkileşimini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir. Asp1 geninin miR395 tarafından düzenlendikleri tesbit edilmiştir (Eldem ve ark., 2013). miR395, ATP sülfür APS1, APS3 ve APS4 kodlayan genleri hedefler. Bu enzimler, inorganik sülfat asimilasyon da ilk adımı katalizler ve sülfür birikiminde (Liang ve ark., 2010) görev alırlar (Khraiwesh ve ark., 2012).

Oksidatif stres yanıtları aynı zamanda miRNA'larla düzenlenir. Oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin oluşumunu başlatır ve süperoksit dimütazlar (SOD) gibi temizleyiciler bitkiye hasar veren molekülleri uzaklaştırır. miR398'in hedefleri *Arabidopsis* ve çeltikte Cu (bakır) -SOD olarak bulunmuş ve miR398'in aşırı ekspresyonu Cu – SOD'nun seviyesini azaltmıştır. Daha ilginç olanı, düşük seviyede Cu şartları altında, Cu – SOD'un seviyelerinde azalma olup miR398 seviyesi yükselmektedir. miR398, Cu homeostasi ve oksidatif stresin önemli bir düzenleyicisidir (Yamasaki ve ark., 2000; Lu ve ark., 2008). Ayrıca tuzlulukla ilgili olarak Cu/Zn süperoksit dismutaz (CSD1 ve CSD2) genlerini miR398 hedeflediği bulunmuştur (Eldem ve ark., 2013).

Bitki hormonlarıyla miRNA'ların etkileşimi ABA yanıtlarını çalışarak keşfedilmiştir (Reyes ve Chua, 2007). miR159 ABA uygulanmış fidelere artış gösterirken miR159'un hedef geninin MYB (myeloblastosis) transkripsiyon faktör ailesi olduğu doğrulanmıştır (Eldem ve ark., 2013). miR159 myb33, myb101 genlerinin aktivitelerini baskılanmaktadır. miR159'un ekspresyonu ABA'ya olan duyarlıdır buna bağlı olarak çiçeklenme zamanı engellenmektedir. miR159, myb33, myb101 ve myb65 transkripsiyon faktör genlerini hedefleyerek tuzluluk, kuraklık, bakteriyel ve fungal patojenlere yanıtında da görev almaktadır (Yanık ve ark., 2013).

Ayrıca miR393, miR397b ve miR402 ABA'yla alakalı diğer miRNA'lardan bazılarıdır (Reyes ve Chua, 2007). Yine tuz ve soğuk stresine maruz kalan bitkilerde miR393 artmakta TIR1 aktivitesi durdurularak oksin iletimi engellenmektedir (Williams ve ark., 2005; Jones-Rhodes ve ark., 2006; Chen, 2009). Bu sonuçlar stres yanıtlarıyla alakalı hormonların aktivitelerinden bir kısmını doğrulamıştır. Son zamanlarda, *Arabidopsis*'de yüksek tuzluluk, kuraklık ve soğuk gibi stres duyarlı miRNA'lar (miR168, miR171 ve miR396) tesbit edilmiş, böylece miRNA'ların abiyotik strese adaptif yanıtta rol oynadığını gösteren bulgular elde edilmiştir (Khraiwesh ve ark., 2012). Yine yapılan bir çalışmada, kuraklığa dayanıklı yabani buğday (*Triticum turgidum ssp. dicoccoides*) kuraklık stresine yanıt olarak miRNA ifade düzeyini mikroarray çipleri kullanarak araştırılmıştır. Yaprak ve kök dokularda toplam 438 miRNA tesbit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada 13 miRNA (miR1867, miR896, miR398, miR528, miR474, miR1450, miR396, miR1881, miR894, miR156, miR1432, miR166 ve miR171) kuraklık stresine yanıt olarak düzenlenmiş olduğu bulunmuştur (Khraiwesh ve ark., 2012; Kantar ve ark., 2010). En önemli abiyotik stres faktörlerinden biride ağaç türlerindeki mekanik strestir. Bu stresle alakalı olarak miR156, miR162, miR164, miR408, miR475, miR480 ve miR481 bulunmuştur (Lu ve ark., 2008). Bu nedenle mekanik strese yanıtta miRNA'lar bulunmaktadır.

Zhou ve ark. (2009) çalışmasında miR169 ailenin üyesi olan miR169g ve miR169n'nın, yüksek tuzluluk tarafından indüklendiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak miR156, miR164, miR167 ve miR396 aile üyelerinde tuzlu ortamda azalma olmamıştır. Son zamanlarda, tuza dayanıklı ve duyarlı iki hatta (*Zea mays*) 'da miRNA profilini araştırmak için kullanılan mikro-dizi deneylerinde miR162, miR168, miR395 ve

miR474 tuzlu ortamdaki mısır köklerinde arttığı tesbit edilmiştir (Khraiwesh ve ark., 2012). Köklerde miR168 artışına bağlı olarak AGO1 proteini oluşumu sağlanırken buna bağlı olarak miRNA biyosentezi düzenlenmektedir (Vaucheret ve ark., 2004).

Mikroarray teknikleri ile tuz stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinden bir miRNA kütüphanesi oluşturulmuş olup tuz stresine maruz bırakılan *Arabidopsis*'de bazı miRNA'larda artışı olduğu tesbit edilmiştir. Özellikle miR156, miR158, miR159, miR165, miR167, miR168, miR169, miR171, miR319, miR393, miR394, miR396, ve miR397 tuz stresine karşı tepki olarak düzenlendiği belirtilmiştir (Khraiwesh ve ark., 2012)

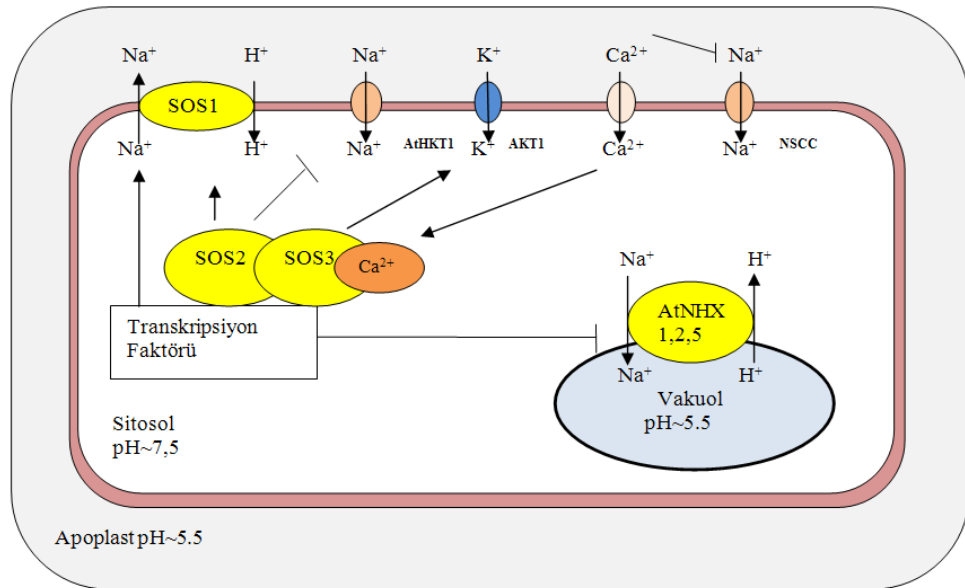
Bu sonuçlarda miRNA'ların abiyotik stres faktörlerine yanıtta vazgeçilemez elementler olduklarını göstermektedir. Khraiwesh ve ark. (2012) yaptığı çalışmada abiyotik (tuz) strese görev alan bazı miRNA'ları Çizelge 2. 3 de verilmiştir.

Çizelge 2. 3. Abiyotik streste (Tuz) düzenlenmiş mRNA'lar ve hedef aileleri (Khraiwesh ve ark., 2012)

Tuz stresi ve miRNA	Hedef gen ve protein
At-miR156	SBP-LIKE
Zm-miR166-	SBP-LIKE
At-miR158	PPR
Zm-miR162	DCL
At-miR167	ARF
At-Zm-miR169-	NFY/MTHAP2-1
At-miR171-	SCL
At-miR319/159-	TCP/MYP
At-Pv-mir393-	TIR1/AFB
At-miR394-	F-box
Zm-miR395-	AST/APS
At-miR396-	GRF
At-miR398-	CSD
Pt-miR482.2-	DRP
Pt-miR1450-	L-RTMK
Pt-miR171-	SCL
Pv-miR159.2	Chlarin heavy chain

2.4. Tuz Stresinin Moleküler Temelleri

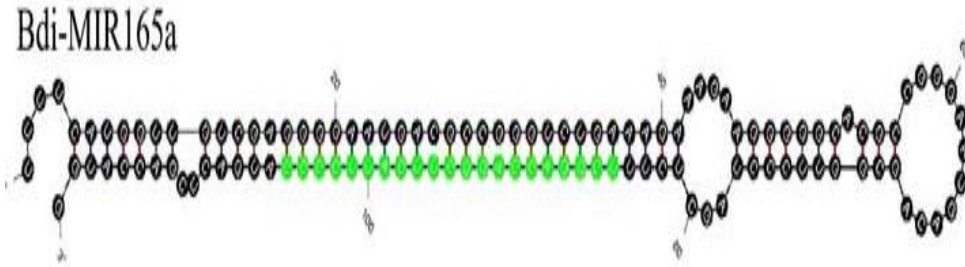
Tuz stresi bitkiler için önemli bir faktördür. Tüm dünyada bitki büyümesini ve üretimini olumsuz olarak etkileyen tuz, ekilebilir arazinin yaklaşık % 6'nı etkisi altına almaktadır (Khraiwesh ve ark., 2012). Bitkilerde tuza tolerans sağlayan genetik olarak birbirine bağlı Tuza asırı duyarlılık (SOS) yolu iyon dengesi ile sağlanmaktadır. *Arabidopsis spp.*'de tuz toleransında birbirine bağlantılı SOS1, SOS2, SOS3 ile Na^+ ve K^+ iyon dengesini (Şekil 2. 3) sağlamaktadır (Sairam ve Tyagi, 2004). Bitkide tuzluluk genelde, Na^+ ve Cl^- seviyesinde artışı sağlarken Ca^{2+} , K^+ gibi iyonların düzeylerinde azalışa neden olmaktadır. Şekil 2. 3'te ifade edildiği gibi SOS, plazma zarında bulunan Na^+/H^+ antiporterleri kodlar SOS2, serin/treonin kinaz proteinlerini kodlar iken SOS3 ise plazma zarında Ca^{2+} bağlayan proteinleri kodlar. Tuzun artması plazma zarındaki kalsiyum kanalını aktif hale getirir ve stoplazmada Ca^{2+} konsantrasyonunun artışına neden olur (Yokoi ve ark., 2002). Bu Ca^{2+} artışı, SOS3 aracılığı ile SOS2 basamaklarını aktive eder. SOS3'un SOS2 etkilemesi ile SOS2 aktif hale geçer. SOS2 ve SOS3, SOS1'i aktive ederek SOS1'in ekspresyon seviyesini belirlemektedir. SOS1'in aktif olması ile iyon dengesi sağlanır ve tuz toleransı ortaya çıkar (Sairam ve Tyagi, 2004; Yılmaz ve ark., 2011).



Şekil 2. 3. SOS sinyal ile iyon dengesi ve tuzluluğa toleransın kalsiyum tarafından düzenlenmesi (Sairam ve Tyagi 2004; Yılmaz ve ark., 2011)

HKT1: sodyum girişi taşıyıcısı AKT1: K⁺ girişi kanalı NSCC: seçici olmayan katyon kanalı
AtNHX 1, 2 ve 5: hücre içi zar Na⁺/H⁺ antiporteridir

Tuza tolerans ve iyon dengesinin sağlanmasında miRNA'lar transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek doğrudan görev alabilirler. miR393, NaCl (Tuz), kuraklık ve ABA uygulamasıyla yüksek oranda ifade olurken, miR319c ise soğuk stres uygulaması ile aşırı ifade olmuş ancak NaCl, kuraklık veya ABA streslerinde ifade artışı olmamıştır (Yang ve ark., 2007). Bugüne kadar yapılan birkaç çalışma tuz muamelesine karşı bitki miRNA'larının farklı ifade düzeylerini belirlemek için yapılmıştır. İfadeye dayalı bir çalışmada Lui ve ark. (2008) miR396, miR168, miR167, miR165 (Şekil 2.4), miR319, miR159, miR394, miR156, miR393, miR171, miR158 ve miR169 gibi birkaç miRNA'nın tuz muamelesine yanıt verdiğini belirtmiştir (Jagadeeswaran ve ark., 2009; Eldem ve ark., 2013). Çeltikte ve *Arabidopsis*'de miR396 yabancı bitki türleriyle karşılaştırıldığında alkali ve tuz stresine dayanıklılıkta bir azalma meydana gözlemlenmiştir (Chi ve ark., 2011). Kavakta tuz stresi sırasında miR530, miR1445, miR1446, miR1447 ve miR171 ifadesinde azalma olurken miR482.2 ve miR1450 kavakgillerde tuz stresi süresince ifade artışı olmuştur (Eldem ve ark., 2013).



Şekil 2. 4. Tuz stresine maruz bırakılan bitkide artış gösteren miR165a (Ünver ve Budak., 2012)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyalinin Elde Edilmesi

3.1.1. *F. culmorum* ve *B. Sorokiniana* Uygulama Materyalinin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan bitki materyalleri Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden elde edilmiştir. Çalışmada kullanılacak olan ekmeklik buğday çeşitleri ve çeşidi geliştiren kurumlar Çizelge 3. 1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılacak ekmeklik buğday çeşitleri ve geliştiren kurumlar

Ekmeklik Buğday Çeşidi	Geliştiren Kurum
Bezostaja-I	Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Mızrak-98	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
Seri-82	Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü

Çizelge 3. 2' de biyotik (*F. culmorum* ve *B. sorokiniana*) stres koşullarına dayanıklı ve hassas olan buğday çeşitleri ile pedigrileri (<http://wheatpedigree.net/>) verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Biyotik (*F. culmorum* ve *B. sorokiniana*) stres koşullarına dayanıklı ve hassas olan buğday çeşitleri ile pedigrileri.

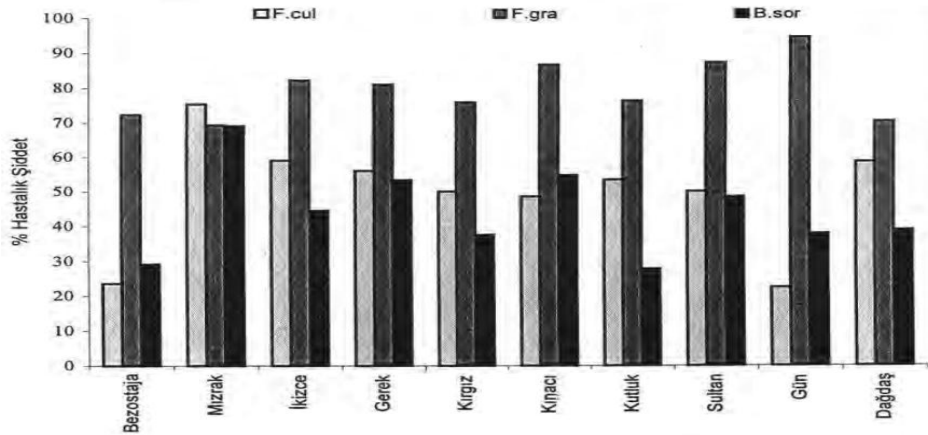
Çeşidin Adı ve Pedigrileri	Stres Faktörü	Hassasiyeti
Mızrak-98 (Ya-17278-4a-2a-1a-2a0a[2400]; Mızrak[000]; Mızrak-98[3532])	Biyotik	Hassas (Demirci, 2003)
Bezostaja-I (M)Bezostaya-1[104];	Biyotik	Dayanıklı (Demirci, 2003)

Mızrak-98: Kılçıklı ve beyaz kavuzlu, başakları orta uzunlukta seyrek ve yarı yatık bir yapıya sahiptir. Orta boylu ve sağlam saplıdır. Dane rengi beyazdır. Gübreye reaksiyonu oldukça iyidir. Orta geçici soğuğa ve kurağa dayanıklıdır. *F. graminarum*' un neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına orta derece de hassastır. Mızrak çeşidinde patojenlerin çıkışa önemli bir etkisi olmadığı belirlenirken, bu çeşitte *F. graminearum*'un hastalık şiddeti % 69, *F. culmorum*'un hastalık şiddeti % 75 ve *B.*

sorokiniana'nın hastalık şiddeti ise % 69.25 olarak bulunmuş (Çizelge 2.1) ve *F. graminearum* ve *B. sorokiniana*'ya karşı orta derecede hassas ve *F. culmorum*' a karşı ise hassas olduğu görülmüştür (Demirci, 2003).

Bezostaja-I : Kılçıksız ve başak rengi beyaz dane rengi kırmızı olan Bezostaja-I kışa dayanıklıdır. Kardeşleme oranı düşük olup boyu 100-110 cm dir. Erkencilik orta derece olup yatmaya dayanıklıdır. Sürme ve rastık hastalığı ile sarı ve kahverengi pasa dayanıklıdır. Kök ve kök boğazı hastalığına karşı ise hassastır (Demirci, 2003). Aktaş ve ark, (1999) yaptıkları çalışmalarda bu çeşidin *F. culmorum* ve *B. sorokiniana*' ya karşı orta derecede dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir. Demirci (2003) yaptığı çalışmada Bezostaja-I çeşidinde ele alınan patojenlerin çıkışa önemli bir etkisinin olmadığı. *F. graminearum*' a karşı hassas bulunmasına karşın (hastalık şiddeti %72), *F. culmorum* (%23) ve *B. sorokiniana* (%29)'ya karşı daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Her iki çalışmada birbirine paralel sonuçlar alınmıştır (Şekil 3. 1).

Bezostaja-I abiyotik (Tuz) stres'e karşı ise duyarlıdır. Bu doğrultuda Öncel ve Keleş (2002) Bezostaja-I, Seri-82 ve Kırac-66 çeşitlerine tuz stresinin uygulanması ile yapılan çalışmada kök ve sürgün büyümesi 200 mM NaCl uygulaması altında 5 gün gibi kısa bir süre kalmasına rağmen önemli ölçüde engellendiği görülmüştür. İncelenen genotipler arasında tuz dayanıklılığı en iyi olan genotipler Seri-82 ve Kırac-66 olarak görünürken Bezostaja-I ve Kızıltan-91 200 mM NaCl'e oldukça duyarlıdır (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Farklı buğday çeşitlerinde kök ve kök boğazı hastalığına sebep olan etmenlerin oluşturduğu hastalık şiddeti (Demirci, 2003).

Seri-82: Akdeniz kuşığı için tescil edilmiş bir çeşittir. Akdeniz bölgesinde sahip olduğu Yr9 geni sayesinde uzun süre pas hastalığına dayanıklılık göstermiştir. Ancak patojenin dayanıklılık genini aşması sonucu son yıllarda büyük verim kaybına uğradığından üretimden kalkma aşamasına gelmiştir (Demirci, 2003).

3.1.2. Tuz Uygulama Materyalinin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan buğday çeşit tohumları Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden elde edilmiştir (Çizelge 3. 1.). Bu buğdayların pedigrileri <http://wheatpedigree.net>'ten alınmış olup ayrıca abiyotik (tuz) stres için kullanılan çeşitler yine daha önceki çalışmalarla dayanıklı ve hassas olduğu belirlenen (Çizelge 3. 3) buğday çeşitleri bu stres faktörüne bağlı yapılan çalışmada Seri-82 ve Kıraç-66 dayanıklılık gösterirken Bezostaja-I ve Kızıltan-91 ise oldukça duyarlılık gösterdiği tesbit edilmiştir (Öncel ve Keleş, 2002).

Çizelge 3. 3. Abiyotik (Tuz) stres koşullarına dayanıklı ve hassas olan buğday çeşitleri ile pedigrileri

Çeşidin Adı ve pedigrileri	Stres faktörü	Hassasiyeti
Seri-82 Kavkaz/(sib)buho//Kalyansona/Bluebird[114]	Abiyotik	Dayanıklı (Öncel ve Keleş, 2002)
Bezostaja-I (M)Bezostaya-1[104];	Abiyotik	Hassas (Öncel ve Keleş, 2002)

3.2.Bitkilerin Büyütülmesi

3.2.1. *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* Uygulaması için Bitkilerin Büyütülmesi

Buğday tohumları (Bezostaja-I ve Mızrak-98) 20 dk boyunca % 40 Sodyumhipoklorit solüsyonu içerisinde steril edilip daha sonra steril su ile yıkanmıştır (Keskin, 2006). Steril edilen tohumlar, toprak, kum ve perlit (1:1:1) karışımının bulunduğu viyollere ekilerek (Şekil 3. 2) iklim dolaplarında 24 °C’de 16/8 saat ışık/karanlık altında ½ Hoagland solüsyonu (Hoagland ve ark., 1950) ile sulanarak 8 gün büyütülmüştür (Keskin, 2006; Öncel, 2002).



Şekil 3. 2. Buğdayın viyollere ekimi

3.2.2. Arnon ve Hoagland Çözeltilisinin Hazırlanması

Çözeltilinin hazırlanması için makroelement ve mikroelementler suda çözerek sıra ile karıştırılmıştır. Karışım için ilk etapta dört makroelementin her biri 1 lt suda çözüldükten sonra tamamı 5 L distile suda karışımı sağlanmıştır. Makroelementlerden KNO₃ ve MgSO₄ 7H₂O suda zor çözünmesinden dolayı ısıtmak gerekebilir.

Makroelementler	g/L
KNO ₃	1,020 g
Ca(NO ₃) ₂ [4H ₂ O]	0,492 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,230 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,490 g

Belirtilen oranda alınan bileşikler sıra ile KNO₃-Ca(NO₃)₂ .[4H₂O] -NH₄H₂PO₄-MgSO₄ 7H₂O karıştırılmıştır (Hoagland ve Arnon,1950).

Mikroelementler	mg/L
H ₃ BO ₄	2,860 mg
H ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0,090 mg
MnCl ₃ 4H ₂ O	1,810 mg
CuSO ₄ H ₂ O	0,080 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,220 mg

Mikroelementler ise çizelgede belirtilen oranda alınarak 1 lt'lik beherde çözdürülerek ve 5 L kapa aktarılmıştır. Bitki örnekleri saksılara konulduktan sonra eklenecek kimyasallar 50 ml'lik polyetilen tüplere % 0,5 lik FeSO₄ .7H₂O (0,5 g) ve % 0,4 lük Tartarik asit (0,4 g) hazırlanan çözeltiler konulmuş ve bu kimyasallar her saksıya 0,6 ml olmak üzere 2 gün aralıklarla eklenmiştir (Öncel ve ark., 2002).

3.3. İzolatların Temini ve PDA Ortam Hazırlanması

Çalışmada kullanılan fungus (Çizelge 3. 4) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden Sayın Prof.Dr. Berna Tunalı'dan temin edilmiştir.

Çizelge 3. 4. Çalışmada kullanılacak olan *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* izolatları

İzolat	İzolat Adı
H09W139-3K2	<i>Fusarium culmorum</i>
Ş-4KB1	<i>Bipolaris sorokiniana</i>

Elde edilen *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* izolatlar kâğıt kültürüne alınarak çalışmanın yapılacağı zamana kadar muhafaza edilmiştir. İzolatların kültüre alınması için PDA (Patates dekstroaz agar) ortamı hazırlanmış ve bunun için 16 g PDA, 2 g Agar, 400 mL saf su alınarak 121°C de 15 dk otoklav edilmiştir (Şekil 3. 3). Otoklav

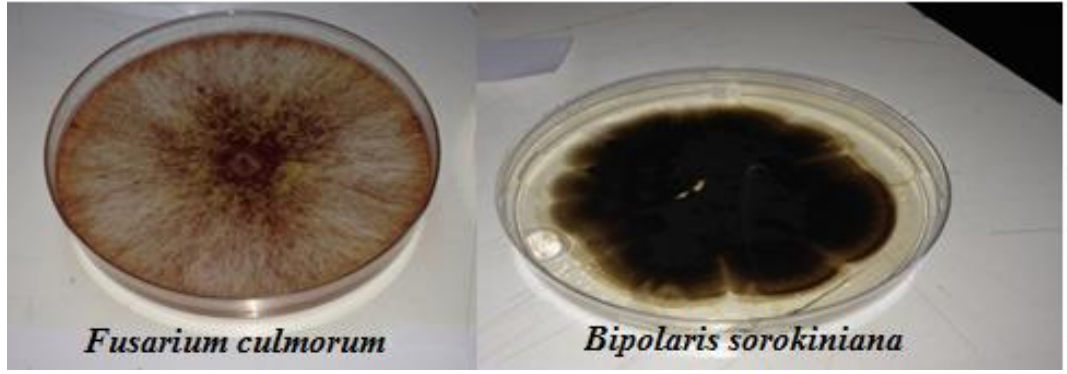
olan PDA'lar 'Polystrene' 90 mm çapında olan petri kaplarında kültüre alınmıştır. PDA ortamı 7 gün +4  C de inkübe edilerek fungusların gelişimi sağlanmıştır (Araz ve ark., 2010; Lawn ve Sayre, 1992).



şekil 3. 3. PDA ve sterilizasyonu sağlayan otoklav

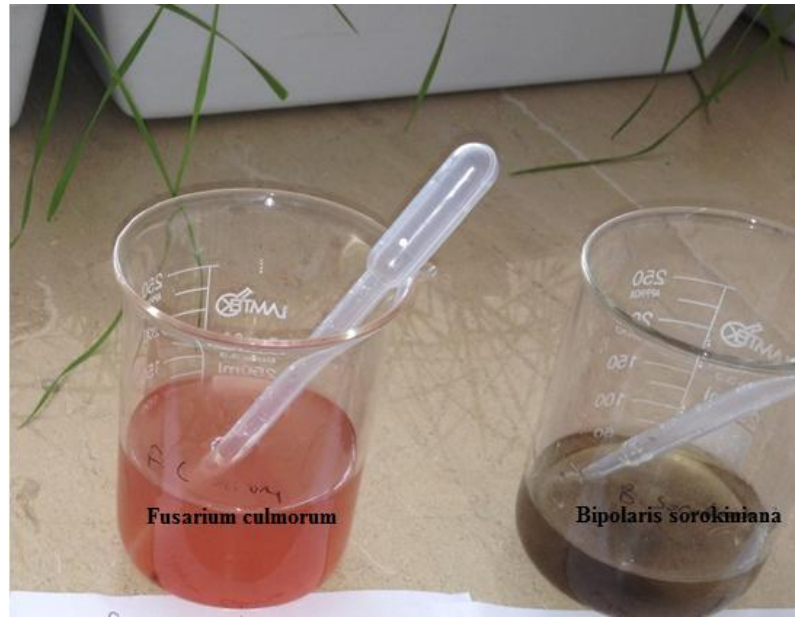
3.4. Fungus Solüsyonlarının Hazırlanması ve İnokülasyonu

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden alınan H09W139-3K2 *F. culmorum* ile ř-4KB1 *B. sorokiniana* izolatları ayrı ayrı kâğıt kültürüne alınarak inokulasyonun yapılacağı zamana kadar -80  C bekletilmiştir. Daha sonra bu izolatlar PDA (patates dekstroz agaroz) ortamında çoğaltılarak petri kaplarına ekimi yapıldı ve 12 saat karanlık periyotta inkübatörde $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de plastik steril petri kaplarında 7–8 gün süre ile fungus (şekil 3. 4) gelişimi sağlanmıştır (Arslan ve ark., 2002).



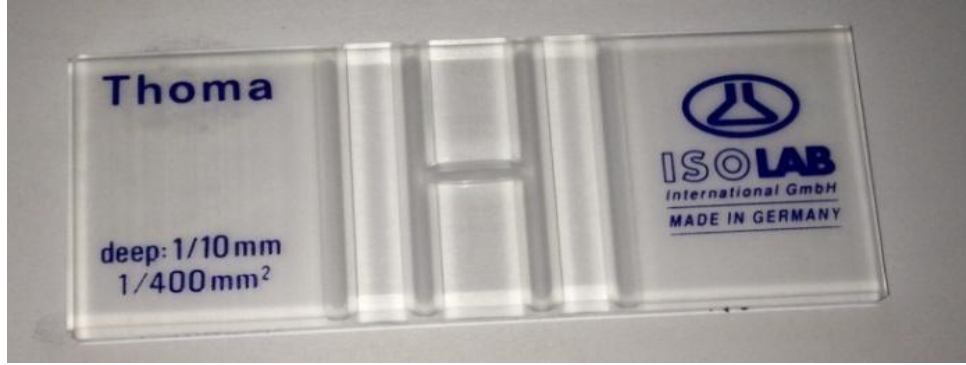
Şekil 3. 4. PDA ortamında geliştirilen *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* izolatları

PDA ortamında gelişen *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* spor ve miselleri saf su ile birlikte petri kaplarında solüsyon haline getirilmiştir (Tunalı ve ark., 2008). Petri kaplarına saf su eklendikten sonra steril sert bir metalle ile karıştırılarak oluşan solüsyonlar steril tülbent bez ile süzülerek beherlere (500 mL) alınmıştır (Şekil 3. 5).



Şekil 3. 5. Solüsyon haline getirilmiş *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* spor ve miselleri

Beherlere alınan süspansiyonda spor konsantrasyonları Thoma (İsolab) deep 1/10 mm ile yapılmıştır (Şekil 3.6). Solüsyon halindeki *F. culmorum* ve *B.sorokiniana* enjeksiyon yöntemi ile buğdaya inoküle edilmiştir. *F. culmorum* spor ve miseleri Şekil 3. 7’de, *B. sorokiniana* spor ve miseleri Şekil 3. 8’de verilmiştir.



Şekil 3. 6. Spor konsantrasyon ölçümü yapılan Thoma deep (1/10 mm)



Şekil 3. 7. *F. culmorum* sporları ve miseller



Şekil 3. 8. *B. sorokiniana* sporları ve miselleri

3.5. *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* Uygulanan Bitkilerin Hasat Edilmesi

F. culmorum ve *B. sorokiniana* solusyonları iklimlendirme dolaplarında 24 °C’de 16/8 saat ışık/karanlık altında ½ Hoagland solüsyonu (Hoagland ve ark., 1950) ile sulanarak 8 gün büyütülen buğday çeşitlerine injeksiyon yöntemi ile inokule edilmiştir. Patojen aşılması yapılmayan kontrol grubuna ise steril saf su inokule edilmiştir. Patojenlerin buğday çeşitlerine inokülasyondan sonra karanlık ortamda 24 saat extrem nemlilikte 10°C de karanlık uygulamasını takiben bitkiler 17°C 16/8 saat ışık/karanlık altında tutulmuştur (Şekil 3. 9). Örnekler inokulasyondan 48 saat sonra (yaprak kısmı) toplanarak -80 °C de RNA izolasyonuna kadar saklanmıştır (Keskin, 2006; Öncel ve ark., 2002).



Şekil 3. 9. İklimlendirme dolabı ve hasata hazır R ve S genotip çeşitleri

3.6.Tuz Stresi Uygulaması ve Bitkilerin Hasat Edilmesi

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden elde edilen Bezostaja-I ve Seri-82 çeşitlerine tuz stresinin uyulanması için buğday tohumları kum-perlit (1:1 v/v) karışımı bulunan saksılara 3'er tekkerrlü olarak ekilerek ve iklimlendirme dolabında 24/16 °C de (14 saat gündüz 10 saat gece) 7 gün süreyle Arnon-Hoagland çözeltisi ile sulanarak (Öncel ve ark., 2002) gelişimi sağlanmıştır (Şekil 3.10). Yedinci günün sonunda fideler iki gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu fideler, içinde Arnon-Hoagland çözeltisi bulunan kavanozlara alınmıştır (Öncel ve ark., 2002). Tuz stresi uygulanacak grup ise besin çözeltisine ek olarak 200 mM NaCl içeren kavanozlara alınarak bu koşullarda fideler hergün havalandırılmak üzere 5 gün süreyle kavanozlarda tutulmuştur. Bu sürenin sonunda kavanozlardan alınan yaprak ve kök örnekleri -80 °C de RNA izolasyonuna kadar bekletilmiştir.



Şekil 3. 10. İklimlendirme dolabında 24/16 °C de Arnon-Hoagland çözeltisi ile sulanarak büyütülen buğday çeşitleri

3.7.Toplam RNA İzolasyonu ve Konsantrasyon Tesbiti

Araştırma kapsamında yer alan bitki materyallerine ait örneklerden ayrı ayrı (Dayanıklı ve Hassas çeşitler) RNA izolasyonları yapılmıştır. Bu kapsamda kontrol ve uygulama lokasyonda alınan örneklerden yaklaşık 1 g yaprak dokusu sıvı azot içinde öğütülerek RNA izolasyonu için hazır hale getirilerek -84°C de izolasyon anına kadar muhafaza edilmiştir. Daha sonra aynı türün tekerrürleri ve kontrol grupları belirlenmiştir. Böylelikle 2 tekerrürlü, 2 uygulamalı (kontrol ve inokulasyon) ve 2 çeşit (Mızrak- 98 ve Bezostaja-I) içeren 8 örneğe ait RNA izole edilerek mikroarray analizine tabi tutulmuştur. RNA izolasyonu EZ-RNA Total RNA izolasyon Kiti (Biological Industries, İsrail) kullanılarak, kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu aşamasında ortama RNaz bulaşmasını önlemek için denemede kullanılan bütün plastik malzemeler ile gerekli tüm çözeltiler, RNaz aktivitesini engelleyen dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiştir. DEPC muamelesine ilave olarak malzemeler, 121°C ve 0,1 MPa basınçta 15 dk otoklav

edildikten sonra 105 °C’de en az bir gece boyu bekletilmiştir. Havan ve havan kolları ise 300 °C’de gece boyu bekletilmiştir. RNA izolasyonu için RNaz ve DNaz ari filtreli pipet uçları kullanılmıştır. RNA izolasyonunda kullanılan pipetler ve RNA izolasyonun yapıldığı tezgâhın üzeri, RNaz bulaşmasını engellemek için %30’luk H₂O₂ ile temizlenmiştir.

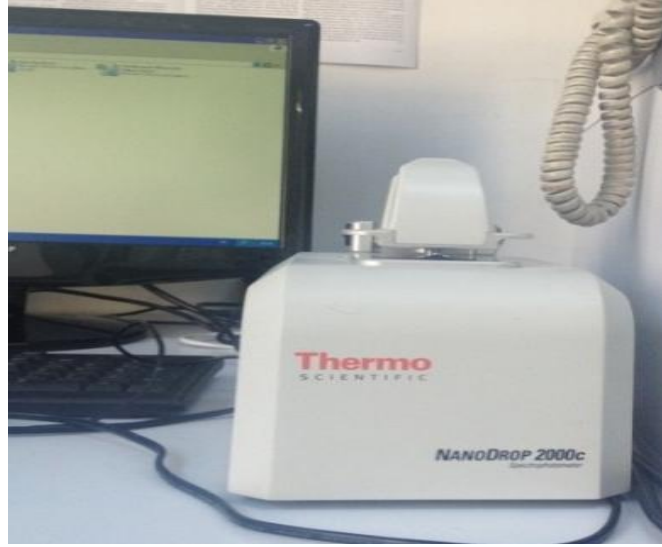
RNA izolasyonu için EZ-RNA Total RNA Isolation Kiti (Biological Industries) kullanılarak, üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzolasyon aşamaları aşağıda verilen protokole uygun olarak yapılmıştır (Şekil 3. 11).

1. Daha önce havanda öğütülen örnekler 50 – 100 mg doku gelecek şekilde eppendorf tüplerine tartılarak alınmıştır.
2. Denatürasyon solüsyonundan eppendorf tüplerine 0,5 mL bırakılmıştır.
3. 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. 0,5 mL ekstraksiyon solüsyonu eklenerek hızlı bir şekilde 15 sn elle çalkalanacaktır. 10 dk oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır.
5. 12000g’de 4 °C’de 15 dk santrifüj edilmiştir.
6. En üstteki faz temiz bir eppendorf tüpe alınmıştır.
7. RNA’yı çöktürmek için 0,5 mL izoporopanol eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
8. 12000g’de 4 °C’de 8 dk santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant uzaklaştırılır ve RNA peletine 1 mL %75 EtOH eklenerek vorteks yardımıyla yıkanmıştır.
10. 7500g’de 4 °C’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
11. EtOH uzaklaştırılır ve 5 dk hava kurutması yapılmıştır.
12. RNA peleti 100 µl DEPC muameleli su ile çözündürülmüştür.
13. Solüsyon 10 – 15 dk 55 °C’de bekletilmiştir. A_{260/280} O.D. değerinde RNA örnekleri 1.6 - 1.9 arasında bir değerlerine sahip olması gerekmektedir.



Şekil 3. 11. EZ-RNA Total RNA Isolation Kiti ile RNA izolasyonu

Örneklerin toplam RNA konsantrasyonları Thermo nanodrop 2000C (ThermoFisher Scientific, Lenexa, KS, A.B.) spektrofotomere ile (Şekil 3.12) ölçümleri yapılarak $A_{260/280}$ O.D. değerindeki veriler alınmıştır. Bunun için önce RNA izolasyonunda %75 Etanol içinine alınan örnekler 10.000 RPM'de 6 dk santrifüj edilmiştir. Alkolden uzaklaştırıldıktan ve iyice kurduğundan emin olduktan sonra 35 μ l DNaz/RNase-free suda çözülmüştür. Örnekler nanodrop'ta ölçülmüş ve agaroz jelde yürütülerek sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre her bir deney grubundan en uygun 8'er örnek seçilmiştir. Seçilen RNA örnekler agaroz jel görüntüsü alınmış ve uygun olan RNA'lardan her bir düzenek için 2'şer bitki grubunun 2 tekerrürlü kontrol ve 2 tekerrürlü uygulama örnekleri olmak üzere seçilmiştir.



Şekil 3.12. Thermo nanodrop 2000C spektrofotometre

3.8. *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* Uygulaması için miRNA Mikroarray Çalışması

Mikroarray tasarımı yapmak için kullanımda olan miRBase sürüm 20.0 versiyonu (www.sanger.ac.uk/software/rfam/mirna/) ve PMRD (Plant miRNA Database) veri tabanında bulunan toplamda 11.861 adet bitki miRNA'ları alınarak büyük ölçekli miRNA çip tasarımı gerçekleştirilmiştir. Çip tasarımı yapılırken olası array dezavantajlarından örneğin çapraz hibridizasyon gibi durumlardan kaynaklanan hataları azaltmak için her bir microRNA probundan 20 tane olacak şekilde çip üzerine yerleştirilmiştir. Problar hazırlanırken bitki miRNA'ları geniş alanda taranmıştır. miRNA array çip üretimi hizmet alımı olarak LC sciences, (LLC, Texas, US) (<http://www.lcsciences.com/mirna.html>) şirketi tarafından yapılmıştır. Buğday çeşitlerinin yapraklarından alınan örneklerle ait RNA'lar izole edilip bu miRNA mikroarrayleri için hazırlanmıştır. Bütün bunlar gözönüne alındığında buğday çimlenmesini takip eden süre içerisinde *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* inakulasyondan sonra yaprak 48. saat sonra örnekler alınmış ve RNA izolasyonları yapılarak mikroarray hibridizasyonları için hazırlanmıştır. Genç yapraklara ait olan RNA örnekleri ile toplamda 11.861 miRNA probu içeren miRNA çiplerinde tarama yapılmıştır. Çipte miRNA ve bunların çeşitli kontrol ve tekrarlarıyla birlikte yer

almaktadır. Çalışmada her bir uygulama için 4 kütüphane oluşturulmuştur fakat çipe yüklenirken iki tekerrülü yükletilmiştir.

Grup No. Örnek İsmi Grup İsmi

F. culmorum uygulaması

<u>Grup no</u>	<u>örnek ismi</u>	<u>grup isim</u>
1	Bezostaja-I kontrol(B-K)	yaprak
2	Bezostaja-I uygulama (B-U)	yaprak
3	Mızrak kontrol(M-K)	yaprak
4	Mızrak uygulama (M-U)	yaprak

B. sorokiniana uygulaması

<u>Grup no</u>	<u>örnek ismi</u>	<u>grup isim</u>
5	Bezostaja-I kontrol(B-K)	yaprak
6	Bezostaja-I uygulama (B-U)	yaprak
7	Mızrak kontrol(M-K)	yaprak
8	Mızrak uygulama (M-U)	yaprak

miRNA çipleri ikiyeşerli biyolojik tekrar olarak yapıp analiz edilmiştir. Aşağıdaki Şekil 3.13 ‘deki plan ile miRNA çipleri hazırlanıp sonuçlar analiz edilmiştir.



Şekil 3.13. *F.culmorum* ve *B. sorokiniana* uygulaması ve ikişer tekrarlı miRNA-mikroarray. BK-Bezostaja-I kontrol, BU-Bezostaja-I uygulama, MK-mızrak kontrol, MU-mızrak uygulama

Daha sonra bu kütüphanedeki gruplandırmalar göz önüne alınarak miRNA'ların ifade seviyeleri birbirlerine göreceli olarak ölçülmüş ve oluşan sinyaller Quantile programı ile normalize edilmiştir. Her bir mikroarrayde uygulamaya konulan prob kadar kontrol probuda bulunmaktadır. Kontrol problemleri array üretimi, örnek işaretleme ve analiz şartlarının kalitesinin kontrolü amacıyla kullanılmıştır. Her bir kütüphanede toplam RNA'dan 100 ng kullanılmıştır. Her kütüphane için 8x15K mikroRNA çip (Agilent) üzerinde etiketleme yapılmıştır. Etiketleme siyanin-3 (Cy3) ve 100 ng total RNA kullanılarak elde edilmiştir. miRNA'yı tamamen etiketleme ve HYB Kit (Agilent) üreticinin talimatları ile miRNA Microarray Sistemine göre diğer etiketleme adımları izlenerek yapılmıştır. Bu işlemi takiben hibritleşme için protokol, ise Cy3 ile etiketli miRNA, üreticinin talimatlarına (Agilent) göre 10X GE bloke edici madde, 2X Hi-RPM hibridizasyon tamponu ve Hyb spikes ihtiva eden bir hibritleme mix'i ilave edilmiştir. Hibritlemeden sonra, yıkama işlemi hemen başlatılmıştır. Çalışmamızda kullanılan iki patojenlerin ait iki farklı array (Agilent) 37°C'de GE1 (Agilent) ve GE2 'de (yıkama tamponu) 5 dk süre ile oda sıcaklığında yıkanmıştır. Hibritleştirilmiş olan mikroarray görüntüleri Agilent Microarray Tarayıcı Sistemi (Agilent Technologies) ile elde edilmiştir. 8x15 K mikroarray Agilent Technologies

ile taranmıştır. Daha sonra veriler Agilent Technologies (Ekstraksiyon v9.5) kullanarak TIFF görüntüleri çıkarılmış ve bu görüntü analizi ile yazılım üzerindeki noktalar sinyal yoğunluklarını ölçmek için kullanılmıştır. Düşük yoğunluktaki noktalar ise çıkarılmıştır.

Hibridizasyon sonrası lazer tarayıcı ile toplanan görüntü mikroarray görüntü analiz yazılımı (GeneSpringGX sürüm 11.5.1) ile dijital ortama aktarılmıştır. Düzensi veriler arka plan çıkarılmış ve sinyaller quantile ile normalize edilmiştir. İki renk kullanılarak yapılan deneylerde, iki setin tesbit edilen sinyalleri (logaritmik olarak düzenlenir) birbirine orantılanmış ve P-değeri hesaplanmıştır. P değeri <0.05 veya $p=0.05$ olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Önemli sinyal değeri olan miRNA'ların hedef genlerini tesbit etmek için Biyoteknoloji BilgiUlusal Merkezi (NCBI) veritabanı dahilindeki Gen Ontoloji (Blast2GO) yani programı kullanılmıştır. miRNA'ların hedef dizilerinin elde edilmesi için mikroarray çalışmasında ifade olan miRNA'ların dizi listesi psRNAtarget ([http://bioinfo3 doğru alanı yapıştırılan. noble.org / psRNATarget/](http://bioinfo3.dogru.alani.yapistirilani.noble.org/psRNATarget/)) ve psRNA target web sunucusunda miRNA'ların dizilerinin karşı hedef siteleri 18.04.2010 yayımlanan *Triticum aestivum*, kütüphanesinde (versiyon 12) seçilmiştir.

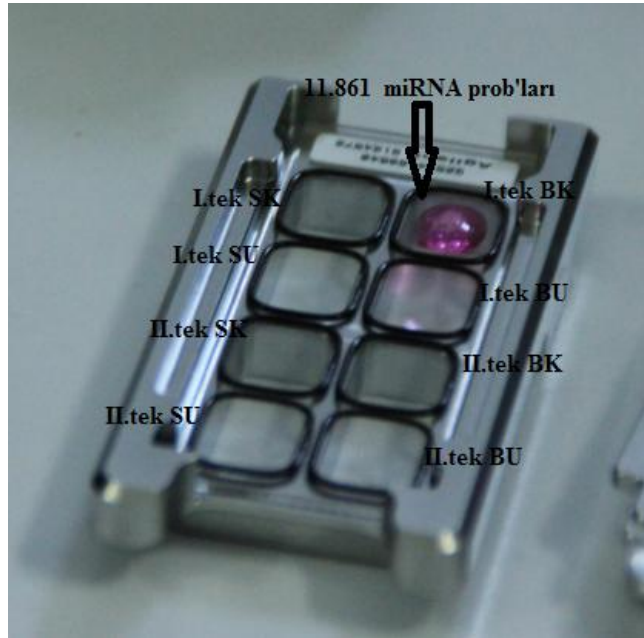
3.9.Tuz Uygulaması için miRNA Mikroarray Çalışması

Buğday da tuz stres mekanizmasında rol oynayabilecek miRNA'ların mikroarray tarama metodu ile saptanması ve araştırılması için array çalışması ve dizaynı *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* uygulaması için miRNA mikroarray çalışması anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Buğday çimlenmesini takip eden süre içerisinde tuz uygulaması sonucu belirli bir gün sonunda (5 gün) köklerden örnekler alınarak RNA izolasyonları yapılarak mikroarray hibridizasyonları için hazırlanmış ve miRNA çipleri ikiye bölünmüş biyolojik tekrarlı olarak bölüm 3. 8'de anlatıldığı gibi analizi yapılmıştır. Tuz uygulamasında 4 kütüphane oluşturulmuştur.

Tuz uygulaması

<u>Grup no</u>	<u>örnek ismi</u>	<u>grup isim</u>
1	Bezostaja-I kontrol(B-K)	kök
2	Bezostaja-I uygulama (B-U)	kök
3	Seri-82 kontrol(S-K)	kök
4	Seri-82 uygulama(S-U)	kök

miRNA çipleri ikiyeşerli biyolojik tekrar olarak yapıları olarak aşağıdaki Şekil 3.14'deki plan ile miRNA çipleri hazırlanıp sonuçlar analiz edilmiştir.



Şekil 3.14. Tuz uygulaması ve ikiyeşer tekrarlı miRNA –mikroarray
BK-Bezostaa kontrol, BU-Bezostaja-I uygulama, MK- Mızrak kontrol, MU-
Mızrak uygulama

3.9.1. miRNA Mikroarray Deney Prosedürü

miRNA Mikroarray deneyleri miRNA Mikroarray System with miRNA Complete Labeling ve Hyb Kit (v2.4, September 2011) kitini kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1. Bitki RNA'ları ~50ng/μl olacak şekilde seyreltilmiştir.

2. Etiketleme (Labeling) Spike-in ve Melezleme (Hybridization) Spike-in Hazırlama
3. 1.Seyreltme etiketleme tamponu (1st Dilution Labeling Spike-in Buffer): 5 tüp;
2µl 1 Etiketleme Spike-in (1 Labeling Spike-in) + 198 µl seyreltme tamponu (dilution buffer) hazırlandı. (4 tanesi -80°C’de saklanmıştır)
4. 2.Seyreltme etiketleme tamponu (2nd Dilution Labeling Spike-in Buffer): 2 µl
1.Seyreltme Tamponu (1st Dilution Buffer)+ 198 µl su
5. 3. Seyreltme etiketleme tamponu (3rd Dilution Labeling Spike-in Buffer): 2 µl
2. Seyreltme tamponu (2nd Dilution Buffer) + 198 µl su
6. 1.Seyreltme melezleme tamponu (1st Dilution Hybridization Spike-in Buffer): 5 tüp;
2µl Hybridization Spike-in + 198 µl seyreltme tamponu (dilution buffer) hazırlandı. (4 tanesi -80°C’de saklanmıştır)
7. 2.Seyreltme melezleme tamponu (2nd Dilution Hybridization Spike-in Buffer):
2 µl 1.seyreltme tamponu (1st Dilution Buffer) + 198 µl su
8. 3. Seyreltme melezleme tamponu (3rd Dilution Hybridization Spike-in Buffer):
2 µl 2. seyreltme tamponu (2nd Dilution Buffer)+ 198 µl su
9. Fosfataz Karışımı Hazırlama (CIP Master Mix)

Kullanmadan hemen önce her bir array slaydı için 9 örneğe göre hazırlanan fosfataz karışımı içeriği. Bir slaytta 8 örnek olmasına rağmen pipetaj ve tüpte kalma durumunda hata payını azaltmak için karışımlar 9 örneklik hazırlanmıştır.

	1 örnek için (µl)	9 örnek için (µl)
CIP master mix		
10X Calf İntestinal Phosphatase Buffer	0.4	3.6
3rd Dilution Labeling Spike-in	1.1	9.9
Calf İntestinal Phosphatase	0.5	4.5
Toplam	2.0	18.0

1. PCR tüpü içine 2 µl (~100 ng) bitki RNA örnekleri konulmuş ve buz üzerinde tutulmuştur.
2. RNA’lar üzerine 2 µl Fosfataz karışımı eklenerek ve 37°C’de 30 dk thermocycler’da bekletilmiştir.

3. Denatürasyon: 30 dk dolunca her bir örneğin üstüne 2,8 µl DMSO eklenmiştir. Isı bloğunda 100°C’de 8 dk bekletilen örnekler hızla sulandırılmış buza gömülmüştür.

Ligasyon Karışımı hazırlama: Karışım hazırlanmadan önce T4 ligaz tamponu (ligase buffer) 37°C’de bekletilerek vortexlenmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında bırakılmıştır.

Ligasyon Mix	1 örnek için (µl)	9 örnek için (µl)
10X T4 RNA Ligaz Buffer	1.0	9.0
Cyanine3-pCp	3.0	27.0
T4 RNA Ligaz	0.5	4.5
Toplam	4.5	40.5

1. Hazırlanan ligasyon karışımı 15 dk içerisinde, buzlu su içerisindeki her tüpe 4,5 µl eklenmiştir. Hafifçe santrifüjde dödürülen örnekler 16°C’de 2 saat termocycler cihazında bekletilerek gece -20°C’de bırakılmıştır.
2. Kurutma: Ertesi gün örnekler 1,5 ml tüpe alındı ve vakumlu santrifüjde orta ısı derecesinde (45-55°C arası) tamamen kuruyana kadar döndürülmüştür.
3. Kurutulduktan sonra 17 µl saf su eklenmiştir. Liyofilize halde gelen 10X GE Blocking Agent üzerine 125 µl saf su eklenmiştir.

Hibridizasyon karışımı Hazırlama: Sulandırılmış örnekler üzerine

1. 1 µl 3. seyretme melezleme (3rd dilution hybridization spike-in),
2. 4,5 µl 10 X GE blocking Agent,
3. 22,5 µl 2X Hi-RPM melezleme tamponu (hybridization buffer) eklenerek 100°C ısı bloğunda 5 dk bekletilmiştir. Ardından hızla sulandırılmış buza alınmıştır.
4. 45 µl örnekler dikkatle Gasket Slide üzerine yüklendi ve Aktif Slide’ın Agilent etiketi yazılı taraf altta kalacak şekilde Gasket Slide üzerine konulmuştur. SureHyb adı verilen düzenek ile iki Slayt sabitlenmiştir.

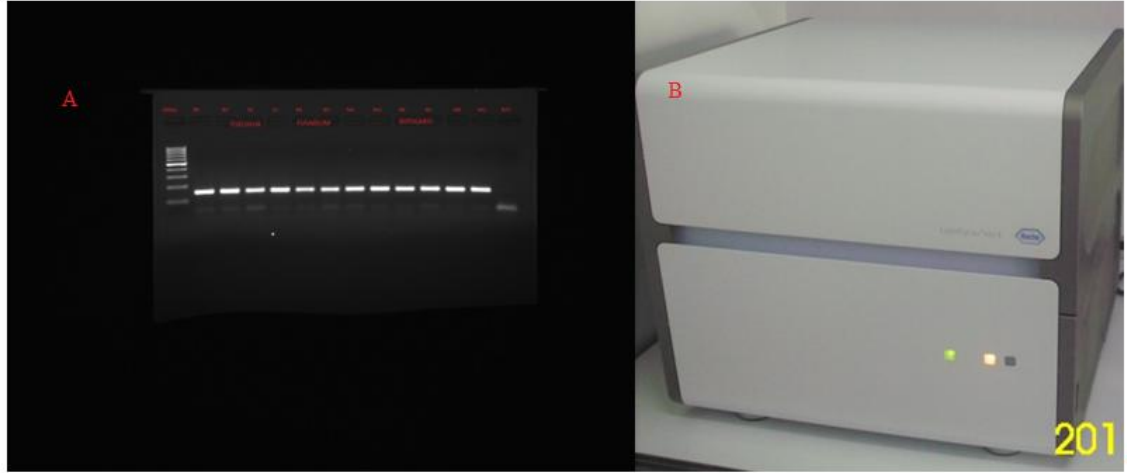
5. Gece 55 °C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınında en az 20 saat döndürülmek üzere bırakılmıştır. Yıkama tamponu (Wash Buffer 1) ve Wash Buffer 2 içerisine TritonX-102 eklenerek iyice çalkalanmıştır. Yıkama tamponu (Wash Buffer 2), bir gece 37 °C etüvde bırakılmıştır.
6. Ertesi gün; 3 tane yıkama tankı saf su, asetonitril ve tekrar saf suyla yıkanılarak temizlenmiştir. Tanklardan ilk ikisine Wash Buffer 1 ve üçüncüsüne Wash Buffer 2 (37 °C) dolduruldu. İkinci ve üçüncü tankın içine manyetik balık koyuldu ve üçüncü tank ısıtıcının üstüne konularak ısıtıcı 50 °C'ye ayarlanmıştır.
7. Hibridizasyon fırınından çıkarılan SureHyb düzeneği açılarak içindeki yapışık slaytlar birinci tank içinde açılmış ve aktif slayt dikkatlice barkod kısmından tutularak ikinci tank içindeki tutacağa alınmıştır. 5 dk boyunca manyetik balık döndürülerek beklenmiştir. Süre sonunda aktif slayt tutacakla birlikte dikkatli bir şekilde alınarak üçüncü tanka konmuştur. Isıtıcı ve balık çalışır konuma 5 dk beklenmiş ve tutacak sapından tutularak çok yavaş bir şekilde, yaklaşık 10 saniye süresinde, tank içindeki sıvıdan çıkarılmıştır. Bu yavaş çıkarma sonucunda slayt kuru olarak alınmıştır.

3.10. *F. culmorum*, *B. sorokiniana* ve Tuz Uygulaması için miRNA Saptama ve qRT – PCR ile Değerlendirme

Biyotik ve abiyotik stres sonucu oluşan miRNA'lar tesbit edilebilmesi için ilk olarak sap-ilmik ters (reverse) transkriptaz (transcriptase) primerleri (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) tasarlanmıştır. İkinci olarak miRNA'ya özel ileri primerler ve sap-ilmik'a uygun universal (evrensel) geri primeri (5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3') tasarlanmıştır. Tasarlanan bu primerler qPCR çalışmalarında kullanılmıştır. *F. culmorum*, *B. sorokiniana* ve tuz uygulaması için sap-ilmik RT primerleri, miRNA'ya özel primerler ve universal primer dizileri Çizelge 3. 5, 3. 6 ve 3. 7 de sıra ile verilmiştir.

Bu amaçla buğday çeşitlerine ait bitkilerden tüm miRNA'lar için izole edilen yaprak, kök dokularına ait RNA'lardan cDNA'lar (Şekil 15-a) elde edilmiş ve

ardından miRNA ifade düzeylerini tesbit etmek için Roche Light Cycler-480 II cihazı (Şekil 15-b) kullanılarak, qRT-PCR protokolü uygulanmıştır (Gutierrez ve ark., 2009; Eldem ve ark., 2012). cDNA elde etmek için Superscript III ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi (Invitrogen) kullanılmıştır.



Şekil 3.14. a)RNA’lardan elde edilen cDNA’lar b) Roche LightCycler 480 Real-Time PCR cihazı

Toplamda her bir stres uygulaması için 7 adet PCR tüpü kullanılmıştır.

(Fusarium yaprak dokusu için)

- B-K (1 numaralı tüp)
 - B-U (2 numaralı tüp)
 - M-K (3 numaralı tüp)
 - M-U (4 numaralı tüp)
 - noRT (sap-ilmik primeri yok) (5 numaralı tüp)
 - noRNA (RNA yok) (6 numaralı tüp)
 - noSSIII (SSIII enzimi yok) (7 numaralı tüp)
-

Bunlardan son üç tüp kontrol amaçlı kullanılmıştır. RNA miktarlarının eşit olması için, her bir dokuya ait total RNA’lardan 100 ng olacak şekilde, ayarlanarak RNA kullanılmıştır.

Her bir tüp için aşağıdaki tabloda içeriği verilen mix karışımı konulmuştur.

İçerik	Hacim
dNTP (10mM)	0,5 µl
RT primer (1pmol)	1 µl
RNA	(Çizelge 3.5 fusarium, 3.6 de bipolaris ve 3.7 tuz uygulaması)
Su (PCR Grade)	değişken

Daha sonra Realtime PCR cihazında tüpler önce 65°C’de 5 dk bekletilmiş ve hemen buza alınmıştır.

Tüplere;

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

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

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

Reaksiyon Koşulları;

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

Reaksiyonlar tamamlanınca tüpler -20°C’ye kaldırılmış ve qRT-PCR protokolüne geçilmiştir.

qRT-PCR için kullanılacak tüm maddeler önceden karıştırılarak 50X’lik bir karışım

hazırlanmıştır.

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

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

qRT-PCR numunelerinin plate yerleştirme düzeneği				
	Kuyular	<u>1/2</u>	<u>1/4</u>	<u>1/8</u>
1. Tüp-yaprak-(B-K)	A:	000	000	000
2. Tüp-yaprak-(B-U)	B:	000	000	000
3. Tüp-kök-(M-K)	C:	000	000	000
4.Tüp-yaprak-(M-U)	D:	000	000	000
5. Tüp-No RT-	E:	000	(1/10)	
6.Tüp-No RNA-	F:	000	(1/10)	
7.Tüp-No SSIII-	G:	000	(1/10)	
Negatif Kontrol(NTC)-	H:	000		

Yukardaki plana göre hazırlanan seyreltme tüplerinden 2’şer µl, master mix karışımından 18’er µl konulmuştur. H kuyucuğuna sample yerine su konulmuştur. ‘Plate’ in üzeri kapatılarak LightCycler480 (Roche) cihazına yerleştirilerek reaksiyon başlatılmıştır.

qRT-PCR Reaksiyon Koşulları;

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

Çizelge 3.5. *F.culmorum* uygulamasında tesbit edilen sap-ilmik ve spesifik miRNA primerleri

bdi-miR159	
forward	5'CTTGGATTGAAGGGAGCTCT-3'
Stem loop primer	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAAGAGCT-3'
ptc-miR169b-3p	
forward	5'GGCAGGTTGTTCTTGGCTAC-3'
Stem loop primer	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAAGTAGCC-3'
ptc-miR482c-5p	
forward	5'TATGGGAGAGGCGGGAATGACT-3'
Stem loop primer	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAAGTCAT-3'
osa-miR1869	
forward	5'TGAGAACAATAGGCATGGGAGGTA-3'
Stem loop primer	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAATACCTC-3'
ppt-miR901	
forward	5'GGTAAAGTGGCGGCTAGGTTA-3'
Stem loop primer	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAATAACCT-3'

Çizelge 3.6. *B. sorokiniana* uygulamasında tesbit edilen sap-ilmik ve spesifik miRNA primerleri

cre-miR1169-3P	
forward	5'TGTGGATGTTGCTTGCTGGAT-3'
Stem loop primer	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAATCCAG-3'
osa_miR319a-3p.2-3p	
forward	5'TTGGACTGAAGGGTGCTCCC-3'
Stem loop primer	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAGGGAGC-3'
ssl-miR398	
forward	5'TGTGTTCTCAGGTCACCCCTC
Stem loop primer	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAGAGGGG-3'
zma-miR164g-3p	
forward	5'CACGTGCTCCCCTTCTCCACC-3'
Stem loop primer	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAGGTGGA-3'
Universal primer	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

Çizelge 3.7. Tuz uygulamasında tesbit edilen sap-ilmik ve spesifik miRNA primerleri

ath_miR5655	
forward	5'-AAGTAGACACATAAGAAGGAG-3'
Stem loop primer	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCCTT-3'
cca-miR6108f	
forward	5'-TATGGTGAGAAGGGTAAGAAG-3'
Stem loop primer	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTTCTT-3'
hcl-miR156a	
forward	5'-TGACAGAAGAGAGTGAGTAC-3'
Stem loop primer	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGTACTC-3'
mdm-miR159c	
forward	5'-GAATTCCTTCTCCTCTCCTTT-3'
Stem loop primer	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAAAGGA-3'
osa_miR169a	
forward	5'-CAGCCAAGGATGACTTGCCGA-3'
Stem loop primer	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCGGCA-3'
osa_miR172b	
forward	5'-GGAATCTTGATGATGCTGCAT-3'
Stem loop primer	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACATGCAG-3'
rgl-miR164	
forward	5'-TGGGGAAGAAGAGCACATGAA-3'
Stem loop primer	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCATG-3'
bdi-miR319b	
forward	5'-TTGGACTGAAGGGTGCTCCCT-3'
Stem loop primer	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAGGGAG-3'
zma-miR482-5p	
forward	5'-TGGGAGATGAAGGAGCCTT-3'

3.11. miRNA'ların Hedeflediği Genlerin Saptanması ve qRT – PCR ile Hedef Genlerin İfadelerinin Doğrulanması

Tesbit edilen olgun miRNA dizileri miRNA hedeflerini tahmin etmek için buğdaya ait ifade olan dizi veri tabanı (Expressed Sequence Tags (EST) database) ile hizalama (alignment) yapılmıştır. Sonuçlanan uyuşmalar (alignmentlar) Allen ve ark. (2007) ve Schwab ve ark. (2005) tarafından önerilen kriterlere uyması gerekmektedir. Kullanılan kriterler kısaca şu şekildedir:

1. sRNA ve hedef arasında 4 hatalı eşleşmeden fazla olmamalıdır (G-U bazları yaklaşık 0,5 uyumsuzluk içerir),
2. miRNA/hedef dupleksindeki 2 yakın hatalı eşleşmeden daha fazla olmamalıdır,
3. miRNA/hedef dupleksinin 2 – 12. pozisyonundaki yakın eşleşmeler olmamalıdır,
4. miRNA/hedef dupleksinin 10 – 11. pozisyonlarında hatalı eşleşmeler olmamalıdır,
5. miRNA/hedef dupleksinin 1 – 12. pozisyonlarında 2.5 hatalı eşleşmeden daha fazla olmamalıdır,

miRNA/hedef dupleksinin Minimum Serbestlik Enerjisi (MFE =Minimum free energy) tamamlayıcısına bağlanmış miRNA'nın MFE'sinin %75'ine eşit veya büyük olması gerekmektedir.

3.12. Bazı miRNA'ların Hedef Genlerinin qRT – PCR ile İfade Analizi

Kök boğazı çürüklüğü ve tuzluluk stresinde ortaya çıkan miRNA'larla alakalı duyarlı ve dayanıklı çeşitlerde varyasyon teşkil eden miRNA hedef genlerinin ifade düzeylerini belirlemek için qRT-PCR kullanılarak, miRNA-hedef gen çiftleri belirlenmiştir. miRNA'ların hedef transkriptleri Plant Small RNA Target Analysis Server (psRNA Target, [http:// plantgrn. Noble. org/ psRNATarget](http://plantgrn.noble.org/psRNATarget)) ve (BlastN algoritması <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn>) kullanılarak

tesbit edilmiştir. Spesifik PCR primerleri Primer3 Plus yazılımı ([http:// www.bioinformatics. nl / cgi-bin / primer 3 plus / primer 3 plus. cgi/](http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)) kullanılarak tasarımı yapılmıştır.

Buğdayda 3 farklı stres faktörü ile 2 farklı dokusunda (yaprak, kök) 16 adet miRNA'nın hedef genlerinin ifade düzeyleri ölçülmüştür. qRT-PCR analizleri için Çizelge 3. 8'de verilen hedefler ve primerleri kullanılmıştır. Primerler yukarıda ifade edildiği gibi tasarlanmıştır. qRT-PCR deneyleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Çizelge 3.8. qRT-PCR ile ifade düzeyleri belirlenmeye çalışılan hedef miRNA'ların primerleri

miRNA adı	İleri Primer (5' >3')	Geri Primer(F) (5' >3')	Gen GI	product size (bp)
Tar_bdi-miR159-3p	AACAGCGGTCTCTTGGAAGA	GGATTGCCACTGAAAGGAGC	gi 359950733	199
Tar_osa-miR1869	CGCAAGTGAGCTAGGTGAAC	GCGAGAAGAAGGGCATCATG	gi 21852	193
Tar_ppt-miR901	TGGAAGTGAGCACACTGACA	GCCATCACTGTAGTTGCCAA	gi 32456059	184
Tar_ptc-miR169b-3p	CGCAACAATTAGGACAAGGC	CTCCCTTGTCTTTGCTGC	gi 508732624	158
Tar_ptc-miR482c-5p	CACTGTCCCCATCCTGAACT	GTGTCTGTGCAGCTTGAGAA	gi 357154399	184
Tar_cre-miR1169-3p	TGACTCGGGCCAATTACCTT	TGGGTTGCCTTTTGTGATGG	gi 32662311	230
Tar_ssl-miR398	GGCACCCGAAGATGAAATCC	TCCACCCTTGCCAAGATCAT	gi 380875809	175
Tar_zma-miR164g-3p	TCCACAACGTGTCCTGAAGA	ATATCGCCTGTTGTTGTCGC	gi 357148196	168
Tar_osa-miR319a-3p.2-3p	TCTTCGACAGGAGCACACTT	TCCTTGAAGTCCCAGAGCTG	gi 357161557	211
ath_miR5655	GTGGAGGTTTAGAAGGCCCT	CCTTCGAGTTGCCAGTTTCC	gi 68036923	147
cca-miR6108f	CGTCCTCAACATCGTCAAGC	CAAGCAGAATAACGCCCCGTG	gi 162319715	205
hci_mir156a	CAGCTCTTACCTGCCTTGC	CAGCAGCACGATACAGCAAG	gi 231274751	221
mdm-miR159c	TGGCAGGAGAGTTAGCGATC	AAGTAGGCAGGGACAGTGAC	gi 2827001	231
mtr-miR5227	CAGCCTACGAACAGCACAAG	GGCTGTTGGGTTGATTCTG	gi 18481621	193
osa_miR169a	CCCTGGCAAATCATCCTTGG	CCATGCCACACAAACCTACC	gi 45774394	196
osa_miR172b	CGACAGGGGATCGGGATTTA	GGGTGAAGGAGTATGCTGGA	gi 68037672	216

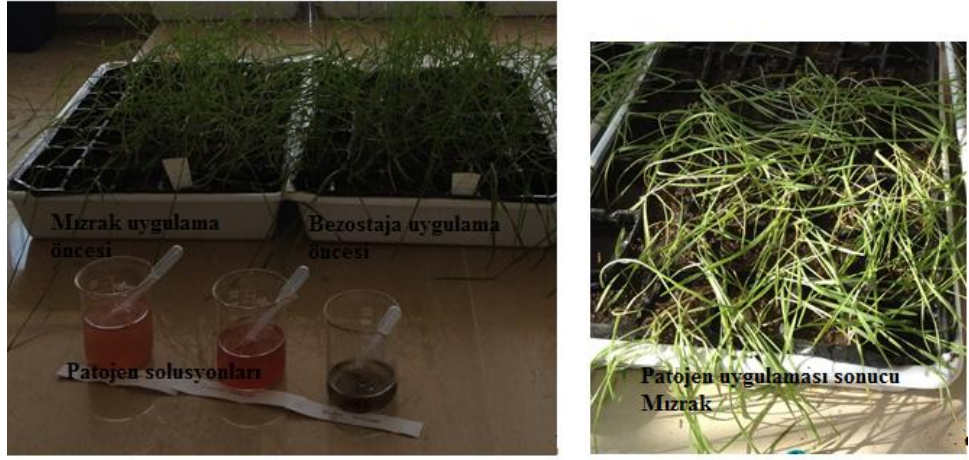
3.12.1. qRT – PCR Verilerinin Değerlendirilmesi

miRNA hedef gen ekspresyon analizinde örneklerin eşik (threshold) değerleri çalışmada kullanılacak olan Roche LightCycler 480 RT- PCR cihazının Software yazılımı aracılığı ile analiz edilmiştir (Ünver ve ark., 2009). RT - PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanarak genlerin ekspresyon düzeyi, oransal hesaplama Livak ve Schmittgen (2001) metoduna ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) göre belirlenmiştir. RT-PCR analizinde hedef transkriplerin normalizasyonunda 18S rRNA (AF147501) kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

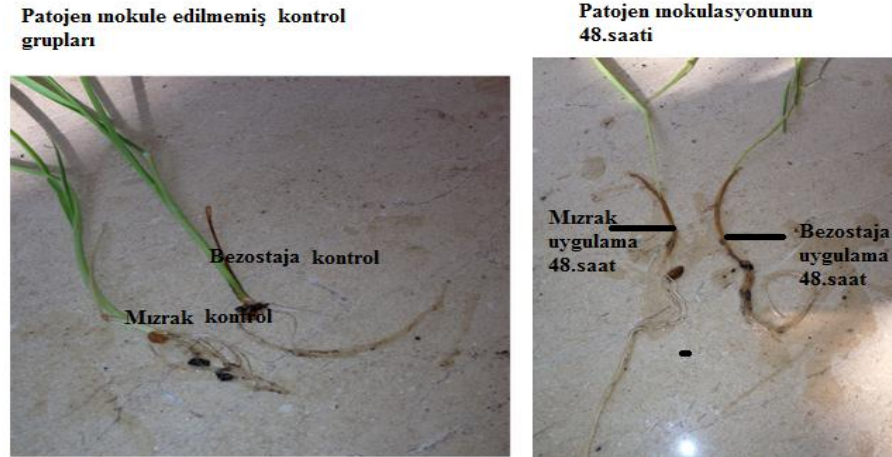
4.1. *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* İnokülasyon Sonuçları

Patojen uygulamasından sonra göze çarpan en belirgin özellik uygulamaya maruz kalan Bezostaja-I ve Mızrak-98 buğday çeşitlerinde yatma gözlenmesi olmuştur (Şekil 4. 1). Uygulamadan sonra belirli aralıklarla incelendiğinde kök ve kök boğazı hastalığının en belirgin özelliği olarak bitkinin kök boğazı bölgesinde belirgin hastalık semptomları (Şekil 4. 2) oluşmaya başlamasıdır (Demirci ve ark., 2003).



Şekil 4. 1. Mızrak ve Bezostaja-I çeşitlerine fungus uygulama öncesi ve Mızrak çeşitinde fungus uygulamasının 48. Saat sonrası genel görünüşü.

Uygulamanın 48. saatinde ise bu çeşitlerin kök boğazı bölgesinde sarıdan kahverengine doğru renk değişiminin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4. 2) Buda patojenlerin sporlarının bitkinin kök boğazı bölgesine başarılı bir şekilde inokule olduğunu göstermektedir. Patojen inokule edilmeyen kontrol gruplarında kök ve kök boğazı lezyonlarına rastlanmamakla beraber bitkinin yatması görülmemiştir.



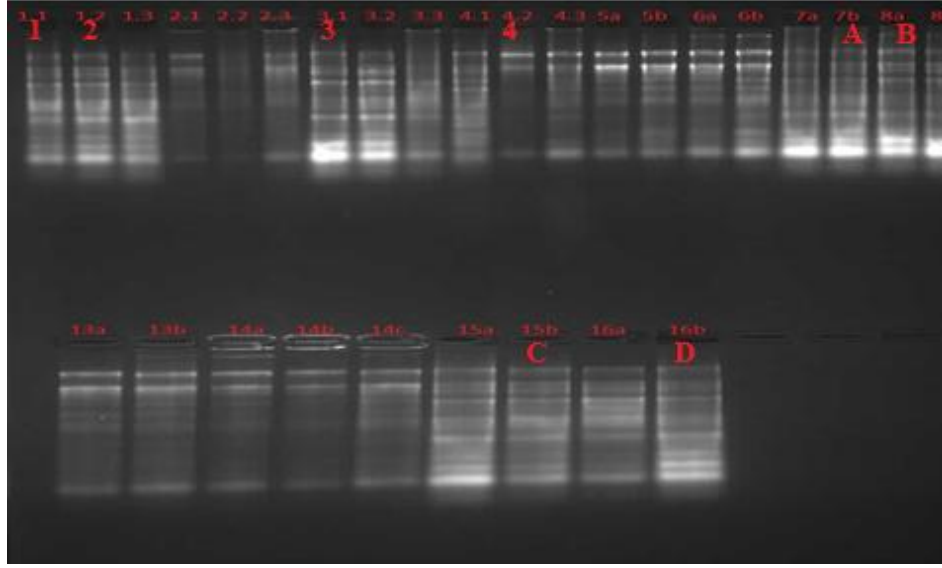
Şekil 4. 2. Patojen uygulamasının 48. saatinde kontrol ve *F.culmorum* uygulama örnekleri

4.2. *F.culmorum* Uygulanan Buğday Çeşitlerinin RNA Konsantrasyonları

Buğday çeşitlerine *F. culmorum* uygulaması sonucu total RNA konsantrasyonları çizelge 4. 1 de, RNA'ların jel görüntüleride ise Şekil 4. 3'de verilmiştir. Örneklerin tümünde O.D. değerleri 1,8'dan fazla olduğundan *F.culmorum* uygulanan ve kontrol örneklerinin RNA konsantrasyonu analiz için yeterli bulunup analizler yapılmıştır.

Çizelge 4.1. *F. culmorum* kontrol ve uygulama örneklerine ait RNA konsantrasyon değerleri

<i>Fusarium</i> Kontrol				
Örnek adı	Örnek no	Nükleik asit kons. (ng/µl)	OD 260/280	OD 260/230
1. I. Bezostaja-I	1.1	1327,8	2,13	1,54
2. II.Bezostaja-I	1.2	1812,8	2,09	2,05
3. I. Mızrak	3.1	5310,9	2,00	1,92
4.II. Mızrak	2.2	3458,1	2,10	2,12
Örnek adı	<i>Fusarium</i> Uygulama			
	Örnek no	Nükleik asit kons. (ng/µl)	260/280	260/230
A.I. Mızrak	7-b	3103,5	2,06	1,78
B.II. Mızrak	8-a	4741,2	2,06	1,82
C.I. Bezostaja-I	15-b	2401,7	2,10	1,98
D.I. Bezostaja-I	16-b	3724,2	2,03	1,78



Şekil 4. 3. *F. culmorum* Stresi RNA'lar Agaroz Jel görüntüsü.1 ve 2 Bezostaja-I uygulama, 3 ve 4 Mızrak-88 uygulama, A ve B Bezostaja-I kontrol,C ve D Mızrak-88 kontrol gruparını göstermektedir.

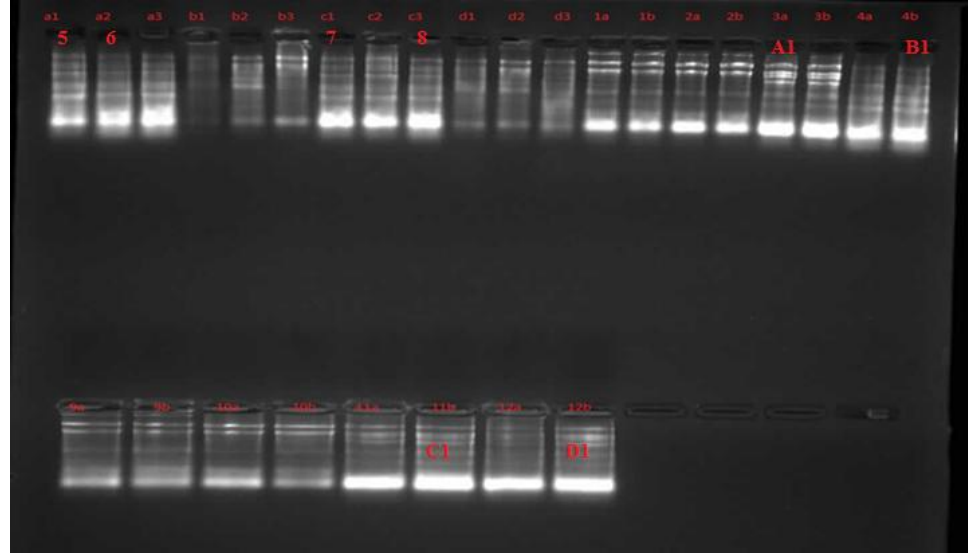
RNA'lar % 1,5 agaroz jel üzerinde yürütülmüş ve RNA bantları iki parlak bantlar olarak ortaya çıkmıştır (28S ve 18S). RNA'dan uygun olanlar çizelge 4. 1'de verilen numaraya göre alınırken şekil 4. 3'deki Bezostaja-I uygulama için 1 ve 2; RNA örnekleri patojen uygulanmayan kontroller için A ve B; Mızrak-98 çeşidi için 3 ve 4; kontrolleri için ise C ve D hatlarındaki RNA'lar analizler için seçilmiştir.

4.3. *B. sorokiniana* Uygulanan Buğday Çeşidinin RNA Konsantrasyonu

B.sorokiniana'ya dayanıklı buğday çeşidi olan Bezostaja-I ve hassas buğday çeşidi olan Mızrak-98'e patojen uygulaması sonucu total RNA konsantrasyonlarına ait $A_{260/280}$ O.D. değerleri Çizelge 4. 2'de, RNA'ların agaroz jel görüntüleri ise Şekil 4. 4'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *B. sorokinana* kontrol ve uygulama örneklerine ait RNA konsantrasyon değerleri

<i>Bipolaris</i> Kontrol				
Örnek Adı	Örnek no	Nükleik asit kons. (ng/μl)	O.D 260/280	O.D 260/230
5- I. Bezostaja-I	a1	2095,2	2,09	2,00
6- II. Bezostaja-I	a2	1868,6	2,12	2,11
7-I. Mızrak	c1	2347,8	2,08	1,87
8-II. Mızrak	c3	2425,5	2,01	1,98
<i>Bipolaris</i> Uygulama				
Örnek adı	Örnek no	Nükleik asit kons.(ng/μl)	260/280	260/230
A1) -I. Mızrak	3-a	4183,6	2,06	1,90
B1) -II. Mızrak	4-b	2305,4	2,04	1,64
C1) - I. Bezostaja-I	11-b	4779,9	2,04	2,08
D1)-II.Bezostaja-I	12-b	4366,5	2,07	1,98



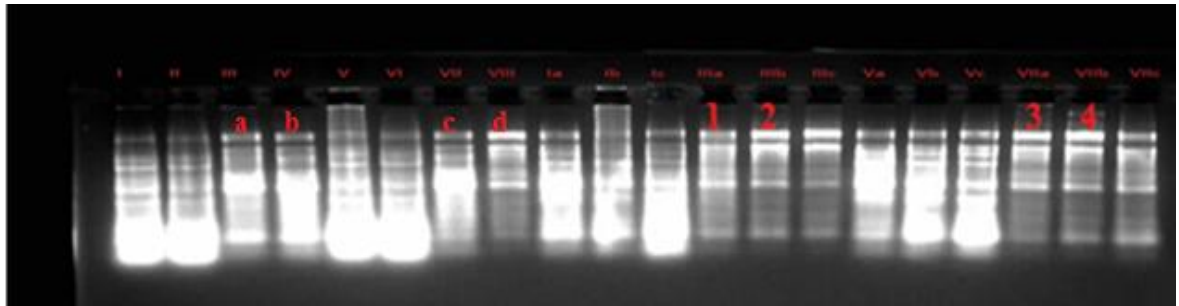
Şekil 4. 4. *B. sorokiniana* Stresi RNA'lar Agaroz Jel görüntüsü. 5 ve 6 Bezostaja-I uygulama, 7 ve 8 Mızrak-88 uygulama, A1 ve B1 Bezostaja-I kontrol, C1 ve D1 Mızrak-88 kontrol gruplarını göstermektedir

4.4. Tuz Uygulanan R ve S genotiplerinin RNA Konsantrasyonu ve Jel Görüntüsü

Total RNA konsantrasyonları $A_{260/280}$ O.D. değerleri 1,8'dan fazla olan tuz uygulanan ve kontrol örneklerinin RNA konsantrasyonu analiz için yeterli bulunmuştur değeri Çizelge 4. 3 verilirken RNA'ların jel görüntüleride (Şekil 4. 5) alınmıştır.

Çizelge 4. 3. Tuz stresi kontrol ve uygulama örneklerine ait RNA konsantrasyon değerleri

Tuzluluk Kontrol				
Örnek Adı	Örnek no	Nükleik asit kons. (ng/μl)	O.D 260/280	O.D 260/230
1 - I. Bezostaja-I	III-A	655,8	2,07	1,38
2-II. Bezostaja-I	III-B	610,4	2,03	1,45
3- I. Seri-82	VII-A	743,2	2,05	1,54
4-II. Seri-82	VII-B	865,1	2,01	1,66
Tuzluluk Uygulamalar				
Örnek Adı	Örnek no	Nükleik asit kons. (ng/μl)	260/280	260/230
a-I. Bezostaja-I	III	1343,5	2,05	1,36
b-II. Bezostaja-I	IV	5148,7	2,04	1,82
c-I.Seri-82	VII	1158,1	2,1	1,54
d-II. Seri-82	VIII	508,1	1,99	1,05



Şekil 4. 5. Tuz Uygulamasındaki RNA'lar ve Agaroz Jel görüntüsü. a ve b seri-82 uygulama, c ve d bezostaja-I uygulama, 1 ve 2 seri-82 kontrol, 3 ve 4 bezostaja-I kontrol gruplarını göstermektedir

4.5. MikroRNA Mikroarray Analizi

4.5.1. Biyotik Stres Faktörlerinin Analizi

Çalışmada patojen olarak kullanılan *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* patojenlerinin uygulandığı buğday çeşitlerinden elde edilen toplam RNA ile yapılan mikroarray çalışma verileri Gene Spring analiz programı ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sinyal şiddetlerinin normalizasyonu ise quantile yöntemine göre yapılmıştır. Sonuçlara göre $p < 0,05$ veya $p = 0,05$ olan problemler seçilerek kat değişim (fold change) değerleri 1,45'e eşit ve üzerinde olanlar Çizelge 4. 4 de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre seçilen miRNA'ların qRT-PCR ile doğrulanması yapılarak hedef genleri tesbit edilmiştir. Yapılan çalışmada, R (dayanıklı Bezostaja-I) ve S (hassas Mızrak-98) buğday genotipleri iki mantar (*F. culmorum* ve *B. sorokiniana*) patojeni ilgili miRNA ifade değerleri oluşturulmuş ve 9 miRNA örnekleri qRT-PCR ile hedeflenmiştir

Çizelge 4. 4. Fungus uygulaması sonucu elde edilen kat değişim (fold change) değerleri.

<i>F. culmorum</i>	Bezostaja-I Kontrol ve Bezostaja-I Uygulama	Bezostaja-I Uygulama ve Mızrak Uygulama	Mızrak Kontrol ve Mızrak Uygulama
miRNA adı			
ath-miR159b	1.004	-1.193	-1.497
ath-miR2933a	-1.351	1.292	2.036
ath-miR395b	-2.288	-1.064	-1.187
ath-miR447c-3p	60.832	1.054	1.025
ath-miR869.1	216.312	1.054	1.025
bdi-miR159	1.260	-1.254	-2.329
cre-miR1168.1	1.570	1.054	19.472
cre-miR1169-3p	3.138	26.821	-1.661

Çizelge 4. 4. (devamı) Fungus uygulaması sonucu elde edilen kat değişim değerleri.

cre-miR916	-82.438	-2.816	-225.746
csi-miR535	-1.555	-1.071	-1.084
gma-miR156aa	-1.217	-1.144	1.672
gma-miR169j-3p	41.442	1.054	1.025
gma-miR171k-5p	-1.660	1.067	1.550
gma-miR2119	-3.193	1.086	-1.403
gma-miR390b-5p	1.221	-2.559	19.180
gma-miR4402	1.208	-3.421	28.225
gma-miR4409	66.503	1.054	1.025
gma-miR4997	-1.228	1.074	1.738
gma-miR5674a	28.232	1.054	1.025
gma-miR5783	-8.227	1.495	2.208
gma-miR6300	1.242	-1.471	-1.892
hbr-miR408a	1.133	1.390	2.242
hbr-miR6170	-1.137	-1.025	1.590
hvu-miR6180	-1.637	-1.037	1.096
mdm-miR169e	78.936	1.054	1.025
mdm-miR319c	3.289	1.054	83.488
mdm-miR3627a	1.633	-1.063	-1.065
mtr-miR2592s	251.898	1.054	1.025
mtr-miR2657a	117.410	1.054	1.025
mtr-miR2679a	-1.076	-1.086	1.614
mtr-miR5208a	155.790	1.054	1.025
mtr-miR5263	-1.935	-1.013	-1.135
mtr-miR5560-3p	-1.832	1.180	-1.157
mtr-miR5562-3p	1.231	-11.769	7.523
osa-miR1423b	-1.312	1.091	-2.497
osa-miR1427	1.197	1.054	57.637
osa-miR1439	4.310	-19.686	3.729

Çizelge 4. 4. (devamı) Fungus uygulaması sonucu elde edilen kat değişim değerleri.

osa-miR159f	1.428	-1.285	-2.086
osa-miR1869	4.074	-60.004	-22.824
osa-miR2093-5p	-1.515	1.033	-1.412
osa-miR2867-3p	1.583	-19.212	1.061
osa-miR2918	37.031	1.054	1.025
osa-miR2928	35.773	1.054	1.025
osa-miR319a-3p	-1.477	1.247	-1.097
osa-miR390-5p	1.515	-20.796	1.049
osa-miR5338	158.650	1.054	1.025
osa-miR5510	-1.773	-1.180	-1.670
osa-miR5819	-1.560	-1.016	1.187
osa-miR5832	91.422	1.054	1.025
peu-miR2911	-19.918	1.658	1.007
ppt-miR1057	-1.518	-1.313	-1.024
ppt-miR901	20.782	-56.821	1.760
ptc-miR169b-3p	212.160	1.054	1.025
ptc-miR396e-3p	-2.462	1.069	-1.472
ptc-miR474b	-1.678	1.136	1.056
ptc-miR482c-5p	1.199	-18.945	-19.495
ptc-miR6436	-1.058	-109.016	-112.181
sbi-miR5565d	96.915	1.054	1.025
sbi-miR5565e	43.838	1.054	1.025
sbi-miR6228-5p	94.154	1.054	1.025
sbi-miR6229-5p	-1.086	1.163	-1.695
vvi-miR3624-5p	98.313	1.054	1.025
vvi-miR3626-3p	-166.784	166.145	1.025
zma-miR169a-3p	137.703	1.054	1.025
zma-miR169r-3p	33.504	1.054	1.025
zma-miR396a-3p	-1.965	1.042	-1.119

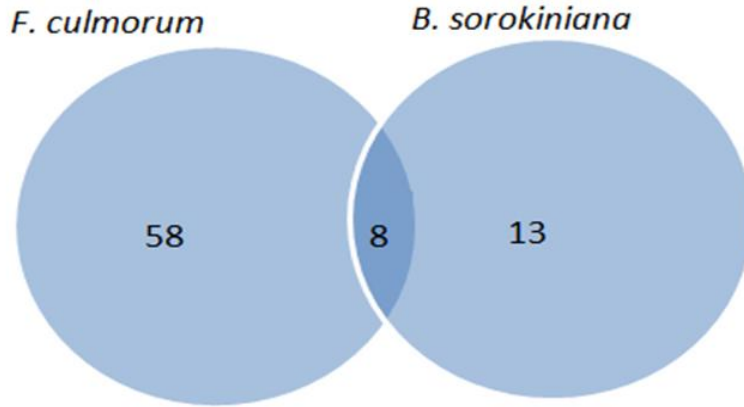
Çizelge 4. 4. (devamı) Fungus uygulaması sonucu elde edilen kat değişim değerleri.

<i>B. sorokiniana</i>			
ath-miR771	1.697	-1.100	1.171
ath-miR869.1	129.708	-1.015	1.035
cre-miR1169-3p	274.313	-5.225	10.440
gma-miR4398	-1.452	-1.790	-1.003
gma-miR482e	2.023	-34.899	-41.842
mtr-miR2592s	151.139	-1.015	1.035
mtr-miR2634	119.451	-1.015	1.035
osa-miR1427	-8.970	-1.876	-32.383
osa-miR1881	158.488	-2.563	40.264
osa-miR319a-3p.2-3p	-9.513	-1.661	-30.276
osa-miR528-5p	-2.175	1.517	-1.555
osa-miR5525	-2.031	-1.058	-31.139
osa-miR5800	-1.229	1.468	1.039
osa-miR6253	1.744	-1.784	1.226
ppt-miR894	1.367	1.155	1.579
ptc-miR169b-3p	102.680	-1.015	1.035
ptc-miR477d-3p	1.577	-1.169	1.193
sbi-miR169r-5p	2.121	1.508	2.800
ssl-miR398	-145.983	4.641	-29.780
vvi-miR3624-5p	58.699	-1.015	1.035
zma-miR164g-3p	-16.860	1.310	-49.344

Buğdayda hem *F. culmorum* ve hem *B. sorokiniana* patojenlerine duyarlı miRNA'lar tesbit etmek için iki ayrı Agilent 8x15K miRNA-mikroarrayi için, ilk etapta *F. culmorum* patojenine duyarlı Bezostaja-I (R) ve Mızrak-98 (S) buğday genotiplerinin RNA örnekleri array üzerine hibridize edilmiş ve ikinci etapta *B. sorokiniana* patojenine duyarlı R ve S buğday genotiplerinin RNA numuneleri array

yerleştirilerek hibridize edilmiştir. Bu patojenlere bağlı olarak 87 miRNA tesbit edilmiştir (Çizelge4. 4).

Tesbit edilen 87 miRNA'dan 66 miRNA *F.culmorum* patojeni uygulaması sonucu 21 miRNA ise *B.sorokiniana* patojeni uygulaması sonucu belirlenmiştir (Şekil 4. 7). miRNA'ların sekiz tanesi (cre-miR1169-3p, mtr-miR2592s-3p, osa-miR1427, osa-miR319a-3p.2-3p, ath-miR869.1, ptc-miR169b-3p, vvi-miR3624-5p, miR482e) *F.culmorum* ve *B.sorokiniana* patojen uygulamasında ortak olarak ifade edilmiştir (Şekil 4. 6).



Şekil 4. 6. R ve S buğday genotiplerinde *F. culmorum* ile *B. sorokiniana* uygulamsı sonucu oluşan miRNA grupları

Çalışmanın ilk etabında, *F. culmorum* duyarlı miRNA'ların profili tesbit edilmiştir. Tesbit edilen 66 miRNA'lardan dokuz tanesi (miR156, miR159, miR169, miR171, miR319, miR390, miR396, miR408, miR535) korunmuş miRNA ailelerindendir ([http: // pmted. agrinome. org/ index. jsp](http://pmted.agrinome.org/index.jsp)) (Çizelge 4. 5).

F. culmorum array çalışmasında vvi-miR3626-3p, ptc-miR474b, peu-miR2911, gma-miR5783, ath-miR2933a, gma-miR171k-5p, gma-miR156a transkriplerin ifadesi R genotipinde azalırken (down regülasyon) S genotipinde ifade seviyesi artmıştır (up regülasyon). *T. aestivum*'da powdery mildew (külleme) enfeksiyonu uygulamasında miR156, miR171, miR164 ve miR396'nın ifadesinde azalma olduğu rapor edilmiştir

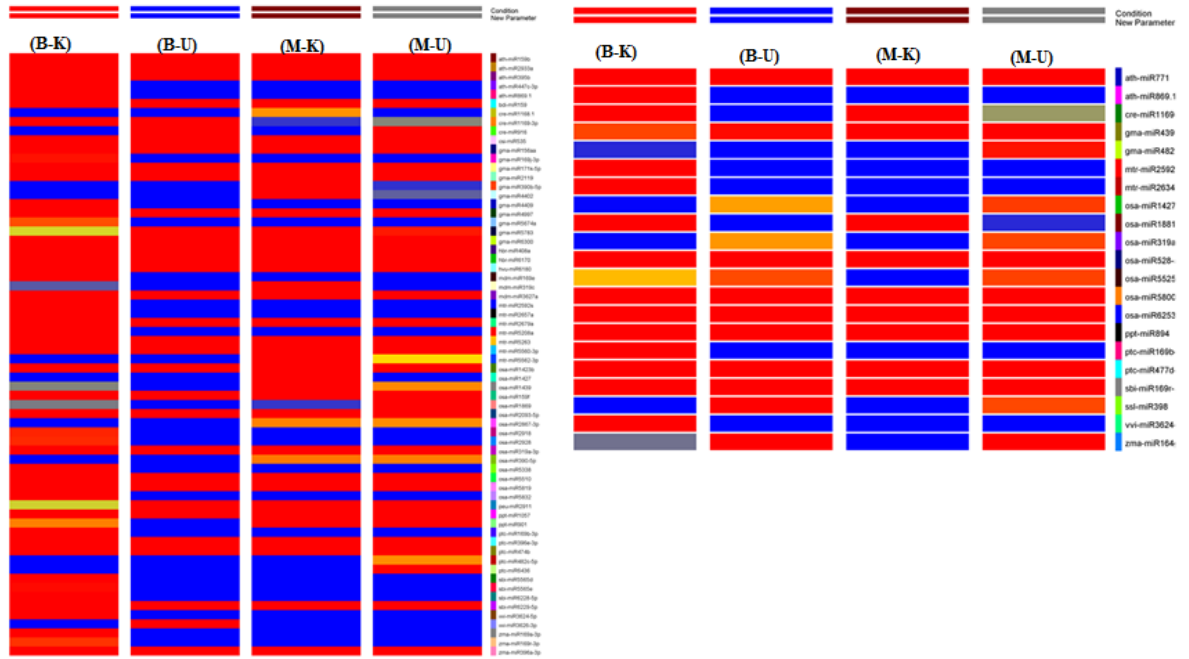
(Khraiwesh ve ark., 2012). Ayrıca ilk deneyde R genotipinde (B-U ve B-K) 19 miRNA ve S genotipinde (M-U ve M-K) 14 miRNA da ifade artması gözlenmiştir.

Çalışmamızın ikinci basamağında buğdayda *B.sorokiniana*'ya duyarlı miRNA'lar tesbit edilmiştir. Tesbit edilen miRNA'lardan 4 tanesi (miR164, miR169, miR319, miR398) korunmuş miRNA ailesindendir (Koptekin ve ark.,2013). *B.sorokiniana* uygulamasına bağlı olarak tesbit edilen 21 miRNA dan 6 tanesi hem R genotipinde (B-U ve B-K kütüphaneler) hemde S genotipinde (M-U ve M-K) ifade seviyesinde artma gözlemlenmiştir (Çizelge 4. 5).

gma-miR482e ait transkriptlerin M-U ve M-K kütüphanesinde ifadesi azalma gösterirken, B-U ve B-K kütüphanesinde ifadesi aşırı miktarda artış göstermiştir. *B.sorokiniana* stresi sonucu 8 miRNA (ath-miR771, ath-miR869.1, mtr-miR2592s, mtr-miR2634, osa-miR6253, ptc-miR169b-3p, ptc-miR477d-3p, vvi-miR3624-5P) sadece B-U ve B-K kütüphanesinde ifade azalması gözlemlenmiştir.

Ayrıca ath-miR771, cre-miR1169-3p, osa-miR1881, ppt-miR894, sbi-miR169r-5p mtr-miR2592s gibi miRNA'lar M-U ve B-U kütüphanelerinde ifade azalması gösterirken M-C ve B-C kütüphanelerinde ifade artışı olmuştur.

Çizelge 4. 5.'de koyu gösterilen ve kat değişim (fold change) oranları fazla olan miR169b-3p, miR901, miR482c-5p, miR159, miR1869, miR319a-3p.2-3p, miR398, miR164g-3p ve miR1169-3p miRNA'lar seçilerek miRNA-microarray verilerini doğrulama amacı ile gerçek zamanlı PCR ile göreceli (relative) ifade seviyesine bakılmıştır.



Şekil 4.7. Biyotik stres faktörleri ile yapılan miRNA-mikroarray ısı (heatmap) grafiği.

F. culmorum patojeni (solda), *B. Sorokiniana* patojeni (sağda). Kırmızı renk ile ifade edilen miRNA'lar ifadesi yüksek olan problemler iken mavi renkteki miRNA'lar ise ifadesi düşük olan problemlerdir.

Biyotik strese bağlı olarak miRNA mikroarray ısı haritasının (heat map) grafiğinde 11.861 miRNA'nın normalize sinyal yoğunlukları temsili gösterilmiştir (Şekil 4. 7). Örneğin *F.culmorum* uygulamasına bağlı olarak Bezostaja-I kontrol uygulamasında miRNA'lar genelde ifade seviyesinde artış (up regüle) olurken uygulamaya bağlı olarak mavi renk kümesinin oluşumu artış göstermektedir buda miRNA'ların ifade seviyesinde azalma (down regüle) olduğunu göstermektedir. Yine ısı haritası (heat map) grafiğinde R ve S buğday genotiplerindeki miRNA'ların artışı veya azalışı hakkında bilgi verirken sarı renkler ise istatistiksel olarak bir önemi yoktur çünkü $P < 0,05$ den büyük olmasından kaynaklanmaktadır. Doğru analiz için kat değişim değeri 1,45 üzerinde ve tekrarlı ölçü değeri olan p'nın 0,05 veya küçük olması gerekmektedir.

4.5.2. Abiyotik Stres Faktörünün Analizi

Abiyotik stres (Tuz) faktörü ile yapılan miRNA-mikroarray çalışmasında buğdayın iki farklı genotipinin kök bölgelerinden elde edilen toplam RNA'lar ile yapılmıştır. Mikroarray'de profilleri değişiklik gösteren birçok miRNA (Çizelge 4. 6) tesbit edilmiştir. İki farklı veri tabanından (miRBase v20 ve PMRD) seçilen 11.861 proplar kullanılarak tuz dirençli (R) Seri-82 ve hassas (S) Bezostaja-I genotiplerinden tuz stresine duyarlı olan miRNA'lar tesbit edilmiştir.

Çizelge 4. 5. Abiyotik stres faktörü kat değişim (fold change) değerleri.

Sistematisik isimler	Bezostaja-I kontrol ve Bezostaja-I uygulama	Bezostaja-I uygulama ve Seri-82 uygulama	Seri-82 kontrol ve Seri-82 uygulama
ath-miR3440b-3p	1.336	1.157	1.509
ath-miR5021	-2.715	-1.032	-3.064
ath-miR5655	-20.536	-1.128	-22.473
bdi-miR319b	1.179	2.026	1.682
cca-miR396c	-1.002	-2.957	16.219
cca-miR6108f	-1.231	-48.712	-58.188
cre-miR1168.2	1.104	-1.867	-1.777
hci-miR156a	1.071	1.596	1.388
hvu-miR5049a	-263.550	-1.058	-2.187
mdm-miR159c	-1.002	-5.434	-5.282
mtr-miR395h	11.617	1.251	1.034

Çizelge 4. 5.(devamı) Abiyotik stres faktörü kat değişim değerleri.

mtr-miR5227	-1.002	-53.626	-52.128
mtr-miR5266	1.061	4.847	6.030
nta-miR156f	1.065	1.307	1.500
osa-miR160f-3p	-1.002	1.005	67.057
osa-miR164d	1.071	1.526	1.181
osa-miR169a	1.081	2.230	1.919
osa-miR172b	2.451	18.911	63.818
osa-miR396a-3p	1.152	-1.933	1.074
osa-miR444b.2	-260.036	1.406	-1.684
osa-miR5076	-1.378	-3.055	-1.200
osa-miR5083	1.556	-1.109	1.491
osa-miR529b	-1.537	-14.110	-21.036
osa-miR5800	-1.409	-1.053	-1.473
pab-miR3710	-1.490	22.916	-2.835
peu-miR2916	1.042	-1.794	-1.282
ppt-miR1074	-285.725	1.060	-2.185
ppt-miR903	21.571	1.552	1.034
ptc-miR156l	-1.368	1.467	-1.092
ptc-miR164f	-1.027	1.466	1.169
rgl-miR164	-2.988	-16.005	-46.391
sbi-miR6222-3p	21.346	1.005	1.034
smo-miR156d	-1.434	1.653	-1.004
tae-miR1134	-2.852	-1.047	-3.605
tae-miR395b	1.778	95.047	1.034
vvi-miR156e	-1.036	1.722	1.354
vvi-miR167c	1.237	1.137	1.645
vvi-miR172a	1.189	2.022	3.079
vvi-miR535a_v14.0	11.845	-19.274	-27.958
zma-miR156k-5p	1.023	1.657	1.468

Çizelge 4. 5.(devamı) Abiyotik stres faktörü kat değişim değerleri.

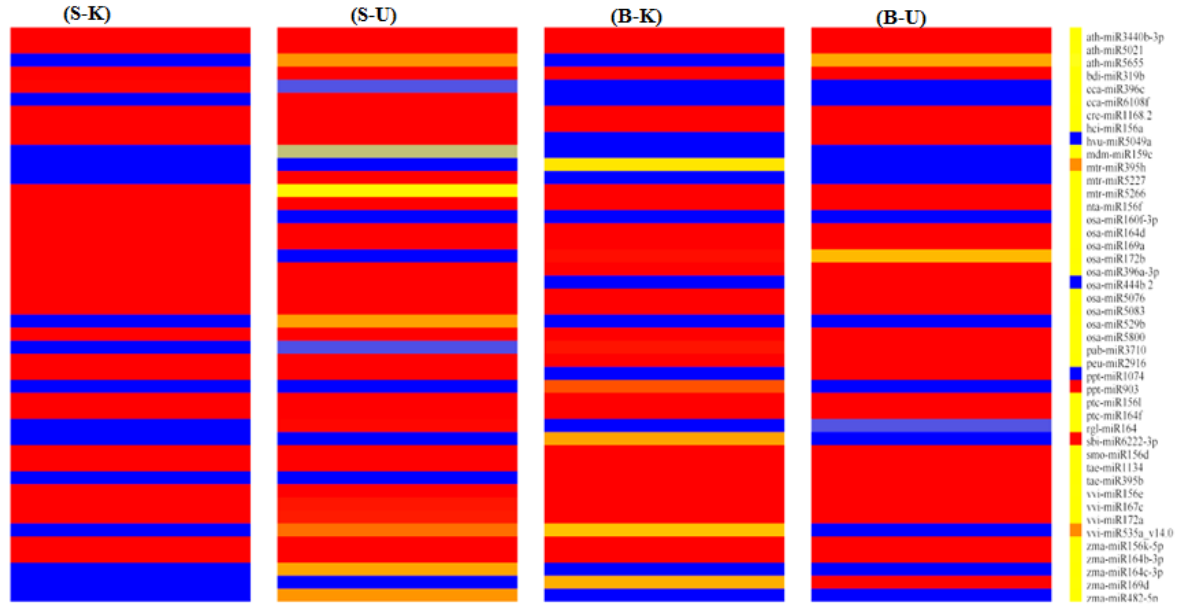
zma-miR164b-3p	-1.559	1.586	1.117
zma-miR164c-3p	-1.002	-21.197	-20.604
zma-miR169d	-2.447	48.872	1.034
zma-miR482-5p	-1.002	-23.140	-22.494

Kısaltılan bitki isimleri: **ath:** *Arabidopsis thaliana*, **ahy:** *Arachis hypogaea*, **aly:** *Arabidopsis lyrata*, **aqc:** *Aquilegia caerulea*, **bdi:** *Brachypodium distachyon*, **far:** *Festuca arundinacea*, **osa:** *Oryza sativa*, **ptc:** *Populus trichocarpa*, **bn:** *Brassica napus*, **cre:** *Chlamydomonas reinhardtii*, **gma:** *Glycine max*, **crt:** *Citrus reticulata*, **ghr:** *Gossypium hirsutum*, **hvu:** *Hordeum vulgare*, **mtr:** *Medicago truncatula*, **smo:** *Selaginella moellendorffii*, **Sof:** *Saccharum officinarum*, **sly:** *Solanum lycopersicum*, **Sbi:** *Sorghum bicolor*, **ppt:** *Physcomitrella patens*, **peu:** *Populus euphratica*, **rco:** *Ricinus communis*, **zma:** *Zea mays*, **pta:** *Pinus taeda*, **Tae:** *Triticum aestivum*, **vvi:** *Vitis vinifera*

Çalışmamızda buğday çeşitlerinden Bezostaja-I ve Seri-82'ye tuz stresi uygulamasına bağlı olarak miRNA mikroarray çalışması sonucu fold change (kat değişim) değerleri 1.45'e eşit ve üzerinde sinyal veren problemler kullanılarak 44 miRNA tesbit edilmiştir (Çizelge 4. 5).

R genotipindeki S-U ve S-C kütüphanesinde 21 miRNA ile S genotipindeki B-U ve B-K kütüphanesinde 20 miRNA ifadesinde artış olmuştur. Tesbit edilen miRNA'lerden dokuz tanesi (pab-miR3710, peu-miR2916, ppt-miR1074, ptc-miR156l, ptc-miR164f, smo-miR156d, vvi-miR156e, zma-miR164b-3p, zma-miR169d) hassas (S) B-K ve B-U kütüphanesinde ifadesinde azalma olurken dayanıklı (R) S-K ve S-U kütüphanesinde ifadesinde artış olmuştur. miR482-5p ise hem R genotipinde hem S genotipindeki kütüphanelerde ifade azalışı gözlemlenmiştir.

Dört kütüphanede tesbit edilen bu miRNA'lerden (koyu renkle belirtilenler) bazıları (miR5655, miR6108f, miR159c, miR164, miR482 miR156a ve miR172b) seçilerek, miRNA-mikroarray verilerini doğrulama amacı ile gerçek zamanlı PCR ile göreceli ifade seviyesine bakılmıştır.



Şekil 4. 8. Abiyotik stres faktörleri ile yapılan miRNA-mikroarray ısı (heat map) grafiği.

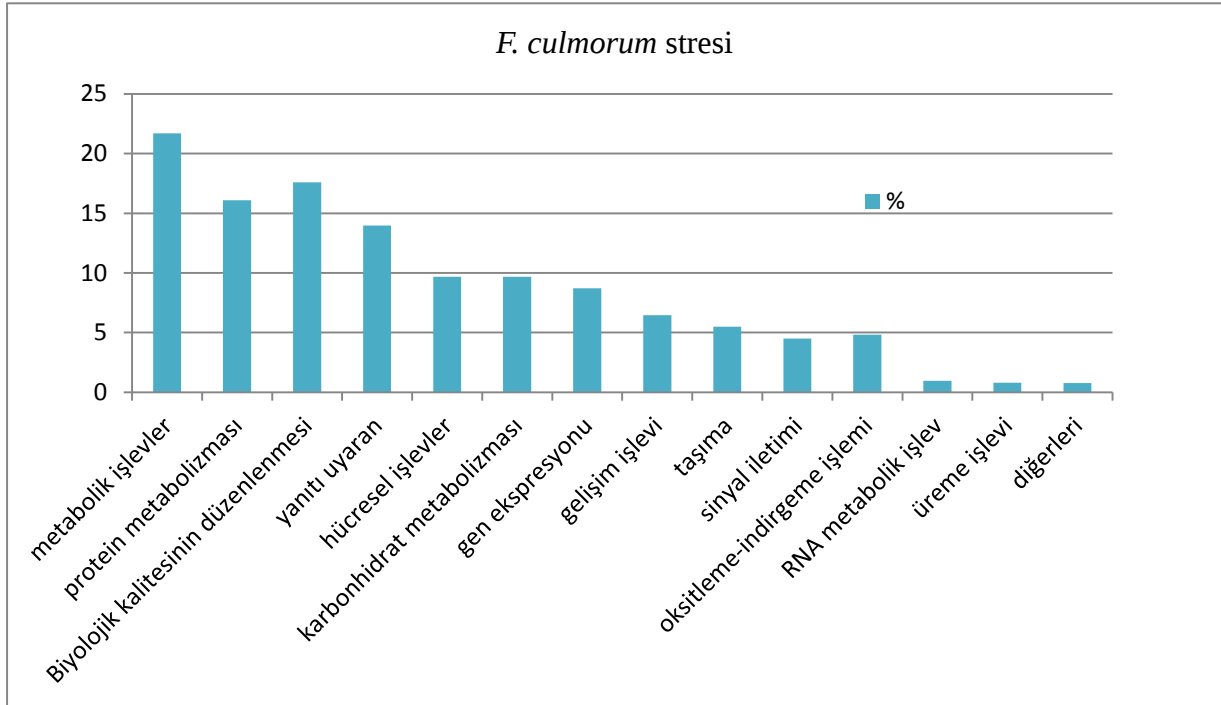
(S-K: Seri-82 kontrol, S-U: Seri-82 uygulama, B-K: Bezostaja-I kontrol, B-U: Bezostaja-I uygulama)

miRNA-mikroarray ısı grafiğinde (heat map) (Şekil 4. b) görüldüğü gibi tuz uygulamasına bağlı olarak dayanıklı (R) genotip olan Seri-82’de miRNA’ların genelde ifade seviyesinde artış görülürken hassas (S) genotip olan Bezostaja-I da ise uygulamaya bağlı olarak miRNA’ların ifade seviyesinde azalma görülmektedir.

4.6.Biyotik stres altındaki R ve S genotipinde tesbit edilen miRNA’larının Hedef Gen Analizi

Buğdaya ait R ve S genotiplerinde miRNA’lar, miRNA-mikroarray ile tesbit edilmiştir. Tesbit edilen bazı miRNA’lar ve yeni miRNA’ların biyoinformatik olarak hedefledikleri genler / proteinlerin aksesyon numaraları ve adları EK 1 ve EK.2.’de verilmiştir. Hedef gen bulunurken psRNATarget ([http:// bioinfo 3. noble. Org / psRNATarget/](http://bioinfo3.noble.org/psRNATarget/)) adlı veritabanı kullanılmıştır. Buğday EST’si taranarak bu verilere ulaşılmıştır. Ayrıca tesbit edilen miRNA’ların gen ontolojisi(EK 1) ve genel işlevleri (general process) EK. 4.’de verilmiştir.

F. culmorum uygulaması sonucu R ve S genotiplerinde, 60 miRNA tarafından 546 hedef gen tesbit edilmiştir. Bu hedef genlerin fonksiyonel profilini tesbit etmek için Blast2GO yazılımı kullanılarak Gen Ontoloji (GO) analizi yapılmıştır. S ve R genotiplerinde 546 duyarlı genin yanıt verme mekanizmasında işlevlerinin olduğu tesbit edilmiştir. Bunlar, hücresel işlev, protein metabolizması, taşıma, karbonhidrat metabolizması biyolojik kalite düzenlenmesi, gen ifadesi, gelişim işlevi, sinyal iletimi, RNA metabolik işlev, üreme işlevi ve diğer kategorilerde farklı olarak (Şekil 4. 9) düzenlendiği tesbit edilmiştir.



Şekil 4. 9. *F. culmorum* uygulamasında tesbit edilen miRNA'ların biyolojik fonksiyonları

B. sorokiniana uygulaması sonucu R ve S genotiplerinde, 155 hedef gen toplamda 17 miRNA tarafından düzenlenmiştir. ssl-miR398 molekülünün bu süreçte 101 transkript hedeflediği görülmüştür.

Hedef geni tesbit edilen 17 miRNA'dan ath-miR869.1 hariç diğer onaltısı en az bir transkript hedef almıştır. Hedef genlerin çeşitli fonksiyonları bulunmuş ve bunlar metabolik işlevler, uyarılara yanıt, protein metabolizması, taşıma, karbonhidrat

metabolizması, peroksidaz reaksiyonları, gen ifadesi, gelişim işlevi, sinyal iletimi, RNA metabolik işlev, üreme işlevi ve oksidasyon işlemi gibi kategorilerin bulunma oranları Şekil 4. 10 da verilmiştir. Ayrıca *B.sorokiniana* uygulaması sonucu tesbit edilen miRNA'ların gen ontolojisi (gene ontology) (EK. 2.) ve genel işlevleri (general process) EK .4.'de verilmiştir.

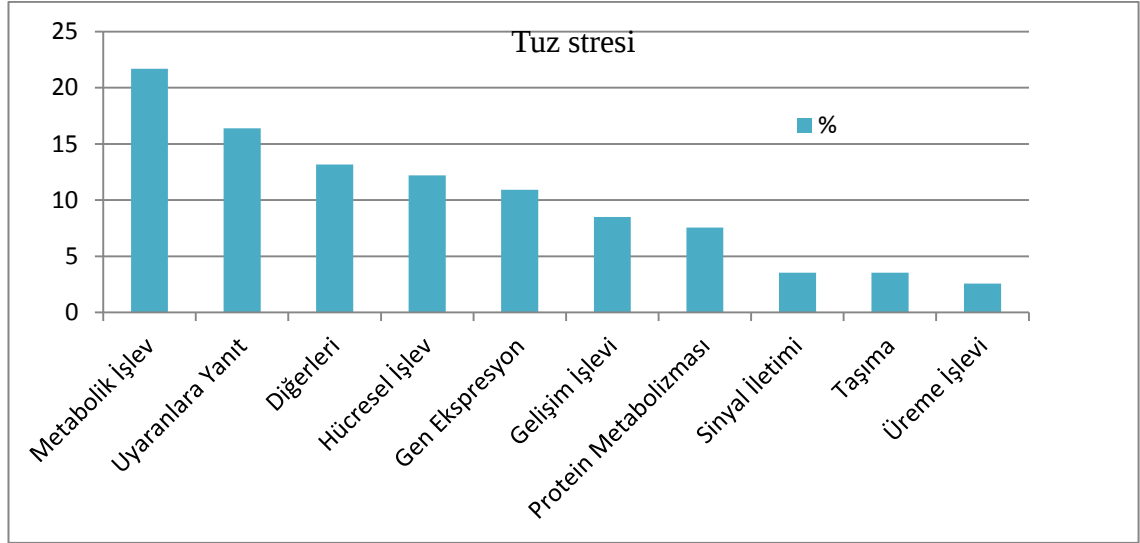


Şekil 4. 10. *B. sorokiniana* uygulamasında tesbit edilen miRNA'ların biyolojik fonksiyonları

4.7. Abiyotik stres altındaki R ve S genotipinde tesbit edilen miRNA'larının Hedef Gen Analizi

Tuz uygulamasına bağlı olarak tesbit edilen miRNA'ların miRU 'ya yüklenen sekansları nerede ise mükemmel bir şekilde hedef miRNA'lara bağlanmışlardır. Bu miRNA'ların olgun dizileri [http:// plantgrn. noble. Org / psRNATarget/](http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/) web sunucusuna yüklenerek ve 565 potansiyel genleri hedeflediği görülmüştür. Bu genlerin açıklama Blast2GO paketi ile yapılmıştır. Sonuç olarak buğdayın R ve S genotiplerine tuz uygulanması sonucu, 44 miRNA tarafından 565

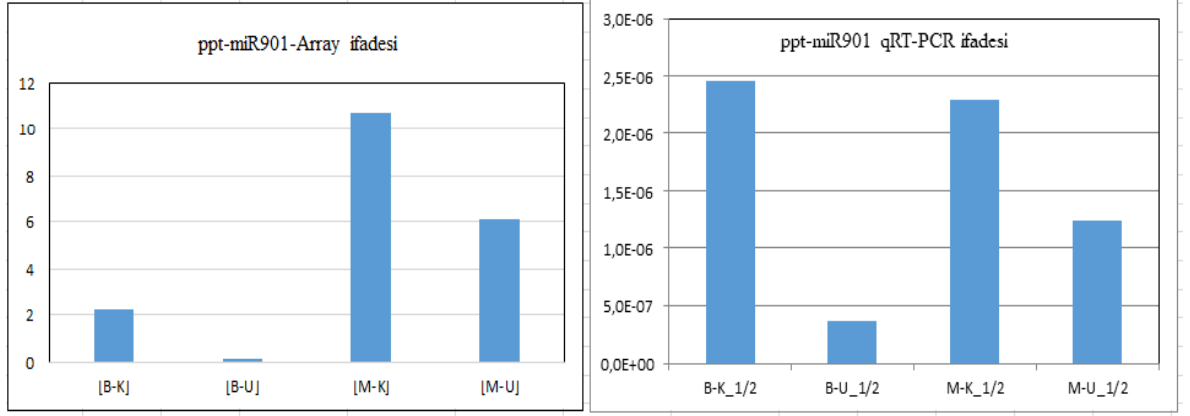
hedef gen tesbit edilmiştir. Hedef genlerin metabolik süreci 10 farklı ana başlıkta toplanmıştır. Metabolik işlev, uyarılara yanıt, hücrel işlev, gen ifadesi, gelişim işlevi, protein metabolizması, sinyal iletimi, taşıma, üreme işlevi ve diğerleri kategorilerin bulunma oranları % olarak Şekil 4.12’de verilmiştir. Ayrıca Tuz uygulaması sonucu tesbit edilen miRNA’ların gen ontolojisi (gene ontology) EK. 3. ve genel işlevleri (general process) EK. 4.’de verilmiştir.



Şekil 4. 11. Tuz uygulamasında tesbit edilen miRNA’ların biyolojik fonksiyonları

4.8. Biyotik stres uygulaması ile tesbit edilen bazı miRNA’ların qRT-PCR ve mikroarray ekspresyon analizleri

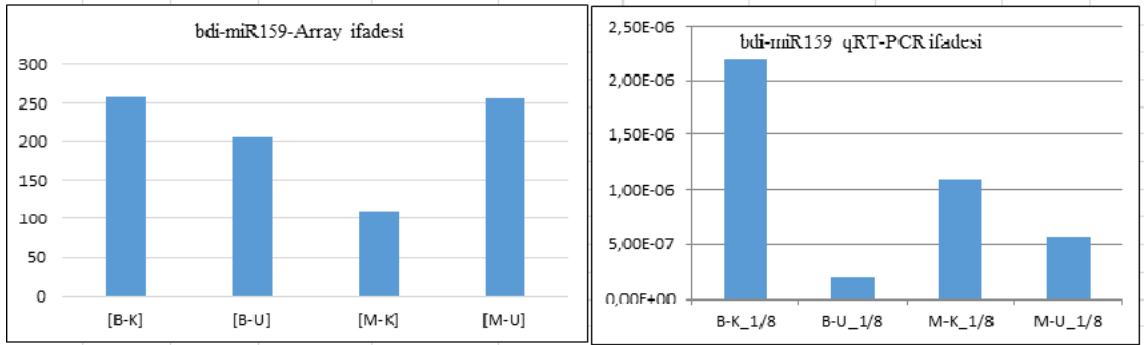
Çalışmada miRNA qRT-PCR ifade analizlerinde RNA’ları seyreltme faktörü 1/2, 1/4 ve 1/8 olarak belirlenmiştir. Mikro-array ifade analizine bağlı olarak uygun seyreltme faktörü kullanılmıştır. Uygulama sonucu tesbit edilen bazı miRNA’ların ifadeleri qRT-PCR anlyzi ile doğrulanması yapılarak, miRNA’ların array ve qRT-PCR sonuçları verilmiştir. qRT-PCR ifade seviyeleri çok düşük olması sebebi ile ifade seviyeleri 10^8 ile çarpılarak karşılaştırılabilir duruma getirilmiştir.



Şekil 4.12. ppt-miR901'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği

(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

ppt-miR901; Array ifade grafiğine göre *F. culmorum* uygulamasına bağlı olarak B-U ile B-C ve M-K ile M-C kütüphanelerinde ifade seviyeleri düşmüştür (Şekil 4.12). Uygulamaya bağlı olarak her iki R ve S genotiplerinde qRT-PCR ve mikroarray sonuçlarında ifade seviyeleri düşüş göstermiştir. Sonuç olarak ppt-miR901 array ve qRT-PCR karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri uyum içindedir. Patojen uygulamasında ppt-miR901 ifade azalması dayanıklılık yolunda görev alan miRNA'laradan biri olduğu öngörülebilir.

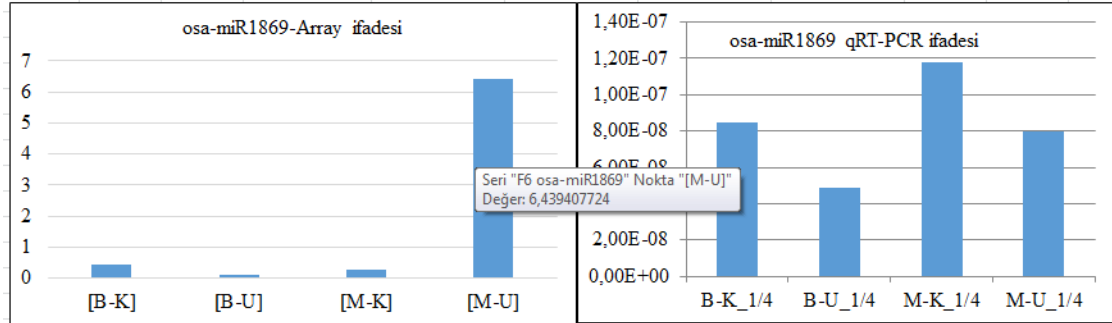


Şekil 4.13. bdi-miR159'un mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği

(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

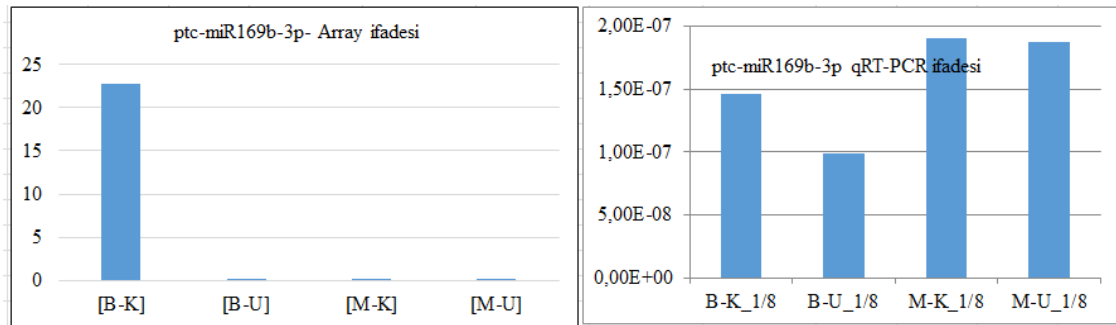
bdi-miR159; Array ifade değerine göre R genotipinde *F. culmorum* uygulamasına bağlı olarak ifade azalırken S genotipinde ifade artışı görülmektedir. qRT-PCR sonuçlarına bakıldığında R ve S genotiplerinde de ifade azalışı gözlemlenmiştir (Şekil

4. 13). Array ve qRT-PCR ifadesinde S genotipi açısındaki farklılık görülmektedir. Bu qRT-PCR ekspresyonda farklı sinyallerin okunmasından kaynaklanabilir (Eldem ve ark.,2013).



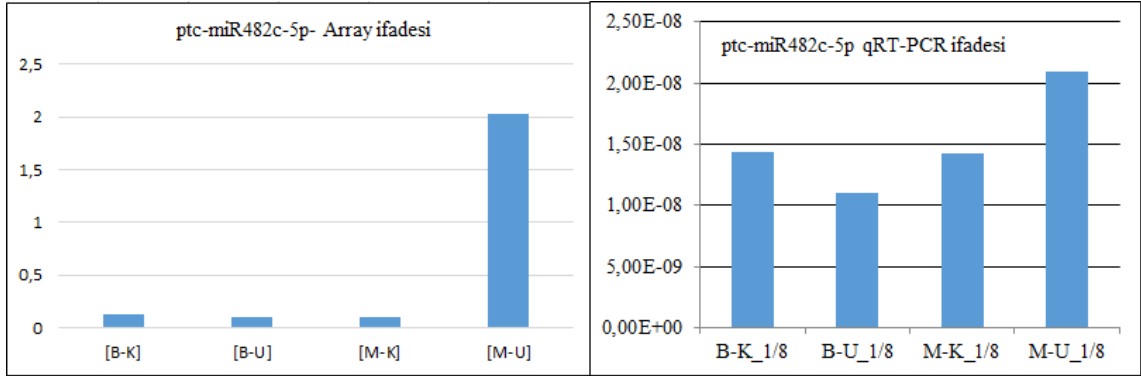
Şekil 4. 14. osa-miR1869'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği
(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

osa-miR1869; Mikroarrayde yoğun olarak görülmüştür. Array ifade değerine göre R genotipi *F. culmorum* uygulamasına bağlı ifade seviyesi azalırken S genotipinde patojen uygulaması sonucu array ifade seviyesinde artış göstermiştir (Şekil 4. 14). qRT-PCR ekspresyon ifadesinde ise yine R genotipinde uygulamaya bağlı ifade azalırken S genotipinde da mikroarray ekspresyonun aksine qRT-PCR ekspresyon ifadesinde artış tesbit edilmiştir. Bu farklılık ise çapraz hibridizasyona uğrayan proablardan kaynaklanıyor olabilir (Xin ve ark., 2012).



Şekil 4. 15. ptc-miR169b-3p'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği
(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

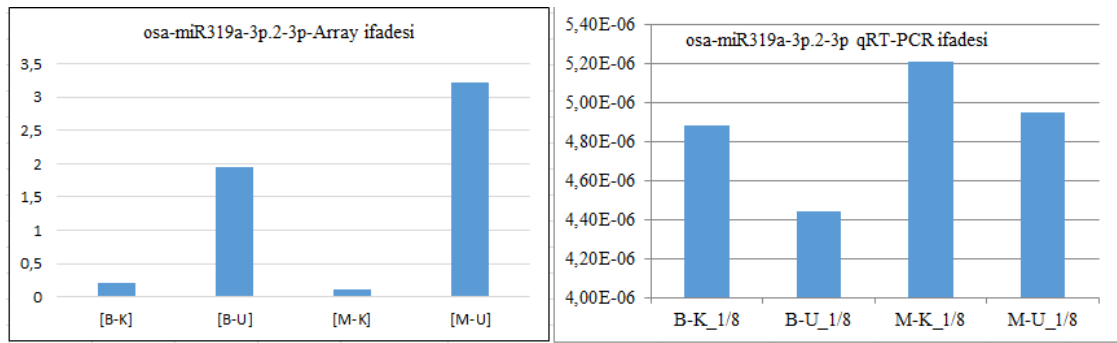
ptc-miR169b-3p; *F. culmorum* R ve S genotiplerine uygulamasına bağlı olarak hem array ekspresyonunda hem de qRT-PCR ekspresyon ifadesi azalmıştır. miR169b-3p array ve qRT-PCR ekspresyonunda uygun bir korelasyon görülmektedir. İfade azalışı R genotipte daha fazladır (Şekil 4.15). soya fasülyesi (*Glycine max* Merr.) köklerine *Bradyrhizobium japonicum* enfeksiyonu sonucu miR169'un köklerde ifadesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (Khraiwesh ve ark., 2012).



Şekil 4. 16. ptc-miR482c-5p'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği

(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

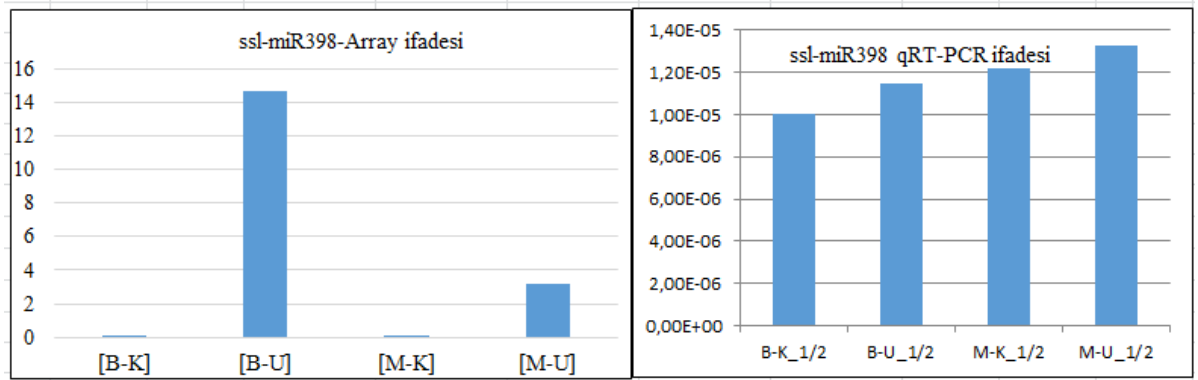
ptc-miR482c-5p; *F. culmorum* uygulamasına bağlı olarak mikroarrayde “kat değişim” değeri çeşitler arasında farklı seviyede ifade olan bu miRNA'nın array ekspresyon grafiğine göre B-K ve B-U kütüphanesinde ifadesi azalmış M-K ve M-U kütüphanesinde ifadesi artmıştır (Şekil 4.16). Gupta ve ark. (2010) yaptıkları derlemelerinde miR482 *Pseudomonas syringe* (DC3000)'le enfekte edilen domatestede baskılandığını tesbit etmişlerdir. Uygulamaya bağlı olarak qRT-PCR ekspresyon ifadesi array ekspresyonu arasında uygun korelasyon göstermektedir.



Şekil 4. 17. cre-miR319a-3p.2-3p'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği

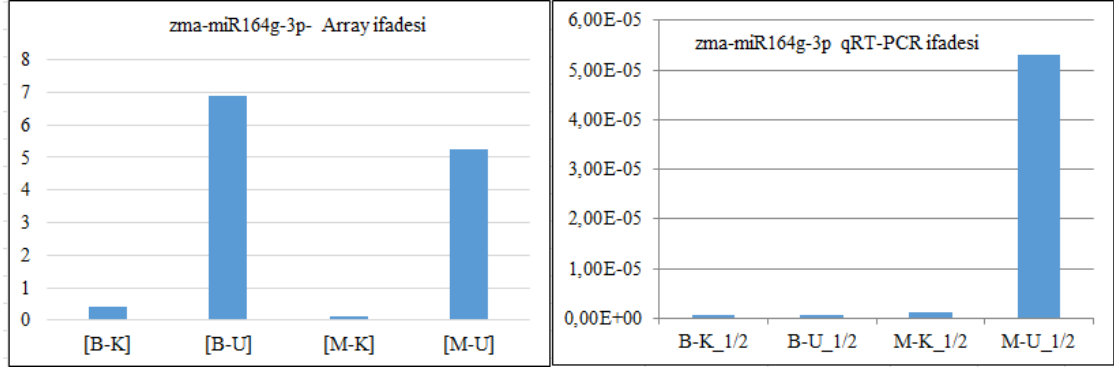
(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

cre-miR319a-3p.2-3p; *B. sorokiniana* uygulamasına bağılı olarak array ve qRT-PCR ekspresyon sonuçları uygun bir korelasyon göstermektedir. Uygulamaya bağılı olarak cre-miR319a-3p.2-3p'nin hem R genotipinde hem S genotipinde array ve qRT-PCR ekspresyon ifadelerinde artış gözlenmiştir (Şekil 4. 17) miR319, *Arabidopsis* de miRJAW bitkiye spesifik transkripsiyon faktörleri olup tcp genleri ile yaprak gelişimini düzenler (Palatnik ve ark., 2003; Schommer ve ark., 2008).



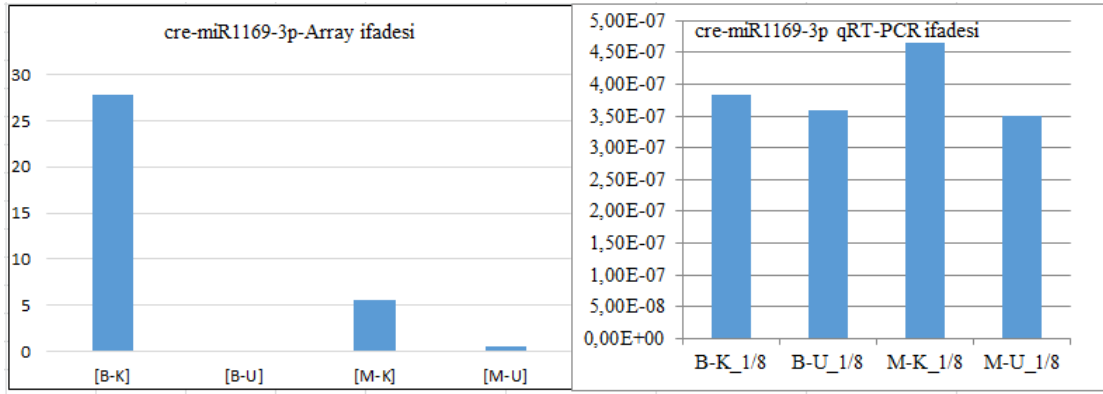
Şekil 4.18. ssl-miR398'in mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiğı
(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

ssl-miR398; *B. sorokiniana* uygulamasına bağılı olarak array ve qRT-PCR ifadeleri arasında uygun bir korelasyon görölmektedir. Uygulamaya bağılı olarak her iki kütüphanede de mikroarray ve qRT-PCR ekspresyon seviyeleri artış göstermektedir (Şekil 4. 18) Moleküler oksijen ve hidrojen peroksit süperoksit bitkilerde süperoksit dismutas (SOD) tarafından dönüştürölür. *Arabidopsis*'de Cu-Zn SOD'ları, CSD1, CSD2 ve CSD3 tarafından kodlanır. Çalışmalarda miR398 oksidatif stres altında ifade azalışının olduğı keşfedilmiştir (Khraiwesh ve ark., 2012).



Şekil 4. 19. zma-miR164g-3p'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafikleri (B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

zma-miR164g-3p; *B. sorokiniana* uygulamasına bağlı olarak R ve S genotiplerinde array ifadesinde ekspresyon artış tesbit edilmiştir. qRT-PCR ise uygulamaya bağlı olarak S genotipinde ekspresyon artış olurken R genotipinde ekspresyon seviyesinde artış daha az görülmektedir (Şekil 4. 19). Gen ekspresyonunda işlevi olan miR164 buğdayda powdery mildew (külleleme) enfeksiyonu sonucu ifade olduğu olduğu rapor edilmiştir (Xin ve ark., 2010). Zma-miR164g-3p biyotik stres yanıt mekanizmasında görev alan miRNA'lardan biri olduğu öngörülmüştür.

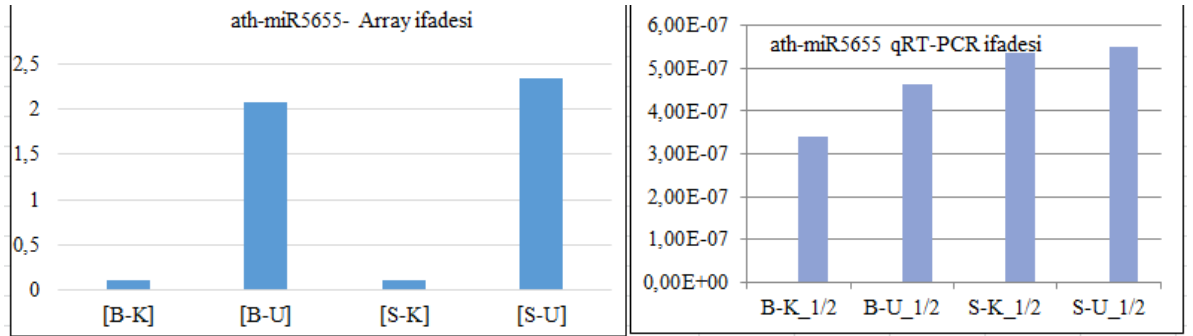


Şekil 4. 20. cre-miR1169-3p'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği (B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

Cre-miR1169-3p; *B. sorokiniana* uygulamasına bağlı olarak array ve qRT-PCR ekspresyonuna göre R genotipini içeren B-K ve B-U kütüphanesi ile S genotipini içeren M-K ve M-U kütüphanesinde ifade seviyeleri düşmüştür (Şekil 4. 20). Analizlerde array ve qRT-PCR ekspresyon sonuçlarında ifade uyumluluğu görülmektedir.

4.9. Abiyotik stres uygulamasında tesbit edilen bazı miRNA'ların qRT-PCR ve mikroarray ekspresyon analizleri

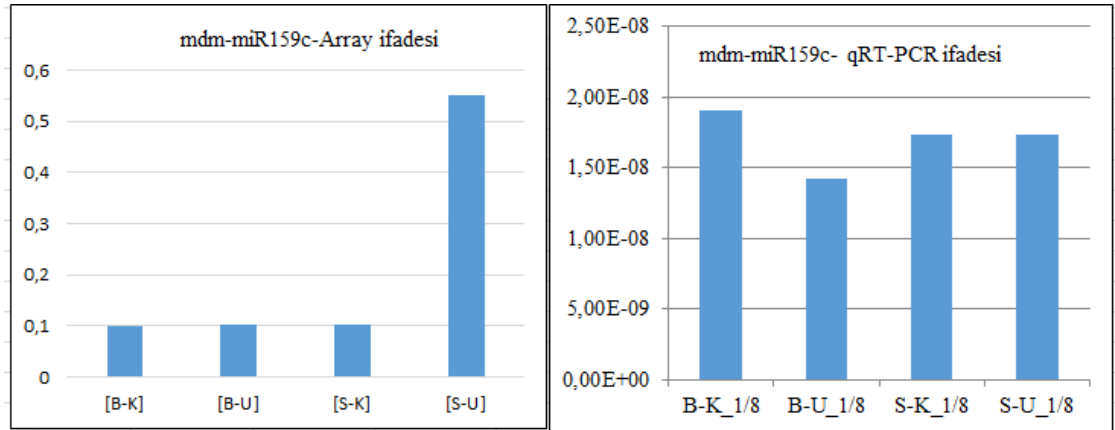
Bölüm 3.3.'deki biyotik stres uygulama analizinde ifade edildiği gibi uygun sulandırma faktörü seçilerek miRNA'ların array ve qRT-PCR sonuçlarındaki ifade (ekspresyon) seviyeleri ölçülmüştür. Tuz uygulamasında S-K ve S-U kütüphanesi R genotipinde, B-K ve B-U kütüphanesi ise S genotipindedir.



Şekil 4. 21. ath-miR5655'in mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği

(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

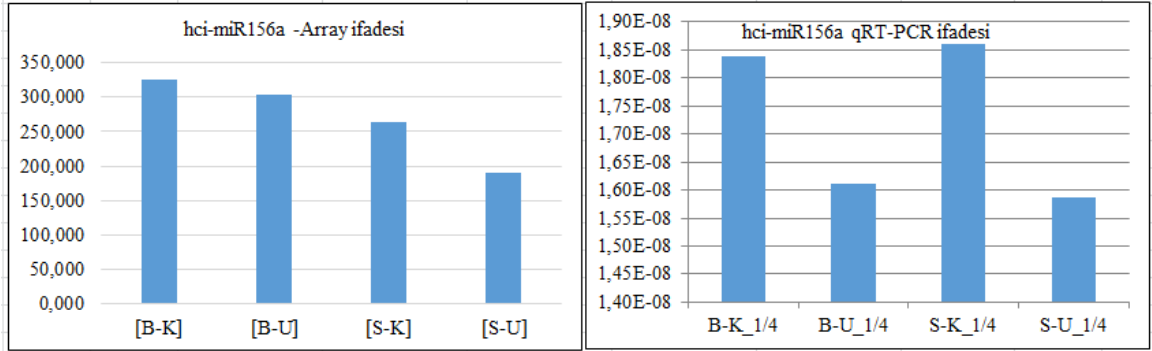
ath-miR5655 mikroarray ve qRT-PCR ifade seviyelerinde tuz uygulamsına bağlı olarak ifade artışı gözlemlenmiştir. mikroarray ve qRT-PCR ekspresyonlarının ifadeleri birbirini desteklemektedir (Şekil 4. 22). Uygulamaya bağlı olarak ath-miR5655 her iki kütüphanede array ve qRT-PCR analizlerine göre ifade artışı olmuştur (Şekil 4.21).



Şekil 4. 22. mdm-miR159c'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği

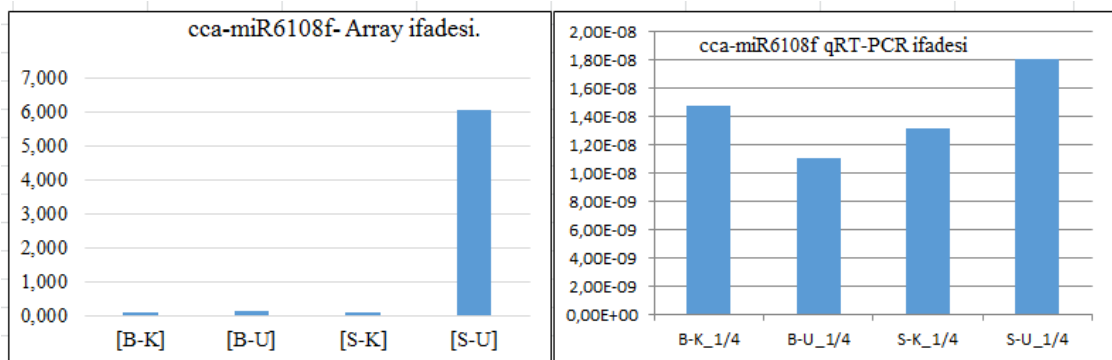
(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

mdm-miR159c; Array ekspresyonunda tuz uygulamasına bağlı olarak S genotipinde ifade seviyesi azalırken R genotipinde de ifade seviyesi artış göstermiştir. qRT-PCR ekspresyon ise her iki genotip (S ve R) için bu ifadeyi doğrular niteliktedir (Şekil4. 22)



Şekil 4. 23. hci-miR156a'nın mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği
(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

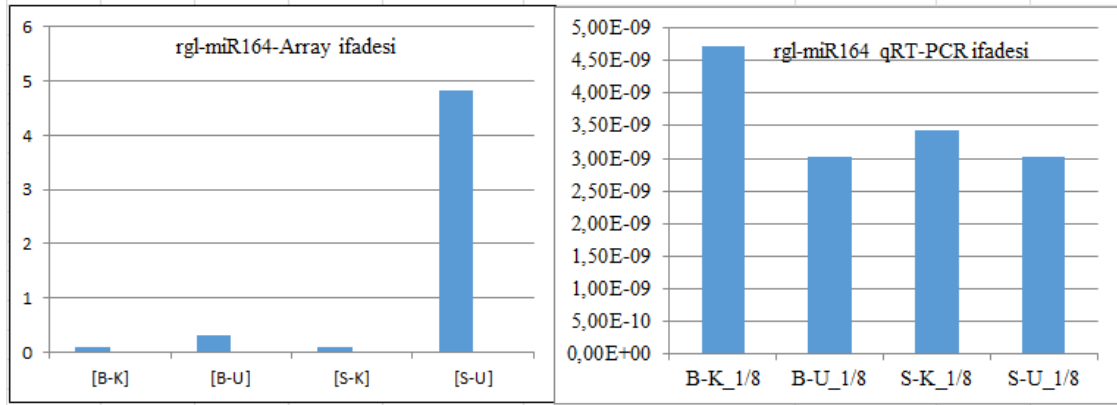
hci-miR156a; Tuz stres uygulamasına bağlı olarak array ve qRT-PCR ifade seviyelerinde azalma görülmektedir. hci-miR156a'nın array ve qRT-PCR ifadeleri uyum içerisinde olup uygulamaya bağlı olarak B-U ve B-K ile S-U ve S-K kütüphanelerinde hci-miR156a'nın ifade azalışı olmuştur (Şekil 4. 23). Mısır köklerine tuz uygulanması sonucu köklerde miR156'nın ifade azalışı olduğu rapor edilmiştir (Khraiwesh ve ark., 2012)



Şekil 4. 24. cca-miR6108f 'in mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği
(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

cca-miR6108f; Tuz stresi uygulamasına bağlı olarak array ifadesinde S genotipinde ve R genotipinde ifade artışı olmuştur. Fakat qRT-PCR ekspresyonu S

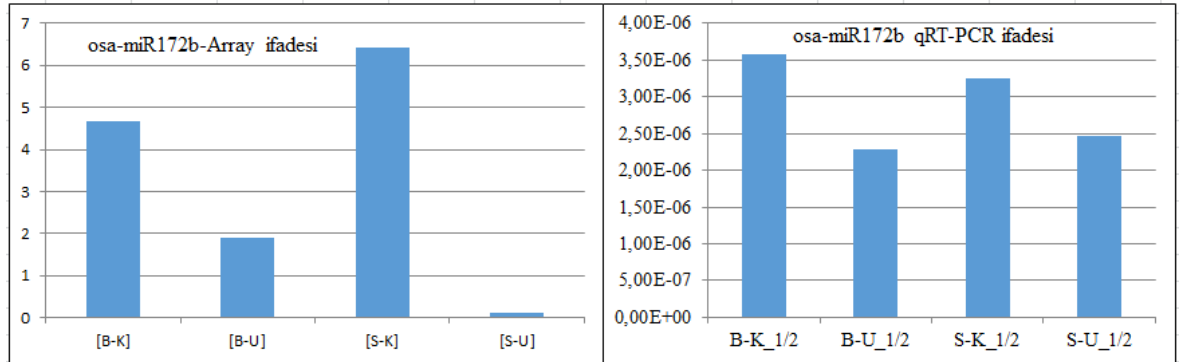
genotipinin ifade azalışı olurken R genotipinde ifade artışı olmuştur S-K ve S-U kütüphanesinde array ile qRT-PCR ekspresyonları uyushmaktadır (Şekil 4. 24)



Şekil 4. 25. rgl-miR164'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiğı

(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

rgl-miR164; Tuz stresi sonucu hem B-K ve B-U hemde S-K ve S-U kütüphanesinde ifade artışı olmuştur. B-K ve B-U ile S-K ve S-U kütüphanelerinin array ve qRT-PCR ekspresyon ifadeleri uygun korelasyon göstermektedir (Şekil 4.25).

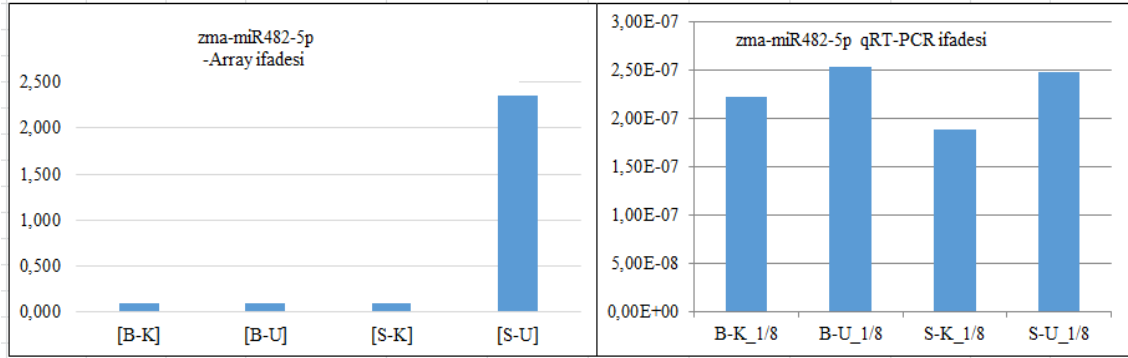


Şekil 4. 26. osa-miR172b'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiğı

(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

osa-miR172b; Tuz uygulamasına bağılı olarak B-K ve B-U ile S-K ve S-U kütüphanelerinde array ve qRT-PCR sonuçları birbiri ile uyumluluk göstermektedir (Şekil4. 26). R ve S genotiplerinde uygulamaya bağılı olarak osa-miR172b ifade seviyesi azalmaktadır. miR172 buğdayda belirli bir işlevi görmekte ve sükkın-CoA

ligaz ile bir hedef etkileşim vardır. Bitkiler âleminde, miR172 EAT (TEP) transkripsiyon faktörlerini hedeflemektedir (Yin ve shen, 2010).



Şekil 4. 27. zma-miR482'nin mikroarray ve qRT-PCR ifade grafiği
(B-K; Besostaja kontrol. B-U; Bezostja uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

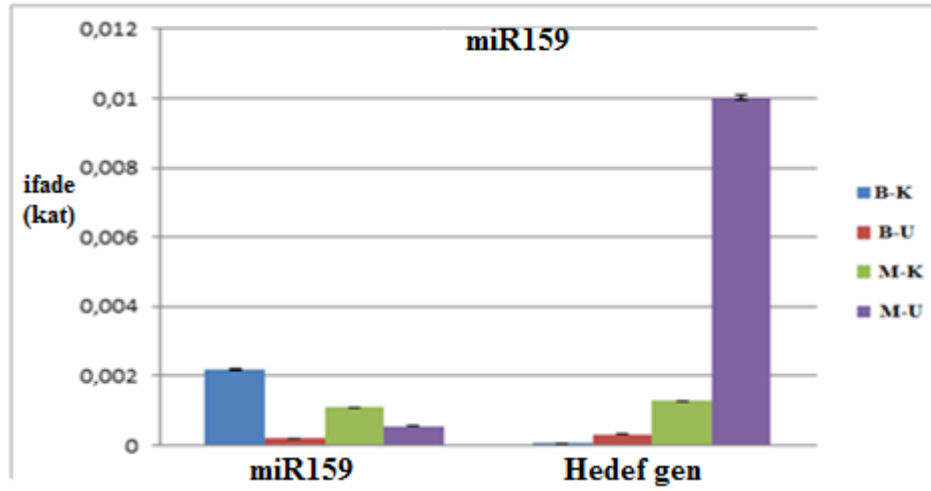
zma-miR482; Tuz uygulamasına bağlı olarak array ve qRT-PCR ifadeleri uyumluluk içinde olup ifade seviyeleri artış göstermektedir (Şekil4. 27). B-K ve B-U ile S-K ve S-U kütüphanelerinde up regüle olmuştur. Buğdaya *F. culmorum* uygulaması sonucu miR482 ailesinin üyesi ifade olmuştur. *F. culmorum* R genotipli buğday ile tuza R genotipli buğdayda miR482 ailesinin ifade artışı olmuştur. Yine yapılan çalışmada *P. trichocarpa*'nın tuz stresine maruz bırakılması sonucu köklerde miR482'nin ifade artışının olduğu görülmüştür (Khraiwesh ve ark., 2012).

4.10. *F.culmorum* uygulamasındaki miRNA ve Hedef gen analiz sonuçları

Buğdaya *F. culmorum* uygulamasına bağlı olarak arrayde önemli derecede ifade edilen miR159, miR901, miR1869, miR169b-3p ve miR482c-3p korunmuş miRNA'larına özgün ileri (Forwed)-RT ve bu miRNA'ların hedef genlerine özgün ileri (Forwed)- geri (Reverse) primerleri tasarlanarak qRT-PCR ile ifade düzeyleri ölçülmüştür. miRNA ve hedef gen arasındaki orantı deneysel olarak gösterilmiştir. Hedef genlerin qRT-PCR analizlerinde, 18S rRNA geni referans alınarak buğday cDNA'ları eşit yoğunlukta reaksiyona başlatılmıştır. Hedef gen analizi yapılan miRNA'ların transkripsiyon faktörünü belirlemek için buğday EST'lerinde blast yapılarak karışıklık gelen tahmini transkripsiyon faktörü verilmiştir. Hedef gen analizlerinde orantısal artış olmuştur.

4.10.1. miR159 ve tar159

bdi-miR159'un Squamosa promotor bağlayıcı protein (SPL) genlerini hedeflediği belirlenmiştir (Yanik ve ark., 2013) Ayrıca bdi-miR159 ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 5.12'de verilmiş olup bdi-miR159 ile hedef gen arasında uyumluluk vardır. R ve S genotiplerin her ikisinde de bdi-miR159 azalırken hedef gen artış göstermiştir. M-K ve M-U kütüphansindeki M-U da hedef gen aşırı ifade olunmuştur (Şekil 4. 28).

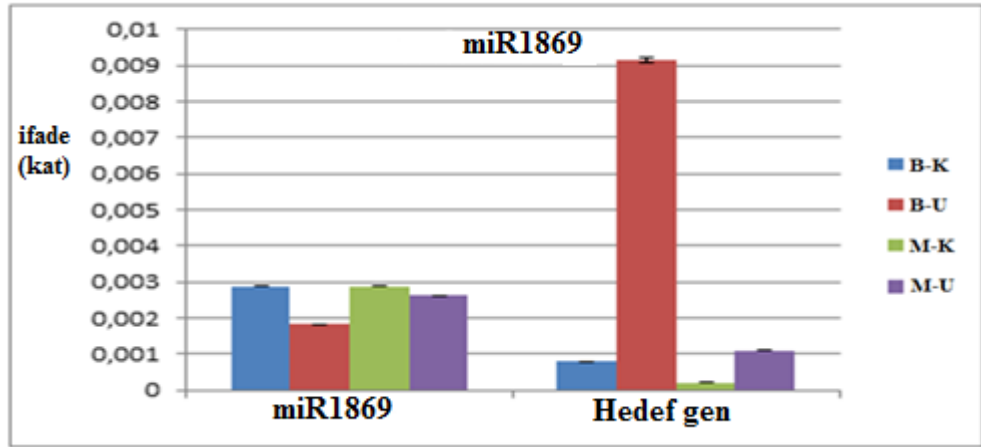


Şekil 4. 28. miR159 ve tar159'ın ifade analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

4.10.2. miR1869 ve tar1869

miR1869 biyoenformatik olarak copine aile isoform 1 (CK162380) genini hedeflediği bulunmuştur (EK 1). Metabolik işlevi olan miR1869'un B-U ve B-K ile M-U ve M-K kütüphanelerinde qRT-PCR analizine göre ifade azalışı gösterirken hedef gen uyumlu bir şekilde artış göstermiştir. R genotipindeki B-U kütüphanesinde ise hedef gen artışı daha fazladır (Şekil 4. 29).

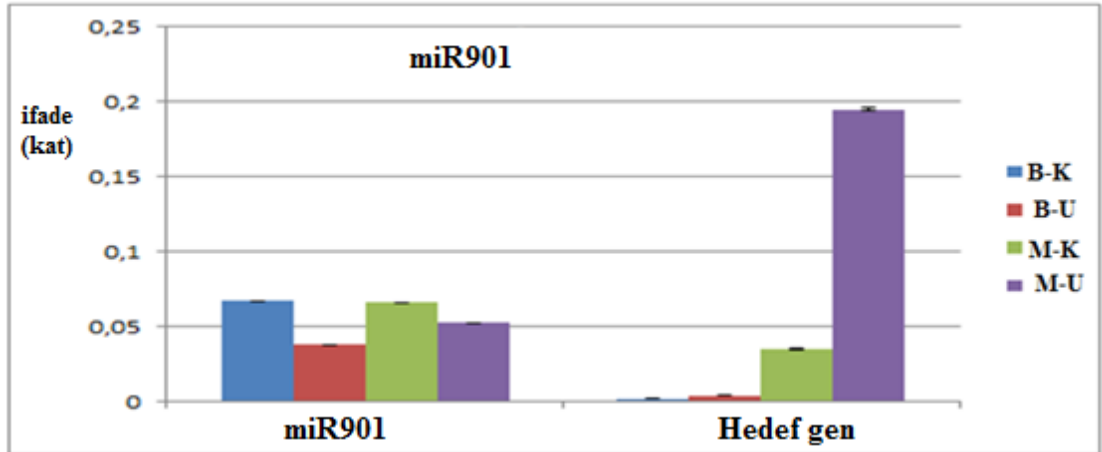


Şekil 4. 29. miR1869 ve tar1869'un miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezostaja-I uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

4.10.3. miR901 ve tar901

miR901'in biyoenformatik olarak sukroz sentezi tip I (sucrose synthase type I) (CA623473) genini hedeflediği tesbit edilmiştir (EK 1). B-K ve BU ile M-K ve M-U kütüphanelerinde ifade olan miR901 hedef gen M-U kütüphanesinde artış olmuştur (Şekil 4.30). miR901 ile hedef gen arasında uyumluluk Şekil 4.30'da görülmektedir.

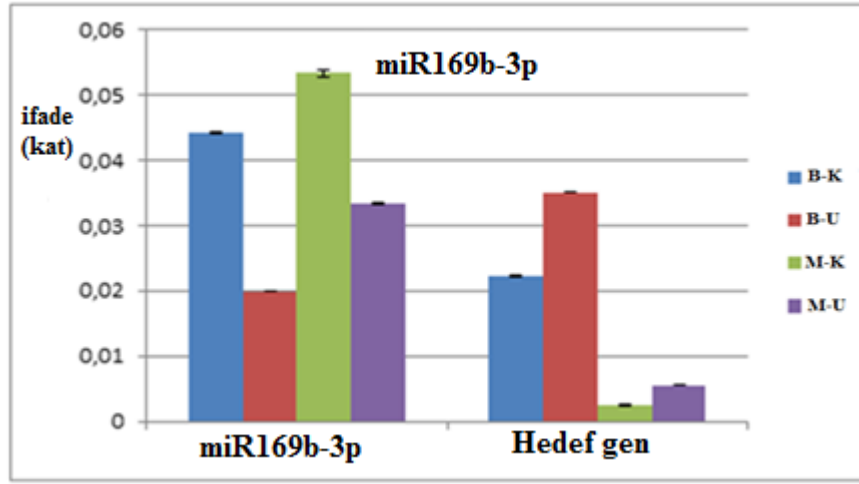


Şekil 4. 30. miR901 ve tar901'in miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezostaja-I uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

4.10.4. miR169b-3p ve tar169b-3p

ptc-miR169b-3p *T. aestivum*'da e3 ubiquitin-protein ligaz (ligase) keğ (TC437786) biyoenformatik olarak hedeflediği tesbit edilmiştir (EK 1). ptc-miR169b-3p B-K ve B-U ile M-K ve M-U kütüphanelerinde yoğun olarak rastlanmaktadır. ptc-miR169b-3p'nin hedeflediği genle uyumu Şekil 4.31 de gösterilmiştir. Dayanıklı ve hassas çeşitte hedef gen ifadesi artış göstermiştir.

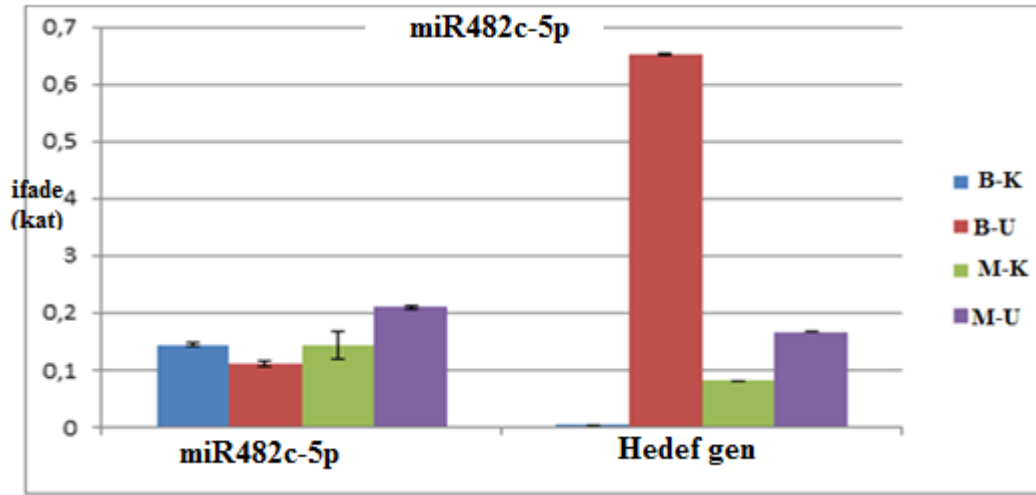


Şekil 4. 31. miR169b-3p ve tar169b-3p'nin miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

4.10.5. miR482c-5p ve tar482c-5p

miR482c-5p biyoenformatik olarak origin recognition complex subunit 4-like (TC458339) geni hedeflediği bulunmuştur (EK1). miR482c-5p qRT-PCR ekspresyonda B-K, B-U ile M-U ve M-K kütüphanelerinde rastlanmıştır. R genotipinde uygulamaya bağlı olarak hedef gen aşırı up regüle olmuştur. miR482c-5p ve hedeflediği gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 4. 32'de verilmiştir.



Şekil 4. 32. miR482c-5p ve tar482c-5p'nın miktar analizi

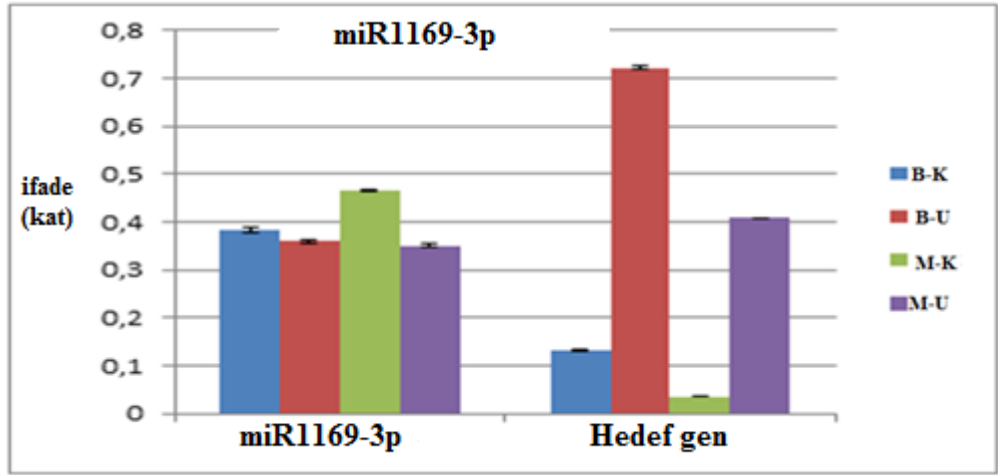
(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

4.11. *B. sorokiniana* uygulamasındaki miRNA ve Hedef gen analiz sonuçları

Buğday çeşitlerine *B. sorokiniana* uygulamasına bağlı olarak arrayde önemli derecede ifade edilen miR1169-3p, miR319a-3p.2-3p, miR398, miR169b-3p ve miR164g-3p korunmuş miRNA'larına özgün ileri (F)-RT ve bu miRNA'ların hedef genlerine özgün ileri (F)- geri (R) primerleri tasarlanarak qRT-PCR ile ifade düzeyleri ölçülmüştür.

4.11.1. miR1169-3p ve tar1169-3p

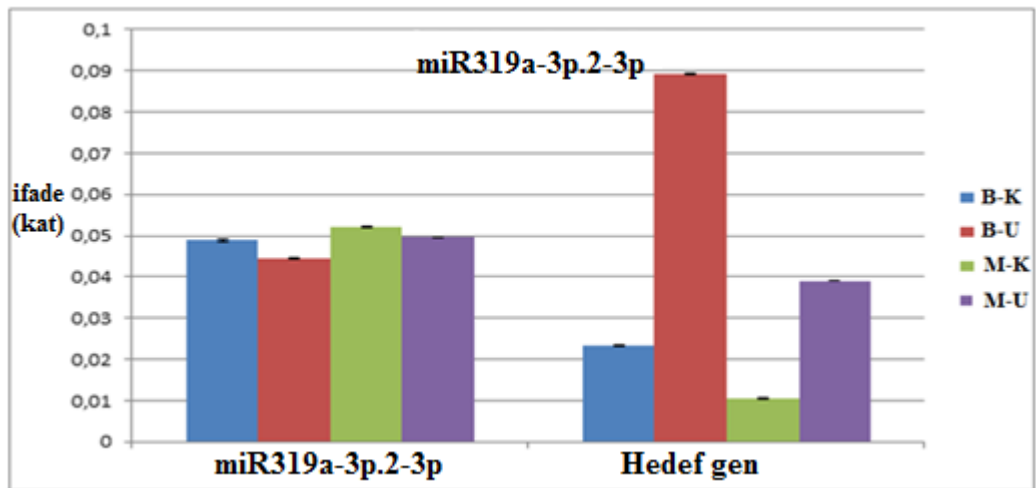
miR1169-3p biyoenformatik olarak leucine-rich repeat receptor-like serine threonin-protein kinaz bam1-like (CJ816283) genini hedeflemektedir (EK.2.). miR1169-3p ve hedef gen ile ilgili qRT-PCR sonucu Şekil 4. 33'de verilmiştir. miR1169-3p ile hedef gen arasında uyum görülmektedir (Şekil 4.33). Tesbit edilen verilere göre *B. sorokiniana* uygulamasına bağlı olarak miR1169-3 B-U kütüphanesinde aşırı ifade olmuştur.



Şekil 4. 33. miR1169-3p ve tar1169-3p'nin miktar analizi
(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

4.11.2. miR319a-3p.2-3p ve tar319a-3p.2-3p

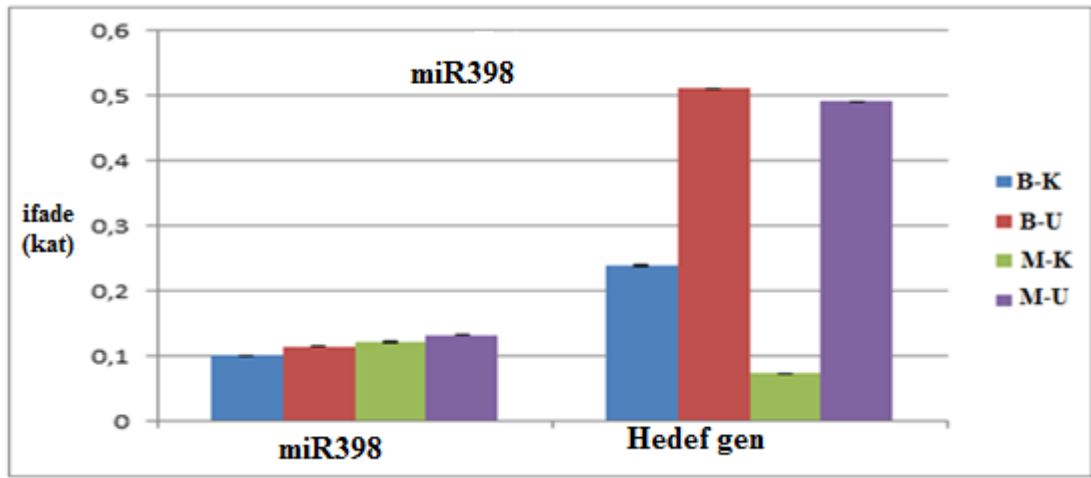
miR319a-3p.2-3p biyoenformatik olarak kofullar proteini ile sıralama ilişkili protein-29 gibi (vacuolar protein sorting-associated protein 29-like) (DR737260) geni hedeflemektedir (EK.2.). Buğdayda korunmuş (conserved) miRNA'lardan olan miR319a-3p.2-3p qRT-PCR ekspresyonda hedef gen ile uyum göstermektedir (Şekil 4. 34). R ve S genotiplerinde ifade olunan miR319a-3p.2-3p hedef geni R genotipinde aşırı ifade olunmuştur.



Şekil 4. 34. miR319a-3p.2-3p ve tar319a-3p.2-3p'nin miktar analizi
(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

4.11.3. miR398 ve tar398

ssl-miR398 biyoenformatik olarak superokide dismutaz 2 (CA650645) genini hedeflemektedir (EK.2.). ssl-miR398 uygulamaya bağılı olarak B-U, B-K ve M-U, M-K kütüphansinde ifade olup qRT-PCR ekspresyonda hedef gen ile uyumlu olduğu görülmektedir (Şekil 4. 35). miR398, homeostasi ve oksidatif stresin önemli bir düzenleyicisidir (Yamasaki ve ark., 2000; Lu ve ark., 2008). Ayrıca tuzla ilgili olarak Cu/Zn süperoksit dismutaz (CSD1 ve CSD2) genlerini miR398 hedeflediği tesbit edilmiştir (Eldem ve ark., 2013). miR398, biyotik ve abiyotik strese görev üstlenen korunmuş miRNA olduğu öngörülmüştür.

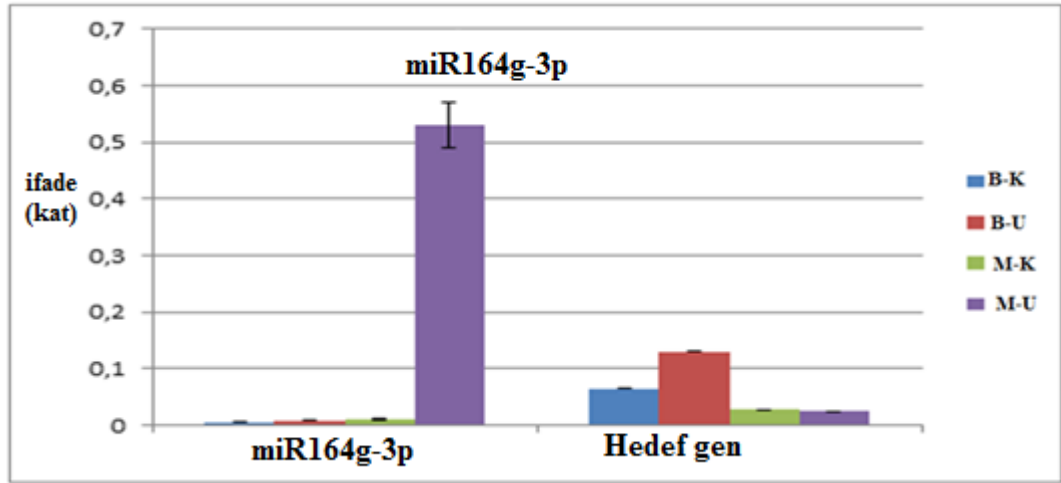


Şekil 4. 35. miR398 ve tar398'in miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

4.11.4. miR164g-3p ve tar164g-3p

miR164g-3p, *T. aestivum*'da transkripsiyon faktörü PCF8-gibi (transcription factor PCF8-like) (AT1G03360) geni biyoenformatik olarak hedeflediği tesbit edilmiştir (EK.2.). Uygulamaya bağılı olarak qRT-PCR ekspresyonu ve hedef gen arasında uyum görülmektedir (Şekil 4. 36). M-U kütüphansinde miR164g-3p aşırı ifade olunca hedef gen aynı oranda baskılanmıştır.



Şekil 4. 36. miR164g-3p ve tar164g-3p'nin miktar analizi

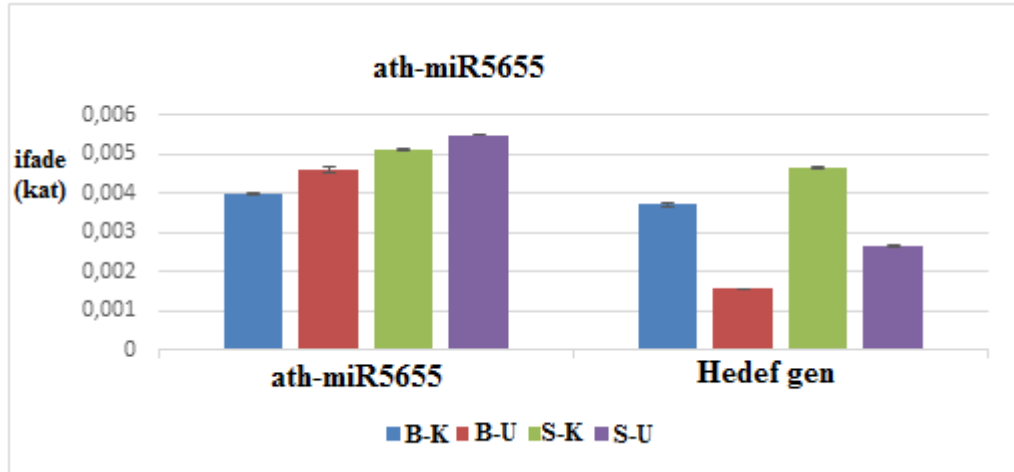
(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. M-K; Mızrak kontrol. M-U; Mızrak uygulama)

4.12. Tuz Uygulaması Hedef Gen Analizleri

Buğdayda R ve S genotipinin kök bölgesine tuz uygulaması sonucu miRNA-Mikroarrayinde 44 miRNA tesbit edilmiştir. Bu tesbit edilen miRNA'lerden önemli derecede ifade edilen miR5655, miR6108, miR156a, miR159c, miR172b, miR164, miR482-5p korunmuş miRNA'larına özgün ileri (F)-RT ve bu miRNA'ların hedef genlerine özgün ileri (F)- geri (R) primerleri tasarlanarak qRT-PCR ile ifade düzeyleri ölçülmüştür. miRNA ve hedef gen arasındaki orantı deneysel olarak gösterilmiştir. miRNA ve hedef gen arasındaki ilişkiyi doğrulamak için bazı miRNA'larda iki ayrı primer tasarlanarak hedef gen doğrulaması yapılmıştır. Hedef genlerin qRT-PCR analizlerinde, 18S rRNA (AF147501) geni referans alınarak buğday cDNA'ları esit yoğunlukta reaksiyona başlatılmıştır.

4.12.1. miR5655 ve tar5655

miR5655 biyoenformatik olarak bhlh135-gibi transkripsiyon faktörü (transcription factor bhlh135-like) (TC392664) geninin hedeflediği tesbit edilmiştir (EK 3). qRT-PCR analizinde miR5655 ile hedef gen (target) uyumluluk göstermektedir (Şekil 4.37). Tuz uygulamasına bağlı miR5655 B-U ve S-U kütüphanelerinde ifade artışı olurken aynı oranda hedef gen B-U ve S-U kütüphanelerinde ifade azalışı olmuştur.

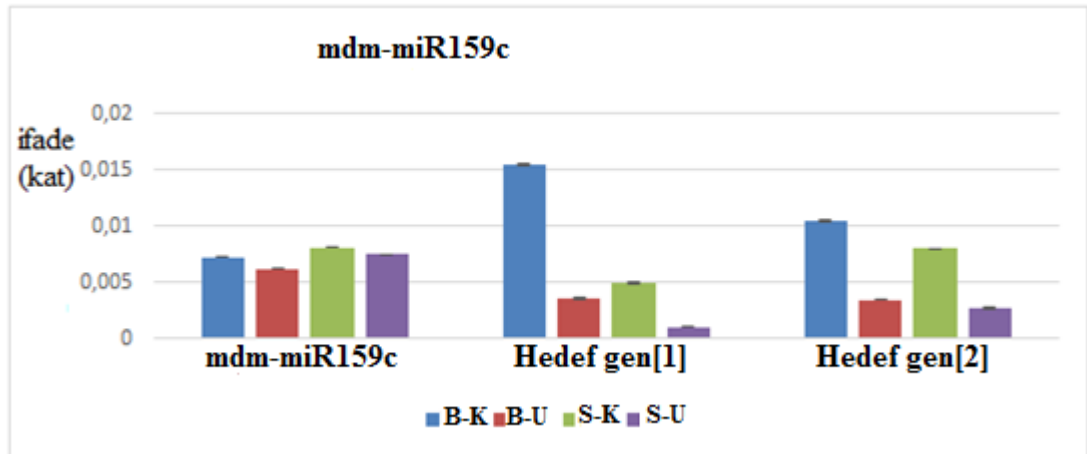


Şekil 4.37. miR5655 ve tar5655'nin miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

4.12.2. mdm-miR159c ve tar159c

mdm-miR159c biyoenformatik olarak *T. aestivum* 70 kDa ısı şok protein (70 kDa heat shock protein) (TaHSP70d) (TC397964) genini hedeflediği tesbit edilmiştir (EK 3). İki primer tasarlanarak hedef genine ulaşılmak istenmiş buna raman tasarlanan primerlerle miR159c'nin hedef geni ile uyumsuzluk göstermektedir (Şekil 4. 38). Fakat mdm-miR159c qRT-PCR ekspresyonu arasında uygun bir korelasyon görülmektedir.

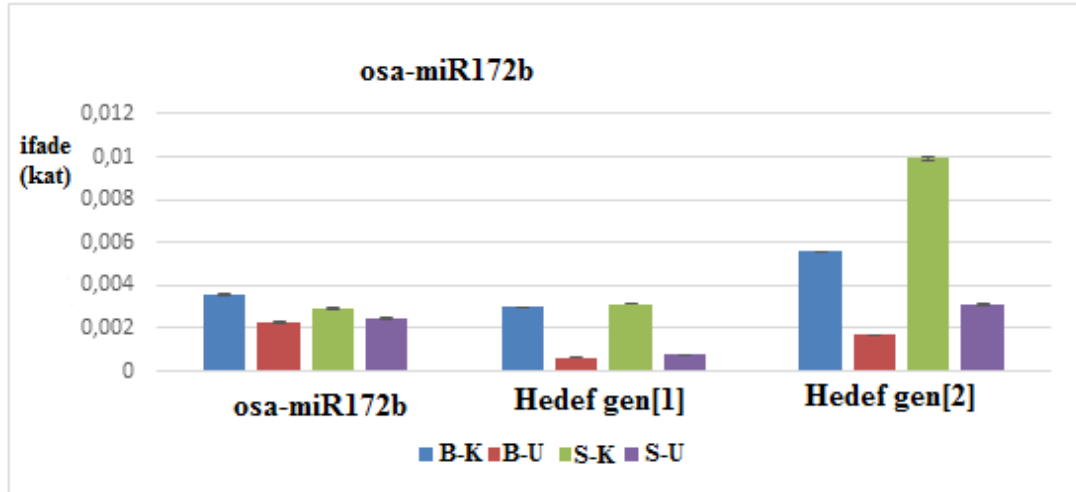


Şekil 4. 38. mdm-miR159c ve tar159c'nin miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

4.12.3. Osa-miR172b ve tar172b

Osa-miR172b biyoenformatik olarak ap2 erebp süperaile proteinin transkripsiyon faktör (ap2 erebp transcription factor superfamily protein) (CA486144) genini hedeflemektedir (EK3). Çiçek organları ve çiçeklenme zamanının belirlenmesinde görevli AP2 (Apetala 2), genlerinin baskılanmasında miR172 kritik bir role sahiptir. Ayrıca kuraklık ve tuzluluk stresine maruz bırakılan tütün bitkisinde de miR172'nin ifadesinin arttığı tesbit edilmiştir (Xin ve ark., 2010) İki primer tasarlanarak target'ı hedeflenen Osa-miR172b'nin hedef gen ile uyuşmadığı görülmektedir (Şekil4.39). Bu hedef genler başka miRNA'ları tarafından hedeflendiği tahmin edilmektedir. Fakat osa-miR172b qRT-PCR ekspresyonu arasında uygun bir korelasyon görülmektedir.

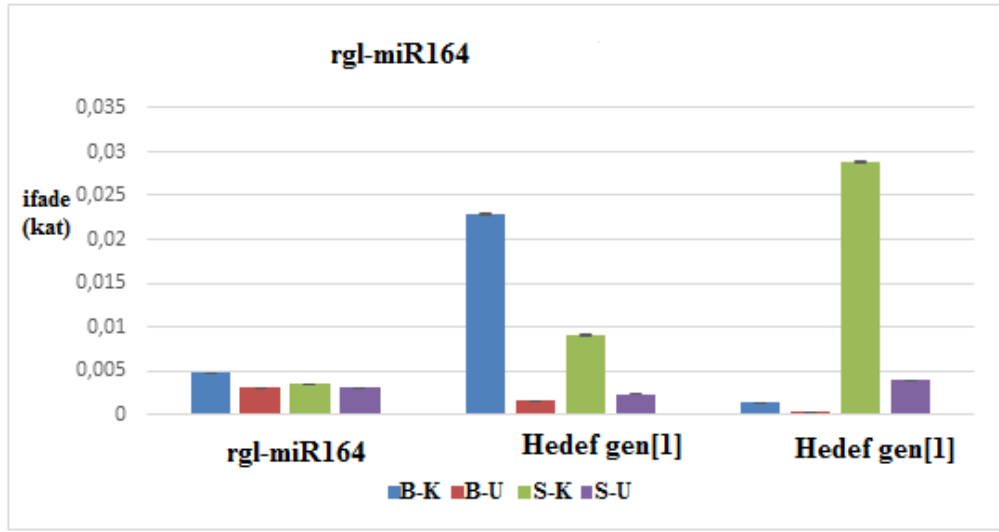


Şekil 4. 39. Osa-miR172b ve tar172b'nin miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

4.12.4. rgl-miR164 ve tar164

rgl-miR164 biyoenformatik olarak thiol proteaz (thiol protease) (CK154749) genini hedeflemektedir (EK 3). rgl-miR164 ile hedef gen uyum için iki farklı primer tasarlanmış fakat bu hedef genin (target) başak miRNA'ları hedeflediği tahmin edilmektedir. Çünkü hedef gen ile rgl-miR164 arasında uyum görülmemektedir (Şekil 4. 40).

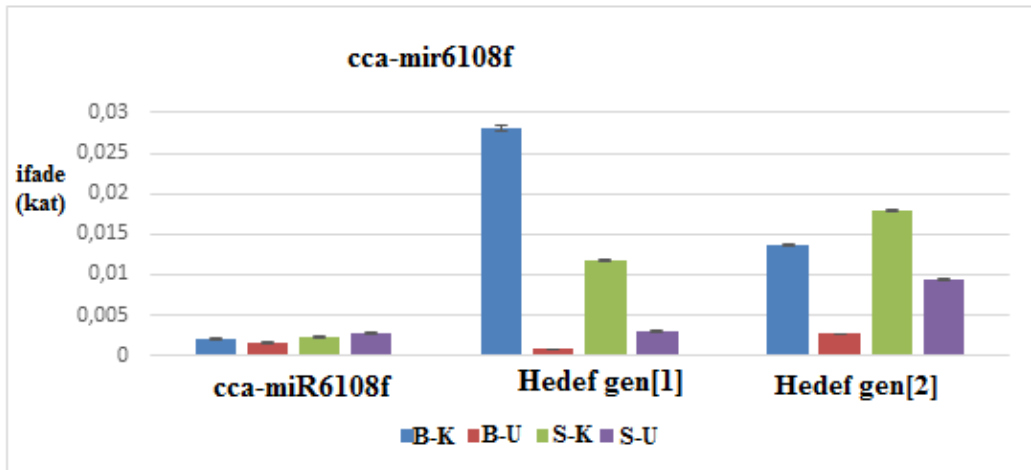


Şekil 4. 40. rgl-miR164 ve tar164'un miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

4.12.5. cca-miR6108f ve tar6108f

cca-miR6108f biyoenformatik olarak halka, çinko parmak süperaile isoform 1 (ring fyve phd zinc finger superfamily isoform 1) (TC387448) genini hedeflemektedir (EK 3). qRT-PCR analizinde miR6108f ile hedef gen arasında uyum görülmemiştir (Şekil 4. 41). Bu hedef genlerin başka bir miRNA'lar tarafından hedeflendiği tahmin edilmektedir. miR6108f ile qRT-PCR analizinde ifade uygunluğu gözlemlenmiştir (Şekil4.28).

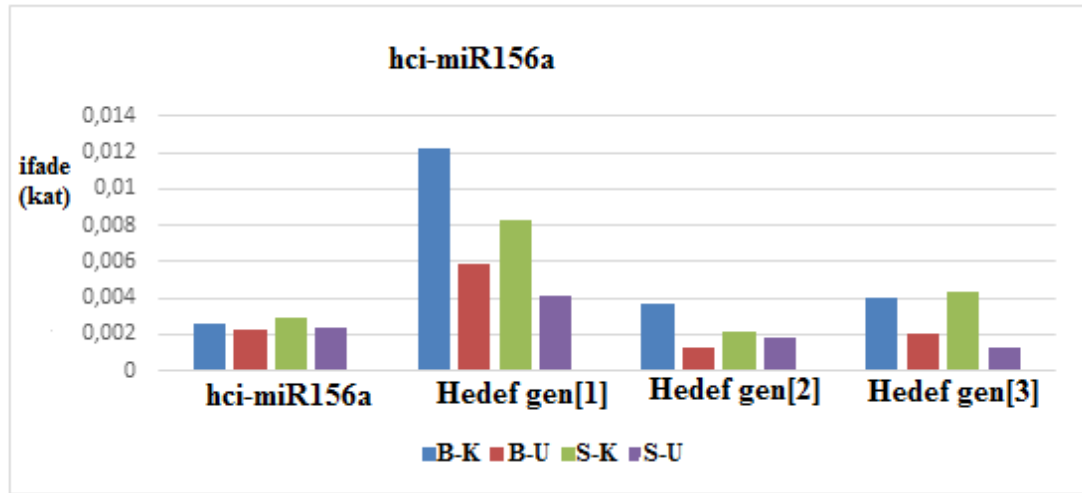


Şekil 4. 41. cca-miR6108f ve tar6108f'in miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

4.12.6. hci-miR156a ve tar156a

hci-miR156a biyoenformatik olarak *T. aestivum* beta-karoten hidroksilaz enzim (bohase gene) (TC383766) genini hedeflediği tesbit edilmiştir (EK 3). Yaprak ve sürgün gelişiminde etkili olan (Khraiwesh ve ark., 2012) hci-miR156a ile hedef geni dorulamak için üç farklı primer tasarlanmıştır (Çizelge 3. 8). Ne B-U ve B-K ile nede S-U ve S-K kütüphanesindeki hci-miR156a ile tesbit edilen hedef genlerin (target) hiç biri ile uyum göstermemiştir. Ama hem array hemde qRT-PCR ekspresyonları hci-miR156a arasınada uygun korelasyon görülmektedir (Şekil 4. 42). miR156'nın endojen seviyesi zamanla düzenlenir, erken dönemde vejetatif aşamada çok yüksek, ama yetişkin faz (Wu ve Poethig 2006) başlangıcından önce hızla azaldığı rapor edilmiştir (Eldem ve ark., 2013).



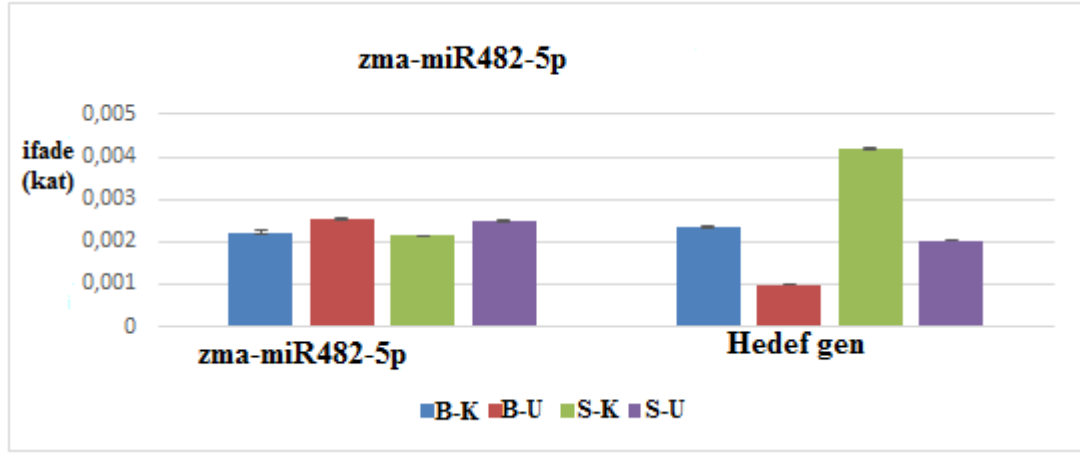
Şekil 4. 42. hci-miR156a ve tar156a'nın miktar analizi

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezotaja-I uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

4.12.7. Zma-miR482-5p ve tar482-5p

Zma-miR482-5p biyoenformatik olarak f-box, lrr-tekrar 3-benzeri protein (f-box lrr-repeat protein 3-like) (TC446646) genini hedeflediği tesbit edilmiştir (EK 3). Tasarlanan primer ile Zma-miR482-5p ile hedef gen arasındaki uyum Şekil 4.27'de

gösterilmiştir. B-U, B-K, M-U ve M-K kütüphanelerinde görülen Zma-miR482-5p uygulamaya bağlı olarak R genotipte ifade artışı olurken hedef gen ifadesi azalmış, S genotipte ise uygulamaya bağlı olarak Zma-miR482-5p ifade azalışı (down regüle) olurken hedef gen ifadesi artmıştır (Şekil 4.43). Önceki çalışmalarda *Bradyrhizobium japonicum* ile enfekteli soya fasulyesin’de (*Glyine max*) miR482 ifade artışının olduğu bulunmuştur (Li ve ark., 2010). R genotip ifadesinin artması dayanıklılık yolunda önemli görev üstlenebilir.



Şekil 4. 43. zma-miR482-5p ve tar482-5p’nin miktar analiz

(B-K; Bezotaja-I kontrol. B-U; Bezostaja-I uygulama. S-K; Seri-82 kontrol. S-U; Seri-82 uygulama)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Buğdayda geçmişten günümüze kadar klasik ıslah yöntemleri ve seleksiyonlarla dayanıklılık sağlanırken üretiminde de kayda değer artış oluşturulmuştur. Fakat biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin çeşitliliği ve gen havuzundaki daralmalardan dolayı verim artışını sağlamak zorlaşmakta ve strese toleransta farklı mekanizmaların geliştirilmesi gerekmektedir.

Strese yanıt sırasında gen ekspresyonun regülasyonu, transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası mekanizmalar, bitkiler için sürekli değişen çevreye uyum sağlamasını anlamamızda önemlidir (Bertolini ve ark., 2013). Bilindiği üzere miRNA'lar bitkilerde büyüme, gelişme, biyotik ve abiyotik strese karşı savunma cevabı olmak üzere bir dizi biyolojik mekanizmadır (Ünver ve ark., 2009). Son yıllarda, çeşitli stres faktörleri altında genomik çalışmalar giderek artmış özellikle yüksek dizileme teknolojisinin kullanılması ile miRNA'ların biogenezi ve işlevlerinin ortaya çıkarılması hız kazanmıştır (Li ve ark., 2011).

miRNA'lar bitkilerde esas *Arabidopsis*'te tesbit edilmiştir. Çeltik (*Oryza sativa*), Mısır (*Zea mays*), Kavak (*Populus trichocarpa*), *Saccharum officinarum*, *Sorgum bicolor*, Yonca (*Medicago truncatula*) ve Soya fasülyesi (*Glycine max*) gibi önemli bitkilerde küçük RNA'ların rolleri ilk büyüme ve gelişme (Mallory ve Vaucheret, 2006) ile ilgili olarak önerilmiştir (Kang ve ark., 2012). Fakat sonraki çalışmalarda miRNA'ların strese yanıtta ifade artışı veya ifade azalışı göstererek bu sayede strese toleransta önemli rol oynadığı gözlemlenmiştir (Xin ve ark., 2010).

miRNA'lar hedeflediği genin ifade düzeyini regüle edebilmesi kendi ekspresyon seviyesindeki farklılıkla ortaya çıkabilir (Eldem ve ark., 2013). Bu amaçla bu çalışmada miRNA'ların farklı doku ve farklı stres şartlarında ifade düzeyinin belirlenmesi amacıyla mikroarray analizlerine başvurulmuştur. Bu nedenle patojen-bitki etkileşimleri incelenmiş ve iki farklı fungus aşılması sonucu biyotik strese gen ifadesini düzenleyen miRNA'lar tesbit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında ilk etapta buğdayda *F. culmorum* ve *B. sorokiniana* patojenlerine duyarlı (R ve S) genotipler kullanılarak miRNA'ları tesbit etmek için geniş çaplı tarama ile oluşturulan miRNA-mikroarray çipi kullanılmıştır. Buğdayda iki farklı patojen karşılaştırıldığında farklı veya aynı ifade düzeyine sahip miRNA profilleri tesbit edilmiştir.

F.culmorum ve *B.sorokiniana* stresi altında yapraktaki gen ifadesini tesbit etmek için buğdayın R ve S genotiplerinden dörter kütüphane oluşturulmuştur. Kütüphanelerde R ve S genotipleri için bir patojen aşılamsı yapılırken birde kontrol grubu alınmıştır.

İlk etapta *F. culmorum* uygulamasına bağlı olarak R ve S genotiplerinde toplamda 66 miRNA tesbit edilmiştir. Tesbit edilen bu miRNA'lerden miR156, miR159, miR164, miR169, miR171, miR319, miR390, miR396, miR408 ve miR535 korunmuş miRNA ailesindendir. Jones-Rhoades ve ark. (2006) bu korunmuş dört miRNA'yı (miR156, miR159 miR319, miR396) fungal strese tesbit etmişlerdir. Biyotik (*C. quercuum f. sp*) strese maruz kalmış *populus*'un kök kısmında miR156, miR159, miR319 tesbit edilmiştir. Yine buğdaya fungus (*E. graminis f. sp. tritici*) patojeni enfekte edilmiş ve yaprakta miR156, miR159, miR396 ifade olduğu görülmüştür (Zhao ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda miR396 (Liu ve ark., 2009; Rodriguez ve ark., 2010), miR319 (Schommer ve ark., 2008), miR164a (Nikovics ve ark., 2006) ve miR156 (Wang ve ark., 2008) gibi miRNA'lar yaprak gelişimi ile olduğu tesbit edilmiştir. Bu bulgular miRNA'ların yaprak morfolojisi ve gelişimini düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir (Eldem ve ark., 2013).

Fusarium uygulamamıza bağlı olarak yaprakta kat değişimi (fold change) R genotipli B-U ve B-K kütüphanesinde S genotipli M-U ve M-K kütüphanesinde değişim gösterirken *F. culmorum* uygulamasına bağlı olarak tesbit edile 66 miRNA'dan (Çizelge 4. 5) bazılarının (20 tanesi) GO analizi ile hedefledikleri genlere gidilmiştir. Bu genlerin savunma yanıtları, protein metabolizması, yağ asidi sentezi, oksidasyon ve redüksiyon tepkisi, uyarılara yanıtta karbonhidrat metabolizmasında işlev yaptıkları tesbit edilmiştir.

Tesbit edilen 66 miRNA'dan B-U kütüphanesinde kat değişim (fold change) aralığı 251 iken M-U kütüphanesinde bu değişim -225 olarak görülmüştür (Çizelge 4.5). M-U kütüphanesinde kat değişimi en fazla olan mtr-miR2592s hedef gen olarak beta-glukosidaz 6'yı (glucosidase) (TC373133) hedeflemektedir (EK1).

Bezostaja-I kontrolünü bezostaja-I uygulama ile karşılaştırılmasında 216,3 kat değişim ifadesine sahip olan ath-miR869.1'in hedef geni olan glukunasil transferaz (GT, TC457607) bitki fungus etkileşiminde önemli bir role sahiptir. Aynı zamanda GT geni, *Fusarium* cinsleri tarafından üretilen bir mikotoksin olan deoksinivalenole (DON) karşı dayanıklılıkta görevi bulunmaktadır (Bowles, 2005).

F.culmorum patojenine dirençli R genotipindeki B-T ve B-C kütüphanesinde ve patojene hassas S genotipindeki M-U ve M-K kütüphanesinde ath-miR159b, ppt-miR901, osa-miR159 ve osa-miR1869 qRT-PCR analizlerinde ifade azlığı olduğu görülmüştür. Fakat ptc-miR482c-5p qRT-PCR analizinde R genotipinde ifade artışı olurken S genotipinde ise ifade azlığı olmuştur.

Biyoenformatik olarak copine family isoform 1 (CK162380) genini hedefleyen osa-miR1869 uygulamaya bağlı olarak R genotipinde qRT-PCR ekspresyonu ifade azlığı olurken S genotipinde ekspresyonu ifade artışı olmaktadır. Diğer bir deyişle osa-miR1869 ifadesindeki artışın hassaslığı (S) artırdığı düşünülmektedir. Muhtemelen bu gen dayanıklılık mekanizmasındaki bir geni hedeflemiş olabilir. Patojen enfeksiyonunda savunma proteinleri görev alır. R genotipinde savunma proteini S genotipine göre daha fazladır. Çünkü array ve qRT-PCR analizi sonucu R genotipinde yüksek ekspresyon seviyesi ile hedef gen oldukça uyumlu olduğu görülmüştür.

Çalışmada B-U ve B-K kütüphanesinde gma-miR171k-5p, gma-miR5783, ath-miR2933 miRNA'ları ifade azlığı olmuştur fakat bu miRNA'lar S genotipi olan M-U ve M-K kütüphanesinde ifade artışı olmuştur (Çizelge 4. 5). Bu miRNA'ların hedef genleri biyoenformatik olarak tesbit edilmiştir. gma-miR171k-5p, dihydrolipoyllisine-residue acetyltransferase component 1 (TC377941) genini hedeflerken, ath-miR2933 pleiotropic ilaç direnç proteini 2 (pleiotropic drug resistance protein 2) (TC421208)

genini hedefler ve gma-miR5783 ise pyruvate dehydrogenase mitochondrial-like (BE418197) genini hedeflemiştir (EK 1).

miR169 aile üyeleri biyotik ve abiyotik strese ifade olmaktadır (Eldem ve ark., 2013). *F. culmorum* uygulamasında ptc-miR169b-3p qRT-PCR analizinde ifade azalışı olmuştur (Şekil 4.16). *B. sorokiniana* uygulamasına bağlı olarak ptc-miR169b-3p ifade olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4. 6).

miRNA159 ve miR319 ailesine ait üyeler *F. culmorum* stresinde ifade (regüle) olduğu rapor edilmiştir (Çizelge 4. 5). Bitkilerde tohum boyutu ve tohum geliştirme miRNA159/miR319 ailesi tarafından düzenlenir. Tohum çimlenmesi düzenleyen myb33 ve myb101 mRNA'ları miR159 aktivitesi tarafından bastırılır (Khraiwesh ve ark., 2012).

İkinci etapta *B. sorokiniana* uygulamasında bağlı olarak R ve S genotiplerinde toplamda 21 miRNA tesbit edilmiştir (Çizelge 4. 6). Bu miRNA'larda beş tanesi ptc-miR169b-3p, sbi-miR169r-5p, ssl-miR398, zma-miR164g-3p, osa-miR319a-3p.2-3p korunmuş miRNA ailesinden olduğu görülmüştür (http://pmted.agrinome.org/advance_search.jsp).

Bu çalışmanın sonucunda enfeksiyonlu hassas (S) genotipte her hangi bir ifadesi azalan miRNA'ya rastlanmamıştır (Çizelge 4. 6). Buna karşılık, gma-miR482e uygulamalı hassas genotipte tek ifadesi artan miRNA iken, uygulamalı dayanıklı genotipte ise ifadesi azalan olarak bulunmuştur. Aynı zamanda miR482 her iki miRNA array denemelerinde enfekteli hassas genotipte ifadesin artışı tesbit edilmiştir. Bu durumda miR482 hem *F. culmorum* hem de *B. sorokiniana* için uygulamalı S genotipinde yanıt miRNA'sıdır. miRNA hedeflerinin biyolojik fonksiyon ve moleküler işlevlerine dayanarak miR482'nin hedefi F-Box, Lrr-tekrar 3-benzeri protein (Lrr-repeat protein 3-like) (TC446646) (EK.2.), (GO:0006511) ubiquitin-katabolik işleme bağlı protein (dependent protein catabolic process) (EK 4). Gupta ve ark. (2010) yaptıkları derlemelerinde miR482 hedefi NBS-LRR protein *Pseudomonas syringe* (DC3000)'le enfekte edilen domatestte baskılandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada sadece grm-miR482e R genotipinde ifade artışı olurken S genotipinde ise

ifade azalışı olmuş, yine sadece osa-miR5800 B-U ve B-K kütüphanesinde ifade azalışı olurken M-U ve M-K kütüphanesinde ifade artışı olmuştur (Çizelge 4. 6).

B. sorokiniana uygulamasında tesbit edilen miRNA'lar Çizelge 4. 6 da verilmiştir. Bu miRNA'ların fonksiyonları ve hedef genleri biyoenformatik olarak tesbit edilmiştir. R genotipine duyarlı olduğu gözlene miR4398 alanin aminotrasferaz 2(TC453365) genini hedeflediği gözlemlenmiştir (EK.2.)

Bipolaris uygulamasına bağlı olarak yapraklardan alınan örneklerin qRT-PCR analizinde miR319a-3p.2-3p, miR398 ve miR164g-3p ifadesi artış gösterirken miR1169-3p ifadesi azalış göstermektedir. miR319a-3p.2-3p biyoenformatik olarak *T. aestivum*'da vacuolar protein sorting-associated protein 29-like (DR737260) genini hedeflediği görülürken (EK.2.) ssl-miR398 biyoenformatik olarak *T.aestivum* süperokside dismutaz (superoxide dismutase) 2 (CA650645) genini hedeflemektedir (EK.2.). miR398 oksidatif strese ifade olduğu görülmektedir (Sunkar ve ark., 2006).

miR164g-3p ise *T. aestivum*'da transcription factor PCF8-like (CA642340) genini hedeflemektedir (EK.2.). miR1169-3p ise biyoenformatik olarak *T.aestivum* sitozolik akonitaz (cytosolic aconitase) (cACO) (CJ816283) genini hedeflediği görülmektedir (EK.2.)

Tesbit edilen miRNA'ların 8 tanesi hem *F. culmorum* ve hem de *B. sorokiniana* patojen uygulamasında ortak olarak ifade olmuştur (Şekil 4. 7). (cre-miR1169-3p, mtr-miR2592s-3p, osa-miR1427, osa-miR319a-3p.2-3p, ath-miR869.1, ptc-miR169b-3p, vvi-miR3624-5p, miR482e) cre-miR1169-3p, miR482e ve osa-miR1427 hariç diğer miRNA'lar arrayde çalışmasında aynı profilleri göstermişlerdir.

Yaptığımız bu çalışmanın üçüncü etabında tuz uygulamasına bağlı olarak R ve S genotiplerinde kök bölgesinden alınan örneklerden 44 miRNA tesbit edilmiştir (Çizelge 4. 7). Bu miRNA'dan olarak 24 tanesi R ve S genotiplerde (bdi-miR319b, cca-miR396c, hci-miR156a, mdm-miR159c, mtr-miR395h, nta-miR156f, osa-miR160f-3p, osa-miR164d, osa-miR169a, osa-miR172b, osa-miR396a-3p, ptc-miR156l, ptc-miR164f, rgl-miR164, smo-miR156d, tae-miR395b, vvi-miR156e, vvi-miR167c, vvi-miR172a, zma-miR156k-5p, zma-miR164b-3p, zma-miR164c-3p, zma-miR169d, vvi-miR535a) korunmuş miRNA ailesinden olduğu (Koptekin ve Aktaş,

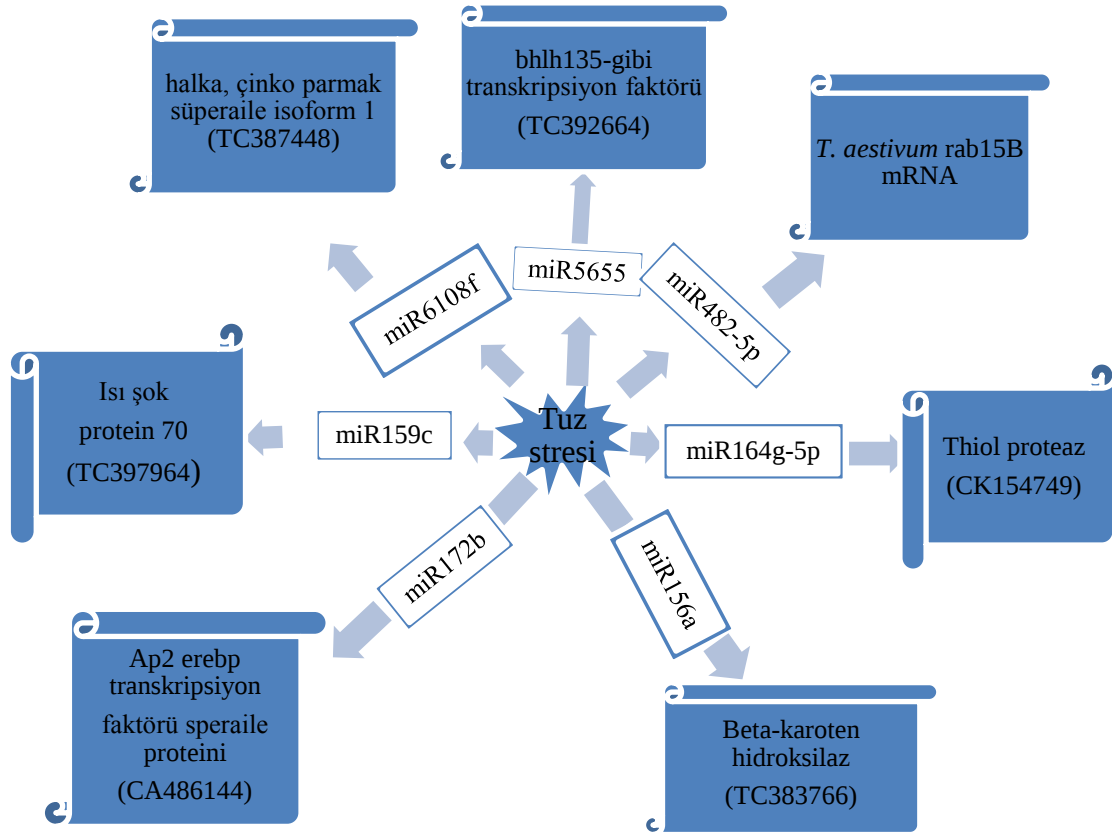
2013) gözlemlenmiştir (http://pmted.agrinome.org/advance_search.jsp). R genotipindeki S-U ve S-K kütüphanesinde 21 miRNA ile S genotipindeki B-U ve B-K kütüphanesinde 20 miRNA ifade artışı olmuştur (Çizelge 4. 7)

Tesbit edilen miRNA'lardan 9 tanesi (pab-miR3710, peu-miR2916, ppt-miR1074, ptc-miR156l, ptc-miR164f, smo-miR156d, vvi-miR156e, zma-miR164b-3p, zma-miR169d hassas (S) B-U ve B-K kütüphanesinde ifade azalışı olurken, dayanıklı (R) S-U ve S-K kütüphanesinde ifade artışı olmuştur. miR482-5p ise hem R genotipinde hem S genotipindeki kütüphanelerde ifadesi azalmıştır (Şekil 4. 43).

S genotipindeki B-K ve B-U kütüphanesinde cre-miR1168.2, osa-miR396a-3p, peu-miR2916 ve vvi-miR535a ifade artışı olurken R genotipindeki S-K ve S-U kütüphanelerinde ifadesi azalmıştır.

Osa-miR160f-3p S genotipinde kat değişimi (fold change) -1.0019 iken R genotipinde ise 67.0572 olarak tesbit edildi bu en büyük değişim aralığı olarak görülmüştür (Çizelge 4.7). osa-miR160f-3p biyoenformatik olarak metal taşınması nramp2-benzer (CA660220) genini hefllediği görülmüştür (EK 3). osa-miR5800 hem tuz uygulamasında hem *B. sorokiniana* uygulamasında ifade olunduğu tesbit edilmiştir. Fakat tuz uygulamasındaki R ve S genotiplerinde ifade azalışı olurken biyotik strese R genotipinde ifade azalışı S genotipinde ise ifade artışı olmuştur.

miR482-5p ise uygulamaya bağlı olarak S-K ve S-U kütüphanesi ile B-K ve B-U kütüphanelerinde ifade azalışı olmuştur. *F. culmorum* uygulamasında miR482c-5p ise R genotipte ifade artışı olurken S genotinde ifade azalışı olmaktadır. miR482 ailesi biyotik ve abiyotik strese yanıt miRNA'sı olduğu gözlemlenmektedir. Yapılan daha önceki çalışmada miR482 ve miR1450 populusta tuz stresinde ifade artışının olduğu rapor edilmiştir (Lu ve ark., 2008).



Şekil 5. 1. Tuz stresindeki buğdayın R ve S genotipinde oluşan bazı miRNA ve biyoenformatik olarak tesbit edilen hedef genleri. (→ Tuz uygulaması sonucu miRNA'ların ifade seviyesi yükselmiş, hedef gen ifadesi azalmıştır. ← Tuz uygulaması sonucu miRNA'ların ifade seviyesinin düşmüş, hedef gen ifadesi ise artmıştır.)

Bugüne kadar tuz artırılmasına bağlı ifade tabanlı çalışmalarda miR396, miR168, miR167, miR165, miR319, miR159, miR394, miR156, miR393, miR171, miR158 ve miR169 rapor edilmiştir (Eldem ve ark., 2013).

Tuz artışına bağlı olarak *Arabidopsis*'te MiR398 birikimi azalırken miR156, miR158, miR159, miR165, miR167, miR168, miR169, miR171, miR319, miR393, miR394, miR396 ve miR397, tuz stresine yanıt olarak ifadelerinin artışı (up regüle) olmuştur (Khraiwesh ve ark., 2012). Buğdayın S genotipinde nta-miR156f, nta-miR156a up regule olurken ptc-miR156l, smo-miR156d ve vvi-miR156e ifadesi azalmıştır. miR156 yapılan önceki çalışmalarda hem *Arabidopsis thaliana*'da hem de diğer bazı bitkilerde genç fazdan olgun faza geçişin zamanlamasını sağlayan Squamosa promotor bağlayıcı protein-benzeri (SPL)'yi düzenlediği belirlenmiştir (Yanik ve ark., 2013). hci-miR156a biyoenformatik olarak beta-karoten hidroksilaz

(TC383766) genini hedeflemektedir (EK 3). miR156a geninin aşırı ekspresyonu *Arabidopsis*'de geç çiçeklenme ve vejetatif faz değişiminde gecikmelere neden olurken miR156 sürgün olgunlaşma (Kantar ve ark., 2010) için sorumlu spl9 ve spl15 genlerin de hedeflemektedir.

Lu ve ark. (2014) yaptığı çalışmada miR5655 transgenik bitkilerdeki fosfat açığına bağlı savunma cevaplarında ifade artışı olduğu rapor edilmiştir. Buğdayın R ve S genotipinde ifade azalışı olan miR5655 biyoenformatik olarak transcription factor bhlh135-like (TC392664) genini hedeflemektedir (EK 3). İşlev olarak anatomik yapı morfogenezinden (EK 4) sorumlu olduğu tesbit edilmiştir (GO: 0009653).

osa-miR172b, hem B-U ve B-K ile hemde S-U ve S-K kütüphanesinde ifadesi artmıştır (up regüle) (Çizelge 4. 7). Biyoenformatik olarak ap2 erebp transcription factor superfamily protein (CA486144) genini hedeflemektedir (EK 3). Bitkilerin erken çiçeklenme ve çiçek organı kimlik fenotipleri miR172'nin aşırı ifadesi ile oluşurken bitkilerin üreme aşamaları için, geçiş düzenlediği gösterilmiştir (Lu ve ark., 2014). miR172 tarafından fonksiyonu belirtilen bu iki ap2- like hedef genleri ile bu eat1 bölgesinin hedefleri (toe1), toe2 ve *Arabidopsis*'te toe3 genleri ile Mısır (*Zea mays*)'da gloy15 gibi çeşitli ap2-benzeri genler miR172 düzenlenir. Ap2 geni mutantlarında aynı morfolojide ve uygunsuz çiçeklenme zamanı ile sonuçlanır (Eldem ve ark., 2013).

Arabidopsis'de tuz stresine karşılık olarak miR169 ifade artışı (Vazquez ve ark., 2008) olurken çalışmamızda buğdayın R ve S genotiplerinde osa-miR169a ve zma-miR169d tesbit edilmiştir. osa-miR169a S ve R genotipinde ifade artışı olurken zma-miR169d S genotipinde ifade azalışı, R genotipinde ise ifade artışı olmuştur (Çizelge 4. 7). Bu miRNA'ların hedef genleri tesbit edilmiş ve sıra ile verilmiştir. osa-miR169a subtilisin-benzeri proteaz (BJ268074) genini ve zma-miR169d polyol transporter 5-like (TC411029) genini hedeflemektedir (EK 3).

Buğdayın S-U ve S-K ile B-U ve B-K kütüphanelerinde rgl-miR164 ifadesinde azalma (down regüle) olmuştur (Çizelge 4. 7). Biyoenformatik olarak thiol proteaz (CK154749) genini hedeflemektedir (EK 3). Önceki çalışmalarda Mısır'da tuz stresine bağlı mikroarray ekspresyonunda miR164 aileleri ifade azalışı (Khraiwesh ve ark.,

2012) gösterirken buğdayda tuz artışına bağlı olarak kök bölgesinden alınan örneklerin mikroarray ekspresyonunda yine aynı şekilde miR164 ifade azalışı olmuştur.

Tuz uygulamasına bağlı tesbit edilen bazı miRNA'ların (miR5655, miR6108f, miR159c, miR164g-5p, miR156a, miR172b ve miR482) qRT-PCR analizi yapıldı ekspresyon seviyelerine göre ifade azalışı ve ifade artışı olanlar tesbit edilerek biyoenformatik çalışma yapılarak hedef genler belirlenerek Şekil 5. 1'de verilmiştir. qRT-PCR analizlerinde miR156a, miR172b ifade azalışı (down regüle) olurken miR5655 (Lu ve ark., 2014), miR6108f, miR159c (Khraiwesh ve ark., 2012), miR164g-5p ve miR482 ifade artışı olduğu tesbit edilmiştir.

Yine bu çalışmada Monocotil bitkilere özgü olan miR444 (Yoa ve ark., 2007) ailesinden osa-miR444b.2 belirli değişim aralığında tesbit edilmiştir. F-box protein at1g78280-benzeri (CJ670763) genini hedefleyen (EK 3) osa-miR444b.2 R ve S genotipinde down regüle olmuştur (Çizelge 4. 7).

Bu çalışma *F. culmorum*, *B. sorokiniana* patojenleri ve tuz stresi açısından buğdayda öncü çalışma niteliğinde olup diğer bitki türlerinde tesbit edilen miRNA'ların homologların buğdayda varlığının ve ifadesinin tesbiti hem ifade yönünden çeşitler arasında varyasyon gösterdiğine dair bilgiler sergilemektedir. miRNA'ların buğdayda gelişim değil, aynı zamanda çeşitli fizyolojik süreçte genlerin rollerini hedeflediğini öngörebiliriz. Bu nedenle, bu çalışmanın sonuçlarının buğdayın tuz, *Fusarium* ve *Bipolaris*'e toleransta daha fazla fayda sağlaması için çalışmayı dahada ilerletmek gerekmektedir. Bu etmenlere bağlı ortaya çıkan miRNA'ların sequence veya miRNAYA ait dizi varyasyonlarının stres, büyüme, gelişme ve verim dahil diğer agronomik unsurlarla ilişkilendirmesi mümkündür.

KAYNAKLAR

- Abdel-Satar, M.A., Khalil, M.S., Mohmed I.N., Abd-Elsalam K.A., Verreet, J.A., 2003. Molecular phylogeny of Fusarium species by AFLP fingerprint. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 2 (3), pp. 51-55
- Agrawal, N. ve Ark., 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67 (4), 657- 685.
- Agrios, G. 2005. Plant pathology. **Elsevier Academic Press**. 922 p
- Aktaş, H., Kınacı E, Yıldırım A.F., Sayın L., Kural A., 1999. Konya yöresinde hububatta sorun kök ve kök boğazı çürüklüğü etmenlerinin hububatta verim komponentlerine etkileri ve mücadelesi üzerine araştırmalar. **Hububat Sempozyumu**, 8-11 Haziran 1999, 392-403. Konya
- Albayrak, G., Yörük E., 2012. Fusarium graminearum ve F. culmorum zolatlarında Trikotesen Üretimiyle ilişkili tri5 ve tri3 Genlerinin ve Transkriptlerinin Analizi. **Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR** (eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi) yıl: 2012 Cilt: 10 Sayı: 1 Sayfa: 11-21 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702120102.pdf
- Allen, R.S., Li J., Stahle M.I., Dubroue A., Gubler F., Millar A.A .,2007Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. **Proc Natl Acad Sci USA** 104: 16371–16376
- Ambros, V., Chen, X.M. 2007.The Regulation of Genes And Genomes by Small RNAs. **Development** 134, 1635-1641.
- Araz, A., Uğuz N., Güler P., 2010 Fusarium Türlerinin İzolasyonu ve Patojenitelerinin Belirlenmesi **Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi** 3 (1):1-5, ISSN: 1308-3961, www.nobel.gen.tr
- Aslan, Ü., Baykal N., 2002. Kök ve Kökboğazı Fungal Patojenlerine Karşı Bazı Buğday Çeşitlerinin Reaksiyonları ve Tohum Koruyucu Fungusitlerin F.culmorum (W.G.Sm.) Sacc.'a Etkisi Ulud. **Üniv.Zir.Fak.Derg.**, 16: 69-76
- Atalay, A., 2007 RNA İnterferans Kursu, s. 25, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü **Yaşam Bilimleri Kursları Serisi**, Ankara,

- Axtell, M. J., Westholm, J. O., Lai, E. C., 2011. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*. 12(4), 221.
- Bağcı, S.A., Hekimhan, H., Arısoy, R.Z., Taner, A., Büyük, O., Nicol, J., Aydoğdu, M. 2008. Farklı Mönavebe Sistemlerinin Hububat Kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı Üzerine Etkisi. **Ülkesel Tahıl Sempozyumu**, 2-5 Haziran 2008, Konya
- Bai, G.H., Shaner G.,1999. Scab of wheat. Prospects for control. **Plant Dis**. 78:760-766.
- Bartel, D.P., 2004 “MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.” **Cell** vol.116, 281 pages
- Bartels, D. ve Sunkar R., 2005. Drought and salt tolerance in plants **Critical Reviews in Plant Sciences** 24: 23–58.
- Baumberger, N., Baulcombe D.C. 2005. Arabidopsis Argonaute1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 102: 11928–11933
- Bazzini, A.A., Hopp H.E.,Beachy R.N., Asurmendi S., 2007. Infection and coaccumulation of tobaccomosaic virus proteins altermicroRNAlevels, correlatingwith symptomand plant development, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104 12157–12162.
- Bernstein, E. ve ark., 2001. Role For A Bidentate Ribonuclease in The Initiation Step of RNA Interference, **Nature**, 409,363- 366
- Bertolini, E., Verelst W., Horner D.S.,Gianfranceschi L., Piccolo V., Inzé D., Mario E., Mica E., 2013. Addressing the Role of microRNAs in Reprogramming Leaf Growth during Drought Stress in Brachypodium distachyon **Molecular Plant** , Volume 6, Number 2 ,Pages 423–443
- Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.Y., Hunter, C., Berardini, T.Z., Poethig,R.S. 2003. HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phasechange and morphogenesis. **Development**. 130: 1493–1504.
- Bologna, N.G, Schapire AL, Palatnik J.F. 2013. Processing of plant microRNA precursors. **Briefings in Functional Genomics**, 12(1): 37-45.

- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A., 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 73: 101-115.
- Bowles, D., Isayenkova J., Lim E-K., Poppenberger B., 2005. **Glycosyltransferases: managers of small molecules**. *Current opinion in plant biology* 2005, 8(3):254-263.
- Bressan, R.A., 2008. “Stres Fizyolojisi”, Editörler:Taiz, L., Zeiger, E., Çeviri Editörü: Türkan D., “Bitki Fizyolojisi”, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 591-620
- Buckingham, S., 2003. The Major World of MicroRNAs. Understanding The RNAissance.**USA: Nature;** p. 1-3.
- Burgess, LW, Liddell CM, Summerel B.A., 1988. Laboratory manual for Fusarium Research. 2nd ed University of Sydney, **Australia**, pp 156
- Caroline, A. M., Lewis J, HeinenS.J., Radmer L,Macky R.D, Baldrige G.D, ZeyenR. J., MuehlbauerG.J., 2007. Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against Fusarium graminearum **Plant Cell Reports** 26:479–488
- Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A., Nicholson, P. 2003. Development of PCR assays to tri7 and tri13 trichothecene biosynthetic and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. **Physiol.Mol. Plant Pathol.** 62: 355-367.
- Chen, X., 2009. Small RNAs and their roles in plant development, **Annu. Rev. Cell Dev.Biol.** 25 21–44.
- Combier, J.-P., Frugier F., Billy F., Boualem A., El-Yahyaoui F., Moreau S., Vernié T., Ott T., Gamas P., Crespi M., Niebel A., 2006. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in Medicago truncatula, **Genes Dev.** 20 3084–3088.
- Cook, R.J, Christensen A.A., 1997. Growth of cereal root rot fungi as affected by temperature x water potential interactions. **Phytopathology** 66(2):193-197.
- Çöl, M., 2007. Geçmişten Günümüze Ekmeklik Buğdayda Verim Ve Kalitedeki Gelişmeler **Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi** Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Konya
- Dağdaş, Y.F., 2009. Investigating The Roles of MicroRNAs In Biotic Stress Responses and Functional Characterization of A Novel ZTL-Type F-Box

Protein via Virus Induced Gene Silencing. Middle East Technical University.
The Graduate School of Natural

- Degirmenci, K., Ertunç F ., 2010. Virüs Enfeksiyonları ile Mücadelede Gen Susturulması ve Uygulamaları. **Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR** (Eski adı: orLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi) Yıl: 2010 Cilt: 08 Sayı: 2 Sayfa: 35-52 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702100204.pdf
- Demirci, F.. 2003. Bazı Buğday Çeşitlerinin Önemli Kök ve Kök Boğazı Hastalık Etmenleri (*Fusarium spp.*, *Bipolaris sorokiniana*)'ne Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi. **Tarım Bilimleri Dergisi**, 9 (4) 460-466.
- Dharmasiri, N. E.M., 2004. Auxin signaling and regulated protein degradation. **Trends Plant Science**.9:302-8.
- Ding, D., Zhang L., Wang H., Liu Z. , Zhang Z., Zheng Y., 2009. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots, **Ann. Bot.** 103 29–38.
- Dong, Z., Han MH, Fedoroff N. 2008. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. **PNAS USA**. 105:9970-9975.
- Edreva, A., 1998. Stress physiology, definitions and concepts of Stress In ‘Symposium of molecular basis of stress physiology in plants’ 4-32. (22-26 June, EBİLTEM, Bornova-İzmir, Turkey).
- Eldem, V.A.U, Ozhuner E, Bakır Y, Uranbey S, Ünver T., 2012. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput sequencing. **PLoS ONE**. 7(12):e50298.
- Eldem, V., Okay S, Ünver T., 2013 Plant microRNAs: New players in functional genomics. **Turkish J Agr and Forestry**, 2013 37:1-21. DOI: 10.3906/tar-1206-50
- Erdurmuş, D., Katırcıoğlu Y.Z., 2008. Buğdayda önemli kök ve kök boğazı hastalık etmenlerine karşı *Trichoderma harzianum*’un etkinliğinin araştırılması. **Bitki koruma bülteni** 48 (1): 37-48
- Eyüpoğlu, F., 1999. Türkiye Topraklarının Verimlilik Durumu. Toprak ve **Gübre Araştırma Enstitüsü Yayınları**. Genel Yayın no, 220. Teknik Yayın no, T-67.

- FAO, Food And Agriculture Organization of The United Nations, <http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Production>. [Ziyaret Tarihi:25.10.2013]
- Filipowicz, W., Bhattacharyya N.S., Sonenberg N., 2008. "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" **Nature Reviews Genetics**, vol. 9, no. 2, pp. 102–114.
- Frazier, T.P., Sun G., Burklew C.E., Zhang B., 2011. Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. **Mol Biotechnol** 49: 159–165.
- Gerlach, W., Nirenberg H.I., 1982. The Genus *Fusarium*: a pictorial atlas Mitt. **Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft. Berlin, Dahlem**.
- Gill, B.S., Appels R., Botha-Oberholster A.M., Buell C.R., Bennetzen J.L., Chalhou B., Chumley F., Dvorák J., Iwanaga M., Keller B., Li W., McCombie W.R., Ogihara Y., Quetier F., Sasaki T.A., 2004. workshop report on wheat genome sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. **Genetics**. 168:1087-1096.
- Goswami, R.S., Kistler, H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Mol. Plant Pathol.** 5(6)515-525.
- Görür, A., Tamer L., 2011. mikroRNA'ların Terapötik Kullanımı. **Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi** 4 (2) Mersin
- Guo, H.S, Xie Q, Fei J.F, Chua N.H., 2005. "MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development." **Plant Cell** vol.17 1386 pages
- Gupta O.P., Permar V., Koundal V., Singh U.D., Praveen S., 2012. MicroRNA regulated defense responses in *Triticum aestivum* L. during *Puccinia graminis f.sp. tritici* infection **Mol Biol Rep** 39:817–824
- Gutierrez, L., Bussell JD., Păcurar DI., Schwambach J., Păcurar M., Bellini C., 2009. Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in Arabidopsis Is Controlled by Complex Regulation of auxin response factor Transcripts and MicroRNA Abundance. **The Plant Cell** Online October 1, 21(10):3119-32.

- Hammond, S. M., Bernstein E., Beach D, Hannon G. J., 2000. "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." **Nature** vol.404, 296 pages
- Hekimhan, H., Bağcı SA., Nicol J., Tunalı B., 2005. Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalıkları etmenlerinin bazı kışlık hububat verimleri üzerine etkileri. **Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi** 5-9 Eylül 2005 Antalya Cilt 1, s:201-206.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Gren, P.J., Jacobsen, S.E., 2006. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. **Nat. Genet.** 38:721–725.
- Hoagland D.R. ve Arnon D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil, **California Agricultural Experiment Station Circular** 347:1-32.
<http://www.angelfire.com/vt2/veyis/bugday>
- Jin, W., Li N., Zhang B., Wu F., Li W., Guo A., Deng Z., 2008. Identification and verification of microRNA in wheat (*Triticum aestivum*). **J Plant Res**, 121:351–355
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel D.P. , Bartel B., 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 19–53.
- Kantar, M., Lucas S., Budak H., 2011. miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress, **Planta** .233:471-484.
- Karaboz, İ. ve Çolak C., 2007. Antisens Teknolojisi Orlab On-Line **Mikrobiyoloji Dergisi** Cilt: 05 Sayı: 2 Sayfa: 14-37 [Www.Mikrobiyoloji.Org/Pdf/702070203.Pdf](http://www.Mikrobiyoloji.Org/Pdf/702070203.Pdf)
- Karagüzel, A., Kalay E., Celep F., 2007. RNA İnterferans (Rnai): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları. **Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi** 33 (1) 41-44
- Karakurt, T., Özdamar H., Ünlü H., 2007. Bitkilerde RNAİ'nin Çalışma Mekanizması ve Kullanım Alanları. **Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakltesi.** 14. 05. 2007.
- Keskin, C.B., 2006. Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Absisik Asitle ilişkili Gen Anlatımı **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü** doktora tezi

- Khan, P.S.S.V., Hoffmann L., Renaut J., Hausman J.F. 2007. Current initiatives in proteomics for the analysis of plant salt tolerance. **Current Science** 93:807-817.
- Khanna D., Balgir P.P., Gurloleen K., 2007. RNA Interference: An Ancient Mechanism For Novel Therapeutics, **The Internet Journal of Genomics and Proteomics**. 2 (2). 1- 45.
- Khraiwesh, B., Zhu J.K., 2012 Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1819 137-148 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.05.001>
- Kılıçoğlu, M.Ç., Özkoç İ., 2008. Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler **Zir. Fak. Dergisi**, 23(1):65-72 J. Of Fac. Of Agric., Omu, 2008, 23(1):65-72
- Kidner, C.A. ve Martienssen, R.A., 2005. The developmental role of microRNA in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 8; 38-44.
- Koç, E., Üstün A.S., 2008. Patojenlere Karşı Bitkilerde Savunma Ve Antioksidanlar **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi** 24 (1-2) 82 - 100 ([Http://Fbe.Erciyes.Edu.Tr/](http://Fbe.Erciyes.Edu.Tr/) Issn 1012-2354
- Koptekin, D., Ve Aktaş, J., 2013. Bitki MikroRNA'ları: Biyogenezi, Köken ve Evrimi. **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi** 6 (2): 140-148, ISSN: 1308-0040, E-ISSN: 2146-0132, www.nobel.gen.tr
- Korkut, K. Z., Başer, İ., Dağlıoğlu, O., Bilgin, O., Konyalı, M., 2009. Farklı Kökenli Ekmeklik Buğday Genotiplerinin Tane Verimi ve Kalite Özellikleri Bakımından Karşılaştırılması, **Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi**, 19 – 22 Ekim 2009, 1: 418 – 422, Hatay.
- Kruszka, K., Pieczynski M., Windels D., Bielewicz D., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulinska Z., Vazquez F., 2012. Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. **Journal of Plant Physiology journal homepage:** www.elsevier.de/jplph
- Kubista, M, Andrade JM, Bengtsson M., 2006. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**. 2006 4//;27(2–3):95-125.
- Lawn, D. A. ve Sayre, K. D. 1992. Soilborne pathogens on cereals in a highland location of Mexico. **Plant Dis.**, 76(2): 149-154.

- Liu, J., Cong, B. and Tanksley, S.D., 2003. Generation and Analysis of an Artificial Gene Dosage Series in Tomato to Study the Mechanisms by Which the Cloned Quantitative Trait Locus fw2.2 Controls Fruit Size, **Plant Physiology**, 132:292–299.
- Liu, P.P., Montgomery T.A., Fahlgren N., Kasschau K.D., Nonogaki H., Carrington J.C., 2007. Repression of auxin response factor10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages, **Plant J.** 52 133–146.
- Livak, K.J., ve Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, 25(4):402-408.
- Llorens, A., Hinojo MJ, Mateo R, Gonzalez-Jaen MT, Vale-Algarra FM, Logrieco A, Jimenez M., 2006. Characterization of Fusarium spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). **Int J Food Microbiol** 106:287-306.
- Lu, S, Sun YH, Chiang V.L ., 2008. Stress-responsive microRNAs in Populus. **Plant J** 55: 131–151.
- Lu, Y.T., Li M.Y. , Cheng K.T., Tan C.M., Su L.W., Lin W.Y, Shih H.T., Chiou T.J., Yang J.Y., 2014. Transgenic Plants that Express the Phytoplasma Effector SAP11 Show 13 Altered Phosphate Starvation and Defense Responses . **Plant Physiology Preview**. Published on January 24, 2014, as DOI:10.1104/pp.113.229740
- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J., Waterhous, P.M. 2006. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS Lett.** 580: 2442–2450.
- miRBase son sürüm 12.0, Ocak, 2013. <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.
- miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit-Version 2.4, September 2011
- Navarro, L., Dunoyer P., Jay F., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O., Jones J.D., 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science** 312: 436–439.

- Nelson, P.E., Toussoun TA, Marasa W.F.O., 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Pres, University Park, Pennsylvania.
- Ochman, H., Gerber, A.S., Harte, D.L., 1998. Genetic Application Of An İnverse Polymerase Chain Reaction, **Genetics**, 120:621–5.
- Öncel, İ., keleş Y., 2002. Tuz Stresi Altındaki Buğday Genotiplerinde Büyüme, Pigment İçeriği ve Çözünür Madde Kompozisyonunda Değişmeler C.Ü. **Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi** Cilt 23 Sayı 2
- Özeker, E., 2005. Salisilik Asit ve Bitkiler Üzerindeki Etkileri **Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.**, 42(1):213-223 ISSN 1018-8851
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. **Nature**, 425; 257–263.
- Paolacci, A.R., Tanzarella O.A., Porceddu E., Ciaffi M.,2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat **BMC Molecular Biology** 10:11
- Parida, A.K., ve Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60: 324- 349.
- Park, S. U., Johnson A. G., Penzes-Yost C., Facchini P. J. 1999. “Analysis of promoters from tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberine bridge enzyme genes involved in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy.” **Plant Mol. Biol.** 40, 121 pages,
- Park, W. J. Li, R. Song, J. Messing, X. Chen, L., 2002. “Carpel factory, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*.” **Curr. Biol.** vol. 12, 1495 pages,
- Pfaffl, M.W., 2006. Real Time PCR, ed: Dorak, M.T. Taylor & **Francis Group**.New York,.Pp:67
- Poljakoff-Mayber, A., Gale, J., 1975. *Plants in Saline Environments*. Springer-Verlag, 27, 3109-3114.
- Pritsch, C ve Buchenauer N., 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**13 (2): 159-169.

- Pritsch, C., Muehlbauer G.J., Bushnell W.R., Somers D.A., Vance C.P., 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 13 (2): 159-169.
- Qixin, S., Yingyin Y., Zhongfu N., Guo G., D.J., 2007. Cloning and characterization of small RNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.) [http:// ses.library.usyd.edu.au/bitstream /2123/3488/1/P102. pdf](http://ses.library.usyd.edu.au/bitstream/2123/3488/1/P102.pdf) (Eriřim Tarihi: 11.06.2013)
- Reinhart, B. J., Weinstein E. G., Rhoades M. W., Bartel B., Bartel D.P., 2002. "MicroRNAs in plants." **Genes Dev.** vol.16, 1626 pages,
- Reyes, J.L, Chua N.H., 2007. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. **Plant J** 49: 592–606.
- Sairam, K.R., Rao V.K., Srivastava G.C., 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration, **Plant Science**, 163, 1037-1046
- Sairam, R.K., Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants, **Current Science**, 86 (10): 407-421.
- Samanani, N., Liscombe D. K., Facchini., P. J., 2004. "Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. " **Plant J.** 40, 302 pages
- Saydam, F., Değirmenci, D., Gunes, V., 2011. mikroRNA'lar ve kanser. **Dicle Medical Journal**, 38(1); 113-120.
- Schwab, R., Palatnik J.F., Riester M., Schommer C., Schmid M., Weigel D., 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. **Dev Cell** 8: 517–527.
- Shaghai Maroof, M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. ve Allard R.W., 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81 pp. 8014–8018.
- Shomon, N., Levy C., 2009. MicroRNA-biogenesis and pre-mRNA splicing crosstalk. **J Biomed Biotechnol** . Article ID:594678.doi:10.1155/2009/594678

- Smith, A. M., Sablowski, R., Martin, C., Jones, J., Harberd, N., Dolan, L., Coupland, G., Amey, A., 2009. **Plant Biology. Garland Publishing Inc., London**, Pp: 583
- Soldatini, G. F., Giannini, A., 1985. The Effect of Water and Salt Stress on the Fixation of $^{14}\text{CO}_2$ and on Amino acid Metabolism in Seedlings of Zea Mays
- Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., Joshua-Tor L., 2004. Crystal Structure of Argonaute and its implications for RISC Slicer Activity. **Science** 305:1434-1437
- Subramanian, S., Fu Y., Sunkar, R., Barbazuk, W.B., Zhu, J.K., Yu O., 2008. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots, **BMC Genomics** 9 160.
- Sun, W, Li Y.S.J., Huang H.D., Shyy J.Y.J., Chien S., 2010. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. **Annu Rev Biomed Eng** ;12:1-27
- Sunkar, R., Kapoor A., Zhu J.K., 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. **Plant Cell** 18: 2051–2065
- Sunkar, R., Zhu J.K., 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis, **Plant Cell** 16 . 2001–2019.
- Sunkar, R., Girke T., Jain P.K., Zhu J.K., 2005. “Cloning and characterization of microRNAs from rice.” **Plant Cell** vol, 17, 1411 pages
- Szweykowska- Kulinska, Z., 2003. RNA Interference and Its Role in The Regulation of Eucaryotic Gene Expression, **Acta Biochimica Polonica**, 50 (1), 217- 229
- Taketa, S., Matsuki, K., Amano, S., Saisho, D., Himi, E., Shitsukawa, N., Yuo, T., Noda, K., and Takeda, K. 2010. Duplicate polyphenol oxidase genes on barley chromosome 2H and their functional differentiation in the phenol reaction of spikes and grains, **Journal of Experimental Botany**, p:1 – 11
- Tang, G., Reinhardt B.J., Bartel D.P., Zamore P.D. 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. **Genes and Development** 17: 49–63.
- Tomari, Y., Matranga C., Martinez N., Haley B., Zamore P.D., 2004. A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. **Science** 306:1377-1380:39-46.
- Tosun, M., 2008. Tahıllarda Hastalığa Dayanıklılığın Temelleri. **Ülkesel Tahıl Sempozyumu**, 2-5 Haziran 2008, KONYA

- Tunalı, B., Nicol, J. M., Uçkun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., Hekimhan, H., Aktaş, H., Hodson, D., Akbudak, M., ve Bağcı S.A. 2008. Survey of root and crown rot fungi associated with spring and winter wheat in Turkey. **Plant Dis. Turkish Journal of Agriculture and Forestry Turk J Agric For** 37: © TÜBİTAK doi:10.3906/tar-1206-50
- Ünver, T., Namuth-Covert, D.M., Budak, H., 2009. Review of Current Methodological Approaches for Characterizing MicroRNAs in Plants. **International Journal of Plant Genomics** 1 – 11.
- Ünver, T., Bakar M., Shearman R., Budak H., 2010. Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate application. **Mol Genet Genomics** 283: 397–413.
- Ünver, T., 2008. Detection and Characterization of Plant Genes Involved in Various Biotic and Abiotic Stress Conditions Using DDRT-PCR and Isolation of Interacting Proteins, Middle East Technical University, **Institute of Natural and Applied Sciences**, PhD Thesis, Ankara, .
- Ünver, T. ve Budak H., 2009. Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon* **Planta** (2009) 230:659–669 DOI 10.1007/s00425-009-0974-7.
- Varkonyi-Gasic, E.W.R., Wood M., Walton E.F., Hellens R.P., 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plants Methods**. Oct 12;3(12).
- Vaucheret, H., Vazquez F., Crete P., Bartel D.P., 2004. The action of argonaute1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development, **Genes Dev**. 18 1187–1197.
- Vaziri P.A., Rezaeieh K.A., 2012. Ökaryot Hücrelerde Korunmuş Mikro RNA’lar ve Hedef Transkripsiyonların Faliyetleri. **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi** 5(2):96-98
- Vazquez, F., Blevins T., Ailhas J., Boller T. ve Meins F., 2008. Evolution of Arabidopsis mir genes generates novel microRNA classes **Nucleic Acids Research**, Vol. 36, No. 20 6429–6438 doi:10.1093/nar/gkn670
- Voinnet, O., 2009. Origin, biogenesis and activity of plant micro RNAs. **Cell** 136: 669–687.

- Wang, W., Vinocur, B., Altman A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta** 218: 1–14.
- Wijnhoven, B.P., Michael, M.Z. and Watson, D.I. 2007. microRNAs and cancer. **Br. J.Surg.**, 94; 23-30.
- Williams, L., Grigg S.P., Xie M., Christensen S., Fletcher J.C., 2005. Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes, **Development** 132 3657–3668.
- Woods, S. A., 1996. Salinity Tolerance of Ornamental Trees and Shrubs. Alberta Agriculture, **Food and Rural Development**. <http://www.agric.gov.ab.ca/soil/saltroot.html>.
- Xin, W., Yu W., Yingyin Y., Chaojie X., Huiru, E., Zhongfu N., ve Qixin S., 2010. RDiverse eset of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC Plant Biology** 2010, 10:123 <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/123>
- Winicow, I., 1998. ‘‘New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants’’, **Annals of Botany**, 82: 703-710.
- Xue, G.P., Kooiker, M., Drenth, J., ve McIntyre, C.L., 2011. TaMYB13 is a transcriptional activator of fructosyltransferasegenes involved in b-2,6-linked fructan synthesis in wheat, **The Plant Journal**, 68, 857–870
- Yakıt, S., ve Tuna, A.L., 2006. Tuz stresi altındaki mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) stres parametreleri üzerine Ca, Mg ve K’un etkileri Akdeniz Üniversitesi, **Ziraat Fakültesi Dergisi**, 19 (1): 59-67.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, F., Pilon M., 2007. Regulation of copper homeostasis by microRNA in Arabidopsis. **J Biol Chem** 282: 16369–16378.
- Yanık, H.,Turktaş M., Dundar E., Hernandez P., Dorado G., Ünver T., 2013. Genome-wide identification of alternate bearing-associated microRNAs (miRNAs) in olive (*Olea europaea* L.). **BMC Plant Biology** 13:10.
- Yao Y., Sun Q., 2012. Exploration of small non coding RNAs in wheat (*Triticum aestivum* L.) **Plant Mol Biol** 80:67–73 DOI 10.1007/s11103-011-9835-4

- Yao, Y. Y., Guo G., Ni G., Sunkar R., Du J. K., Zhu J. K., Sun Q. X., 2007. "Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.)." **Genome Biol.** vol. 8, 96 page,
- Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Arikan Terzi, E. S., Uruşak, B. 2010. Bitkilerde Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik ve Biyokimyasal Markörleri. **Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi**, 1 : 1-33.
- Yılmaz, E., A. Tuna L., Bürün B., 2011. Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Gelistirdikleri Tolerans Stratejileri. **C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi** 7.1 47–66
- Yin, Z.J., Shen F.F., 2010. Identification and characterization of conserved microRNAs and their target genes in wheat (*Triticum aestivum*) GMR. **Genet. Mol. Res.** 9 (2): 1186-1196 . DOI 10.4238/vol9-2gmr805
- Yokoi, S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 2002. Salt stress tolerance of plants, **JIRCAS Working Report**, 25-33 .
- Zhang, B.H, Pan, X. P., Wang, Q. L., Cobb, G. P., Anderson, T. A., 2005."Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis." **Cell Res.** vol. 15:5, 360.
- Zhou, X., Sunkar R., Jin H., Zhu J.K., Zhang W., 2009. Genome-wide identification and analysis of small RNAs originated from natural antisense transcripts in *Oryza sativa*, **Genome Res.** 19 70–78.
- Zhou, X., Wang G., Sutoh K., Zhu J-K., Zhang W., 2008. Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis, **Biochim Biophys Acta** 780–788.
- Zhu, J-K., 2005. Understanding and improving salt tolerance in plant, **Crop Science**, 45: 437-448 .
- Zhu, Q.H., Sutoh K., Lui M., ve Guo,G., 2008. A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains **Genome Research** 18:1456–1465 ©2008 by Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISSN 1088-9051/08; www.genome.org

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında İslahiye’de doğdum. İlk, Orta ve Lise’yi Hatay’da okudum. 1993 yılında girdiğim On Dokuz Mayıs Üniversitesi Amasya Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünden 1997 yılında mezun oldum. 2000 yılında Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünden Yüksek Lisans Derecesi alarak mezun oldum. 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoloji Anabilim Dalında doktora başladım. 2013 yılında Gençlik Hizmetleri ve Spor Bakanlığının’da göreve başladım halen bu kurumda görevime devam etmekteyim. Evli ve iki çocuk babasıyım.

EKLER

Buğday çeşitlerine stres uygulamasına bağlı olarak elde edilen miRNA'ların GO gidilerek hedef gen analizleri biyoenformatik olarak yapılmıştır. Tesbit edilen bu hedef genler *F.culmorum* uygulaması sonucu tesbit edilenler EK.1.'de *B.sorokiniana* uygulamasında tesbit edilenler EK.2.'de ve tuz uygulamasında tesbit edilenler EK.3.'de verilirken GO'daki metabolik işlevler ise EK.4.'de verilmiştir

EK.1. *F.culmorum* miRNA'ları, hedef gen ID ve hedef gen adı

miRNA	Hedef gen ID	Hedef gen adı
ath-miR159b	CK212140	histone -like isoform 1
ath-miR2933a	TC410127	hlh dna-binding domain superfamily protein
	BE402949	arginine biosynthesis bifunctional protein chloroplastic-like
	TC421208	pleiotropic drug resistance protein 2
ath-miR3440b-3p	TC453810	2fe-2s ferredoxin
	CD491139	trafficking protein particle complex subunit 11-like
	TC416005	polyamine oxidase
	CJ606073	nad-dependent epimerase dehydratase
ath-miR395b	CA730805	probable beta-d-xylosidase 7-like
	TC379813	autophagy-related protein 18d-like
	TC454269	autophagy-related protein 18a
	TC401715	atp sulfurylase
	TC455080	atp sulfurylase
	CV779320	low affinity sulfate transporter 3-like
ath-miR869.1	TC457607	probable glucuronoxylan glucuronosyltransferase f8h-like
bdi-miR159-3p	TC368630	transcription factor
	TC452060	meiotic recombination protein spo11-2-like
	TC377621	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10
	TC393503	ubiquitin-specific protease 9 isoform 1
cre-miR1168.1	CA740704	starch branching enzyme interacting protein-1
cre-miR1169-3p	TC377014	dof zinc finger protein
	TC417455	gtp-binding nuclear protein ran-3-like
	CK168241	ras-related protein rab-2-a
	CK207579	coatamer subunit epsilon-1-like
csi-miR535	GH725405	cell division protein ftsz-like protein 2- chloroplastic
	GH725405	cell division protein ftsz-like protein 2- chloroplastic
	TC389425	cell division protein homolog 2- chloroplastic-like
gma-miR169j-3p	CA614452	complex 1 protein containing protein
	TC461647	embryo defective 2410 protein
	CA614452	complex 1 protein containing protein
gma-miR171k-5p	CA626027	60s ribosomal protein l19-1-like

gma-miR2119	DR731782	triosephosphate cytosolic
	DR731782	triosephosphate cytosolic
	CJ787314	protein uxt homolog
gma-miR390b-5p	CJ876869	6-phosphofructo-2-kinase fructose- -bisphosphatase-like
	TC392015	fructose-6-phosphate-2-kinase fructose- -bisphosphatase
	TC372366	tubulin alpha-2 chain-like
	TC383267	dna-binding protein phosphatase 2c
gma-miR4386	TC422719	probable beta-d-xylosidase 7-like
	CA717583	light-inducible protein cprf2
gma-miR4402	TC419815	40s ribosomal protein s18
	GD186496	vamp-like protein ykt61-like
gma-miR4409	CA602590	o-acetylserine lyase (oas-tl) isoform a1
	BE412157	protein arabidillo 1
	TC404585	pseudouridylate synthase transporter
	TC417542	pseudouridylate synthase transporter
osa-miR2928	TC446622	probable cellulose synthase a catalytic subunit 5
	BE412157	protein arabidillo 1
	BE412388	protein arabidillo 1
	TC400538	avr9 elicitor response protein
	TC417542	pseudouridylate synthase transporter
gma-miR4411	CA602590	o-acetylserine lyase (oas-tl) isoform a1
gma-miR4412	CA602590	o-acetylserine lyase (oas-tl) isoform a1
gma-miR4413	CA602590	o-acetylserine lyase (oas-tl) isoform a1
gma-miR4418	CA602590	o-acetylserine lyase (oas-tl) isoform a1
gma-miR4424	CA602590	o-acetylserine lyase (oas-tl) isoform a1
gma-miR5674a	TC399588	serine threonine protein kinase
	TC428758	serine threonine protein kinase
	TC377585	ribonucleoprotein chloroplastic-like
	TC398002	ribonucleoprotein a
	TC398002	ribonucleoprotein a
gma-miR5783	TC428175	neutral alpha-glucosidase ab-like
	BE418197	peroxiredoxin q
	CV769684	homoserine o-acetyltransferase isoform 4
	CV771942	dnaj domain containing protein
	TC414153	protein transport protein sec61 gamma subunit
gma-miR5784	CV769684	homoserine o-acetyltransferase isoform 4
hbr-miR408a	TC368737	ethylene-responsive transcription factor rap2-4-like
	TC391668	dre binding factor 2
	TC425977	tpa: ap2 erebp transcription factor superfamily protein
	TC403779	transmembrane expressed
hbr-miR6170	TC371123	syntaxin 81
	CA498724	alanine aminotransferase
	CV771056	udp-glucose 6- expressed
	TC388404	nadh:ubiquinone oxidoreductase family protein

	TC461316	chaperone protein chloroplastic-like
hbr-miR6172	CA498724	alanine aminotransferase
hvu-miR6180	CJ585879	calcium-dependent protein kinase
	CA618751	atp sulfurylase
	CJ585879	calcium-dependent protein kinase
	TC393999	ankyrin repeat-containing protein at3g12360-like
mdm-miR169e	BE515656	transcription elongation regulator
	BJ317107	respiratory burst oxidase homolog protein b-like
	CA622058	protein kinase
	CJ774802	pto kinase interactor 1
	DR733839	pto kinase interactor 1
	TC427326	pto kinase interactor 1
	BJ317107	respiratory burst oxidase homolog protein b-like
mdm-miR319c	CK216093	ubiquitin-conjugating enzyme e2 36
	CA617854	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase fab1c-like
	TC408661	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase fab1c-like
mdm-miR3627a	CA618136	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha-like
	CA622222	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha-like
mtr-miR2592s-3p	TC373133	beta-glucosidase 6
	CA622562	two-component response regulator-like prr73
	CD928201	protein maternal effect embryo arrest 13
	TC372723	rna-binding protein 39
	CA622562	two-component response regulator-like prr73
mtr-miR2679a	TC368548	sucrose-phosphate synthase
	CV767044	60s ribosomal protein l6
mtr-miR5208a	TC421268	beta-cyanoalanine synthase
	TC386518	vacuolar-processing enzyme
	TC391995	vacuolar-processing enzyme-like
	TC417644	vacuolar processing enzyme 1
osa-miR1427	CV775813	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
	TC408247	translation factor guf1 mitochondrial-like
osa-miR1439	TC370181	calmodulin
	TC379298	geranylgeranyl diphosphate chloroplastic-like
	TC369361	calmodulin
osa-miR159f	TC442914	cytochrome p450 71c2
osa-miR164e	CA642340	nac domain-containing protein 21 22
	TC371535	nac domain-containing protein 21 22
	TC370694	mitogen-activated protein kinase 4
	TC371551	mitogen-activated protein kinase 4
	TC398164	mitogen-activated protein kinase 4
osa-miR1869	CK162380	copine family isoform 1
osa-miR1877	TC452174	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	TC408224	trimethylguanosine synthase
osa-miR2093-5p	TC438706	tpa: lstk-1-like -related protein kinase family protein

osa-miR2867-3p	CD454144	disease resistance protein rga3-like
osa-miR2918	CK201915	nadh dehydrogenase
osa-miR2928	TC450088	30s ribosomal protein s17
osa-miR2929	TC450088	30s ribosomal protein s17
osa-miR2930	TC461535	30s ribosomal protein s17
osa-miR2931	TC461535	30s ribosomal protein s17
	CA633311	root peroxidase
	CA682798	root peroxidase
osa-miR2928	TC402694	peroxidase 15-like
osa-miR2928	CK201915	nadh dehydrogenase
	TC407802	hypothetical protein F775_06788
	TC420067	hypothetical protein F775_06788
osa-miR2929	TC450088	30s ribosomal protein s17
osa-miR2930	TC461535	30s ribosomal protein s17
	CA633311	root peroxidase
	CA682798	root peroxidase
	CA695783	root peroxidase
osa-miR319a-3p.2-3n	DR737260	vacuolar protein sorting-associated protein 29-like
osa-miR390-5p	TC378536	probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at1g63430-like
	BI750871	cytochrome p450 71a1-like
osa-miR5338	TC392637	acyl carrier protein mitochondrial-like
	TC403841	acyl carrier protein
	TC421122	acyl carrier protein mitochondrial-like
osa-miR5510	CJ810181	scl1 protein
	TC390011	ccaat-binding transcription factor family protein
	BQ483771	acylamino-acid-releasing isoform 1
osa-miR5819	CA719798	predicted protein
	CA622479	autophagy-related protein 8c-like
	CV768717	translocon-associated protein subunit beta-like
osa-miR5832	TC393887	bel1-like homeodomain protein 6-like isoform x1
	TC434600	wall-associated receptor kinase 5
ppt-miR1057	CV770963	beta-glucosidase 6
	TC370183	beta-glucosidase 6
	TC379533	beta-glucosidase 6
	TC417770	beta-glucosidase 6
	TC400867	ubiquitin-conjugating enzyme e2-17 kda
ppt-miR901	CA623473	sucrose synthase
	TC385595	cytochrome partial
ptc-miR169b-3p	TC415051	#AD?
	TC437786	e3 ubiquitin-protein ligase keg
	TC437129	peroxidase n-like
ptc-miR482c-5p	TC458339	origin recognition complex subunit 4-like
sbi-miR5565d	TC375293	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase pasticcinol-like
sbi-miR6228-5p	TC375959	ubiquitin-conjugating enzyme e2 10

	TC435381	ubiquitin-conjugating enzyme e2 10
	TC447325	ubiquitin-conjugating enzyme e2
vvi-miR3624-5p	TC373648	histone acetyltransferase gcn5-like
	TC373648	histone acetyltransferase gcn5-like
	TC375113	histone acetyltransferase gcn5-like
	TC409573	disease resistance protein rpp13
vvi-miR3626-3p	TC454539	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	TC413249	protein argonaute 1b
	TC388487	uncharacterized mscl family protein at1g78610-like
	TC416436	mechanosensitive ion channel
zma-miR169a-3p	TC370825	oxygen-evolving enhancer protein 3- chloroplastic
	TC370825	oxygen-evolving enhancer protein 3- chloroplastic
	TC428564	werner syndrome-like exonuclease-like
zma-miR169r-3p	CK206459	gds1 esterase lipase at2g04570-like
	TC370230	acyl- n-acyltransferases superfamily
	TC378598	acyl- n-acyltransferases-like protein
	CJ879342	uncharacterized wd repeat-containing

EK.2. *B.sorokiniana* miRNA'lar, Hedef gen ID ve Hedef gen adı

miRNA adı	Hedef gen ID	Hedef gen adı
ath-miR869.1	TC457607	probable glucuronoxylan glucuronosyltransferase f8h-like
cre-miR1169-3p	CJ816283	leucine-rich repeat receptor-like serine threonine-protein kinase bam1-like
	TC417455	gtp-binding nuclear protein ran-a1
gma-miR4398	TC439621	ubiquitin conjugating enzyme 2
gma-miR482e	TC446646	f-box lrr-repeat protein 3-like
	CJ624314	auxin response factor 18-like
	TC405360	protein wax2
	TC458828	myrosinase-binding at1g52030-like
mtr-miR2592s-3p	CA622562	two-component response regulator-like prr73
	CA622562	two-component response regulator-like prr73
	CD928201	protein maternal effect embryo arrest 13
	TC372723	rna-binding protein 39
	CA622562	two-component response regulator-like prr73
mtr-miR2634	TC452686	mitochondrial substrate carrier family protein b-like
	CA609890	mitochondrial adenine nucleotide transporter adnt1-like
	TC404543	cationic peroxidase 1-like
	TC419162	mitochondrial substrate carrier family protein b-like
	TC452686	mitochondrial substrate carrier family protein b-like
osa-miR1427	CV775813	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
	CV775813	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
	TC408247	translation factor guf1 mitochondrial-like
osa-miR1881	TC382217	cap-binding protein
	TC394027	eukaryotic translation initiation factor 4e type 3
	TC403176	cap-binding protein
osa-miR319a-3p.2-3p	DR737260	vacuolar protein sorting-associated protein 29-like
osa-miR528-5p	CK213042	guanine deaminase
	TC444511	cytidine deoxycytidylate deaminase family protein
osa-miR5525	CA486358	carbon catabolite-derepressing protein kinase
osa-miR5836	CK200358	40s ribosomal protein s3
	TC402934	protein strubbelig-receptor family 8-like

osa-miR6253	TC453077	sex determination protein tasselseed-2
ppt-miR894	TC437472	serine threonine-protein phosphatase pp2a-3 catalytic subunit
ptc-miR169b-3p	CJ645529	ribosomal rna large subunit methyltransferase n
ptc-miR477d-3p	CK200081	acyltransferase-like protein
	CV762945	calcium-transporting atpase plasma membrane-type
	TC382042	cyclase family protein isoform 1
	CA618699	60s ribosomal protein l37
ssl-miR398	CA650645	superoxide dismutase 2
	CA663864	copper zinc-superoxide dismutase
	CA614433	superoxide dismutase 2
	CA635382	cytosolic cu zn superoxide dismutase

EK 3. Tuz stresi miRNA'lar,Hedef gen ID ve Hedef gen adı

miRNA adı	Hedef gen ID	Hedef genin(Target) adı
ath-miR3440b-3p	CK159784	bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
	CD491139	trafficking protein particle complex subunit 11-like
ath-miR5021	TC385548	plasma membrane atpase 1-like
	TC453475	probable glucuronosyltransferase os01g0926700-like
	TC373827	short-chain dehydrogenase tic chloroplastic-like
	TC430935	hydroxymuconic semialdehyde hydrolase
	TC385548	plasma membrane atpase 1-like
ath-miR5655	TC392664	transcription factor bhlh135-like
	TC402489	transcription factor bhlh135-like
bdi-miR319b-3p	DR737260	vacuolar protein sorting-associated protein 29-like
	CK212140	histone -like isoform 1
cca-miR396c	TC370920	protein disulfide isomerase-like 2-1-like
	TC376383	transcription factor hbp-1a
	CK160760	gem-like protein 1-like
cca-miR6108f	TC387448	ring fyve phd zinc finger superfamily isoform 1
	TC371879	cortical cell-delineating protein precursor
hci-miR156a	TC383766	beta-carotene hydroxylase
	TC408973	beta-carotene hydroxylase
	TC383766	beta-carotene hydroxylase
hvu-miR5049a	TC419590	60s ribosomal protein l36
	TC419590	60s ribosomal protein l36
	CA623472	histidine kinase
	TC385447	retrotransposon unclassified
miR159c	TC397964	heat shock protein 70
	TC420191	subtilisin-like protease-like
	TC408925	catalytic hydrolase
miR395h	TC425185	tetrapyrrole-binding chloroplastic-like
	CV761940	atp sulfurylase
mtrmiR5227	CK214507	protein
	TC416575	protein dr1 homolog
mtrmiR5266	TC451145	protein wax2-like
	BG908514	glutamate receptor -like
nta-miR156f	BE445081	wrky transcription factor 71
osamiR160f-3p	CA660220	metal transporter nramp2-like
osamiR164d	TC370694	mitogen-activated protein kinase 4
	TC371551	mitogen-activated protein kinase 4
osa-miR169a	BJ268074	subtilisin-like protease
	CA664884	photosystem ii 10 kda chloroplastic
	NP958308	ccaat-box transcription factor complex whap9
	TC430923	ccaat-box transcription factor complex whap6
osa-miR172b	CA486144	ap2 erebp transcription factor superfamily protein
	GH725141	succinyl- ligase
	TC389631	dnaj homolog mitochondrial-like
	TC401083	ethylene-responsive transcription factor rap2-7-like

	TC413366	protein
osa-miR396a-3p	CA655664	ribulose- -bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit
osa-miR444b.2	CJ670763	f-box protein at1g78280-like
	TC424265	mads-box transcription factor 27-like
osa-miR5076	TC427541	wd repeat-containing protein dwa1-like
	AL815801	gag-pol precursor
osa-miR529b	TC406943	e3 ubiquitin-protein ligase rnf14-like
	TC440258	30s ribosomal protein chloroplastic-like
pab-miR3710	TC379923	vamp protein sec22
	TC379923	vamp protein sec22
peu-miR2916	BJ308797	histone -like
	BJ252408	rrna intron-encoded homing endonuclease
ppt-miR1074	TC391471	malate dehydrogenase
	TC397335	aspartate aminotransferase
ptc-miR156l	TC430081	anaphase-promoting complex subunit 5-like
	TC421513	phospholipase d alpha 2
	TC368622	fatty acyl coa reductase
ptc-miR164f	TC387394	two-component response regulator arr4-like
	TC436881	two-component response regulator arr4-like
rgl-miR164	CK154749	thiol protease
	TC382632	papain-like cysteine proteinase
	CA681677	vesicle transport protein got1b-like
sbi-miR6222-3p	BE418862	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100825116
smo-miR156d	TC369946	endochitinase a-like
	CA685563	retrotransposon unclassified
tae-miR1134	TC402631	transmembrane protein kinase
	TC416929	protein arginine n-methyltransferase 5
tae-miR395b	CV759442	subtilisin-like protease
	TC370044	ribosomal protein l19
vvi-miR156e	TC410508	uncharacterized loc101204893
	TC453315	uncharacterized loc101204893
vvi-miR167c	TC422705	superkiller viralicidic activity 2-like 2-like
vvi-miR172a	TC391656	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 2-like
	TC391656	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 2-like
zma-miR156k-5p	TC398965	l-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase-like isoform x1
zma-miR164b-3p	CA730805	probable beta-d-xylosidase 7-like
	CV780344	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6-like
zma-miR164c-3p	TC432145	transaldolase 1
zma-miR169d	TC411029	polyol transporter 5-like

EK 4 Biyotik ve Abiyotik strese tesbit edilen miRNA GO numarsı ve genel işlevleri

miRNA'lar	GO Numarsı	General işlevleri
ath-miR869.1	GO:0008152	metabolic process
cre-miR1169-3p	GO:0009069	serine family amino acid metabolic process
	GO:0006468	protein phosphorylation
	GO:0007264	small GTPase mediated signal transduction
	GO:0015031	protein transport
	GO:0006890	retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER
gma-miR4398	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process
	GO:0006522	alanine metabolic process
	GO:0006531	aspartate metabolic process
	GO:0006833	water transport
gma-miR482e	GO:0009407	toxin catabolic process
	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process

	GO:0016567	protein ubiquitination
	GO:0009734	auxin mediated signaling pathway
	GO:0010025	wax biosynthetic process
	GO:0055114	oxidation-reduction process
	GO:0006508	proteolysis
mtr-miR2592s-3p	GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent
	GO:0000160	phosphorelay signal transduction system
	GO:0009793	embryo development ending in seed dormancy
	GO:0006397	mRNA processing
	GO:0035556	intracellular signal transduction
	GO:0045449	regulation of transcription, DNA-dependent
mtr-miR2634	GO:0006096	glycolysis
	GO:0006098	pentose-phosphate shunt
	GO:0055114	oxidation-reduction process
	GO:0006804	peroxidase reaction
	GO:0080121	AMP transport
osa-miR1427	GO:0008152	metabolic process
	GO:0050896	response to stimulus
	GO:0045727	positive regulation of translation
	GO:0006184	GTP catabolic process
	GO:0006448	regulation of translational elongation
osa-miR1881	GO:0006446	regulation of translational initiation
osa-miR319a-3p.2-3p	GO:0061025	membrane fusion
	GO:0080129	proteasome core complex assembly
	GO:0009853	photorespiration
	GO:0008333	endosome to lysosome transport
	GO:0016192	vesicle-mediated transport
osa-miR528-5p	GO:0006144	purine nucleobase metabolic process
	GO:0008152	metabolic process
	GO:0006206	pyrimidine nucleobase metabolic process
	GO:0009972	cytidine deamination
osa-miR5525	GO:0006468	protein phosphorylation
	GO:0009069	serine family amino acid metabolic process
osa-miR5836	GO:0042254	ribosome biogenesis
	GO:0006412	translation
	GO:0006468	protein phosphorylation
osa-miR6253	GO:0050794	regulation of cellular process
	GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process
	GO:0044238	primary metabolic process
ppt-miR894	GO:0006470	protein dephosphorylation
ptc-miR169b-3p	GO:0070475	rRNA base methylation
	GO:0030488	tRNA methylation
	GO:0055114	oxidation-reduction process
	GO:0006804	peroxidase reaction
	GO:0006979	response to oxidative stress
ptc-miR477d-3p	GO:0008152	metabolic process
	GO:0007338	single fertilization
	GO:0006412	translation
ssl-miR398	GO:0055114	oxidation-reduction process
	GO:0046686	response to cadmium ion
	GO:0006950	response to stress
	GO:0006094	gluconeogenesis
	GO:0006096	glycolysis
vvi-miR3624-5p	GO:0006468	protein phosphorylation
	GO:0045727	positive regulation of translation

	GO:0000085	G2 phase of mitotic cell cycle
	GO:0009908	flower development
	GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-dependent
	GO:0016571	histone methylation
miRNA'lar	GO numarsı	General işlevler
ath-miR159b	GO:0006334	metabolic process
ath-miR2933a	GO:0009555	developmental process
	GO:0048657	gene expression
	GO:0006355	reproductive process
	GO:0006810	transport
ath-miR3440b-3p	GO:0048868	developmental process
	GO:0034645	metabolic process
	GO:0044723	metabolic process
	GO:0042742	response to stimulus
	GO:0009737	response to stimulus
ath-miR395b	GO:0005975	carbohydrate metabolism
	GO:0000045	Cellular process
	GO:0008272	transport
	GO:0055085	transport
ath-miR447c-3p	GO:0006094	carbohydrate metabolism
	GO:0007010	developmental process
	GO:0000085	metabolic process
	GO:0001510	RNA metabolic process
ath-miR869.1	GO:0008152	metabolic process
bdi-miR159-3p	GO:0030154	Cellular process
	GO:0007155	Cellular process
cre-miR1168.1	GO:0006821	transport
cre-miR1169-3p	GO:0006355	gene expression
	GO:0006184	metabolic process
	GO:0006406	transport
csi-miR535	GO:0010020	Cellular process
	GO:0006184	metabolic process
gma-miR169j-3p	GO:0008152	metabolic process
	GO:0009987	metabolic process
	GO:0032259	metabolic process
	GO:0044707	metabolic process
	GO:0055114	oxidation-reduction process
	GO:0006626	protein metabolism
gma-miR171k-5p	GO:0006412	metabolic process
	GO:0006090	metabolic process
	GO:0009750	response to stimulus
	GO:0009749	response to stimulus
	GO:0009744	response to stimulus
	GO:0010359	transport
gma-miR2119	GO:0006094	carbohydrate metabolism
	GO:0006096	carbohydrate metabolism
	GO:0006098	carbohydrate metabolism
	GO:0006970	response to stimulus
	GO:0044699	response to stimulus
gma-miR390b-5p	GO:0006003	carbohydrate metabolism
	GO:0006000	carbohydrate metabolism
	GO:0016310	metabolic process
	GO:0006468	protein metabolism
	GO:0006470	protein metabolism
	GO:0043609	regulation of carbon utilization

gma-miR4386	GO:0005975	carbohydrate metabolism
	GO:0006355	gene expression
gma-miR4402	GO:0042254	Cellular process
	GO:0006412	metabolic process
	GO:0016192	transport
gma-miR4409	GO:0006094	carbohydrate metabolism
	GO:0006096	carbohydrate metabolism
	GO:0019288	metabolic process
osa-miR2928	GO:0030244	metabolic process
	GO:0006511	protein metabolism
	GO:0016567	protein metabolism
	GO:0006810	transport
gma-miR4411	GO:0007030	Cellular process
gma-miR4412	GO:0009805	developmental process
gma-miR4413	GO:0006535	metabolic process
	GO:0019761	metabolic process
	GO:0007568	metabolic process
	GO:0009684	metabolic process
	GO:0009853	metabolic process
gma-miR4418	GO:0006972	response to stimulus
	GO:0046686	response to stimulus
	GO:0009651	response to stimulus
	GO:0010043	response to stimulus
gma-miR4424	GO:0006816	transport
	GO:0006833	transport
gma-miR5674a	GO:0006468	protein metabolism
	GO:0009409	response to stimulus
gma-miR5783	GO:0005975	carbohydrate metabolism
	GO:0006725	metabolic process
	GO:0034641	metabolic process
	GO:0007623	rhythmic process
	GO:0006364	RNA metabolic process
gma-miR5784	GO:0007623	rhythmic process
hbr-miR408a	GO:0006355	gene expression
	GO:0055085	transport
hbr-miR6170	GO:0000226	Cellular process
	GO:0000226	Cellular process
	GO:0048443	developmental process
	GO:0006508	protein metabolism
	GO:0048440	reproductive process
	GO:0010228	reproductive process
	GO:0080167	response to stimulus
	GO:0009734	signal transduction
	GO:0016192	transport
hbr-miR6172	GO:0046686	response to stimulus
	GO:0001666	response to stimulus
hvu-miR6180	GO:0019252	carbohydrate metabolism
	GO:0000103	metabolic process
	GO:0006468	protein metabolism
	GO:0009651	response to stimulus
mdm-miR169e	GO:0009294	metabolic process
	GO:0055114	metabolic process
	GO:0009408	oxidation-reduction process
	GO:0008380	RNA metabolic process
mdm-miR319c	GO:0006301	developmental process

mdm-miR3627a	GO:0006511	protein metabolism
	GO:0010039	response to stimulus
	GO:0006002	carbohydrate metabolism
	GO:0006096	carbohydrate metabolism
mtr-miR2592s-3p	GO:0006002	carbohydrate metabolism
	GO:0009744	response to stimulus
	GO:0005975	carbohydrate metabolism
	GO:0035556	gene expression
mtr-miR2679a	GO:0009793	reproductive process
	GO:0006397	RNA metabolic process
	GO:0000160	signal transduction
	GO:0006355	signal transduction
mtr-miR5208a	GO:0005986	carbohydrate metabolism
	GO:0006412	metabolic process
	GO:0006096	carbohydrate metabolism
	GO:0006096	carbohydrate metabolism
osa-miR1427	GO:0006535	developmental process
	GO:0019761	metabolic process
	GO:0042744	metabolic process
	GO:0009684	metabolic process
	GO:0009266	response to stimulus
	GO:0006833	transport
	GO:0006003	carbohydrate metabolism
	GO:0006000	carbohydrate metabolism
	GO:0016310	metabolic process
	GO:0045040	protein metabolism
	GO:0008152	metabolic process
	GO:0006184	metabolic process
osa-miR1439	GO:0045727	metabolic process
	GO:0006414	metabolic process
	GO:0050896	response to stimulus
	GO:0006084	metabolic process
osa-miR159f	GO:0015995	metabolic process
	GO:0019344	metabolic process
	GO:0055114	oxidation-reduction process
	GO:0009846	reproductive process
osa-miR164e	GO:0019722	signal transduction
	GO:0055114	oxidation-reduction process
	GO:0006355	gene expression
	GO:0007623	gene expression
osa-miR1869	GO:0006468	protein metabolism
	GO:0051607	response to stimulus
	GO:0009735	response to stimulus
	GO:0009987	metabolic process
osa-miR1877	GO:0006096	carbohydrate metabolism
	GO:0048316	developmental process
	GO:0055114	oxidation-reduction process
	GO:0042742	response to stimulus
osa-miR2093-5p	GO:0001510	RNA metabolic process
	GO:0009452	RNA metabolic process
	GO:0006468	protein metabolism
	GO:0006952	response to stimulus
osa-miR2867-3p	GO:0022900	metabolic process
osa-miR2928	GO:0009853	metabolic process
osa-miR2928	GO:0009965	metabolic process

osa-miR2928	GO:0016117	metabolic process
osa-miR2931	GO:0006412	metabolic process
	GO:0055114	oxidation-reduction process
osa-miR2928	GO:0055114	oxidation-reduction process
osa-miR2928	GO:0006511	protein metabolism
	GO:0045040	protein metabolism
osa-miR2928	GO:0045040	protein metabolism
osa-miR2929	GO:0009793	reproductive process
osa-miR2930	GO:0009793	reproductive process
	GO:0006979	response to stimulus
osa-miR2928	GO:0006952	response to stimulus
osa-miR2928	GO:0006972	response to stimulus
osa-miR2928	GO:0046686	response to stimulus
osa-miR2928	GO:0051707	response to stimulus
osa-miR2928	GO:0006979	response to stimulus
	GO:0009631	response to stress
	GO:0006833	transport
osa-miR319a-3p.2-3p	GO:0001881	response to stimulus
osa-miR319a-3p.2-3p	GO:0051788	signal transduction
osa-miR319a-3p.2-3p	GO:0008333	transport
osa-miR319a-3p.2-3p	GO:0016192	transport
osa-miR390-5p	GO:0008152	metabolic process
	GO:0055114	oxidation-reduction process
	GO:0006468	protein metabolism
osa-miR5338	GO:0006633	developmental process
	GO:0042335	metabolic process
	GO:0000038	metabolic process
	GO:0006415	metabolic process
	GO:0006633	metabolic process
	GO:0009409	response to stimulus
	GO:0051607	response to stimulus
osa-miR5510	GO:0006355	gene expression
	GO:0006351	gene expression
	GO:0006508	protein metabolism
osa-miR5819	GO:0000272	carbohydrate metabolism
	GO:0006914	Cellular process
	GO:0006355	gene expression
	GO:0006281	metabolic process
	GO:0046939	metabolic process
	GO:0032258	protein metabolism
osa-miR5832	GO:0006355	gene expression
	GO:0006468	protein metabolism
ppt-miR1057	GO:0005975	carbohydrate metabolism
	GO:0005975	carbohydrate metabolism
	GO:0042023	metabolic process
	GO:0043161	protein metabolism
	GO:0016567	protein metabolism
	GO:0006468	protein metabolism
	GO:0010286	response to stimulus
	GO:0051788	response to stimulus
ppt-miR901	GO:0008152	metabolic process
	GO:0015979	metabolic process
ptc-miR169b-3p	GO:0006096	carbohydrate metabolism
	GO:0010118	developmental process
	GO:0009555	metabolic process

ptc-miR482c-5p	GO:0016310	metabolic process
	GO:0030488	RNA metabolic process
	GO:0008283	developmental process
	GO:0045132	metabolic process
	GO:0006346	metabolic process
sbi-miR5565d	GO:0051567	protein metabolism
	GO:0009560	reproductive process
	GO:0006396	RNA metabolic process
	GO:0000226	Cellular process
	GO:0030154	Cellular process
sbi-miR6228-5p	GO:0000911	developmental process
	GO:0030010	developmental process
	GO:0009735	response to stimulus
	GO:0010048	response to stimulus
	GO:0051510	Cellular process
vvi-miR3624-5p	GO:0061025	Cellular process
	GO:0043248	Cellular process
	GO:0051510	Cellular process
	GO:0061025	Cellular process
	GO:0042023	metabolic process
vvi-miR3626-3p	GO:0006635	metabolic process
	GO:0000085	developmental process
	GO:0009908	developmental process
	GO:0000085	developmental process
	GO:0045893	response to stimulus
zma-miR169a-3p	GO:0006952	response to stimulus
	GO:0006006	carbohydrate metabolism
	GO:0048513	developmental process
	GO:0044767	response to stimulus
	GO:0055085	transport
zma-miR169r-3p	GO:0000023	carbohydrate metabolism
	GO:0006098	carbohydrate metabolism
	GO:0019252	carbohydrate metabolism
	GO:0009767	metabolic process
	GO:0006139	metabolic process
miRNA'lar	GO:0043085	positive regulation of catalytic activity
	GO:0006629	metabolic process
	GO:0008152	metabolic process
	GO:0008152	metabolic process
	GO:0006457	protein metabolism
ath-miR3440b-3p	GO numarsı	Genel işlevler
ath-miR5021	GO:0008150	biological_process
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0005975	nucleobase-containing compound metabolic process
	GO:0006412	translation
	GO:0009058	biosynthetic process
ath-miR5655	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
	GO:0006810	transport
	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis
	GO:0009056	catabolic process
bdi-miR319b-3p	GO:0007049	cell cycle
	GO:0009790	embryo development
	GO:0007165	signal transduction
	GO:0009058	biosynthetic process

cca-miR396c	GO:0009056	catabolic process
	GO:0016043	cellular component organization
	GO:0009987	cellular process
	GO:0008152	metabolic process
	GO:0019538	protein metabolic process
	GO:0009607	response to biotic stimulus
	GO:0006950	response to stress
	GO:0007165	signal transduction
	GO:0006810	transport
	GO:0008150	biological_process
cca-miR6108f	GO:0007049	cell cycle
	GO:0019725	cellular homeostasis
	GO:0009987	cellular process
	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0009056	catabolic process
	GO:0016043	cellular component organization
	GO:0009987	cellular process
	GO:0009987	cellular process
	GO:0006464	cellular protein modification process
hci-miR156a	GO:0006629	lipid metabolic process
	GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process
	GO:0019538	protein metabolic process
	GO:0006810	transport
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0009987	cellular process
	GO:0006629	lipid metabolic process
	GO:0019748	secondary metabolic process
	GO:0009056	catabolic process
hvu-miR5049a	GO:0016043	cellular component organization
	GO:0009987	cellular process
	GO:0006810	transport
	GO:0008150	biological_process
mdm-miR159c	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
	GO:0006950	response to stress
	GO:0007165	signal transduction
mtr-miR395h	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis
	GO:0008150	biological_process
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
mtr-miR5227	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0006810	transport
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
mtr-miR5266	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0009987	cellular process
	GO:0006629	lipid metabolic process
	GO:0008152	metabolic process
	GO:0007165	signal transduction
	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0006412	translation
	GO:0006810	transport

nta-miR156f osa-miR160f-3p	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0008150	biological_process
	GO:0019725	cellular homeostasis
	GO:0009987	cellular process
	GO:0008152	metabolic process
	GO:0009607	response to biotic stimulus
osa-miR164d	GO:0006810	transport
	GO:0006464	cellular protein modification process
	GO:0009607	response to biotic stimulus
	GO:0007165	signal transduction
osa-miR169a	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0008150	biological_process
	GO:0009056	catabolic process
	GO:0009987	cellular process
osa-miR172b	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis
	GO:0008150	biological_process
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
	GO:0009056	catabolic process
	GO:0016043	cellular component organization
	GO:0009987	cellular process
	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
osa-miR396a-3p	GO:0008152	metabolic process
	GO:0015979	photosynthesis
	GO:0008150	biological_process
	GO:0007049	cell cycle
	GO:0016043	cellular component organization
osa-miR444b.2	GO:0006950	response to stress
	GO:0007165	signal transduction
	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0006464	cellular protein modification process
	GO:0006259	DNA metabolic process
	GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process
	GO:0006950	response to stress
	GO:0007165	signal transduction
osa-miR5076	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0016043	cellular component organization
	GO:0009987	cellular process
	GO:0006464	cellular protein modification process
	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0006412	translation
	GO:0006810	transport
	GO:0009607	response to biotic stimulus
	GO:0006950	response to stress
	GO:0016043	cellular component organization
peu-miR2916	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy
	GO:0000003	reproduction
ppt-miR1074	GO:0008150	biological_process
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
	GO:0009056	catabolic process
	GO:0006519	cellular amino acid metabolic process
ptc-miR156l	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis

ptc-miR164f	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0009056	catabolic process
	GO:0016049	cell growth
	GO:0006519	cellular amino acid metabolic process
	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0008150	biological_process
	GO:0008150	biological_process
	GO:0009628	response to abiotic stimulus
rgl-miR164	GO:0009719	response to endogenous stimulus
	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0009056	catabolic process
	GO:0009987	cellular process
sbi-miR6222-3p	GO:0019538	protein metabolic process
	GO:0006810	transport
	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
smo-miR156d	GO:0009056	catabolic process
	GO:0006259	DNA metabolic process
	GO:0009790	embryo development
	GO:0008152	metabolic process
tae-miR1134	GO:0006350	transcription, DNA-dependent
	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis
	GO:0008150	biological_process
	GO:0009058	biosynthetic process
tae-miR395b	GO:0008150	biological_process
	GO:0009056	catabolic process
	GO:0019538	protein metabolic process
	GO:0006412	translation
vvi-miR156e	GO:0007049	cell cycle
	GO:0007049	cell cycle
	GO:0016043	cellular component organization
	GO:0009987	cellular process
vvi-miR167c	GO:0008150	biological_process
	GO:0030154	cell differentiation
	GO:0016043	cellular component organization
	GO:0009987	cellular process
vvi-miR172a	GO:0006810	transport
	GO:0009056	catabolic process
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
	GO:0009987	cellular process
zma-miR156k-5p	GO:0006629	lipid metabolic process
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process
	GO:0009056	catabolic process
zma-miR164b-3p	GO:0009987	cellular process
	GO:0015979	photosynthesis
	GO:0009791	post-embryonic development
	GO:0009606	tropism
zma-miR164c-3p	GO:0008150	biological_process
	GO:0009058	biosynthetic process
	GO:0006412	translation
	GO:0009987	cellular process
zma-miR169d	GO:0009987	cellular process
	GO:0006810	transport
