

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARUL MOZAİK VİRÜSÜ, MARUL NEKROTİK
BODURLUK VİRÜSÜ VE MARUL NEKROTİK SARILIK
VİRÜSÜ'NÜ HEDEFLEYEN miRNA'LARIN *IN SILIKO*
YAKLAŞIMLARLA BELİRLENMESİ

Eda ÖZKESER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Sevgi MARAKLI

Temmuz, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MARUL MOZAİK VİRÜSÜ, MARUL NEKROTİK
BODURLUK VİRÜSÜ VE MARUL NEKROTİK SARILIK
VİRÜSÜ'NÜ HEDEFLEYEN miRNA'LARIN *IN SILIKO*
YAKLAŞIMLARLA BELİRLENMESİ**

Eda ÖZKESER tarafından hazırlanan tez çalışması 25.07.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sevgi MARAKLI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Sevgi MARAKLI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emre YÖRÜK, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Doç. Dr. Hilal AY, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Sevgi MARAKLI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Marul Mozaik Virüsü, Marul Nekrotik Bodurluk Virüsü ve Marul Nekrotik Sarılık Virüsü’nü Hedefleyen miRNA’ların *In Siliko* Yaklaşımlarla Belirlenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Eda ÖZKESER

İmza



Sevdiklerime

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmam süresince engin bilgilerini benden esirgemeyen, beni her zaman hoşgörü ile karşılayan ve yol gösteren değerli hocam, tez danışmanım sayın Doç. Dr. Sevgi MARAKLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte beni yalnız bırakmayan değerli laboratuvar arkadaşlarım Perihan YİĞİT, Esranur GÜLTEKİN ve Kübra ERGÜN'e destekleri ve arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

Son olarak hayatımda desteklerini benden esirgemeyen ve benim için her daim en iyisini isteyen değerli annem Sibel NOMAN ÖZKESER'e ve değerli babam Yavuz ÖZKESER'e; sevgili kardeşim İlayda ÖZKESER'e; tez çalışmam boyunca moral, neşe ve motivasyon kaynağım olan çok kıymetli köpeğim Magic'e; sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Eda ÖZKESER

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Marul Bitkisi (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	4
2.2 Marul Virüsleri.....	4
2.2.1 Marul Mozaik Virüsü (LMV).....	5
2.2.2 Marul Nekrotik Bodurluk Virüsü (LNSV)	7
2.2.3 Marul Nekrotik Sarılık Virüsü (LNYV)	8
2.3 RNAi Mekanizması ve miRNA'lar.....	9
3 MATERYAL VE METOD	13
3.1 Bitki mikroRNA'larının Elde Edilmesi	13
3.2 BLAST Analizi	13
3.3 Yanlış Eşleşme Eleme Süreci	14
3.4 RNAfold Analizi	14
3.5 Viral Genomların Eldesi ve Anotasyonu	15
3.6 Virüs Genomlarında Hedef Tahmini.....	15
4 BULGULAR	17
4.1 Bitki miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi	17
4.2 BLAST Analizleri ve Eliminasyon Süreci.....	22
4.3 Genom Organizasyonu.....	22
4.4 pre-miRNA İkincil Yapılarının Belirlenmesi	25
4.5 miRNA Hedef Tahmini.....	51
5 SONUÇ	60
KAYNAKÇA	65



SİMGELİSTESİ

>	büyük
kDa	kilodalton
kcal	kilokalori
<	küçük
nm	nanometre
%	yüzde



KISALTMA LİSTESİ

AMFE	Ayarlanmış Minimal Katlanma Serbest Enerjisi
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
dsRNA	Çift Sarmallı RNA
EST	Expressed Sequence Tags
GSS	Genomic Survey Sequences
LMV	Marul Mozaik Virüsü
LNSV	Marul Nekrotik Bodurluk Virüsü
LNyV	Marul Nekrotik Sarılık Virüsü
MFE	Minimum Serbest Enerji
MFEI	Minimum Katlanma Enerji İndeksi
miRNA	MikroRNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nükleotit
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
RNAi	RNA İnterferans
ssRNA	Tek Sarmallı RNA
SIGS	Sprey Aracılı Gen Susturma
UTR	Translasyona Uğramayan Bölge

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Marul mozaik virüsü (LMV) dağılımı.....	6
Şekil 2.2	Marullarda LMV izolatlarının neden olduğu semptomlar. A, LMV virionlarının elektron mikrografı (çubuk, 200 nm); B-D, Cüceleşme ve nekroz da dahil olmak üzere LMV-E izolatının neden olduğu ciddi semptomlar (C'de yakın çekim); E, LMV-AF199'un neden olduğu mozaik semptomlar; F, Mozaik belirtileri gösteren enfekte olmuş yaprak.....	7
Şekil 2.3	Farklı marul türlerinde LNSV'nin sebep olduğu hastalık semptomları. Sol taraftakiler sağlıklı, sağ taraftakiler hastalıklı. A, gövde tipi; B, yaprak tipi; C, yeşil romaine marul ve D kırmızı kıvrıkcık marul.....	8
Şekil 2.4	LNyV genomunu gösteren diyagram. Altı genin (Leader (L) ve Trailer (T) dahil olmak üzere) genom organizasyonunu ve nükleotit pozisyonunu göstermektedir. N ve P Geni, N geninin UTR'lerini gösterecek şekilde genişletilmiştir ve siyah yatay çizgi, Leader (L) dizisi ile N ve P genleri arasındaki genler arası bölgeleri temsil etmektedir	9
Şekil 2.5	A, Sağlıklı marul bitkisi; B, Bitkide bodurluk, yaprak sarılığı, yaprak kıvrılması ve pürüzlülüğü ve yaprak dokusunda aralıklarla meydana gelen nekroz, doku ölümleri gibi semptomlar gösteren, LNyV ile enfekte olmuş marul bitkisi.....	9
Şekil 2.6	RNAi aracılı gen susturulması hücrel yolakları.....	11
Şekil 4.1	Marul mozaik virüsü genomik organizasyonu	23
Şekil 4.2	Marul nekrotik bodurluk virüsü genomik organizasyonu	24
Şekil 4.3	Marul nekrotik sarılık virüsü genomik organizasyonu.....	25
Şekil 4.4	<i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR2590 dizisinin ikincil yapısı	26
Şekil 4.5	<i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR7484a dizisinin ikincil yapısı	26
Şekil 4.6	<i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR10212 dizisinin ikincil yapısı	26
Şekil 4.7	<i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6274 dizisinin ikincil yapısı	27
Şekil 4.8	<i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6463 dizisinin ikincil yapısı	27
Şekil 4.9	<i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR8011a dizisinin ikincil yapısı	27
Şekil 4.10	<i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172a dizisinin ikincil yapısı	28

Şekil 4.11 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172b dizisinin ikincil yapısı	28
Şekil 4.12 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR5564 dizisinin ikincil yapısı	29
Şekil 4.13 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1520 dizisinin ikincil yapısı	29
Şekil 4.14 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR7777 dizisinin ikincil yapısı	29
Şekil 4.15 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1440 dizisinin ikincil yapısı	30
Şekil 4.16 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR399a dizisinin ikincil yapısı	30
Şekil 4.17 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1315 dizisinin ikincil yapısı	30
Şekil 4.18 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1107a dizisinin ikincil yapısı	31
Şekil 4.19 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1107b dizisinin ikincil yapısı	31
Şekil 4.20 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6167 dizisinin ikincil yapısı	31
Şekil 4.21 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR166a dizisinin ikincil yapısı	32
Şekil 4.22 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR166b dizisinin ikincil yapısı	32
Şekil 4.23 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR8647 dizisinin ikincil yapısı	32
Şekil 4.24 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR11000 dizisinin ikincil yapısı	33
Şekil 4.25 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6274 dizisinin İkincil yapısı	33
Şekil 4.26 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR478 dizisinin ikincil yapısı	33
Şekil 4.27 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6463 dizisinin ikincil yapısı	34
Şekil 4.28 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172c dizisinin ikincil yapısı	34
Şekil 4.29 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172d dizisinin ikincil yapısı	34
Şekil 4.30 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR5564 dizisinin ikincil yapısı	35
Şekil 4.31 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR156a dizisinin ikincil yapısı	35

Şekil 4.32 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR156b dizisinin ikincil yapısı	35
Şekil 4.33 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR169 dizisinin ikincil yapısı	36
Şekil 4.34 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6155 dizisinin ikincil yapısı	36
Şekil 4.35 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172e dizisinin ikincil yapısı	36
Şekil 4.36 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6189 dizisinin ikincil yapısı	37
Şekil 4.37 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR399b dizisinin ikincil yapısı	37
Şekil 4.38 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1107a dizisinin ikincil yapısı	37
Şekil 4.39 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR156c dizisinin ikincil yapısı	38
Şekil 4.40 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR837a dizisinin ikincil yapısı	38
Şekil 4.41 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR9567 dizisinin ikincil yapısı	38
Şekil 4.42 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR4393 dizisinin ikincil yapısı	39
Şekil 4.43 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR166c dizisinin ikincil yapısı	39
Şekil 4.44 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR166d dizisinin ikincil yapısı	39
Şekil 4.45 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR7531 dizisinin ikincil yapısı	40
Şekil 4.46 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR7486 dizisinin ikincil yapısı	40
Şekil 4.47 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR482 dizisinin ikincil yapısı	40
Şekil 4.48 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR169b dizisinin ikincil yapısı	41
Şekil 4.49 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR8011b dizisinin İkincil yapısı	41
Şekil 4.50 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR8028 dizisinin ikincil yapısı	41
Şekil 4.51 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR3630 dizisinin ikincil yapısı	42
Şekil 4.52 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR530 dizisinin ikincil yapısı	42

Şekil 4.53 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR437 dizisinin ikincil yapısı	42
Şekil 4.54 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR11509 dizisinin ikincil yapısı	43
Şekil 4.55 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR823 dizisinin ikincil yapısı	43
Şekil 4.56 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR3446 dizisinin ikincil yapısı	43
Şekil 4.57 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR837b dizisinin ikincil yapısı	44
Şekil 4.58 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR837c dizisinin ikincil yapısı	44
Şekil 4.59 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6167a dizisinin ikincil yapısı	44
Şekil 4.60 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6167b dizisinin ikincil yapısı	45
Şekil 4.61 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR535 dizisinin ikincil yapısı	45
Şekil 4.62 <i>Lactuca sativa</i> bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172f dizisinin ikincil yapısı	45
Şekil 4.63 LMV, LNSV ve LNYV genomlarında tahmin edilen lsa-miRNA hedef bölgelerinin dağılım grafiği	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 miRBase'deki bütün bitki türlerine ait öncül ve olgun miRNA dizileri	17
Tablo 4.2 LMV'yi hedefleyen yeni tanımlanan miRNA dizileri	46
Tablo 4.3 LNSV'yi hedefleyen yeni tanımlanan miRNA dizileri	47
Tablo 4.4 LNYV'yi hedefleyen yeni tanımlanan miRNA dizileri	49
Tablo 4.5 LMV'yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları	52
Tablo 4.6 LNSV'yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları	53
Tablo 4.7 LNYV'yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları	55



Marul Mozaik Virüsü, Marul Nekrotik Bodurluk Virüsü ve Marul Nekrotik Sarılık Virüsü'nü Hedefleyen miRNA'ların *In Siliko* Yaklaşımlarla Belirlenmesi

Eda ÖZKESER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sevgi MARAKLI

Marul (*Lactuca sativa* L.) bitkisi dünya çapında en çok yetiştirilen ve tüketilen bitkilerden biri olup besin değeri oldukça yüksektir. Dünya çapında ciddi ekonomik kayıplara sebep olan Marul Mozaik Virüsü (LMV), Marul Nekrotik Bodurluk Virüsü (LNSV) ve Marul Nekrotik Sarılık Virüsü (LNYV) marulun ana viral patojenlerindendir. Bu patojenlere karşı mücadelede farklı yöntemler (radikasyon, sanitasyon ve dezenfeksiyon vb.) kullanılsa da RNAi aracılı koruma çok daha çevre dostu bir çözüm sunmaktadır. RNA interferans (RNAi), küçük dsRNA'ları kullanarak gen anlatımını düzenleyen bir mekanizma olup spreyci aracılı gen susturma (SIGS) teknolojisi ile birlikte geliştirilerek patojenlere karşı bitki savunmasında kullanılmaktadır. Bu teknolojiye yaygın olarak kullanılan mikroRNA'lar (miRNA'lar) gen anlatımını post-transkripsiyonel ya da post-translasyonel olarak düzenleyen, yaklaşık 20-24 nt uzunluğunda kısa, tek sarmallı, kodlama yapmayan RNA molekülleridir. Bu çalışmanın amacı; marul mozaik, nekrotik bodurluk ve nekrotik sarılık virüslerinin ORF'lerini hedefleyen potansiyel marul miRNA'larını tespit etmek, en etkili miRNA hedef bağlanma bölgelerini

tahmin etmek ve sonuçta bu virüslere karşı tanımlanan miRNA dizilerinin kullanım potansiyellerini belirlemektir. Bu amaç kapsamında; miRBase veri tabanından elde edilen bitki miRNA'larını *Lactuca sativa* (taxid:4236) genomunda araştırmada BLAST, virüs genom organizasyonu ve anotasyonunda SnapGene, pre-miRNA ikincil yapılarının belirlenmesinde RNAfold ve miRNA hedef tahmininde RNAhybrid analizleri gerçekleştirilmiştir. Marul genomunda toplamda 59 tane yeni marul miRNA'sı ilk defa tanımlanmış, ikincil yapıları analiz edilmiş ve hedef tahmin çalışmaları yürütülmüştür. 12 miRNA'nın (lsa-miR7484a, lsa-miR10212, lsa-miR6274, lsa-miR6463, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172b, lsa-miR5564, lsa-miR1520, lsa-miR7777, lsa-miR1440 ve lsa-miR399a) LMV'nin ORF'sini, 25 miRNA'nın (lsa-miR1315, lsa-miR1107a, lsa-miR1107b, lsa-miR6167, lsa-miR166a, lsa-miR166b, lsa-miR8647, lsa-miR7484a, lsa-miR11000, lsa-miR6274, lsa-miR478, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172c, lsa-miR172e, lsa-miR5564, lsa-miR399a, lsa-miR156a, lsa-miR156b, lsa-miR169, lsa-miR6155, lsa-miR172f, lsa-miR7777, lsa-miR6189 ve lsa-miR399b) LNSV'nin ORF'lerini ve 40 miRNA'nın da (lsa-miR828, lsa-miR156c, lsa-miR837a, lsa-miR9567, lsa-miR4393, lsa-miR166c, lsa-miR166d, lsa-miR7531, lsa-miR7486, lsa-miR482, lsa-miR169b, lsa-miR8011b, lsa-miR8028, lsa-miR3630, lsa-miR530, lsa-miR437, lsa-miR11509, lsa-miR823, lsa-miR3446, lsa-miR837b, lsa-miR837c, lsa-miR6167a, lsa-miR6167b, lsa-miR535, lsa-miR172f, lsa-miR166a, lsa-miR166b, lsa-miR7484a, lsa-miR478, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172d, lsa-miR156a, lsa-miR156b, lsa-miR169, lsa-miR6155, lsa-miR2590, lsa-miR10212, lsa-miR6463 ve lsa-miR172b) LNYV'nin ORF'lerini hedeflediği belirlenmiştir. Tanımlanan bu miRNA'ların, marul bitkisinde LMV, LNSV ve LNYV'ye karşı RNAi aracılı direnç kazanmasına yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: miRNA, *in siliko*, *Lactuca sativa*.

Determination of miRNAs Targeting Lettuce Mosaic Virus, Lettuce Necrotic Stunt Virus and Lettuce Necrotic Yellows Virus Using *In Silico* Approaches

Eda ÖZKESER

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Dr. Sevgi MARAKLI

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most popularly grown and consumed plants worldwide with a very rich nutritional value. Lettuce mosaic virus (LMV), Lettuce necrotic stunt virus (LNSV), and Lettuce necrotic yellows virus (LNYV) are the main viral pathogens of the lettuce plants, causing serious economic losses worldwide. Although different methods (radiation, sanitation and disinfection, etc.) have been used in the fight against these pathogens, RNAi-mediated protection offers a much more environmentally friendly solution. When combined with spray-induced gene silencing (SIGS) technology, RNA interference (RNAi) is a method that controls gene expression through small dsRNAs and is utilized by plants to fight against infections. MicroRNAs (miRNAs), commonly used in this technology, are non-coding, single-stranded, and short RNA molecules with approximately 20-24 nt in length that regulate gene expression at post-transcriptional/translational levels. The aim of this study is to identify potential lettuce miRNAs targeting ORFs of LMV, LNSV and LNYV, predict the most effective miRNA target binding sites and ultimately determine the potential use of miRNA sequences identified against these viruses. For this purpose, BLAST analyzes were performed to investigate plant miRNAs obtained from the miRBase database in the *Lactuca sativa*

(taxid:4236) genome, SnapGene analyzes were carried out for virus genome organization and annotation, RNAfold was used for determination of pre-miRNA secondary structures, and RNAhybrid was utilized for miRNA target prediction. 59 novel lettuce mature miRNAs were identified for the first time, their secondary structures were analyzed, and target prediction studies were conducted. 12 miRNAs (lsa-miR7484a, lsa-miR10212, lsa-miR6274, lsa-miR6463, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172b, lsa-miR5564, lsa-miR1520, lsa-miR7777, lsa-miR1440 ve lsa-miR399a) were found to target the ORF of the LMV, 25 miRNAs (lsa-miR1315, lsa-miR1107a, lsa-miR1107b, lsa-miR6167, lsa-miR166a, lsa-miR166b, lsa-miR8647, lsa-miR7484a, lsa-miR11000, lsa-miR6274, lsa-miR478, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172c, lsa-miR172e, lsa-miR5564, lsa-miR399a, lsa-miR156a, lsa-miR156b, lsa-miR169, lsa-miR6155, lsa-miR172f, lsa-miR7777, lsa-miR6189, and lsa-miR399b) were found to target ORFs of the LNSV, and 40 miRNAs (lsa-miR828, lsa-miR156c, lsa-miR837a, lsa-miR9567, lsa-miR4393, lsa-miR166c, lsa-miR166d, lsa-miR7531, lsa-miR7486, lsa-miR482, lsa-miR169b, lsa-miR8011b, lsa-miR8028, lsa-miR3630, lsa-miR530, lsa-miR437, lsa-miR11509, lsa-miR823, lsa-miR3446, lsa-miR837b, lsa-miR837c, lsa-miR6167a, lsa-miR6167b, lsa-miR535, lsa-miR172f, lsa-miR166a, lsa-miR166b, lsa-miR7484a, lsa-miR478, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172d, lsa-miR156a, lsa-miR156b, lsa-miR169, lsa-miR6155, lsa-miR2590, lsa-miR10212, lsa-miR6463, and lsa-miR172b) were identified to target LNYV's ORFs. It is stated that these identified miRNAs will be useful in acquiring RNAi-mediated resistance against LMV, LNSV and LNYV in lettuce plants.

Keywords: miRNA, *in silico*, *Lactuca sativa*.

1.1 Literatür Özeti

Dünyanın hemen her ülkesinde yoğun olarak yetiştirilmekte olan sebzeler, insanoğlunun temel besin kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Beslenmedeki önemlerinin anlaşılmasıyla birlikte dünyada bitkilerle ilgili araştırmalar hızla artmış ve sebze üretiminde de artış gözlenmiştir. TÜİK verilerine göre Türkiye’de de benzer şekilde 2023 yılında bir önceki yıla göre sebze ürünleri üretim miktarı % 0,6 artarak yaklaşık 31,8 milyon ton olarak gerçekleşmiştir [1].

Dünyada yaygın olarak yetiştirilen sebzelerden biri olan marul, Asteraceae (Papatyagiller) ailesinin bir üyesidir. Marul; C vitamini, demir ve folat açısından oldukça zengin bir bitkidir. Anti-inflamatuar, anti-diyabetik ve kolesterol düşürücü özellikleri vardır [2], [3], [4].

Marul yetiştiriciliğinde mantar hastalıkları ve özellikle viral hastalıklar ekonomik kayıplara neden olmaktadır [5]. Virüslerin neden olduğu hastalıklar, dünyada ekonomik getirisi yüksek olan bitkilerde önemli kayıplara yol açtığı gibi, ürün kalitesini de düşürmektedir [6].

Marul mozaik virüsü (LMV), +ssRNA genomuna sahip olan bir virüs olup dünya çapında marul mahsullerinde en zararlı viral hastalıklardan biri olan marul mozaik hastalığına neden olmaktadır [5]. Bununla birlikte LMV izolatlarının; semptomlar, tohum aktarımı vb. gibi biyolojik özellikleri arasındaki farklılıkları ve geniş biyolojik çeşitliliği bu virüsü, bitki virüsü etkileşimlerinin incelenmesi için çok uygun bir model haline getirmektedir [7]. Yaprak bitleri ile taşınmakta olan bu virüs bulaştığında bir hafta içinde bütün bir tarlayı enfekte edebilmektedir. Yaprak bitleriyle mücadelede toprağa, bitkinin kendisine ve tüketicilerine son derece zararlı olan pestisitler kullanılmaktadır [8], [9].

Diğer bir RNA virüsü olan Marul nekrotik bodurluk virüsü (LNSV), -ssRNA genomuna sahip bir virüstür ve bodurluk, nekroz ve ölüme neden olan marul gövde hastalığına neden olmaktadır [10], [11]. Marul üretiminde büyük kayıplara yol açan bir diğer virüs olan Marul Nekrotik Sarılık Virüsü (LNYV) de -ssRNA genomuna

sahip bir virüs olup yaprak bitleri tarafından kalıcı ve istilacı bir şekilde bulaşabilen ciddi bir marul hastalığına neden olmaktadır [12], [13].

RNA interferans (RNAi), küçük dsRNA'ları (çift sarmallı RNA'lar) kullanan, ökaryotlarda gen anlatımını düzenleyen bir mekanizmadır. RNAi'nin keşfi, RNA dünyasının kapılarını açmıştır. Bu güçlü mekanizma fonksiyonel genomikte, hastalıkların tedavisine yönelik terapatik uygulamalarda, tarımda ve diğer alanlarda kullanılabilir. RNAi bazı gen terapileri, özellikle virüsle ilişkili hastalıkların tedavisinde umut vaat etmektedir [14], [15], [16].

Transgenik yöntemlere dayanmayan bir RNAi teknolojisi olan sprey aracılı gen susturma (SIGS), gen fonksiyonunun incelenmesi için önemli bir potansiyele sahiptir [17]. SIGS, doğa dostu yeni bir genetik mühendisliği teknolojisi olup bu teknolojiye, patojen geni hedef alan RNA'lar bitkiye topikal olarak uygulanarak (yapraklar gibi bitki dokularına) hastalığın kontrol altına alınması sağlanır. SIGS, ekzojen çift sarmallı RNA'yı (dsRNA) bitkilere püskürtme, enjeksiyon veya sulama yoluyla sokarak hedef genleri anında susturmak için RNAi yolağını tetikler [17].

Yaygın olarak kullanılan bu tekniğin temel sorunu, stabil olmaması nedeniyle RNA'nın çevre koşullarına maruz kaldığında hızlı bir şekilde bozunabilmesidir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, Qiao vd. [18], domates ve üzüm bitkileri araştırmalarında belirttikleri gibi RNA kapsüllemesi için yapay nanopartiküller geliştirerek dsRNA sprey metodunu kullandılar. Stabilitenin iyileştirilmesiyle patojene karşı RNAi aracılı koruma çevre dostu bir şekilde mümkün hale geldi. MikroRNA'lar (miRNA'lar), RNAi teknolojisinde kullanılan kısa kodlama yapmayan dizilerdir [19]. Bitkilerde ve hayvanlarda yaşamı sürdüren düzenleyici bir role sahip olan miRNA'lar, yaklaşık 20-24 nükleotit (nt) uzunluğunda küçük, endojen ve tek sarmallı RNA molekülleridir. Özellikle bitkilerde bağışıklık savunma sisteminin anahtar aktivatörlerinden biri olarak kabul edilirler [20], [21]. miRNA'lar; hedef mRNA'yı keserek post-transkripsiyonel veya post-translasyonel susturma ile gen anlatımını düzenler [22]. miRNA'ların ve hedeflerinin tanımlanması, bitkilerin virüs enfeksiyonu da dahil olmak üzere çevresel strese karşı direncini arttırmak için önemlidir [23], [24]. Bu nedenle, patojenite ile ilgili genleri hedefleyen miRNA'ların tespiti ve RNAi teknolojisinde kullanımı; tarımda sadece ilgili patojeni etkileyip, toprağa, suya ve bitkinin kendisine herhangi bir zarar vermemesi açısından önemlidir. Tarımda yaygın olarak kullanılan ama

evreyeye zarar veren pestisitlere karşı alternatif olabilecek bu teknoloji, son yıllarda yaygın olarak çalışılmaktadır [25].

Bu tez çalışmasının amacı marul genomunda LMV, LNSV ve LNYV genomlarını hedefleyen miRNA'ların tespit edilmesidir. Bu amaçla, miRNA tahmin algoritması analizleri yardımıyla, marul miRNA'larının virüslere karşı potansiyel hedefleri, marul çeşitlerinde direnç oluşturma konusunda emsal olarak belirlendi. Buradaki biyoinformatik yaklaşım, genetik mühendisliğı aracılığıyla virüse dayanıklı marul bitkileri oluşturma konseptini desteklemektedir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı; marul (*Lactuca sativa* L.) bitkisinin genomunda marul mozaik virüsü (LMV), marul nekrotik bodurluk virüsü (LNSV) ve marul nekrotik sarılık vürüsü (LNYV) ORF'lerini hedefleyen miRNA'ları belirlemek ve en etkili miRNA hedef bağlanma bölgelerini tespit etmektir.

1.3 Hipotez

Lactuca sativa, tüm dünyada üretimi ve tüketimi yaygın olan oldukça zengin besin değerine sahip bir bitkidir. Çeşitli çalışmalarda, bitki-patojen savaşlarında miRNA'ların gücünden yararlanılabileceğı ortaya konulmuştur. LMV, LNSV ve LNYV marul bitkisinin önemli zararlılarından olup marul genomunda bu virüsleri hedefleyen miRNA'ların tespit edilmesi öngörölmüştür. Böylece, bu virüslerle savaşta evre dostu bir yaklaşım sağlayacakları düşünölmektedir.

2.1 Marul Bitkisi (*Lactuca sativa* L.)

Dünyada yaygın olarak yetiştirilen sebzelerden biri olan marul, Asteraceae ailesine (Papatyagiller) ait C vitamini, demir, folat, lif ve polifenoller, karotenoidler gibi birçok faydalı biyoaktif bileşiğin kaynağı olan oldukça zengin besin değerine sahip bir bitkidir. Gıda ve Tarım Örgütü'ne göre (<http://www.fao.org/>), 2022 yılında dünya çapında marul üretimi 27,149,446.41 ton olup tüm yapraklı sebzeler arasında 3. sırada yer almaktadır. Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre Türkiye'de yaprağı yenen sebzeler arasında 2. sırada olup 2022 yılında kıvırcık marul üretimi 252,583 ton iken 2023 yılında %2,9'luk değişim ile 259,868 tona çıkmıştır. Göbekli marul üretimi ise 204,422 ton iken 2023 yılında %3,5'luk değişim ile 211,660 tona çıkmıştır. 2022 yılında 104,985 ton olan aysberg marul üretimi ise 2023 yılında %1,2'lik değişim ile 106,245 tona çıkmıştır [1]. Besleyici değerinin yanı sıra kalorisi, sodyumu ve yağı oldukça düşük olan marul bitkisi, anti-inflamatuvar, anti-diyabetik ve kolesterol düşürücü etkilere de sahiptir [2], [3], [4].

Avrupa ve Himalayalar'da bulunan çok yıllık yabani *Lactuca* türlerinin haploid kromozom sayısı $n = 8$ 'dir. Avrupa ve Akdeniz türlerinin çoğu, Orta Doğu, Afrika ve Hindistan'daki türlerin ise $n = 9$ olarak bildirilmiştir. Kanada'dan Florida'ya kadar türler ise $n = 17$ haploid kromozom sayısına sahiptir. Ancak birçok *Lactuca* türünün kromozom sayıları bilinmemektedir ve birçok Kuzey Amerika türünün gerçek kromozom sayıları rapor edilen verilerden farklı olabilir [26]. Marul genom dizileme konsorsiyumu tarafından 2022 yılında yayımlanan raporda; Magnoliopsida sınıfının Asteraceae ailesine ait 9 haploid kromozoma sahip ($n=9$) bir bitki olan bahçe marulunun (taxonomy ID: 4236, GenBank: GCA_002870075.4) genom boyutu 2.6 Gb olarak rapor edilmiştir (NCBI BioProject erişim no: PRJNA173551) [27].

2.2 Marul Virüsleri

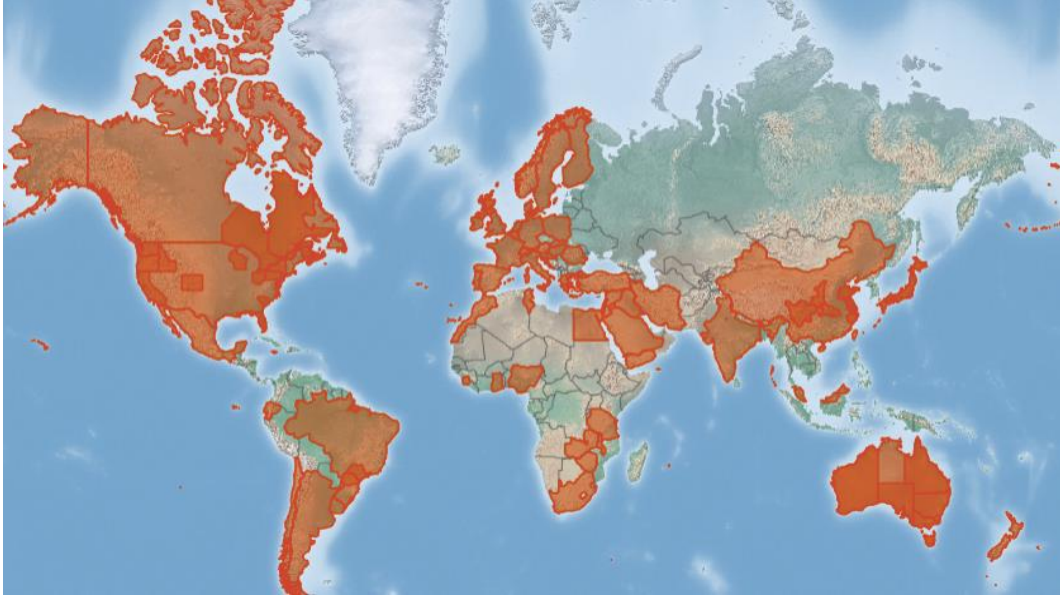
Virüsler, bitkilerde ciddi ekonomik kayıba neden olan en etkili patojenlerdir. Virüs enfeksiyonlarının etkileri; verimde azalma, bitkilerin boyut, şekil, tat, yapı ve

kompozisyon kalitesinin azalması, canlılığın azalması (kuruya, soğuğa duyarlılık), diğer patojenlerin enfeksiyonuna yatkınlık, kısa raf ömrü ve fertilitede azalmadır. Tüm virüsler, üremek için konakçılarının hücresel mekanizmasına bağımlı olan zorunlu parazitler oldukları gibi bitki virüsleri de enfekte olmuş bitkilerden sağlıklı bitkilere, vektör adı verilen canlı organizmalar tarafından aktif bulaşma yoluyla bulaşır. Bitkilerle beslenen eklembacaklılar, nematodlar ve bitki paraziti mantarlar, bitki virüsleri için başlıca vektör organizma türleridir. Bitki virüslerinin her türü önemli hastalıklara neden olan ajanlardır ve dünyanın hemen her yerinde mahsul verimi ve kalitesindeki kayıplardan sorumludur. En ciddi marul virüsleri arasında; marul mozaik virüsü (LMV), marul nekrotik bodurluk virüsü (LNSV) ve marul nekrotik sarılık virüsü (LNYV) yer almaktadır [26].

2.2.1 Marul Mozaik Virüsü (LMV)

LMV, dünya çapında farklı mahsullerde ekonomik zararlara ve ciddi verim kayıplarına neden olan yaprak bitleri ve tohumlarla taşınan Potyviridae ailesindeki Potyviruslerin en önemli üyelerinden biridir. Dünya çapında marul mahsullerinde en zararlı viral hastalıklardan birine (mozaik hastalığı) neden olarak %50'ye varan büyük ekonomik kayıp oluşturmaktadır [5], [28]. Dünyada, LMV dağılımı Şekil 2.1'de görüldüğü gibidir [29].

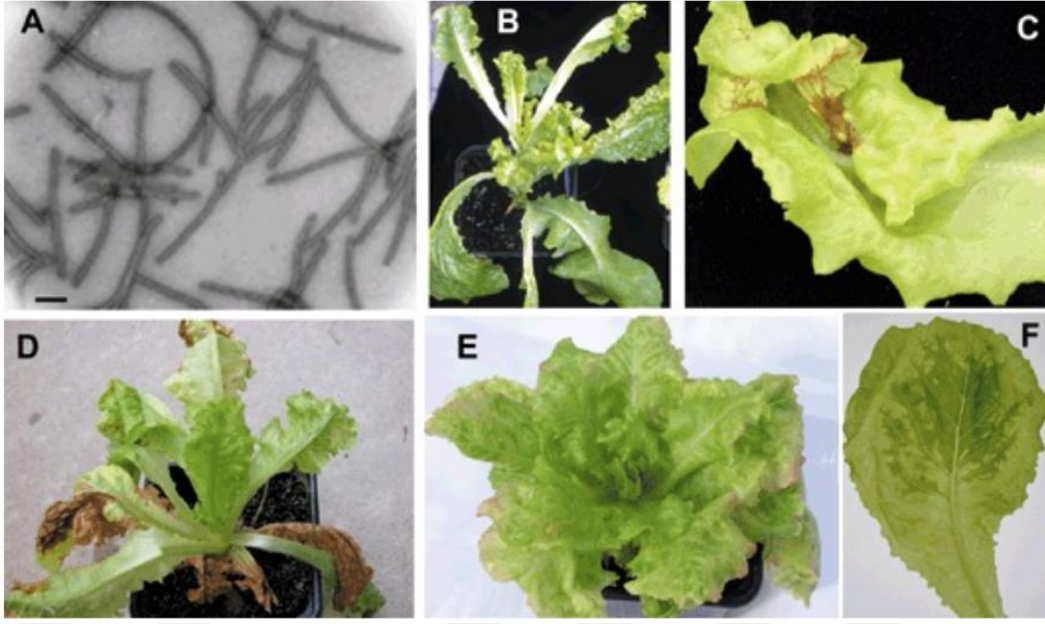
LMV ile enfekte olmuş bitkilerde gözlenen bazı belirtiler Şekil 2.2'de de görüldüğü üzere damarlarda ve mozaik şekillerinde renk değişiklikleri, yaprak kıvrılması ve solması, bodurlaşma/cücelik ve nekrotik lekelerdir [7], [30].



Şekil 2.1 Marul mozaik virüsü (LMV) dağılımı [29].

LMV, diğer Potyviruslerde olduğu gibi esas olarak yaprak bitleri, özellikle *Myzus persicae*, *Acyrtosiphon scariolae*, *Macrosiphum euphorbiae* ve *Aphis gossypii* ile taşınır. Virüs bulaşan bir tarla bir hafta içinde tamamen enfekte olabilmektedir ve hasadın tamamen kaybedilmesine neden olmaktadır [8], [9].

Yaklaşık 750x13 nm uzunluğunda esnek iplikçiklerden oluşan partiküller içeren ve 10.080 baz çifti (bç) boyutunda tek sarmallı pozitif RNA (+ssRNA) genomuna sahip olan LMV (NCBI erişim no: MZ318158), *Potyviridae* ailesinin Potyvirus cinsine aittir [5]. Tüm Potyviruslerde olduğu gibi genomik RNA'sı, 5' ucunda virüs tarafından kodlanan bir genom bağlantılı viral proteinine (VPg) kovalent olarak bağlanır ve 3' ucunda poliadenile edilir [31], [32]. LMV genomu, iki UTR (translasyona uğramayan bölge) (5' ucunda 103 nt ve 3' ucunda 210 nt) ile çevrelenen ve büyük bir poliproteini kodlayan bir ana açık okuma çerçevesinden (ORF) oluşur [33].



Şekil 2.2 Marullarda LMV izolatlarının neden olduğu semptomlar. A, LMV virionlarının elektron mikrografı (çubuk, 200 nm); B-D, Cüceleşme ve nekroz da dahil olmak üzere LMV-E izolatının neden olduğu ciddi semptomlar (C'de yakın çekim); E, LMV-AF199'un neden olduğu mozaik semptomlar; F, Mozaik belirtileri gösteren enfekte olmuş yaprak [7].

2.2.2 Marul Nekrotik Bodurluk Virüsü (LNSV)

Marul üretiminde büyük kayıplara yol açan bir diğer virüs ise *Tombusviridae* ailesinin Tombusvirüs cinsine ait olan marul nekrotik bodurluk virüsüdür (LNSV). LNSV marul bitkilerinde; bodurluk, nekroz ve ölüme neden olan marul dieback hastalığına neden olur (Şekil 2.3). Tek zincirli ve lineer RNA genomu (NCBI erişim no: JN700748) 4772 nt uzunluğundadır ve 5' ucu 166 nt uzunlukta UTR içerir. Tek zincirli ve lineer RNA genomuna sahip bir virüs olup (ssRNA(-)) altı ORF bölgesi bulunmaktadır. 167-1057 nt arasında yer alan birinci ORF, 33 kDa büyüklüğünde bir protein kodlamaktadır. 167-2623 nt arasında yer alan ikinci ORF ise 92 kDa büyüklüğünde ikinci proteini kodlamaktadır. Üçüncü ORF, LNSV'nin dış kabuğunu oluşturan 41 kDa'lık bir proteini kodlar. Dördüncü ORF ise virüsün hareketini ve bitkileri enfekte etmesini sağlayan P22 proteinini kodlar. Beşinci ORF, P19 proteinini kodlamaktadır. Altıncı ORF ise 4487-4663 nt arasındadır [10], [11].

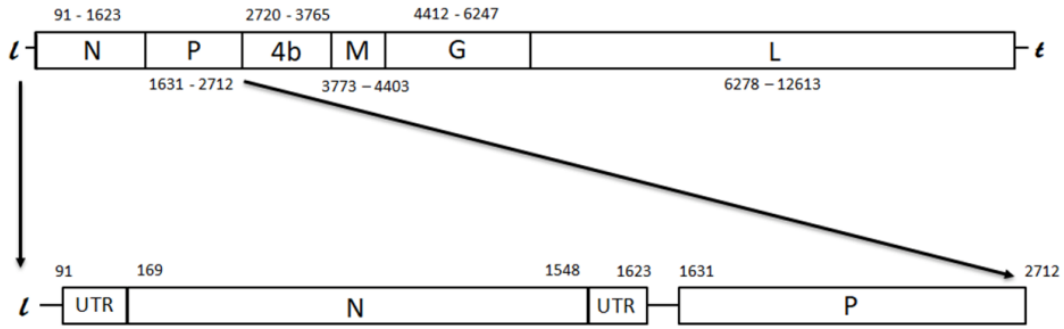


Şekil 2.3 Farklı marul türlerinde LNSV'nin sebep olduğu hastalık semptomları. Sol taraftakiler sağlıklı, sağ taraftakiler hastalıklı. A, gövde tipi; B, yaprak tipi; C, yeşil romaine marul ve D kırmızı kıvırcık marul [34].

2.2.3 Marul Nekrotik Sarılık Virüsü (LNYV)

Cytorhabdovirüs cinsine ait monopartit bir virüs olan marul nekrotik sarılık virüsü (LNYV) (NCBI erişim no: NC_007642), P ve L proteinlerine bağlı nükleokapsid proteinleri ile kaplanmış bir genom ile zarflanmıştır ve basil şeklindedir. LNYV, 12.807 nt'lik tek sarmallı negatif RNA genomuna sahiptir. Genomu bir nükleokapsid proteini (N), bir fosfoprotein (P), bir hareket proteini (4b), bir matris proteini (M), bir glikoprotein (G) ve bir polimerazı (L) kodlar (Şekil 2.4). Bu virüs *Hyperomyzus lactucae* yaprak biti tarafından kalıcı ve istilacı bir şekilde bulaşabilen ciddi bir marul hastalığına neden olur [12], [13].

LNYV ile enfekte olmuş bitkilerde gözlenen bazı belirtiler Şekil 2.5'de de görüldüğü üzere yaprak sarılığı, yaprak kıvrılması ve solması, bodurlaşma ve nekrozdur [35].



Şekil 2.4 LNYV genomunu gösteren diyagram. Altı genin (Leader (L) ve Trailer (T) dahil olmak üzere) genom organizasyonunu ve nükleotit pozisyonunu göstermektedir. N ve P Geni, N geninin UTR'lerini gösterecek şekilde genişletilmiştir ve siyah yatay çizgi, Leader (L) dizisi ile N ve P genleri arasındaki genler arası bölgeleri temsil etmektedir [36].



Şekil 2.5 A, Sağlıklı marul bitkisi; B, Bitkide bodurluk, yaprak sarılığı, yaprak kıvrılması ve pürüzlülüğü ve yaprak dokusunda aralıklarla meydana gelen nekroz, doku ölümleri gibi semptomlar gösteren, LNYV ile enfekte olmuş marul bitkisi [35].

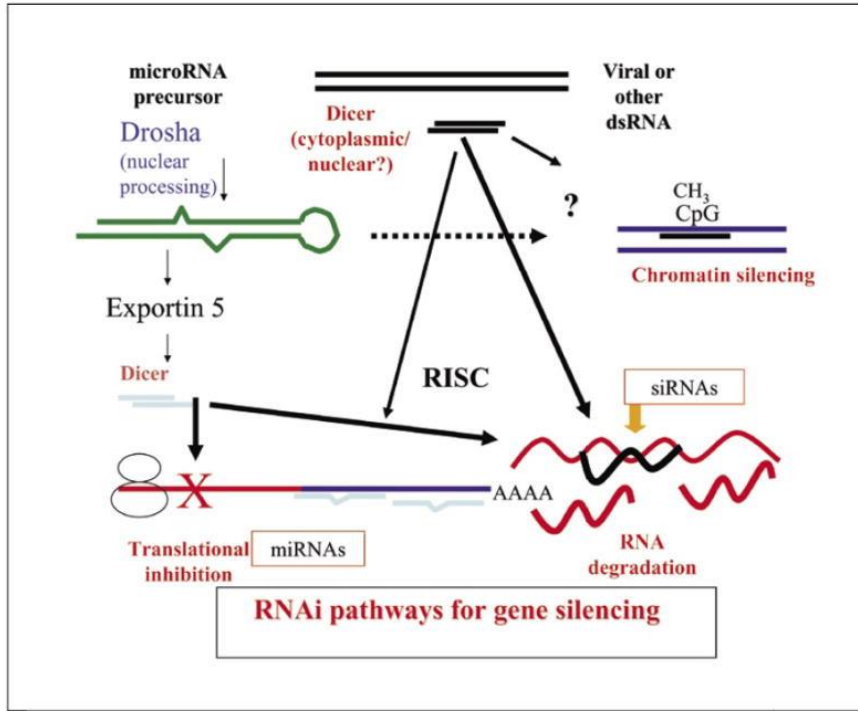
2.3 RNAi Mekanizması ve miRNA'lar

RNAi, mayadan insana kadar evrimsel olarak korunmuş bir gen susturma mekanizmasıdır. Prokaryotlarda da RNAi mekanizmasına işlevsel olarak benzeyen ama homolog olmayan RNAi benzeri bir savunma sistemine sahiptir [37]. RNAi kaynaklı gen susturma, transkripsiyon, mRNA stabilitesi ve translasyon dahil olmak üzere her seviyede gen anlatımını kontrol eder [38].

RNAi, gen aktivitesinin homolojiye bağlı kontrolünü yönlendirmek için tetikleyici olarak küçük çift sarmallı RNA (dsRNA) moleküllerini kullanan çoğu ökaryotik hücrenin düzenleyici bir mekanizmasıdır [39]. Şekil 2.6'da görüldüğü gibi, RNAi

mekanizması çok yönlüdür ve küçük çift sarmallı RNA'ların (dsRNA'lar) gen anlatımını düzenlediği çeşitli yollar vardır. Endojen mikroRNA (miRNA) yolağı, çekirdekte pre-miRNA'lara dönüştürülen, sitoplazmaya gönderilen ve tekrar fonksiyonel miRNA'lara dönüştürülen ve Polimeraz II ile kopyalanan birincil miRNA'larla başlar [19]. miRNA'lar, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) ile kompleksleşerek ve "seed dizileri" olarak adlandırılan kısa homoloji uzantıları yoluyla hedef dizilerin 3' UTR'lerine bağlanarak gen anlatımını transkripsiyonel baskılama veya mRNA degradasyonu yoluyla post-transkripsiyonel olarak düzenleyen endojen moleküllerdir [40], [41], [42].

miRNA'lar, hedef mRNA'ları yıkarak veya mRNA'ların transkripsiyonunu bloke ederek post-transkripsiyonel inhibisyon ile gelişim, farklılaşma, metabolizma ve savunma için gerekli genlerin anlatımını düzenlerler. MiRNA'ların biyolojik olaylardaki önemli rollerinden dolayı, miRNA işleme (miRNA processing) mekanizmalarını tanımlamak için kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Genel olarak miRNA'lar, kendi genlerinden veya intronlardan üretilen, birincil miRNA'lar (pri-miRNA'lar) adı verilen uzun transkriptlerden işlenir. Tek bir pri-miRNA, miRNA dizilerine sahip bir veya daha fazla kusurlu saç tokası ilmek (hairpin-loop) yapısı içerir. Bitkilerde, pri-miRNA'nın iki aşamalı bölünmesi bir Dicer homologu olan Dicer-like1 (DCL1) tarafından gerçekleştirilir. HUA ENHANCER 1 (HEN1), miRNA'ların çekirdekten dışarı taşınmalarından önce miRNA'ların 3' ucuna bir metil grubu ekler. Bu çekirdek proteinlere ek olarak, 20'den fazla bileşen doğrudan veya dolaylı olarak bitki pri-miRNA işlenmesinde rol oynar. Hem bitkilerde hem de hayvanlarda son adım, olgun miRNA'ların sitoplazmadaki RNA kaynaklı susturma kompleksinin (RISC) temel katalitik bileşenlerinden biri olan ARGONAUTE 1 (AGO1) proteinine seçici olarak yüklenmesini içerir [43].



Şekil 2.6 RNAi aracılı gen susturulması hücresel yolları [19].

RNAi mekanizması, mevcut ve gelecekteki gıda üretimini güvence altına almak için dünya çapında ihtiyaç duyulan, entegre bitki zararlıları yönetimine ve sürdürülebilir tarım stratejilerine büyük katkı sağlamak için kullanılabilecek doğal bir mekanizma olmakla birlikte bu teknoloji, gen anlatımını modifiye ederek bitkileri geliştirmek ve bitki zararlılarının ve patojenlerin genlerini hem bitki içinde (konakçı kaynaklı gen susturma) hem de topikal uygulamalar (sprey kaynaklı gen susturma) ile hedeflemek amacıyla geliştirilmekte ve kullanılmaktadır [44]. Bu amaçlarla, özellikle patojenite ile ilgili genleri hedefleyen miRNA'lar tespit edilerek bitkilere uygulanmaktadır [45], [46]. Bu amaçla, çeşitli bitki patojenleriyle yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde domates ve üzüm bitkilerini etkileyen bir patojen olan *Botrytis cinerea*'yı kontrol altına almak amacıyla araştırmalar yürütülmüş ve dsRNA dağıtımını ve patojen tarafından alımını kolaylaştırmak amacıyla yapay nanopartiküller sentezlenmiştir. Stabilitayı geliştirerek patojene karşı RNAi aracılı bitki korunmasının mümkün hale geldiğini öne sürmüşlerdir [18]. Diğer bir çalışmada ise oldukça etkili bir orman patojeni olan *Fusarium circinatum*'un vezikül taşınması, sinyal iletimi ve hücre duvarı biyogenezi metabolik yollarında yer alan yaşamsal genlerini hedef alan dsRNA

molekülleri tasarlanmış, üretilmiş ve bitkiye uygulanmıştır. Sonuçta, dsRNA'ların patojenin virülansının inhibisyonunu tetikleyebildiği doğrulanmıştır [47].

He vd. [25] tarafından yürütülen bir çalışmada ise dünya çapında mahsul veriminde ciddi kayıplara neden olan fitopatojenler ile mücadelede, SIGS yönteminin ekolojik olarak sürdürülebilir bir patojen kontrol yaklaşımı olduğu öne sürülmektedir. Başka bir çalışmada ise RNAi'nin arbovirüse dirençli sivrisinek popülasyonlarının geliştirilmesinde artropod genlerinin susturulması için önemli bir araç olduğundan bahsedilmektedir [48]. Yapılan araştırmalar incelendiğinde, marul virüsleri (LMV, LNSV ve LNYV) ile ilgili herhangi bir RNAi çalışmasının olmadığı görülmüştür.



Bu tez çalışmasında, bitki miRNA'ları miRBase veri tabanından alındı, Blast analizleri ile *Lactuca sativa* (taxid:4236) genomunda araştırıldı. Yanlış eşleşmelerin silinmesinin ardından RNAfold analizleri gerçekleştirilerek aday miRNA dizilerinin ikincil yapıları belirlendi. SnapGene programı kullanılarak viral genomların anotasyonu yapıldı ve sonrasında virüs genomlarında hedef tahmini analizleri RNAhybrid programı aracılığıyla gerçekleştirilerek virüslerin ORF'lerini hedefleyen yeni miRNA'lar belirlendi.

3.1 Bitki miRNA'larının Elde Edilmesi

Yayınlanmış bütün bitki türlerinin (Viridiplantae) olgun (mature) miRNA dizileri, miRNA dizilerinin veri tabanı olan miRBase'den elde edildi (v22, <http://mirbase.org/>). miRBase veritabanı, *in siliko* veya deneysel yöntemlerle elde edilen, farklı organizmaların bütün yayınlanmış miRNA dizilerinin öncül ve olgun formları hakkında bilgiler içeren standart bir online referans kaynağıdır [49].

Yapılan çalışmalar olgun miRNA'ların canlılar arasında daha korunmuş yapıda olduklarını göstermektedir [50]. Bu nedenle bu çalışmada yürütülen *in siliko* analizlerde olgun miRNA dizileri kullanılmıştır. Benzer dizilerin tekrarlı analizini engellemek ve yanlış pozitif sonuçların önüne geçebilmek amacıyla üzerinde benzerlik gösteren diziler excel programının koşullu biçimlendirme özelliği kullanılarak elendi ve her bir dizi için “single tone” elde edildi.

3.2 BLAST Analizi

NCBI programında bulunan BLASTN programı kullanılarak Blast analizleri gerçekleştirildi. miRBase veri tabanından elde edilen referans miRNA dizileri *Lactuca sativa* (taxid:4236) genomunda 3 farklı veri tabanı [nucleotide collection (nr/nt), expressed sequence tags (est), genomic survey sequences (gss)] kullanılarak araştırıldı. Program seçeneği “somewhat similar sequences” olarak, maksimum hedef diziler “1000”, beklenen eşik değeri “1000” ve kelime büyüklüğü “7” olarak seçildi. Diğer parametreler değiştirilmeden kullanıldı [51].

Veri tabanı nükleotit (nr/nt), sonrasında est ve son olarak da gss olarak seçildi ve analizler tek tek bu veri tabanları kullanılarak yapıldı. Elde edilen sonuçlardan E değeri (expect value) 1'den küçük olan ve/veya I değeri (Identities) 12 ve 12'nin üzerinde olan sonuçlar alındı ve sonraki analizlerde kullanılmak üzere kaydedildi.

3.3 Yanlış Eşleşmelerin Belirlenmesi ve Eleme Süreci

Bir önceki aşamada elde edilen diziler, referans miRNA dizileri ile karşılaştırılarak tek tek kontrol edildi. Referans miRNA dizileri ile eşleşen EST dizileri arasında maksimum 7 yanlış eşleşme ve/veya indeller (insersiyon/delesyon) bir sonraki aşama olan eleme sürecinde kullanılmak üzere tespit edildi [52].

NCBI veri tabanında EST, GSS ya da nükleotit dizilerinin kısmi dizileri de bulunmaktadır. Çoğu zaman birbirine oldukça benzer dizilere de farklı erişim numaraları verildiği görülmektedir. Yapılan analizlerde de benzer dizilerde aynı ya da farklı miRNA dizileri belirlendi. Bu dizilerin tekrar tekrar analiz edilmesine gerek olmadığı için aynı EST, GSS ya da nükleotit dizisine ait tekrarlı diziler, her bir miRNA dizisine ait 'single tone' oluşturulması için BLASTN programı kullanılarak elendi. Elemede BLASTN programındaki parametreler değiştirilmeden analiz gerçekleştirildi.

Bununla birlikte miRNA dizileri kodlama yapmayan diziler olduğundan belirlenen miRNA dizilerinin protein kodlayıp/kodlamadığının belirlenmesi için miRNA'lar BLASTX programı ile analiz edildi ve protein kodlamayan diziler potansiyel aday miRNA dizileri olarak seçildi.

3.4 RNAfold Analizi

Aday miRNA'ların ikincil stem-loop yapıları ViennaRNA Package (Versiyon 2.6.3) RNAfold Web Server programı (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) kullanılarak Minimum Free Energy algoritması ile analiz edildi [53].

Elde edilen sonuçlar, aşağıdaki kriterler göz önüne alınarak değerlendirildi.

- i. Potansiyel miRNA dizisi, 'stem-loop' hairpin yapısında uygun bir konumda bulunmalı.
- ii. miRNA veya miRNA* dizilerinde herhangi bir loop veya kırık olmamalı.

- iii. MFEI (Minimum Katlanma Enerji İndeksi) değeri >0.85 ve MFE (Minimum Serbest Enerji) değeri ≤ -18 kcal/mol olmalı.
- iv. Olgun miRNA ve miRNA* dizileri arasında Watson-Crick veya G/U baz çiftinden min 12 tane olmalı [52].

Sonuçların referans dizileri, pozisyonları, MFE değerleri, miRNA nt sayıları, MFEI, AMFE (Adjusted Minimal Folding Free Energy) ve % GC değerleri belirlendi. MFEI ve AMFE değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı [54].

AMFE (Ayarlanmış Minimal Katlanma Serbest Enerjisi) = (MFE (Minimum Serbest Enerji) / (miRNA dizisi uzunluğu) x 100

MFEI (Minimum Katlanma Enerji İndeksi) = AMFE (Ayarlanmış Minimal Katlanma Serbest Enerjisi) / (G+C) %

3.5 Viral Genomların Eldesi ve Anotasyonu

Lactuca sativa bitkisinden izole edilen LMV, LNSV ve LNYV genomlarının tam uzunluktaki transkriptleri (sırasıyla erişim no: MZ318158, JN700748 ve NC_007642) NCBI'dan çekildi ve ORF'lerinin beklenen boyutları, konumları ve % GC içerikleri SnapGene programı (Versiyon 7.1.1) (<https://www.snapgene.com/>) kullanılarak analiz edildi.

3.6 Virüs Genomlarında Hedef Tahmini

Viral genomları hedef alan potansiyel miRNA'ları belirleyebilmek için RNAhybrid programı (Version 2.2) kullanılarak RNAhybrid analizleri gerçekleştirildi [55]. Bu amaçla, virüslerin ORF dizilerini hedefleyen yeni miRNA'lar belirlendi.

Potansiyel hedefler aşağıdaki kriterler kullanılarak belirlenmiştir.

- i. Hedef miRNA ve aday mRNA arasında maksimum 4 nt yanlış eşleşme olmalı.
- ii. Yanlış eşleşmeler, miRNA dizisinin 5' ucundan itibaren 10. ve 11. pozisyonlarda olmamalı.
- iii. miRNA'nın 5' ucundan itibaren 1. ve 9. pozisyonlar arasında 1 nt' den fazla yanlış eşleşme olmamalı.

- iv. Hedef miRNA ile potansiyel mRNA arasında herhangi bir bölgede yan yana 2 nt'ten fazla yanlış eşleşme ve boşluk olmamalı.
- v. miRNA' nın 5' ucundan itibaren 2-7 ve/veya 8-13 nt bölgesi için MFE değeri $\leq -20 \text{ kcal mol}^{-1}$ olmalı [56], [52].



4.1 Bitki miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi

82 farklı bitki türüne ait toplamda 10496 tane olgun miRNA dizisi, miRBase veri tabanından alındı. Bitki türlerinin ait oldukları aile isimleri ile birlikte sahip oldukları öncül ve olgun miRNA dizi sayıları Tablo 4.1’deki gibidir. “Single tone” oluşturularak eleme işlemi yapıldıktan sonra 6083 olgun miRNA dizisi elde edildi.

Tablo 4.1 miRBase’deki bütün bitki türlerine ait öncül ve olgun miRNA dizileri

Alem	Şube	Sınıf	Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Sayısı
Viridiplantae	Chlorophyta		Chlorophyta	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	50 öncül miRNA, 86 olgun miRNA
	Coniferophyta		Coniferophyta	<i>Cunninghamia lanceolata</i>	4 öncül miRNA, 4 olgun miRNA
				<i>Picea abies</i>	594 öncül miRNA, 600 olgun miRNA
				<i>Pinus densata</i>	29 öncül miRNA, 29 olgun miRNA
				<i>Pinus taeda</i>	35 öncül miRNA, 36 olgun miRNA
	Embryophyta		Embryophyta	<i>Physcomitrella patens</i>	247 öncül miRNA, 298 olgun miRNA
				<i>Selaginella moellendorffii</i>	58 öncül miRNA, 64 olgun miRNA
	Magnoliophyta		Magnoliophyta	<i>Amborella trichopoda</i>	124 öncül miRNA, 129 olgun miRNA
		Eudicotyledons	Amaranthaceae	<i>Salicornia europaea</i>	31 öncül miRNA, 31 olgun miRNA
			Araliaceae	<i>Panax ginseng</i>	29 öncül miRNA, 32 olgun miRNA
			Asteraceae	<i>Cynara cardunculus</i>	48 öncül miRNA, 63 olgun miRNA

Tablo 4.1 miRBase’deki bütün bitki türlerine ait öncül ve olgun miRNA dizileri
(devamı)

Alem	Şube	Sınıf	Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Sayısı
Viridiplantae	Magnoliophyta	Eudicotyledons	Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	6 öncül miRNA, 7 olgun miRNA
				<i>Helianthus argophyllus</i>	3 öncül miRNA, 3 olgun miRNA
				<i>Helianthus ciliaris</i>	3 öncül miRNA, 3 olgun miRNA
				<i>Helianthus exilis</i>	2 öncül miRNA, 2 olgun miRNA
				<i>Helianthus paradoxus</i>	3 öncül miRNA, 3 olgun miRNA
				<i>Helianthus petiolaris</i>	3 öncül miRNA, 3 olgun miRNA
				<i>Helianthus tuberosus</i>	16 öncül miRNA, 16 olgun miRNA
			Brassicaceae	<i>Arabidopsis lyrata</i>	205 öncül miRNA, 385 olgun miRNA
				<i>Arabidopsis thaliana</i>	326 öncül miRNA, 430 olgun miRNA
				<i>Brassica napus</i>	90 öncül miRNA, 92 olgun miRNA
				<i>Brassica oleracea</i>	10 öncül miRNA, 11 olgun miRNA
				<i>Brassica rapa</i>	96 öncül miRNA, 157 olgun miRNA
				<i>Camelina sativa</i>	91 öncül miRNA, 112 olgun miRNA
			Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	79 öncül miRNA, 81 olgun miRNA
			Cucurbitaceae	<i>Cucumis melo</i>	120 öncül miRNA, 120 olgun miRNA
				<i>Cucumis sativus</i>	5 öncül miRNA, 5 olgun miRNA
			Euphorbiaceae	<i>Hevea brasiliensis</i>	30 öncül miRNA, 31 olgun miRNA

Tablo 4.1 miRBase’deki bütün bitki türlerine ait öncül ve olgun miRNA dizileri (devamı)

Alem	Şube	Sınıf	Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Sayısı
Viridiplantae	Magnoliophyta	Eudicotyledons	Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i>	174 öncül miRNA, 175 olgun miRNA
				<i>Ricinus communis</i>	63 öncül miRNA, 63 olgun miRNA
			Fabaceae	<i>Acacia auriculiformis</i>	7 öncül miRNA, 7 olgun miRNA
				<i>Acacia mangium</i>	23 öncül miRNA, 32 olgun miRNA
				<i>Arachis hypogaea</i>	3 öncül miRNA, 3 olgun miRNA
				<i>Glycine max</i>	684 öncül miRNA, 756 olgun miRNA
				<i>Glycine soja</i>	13 öncül miRNA, 13 olgun miRNA
				<i>Lotus japonicus</i>	299 öncül miRNA, 365 olgun miRNA
				<i>Medicago truncatula</i>	672 öncül miRNA, 790 olgun miRNA
				<i>Phaseolus vulgaris</i>	8 öncül miRNA, 10 olgun miRNA
				<i>Vigna unguiculata</i>	18 öncül miRNA, 18 olgun miRNA
			Lamiales	<i>Avicennia marina</i>	2 öncül miRNA, 3 olgun miRNA
				<i>Digitalis purpurea</i>	13 öncül miRNA, 13 olgun miRNA
				<i>Rehmannia glutinosa</i>	32 öncül miRNA, 37 olgun miRNA
				<i>Salvia miltiorrhiza</i>	1 öncül miRNA, 1 olgun miRNA
				<i>Salvia sclarea</i>	18 öncül miRNA, 18 olgun miRNA
			Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	124 öncül miRNA, 124 olgun miRNA
			Malvaceae	<i>Gossypium arboreum</i>	1 öncül miRNA, 1 olgun miRNA
				<i>Gossypium herbaceum</i>	1 öncül miRNA, 1 olgun miRNA

Tablo 4.1 miRBase’deki bütün bitki türlerine ait öncül ve olgun miRNA dizileri
(devamı)

Alem	Şube	Sınıf	Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Sayısı
Viridiplantae	Magnoliophyta	Eudicotyledons	Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i>	78 öncül miRNA, 80 olgun miRNA
				<i>Gossypium raimondii</i>	296 öncül miRNA, 296 olgun miRNA
				<i>Theobroma cacao</i>	82 öncül miRNA, 82 olgun miRNA
			Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	39 öncül miRNA, 74 olgun miRNA
			Paeoniaceae	<i>Paeonia lactiflora</i>	15 öncül miRNA, 15 olgun miRNA
			Ranunculaceae	<i>Aquilegia caerulea</i>	45 öncül miRNA, 45 olgun miRNA
			Rhizophoraceae	<i>Bruguiera cylindrica</i>	4 öncül miRNA, 4 olgun miRNA
				<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	4 öncül miRNA, 4 olgun miRNA
			Rosaceae	<i>Fragaria vesca</i>	118 öncül miRNA, 131 olgun miRNA
				<i>Malus domestica</i>	308 öncül miRNA, 322 olgun miRNA
				<i>Prunus persica</i>	180 öncül miRNA, 214 olgun miRNA
			Rutaceae	<i>Citrus clementina</i>	5 öncül miRNA, 5 olgun miRNA
				<i>Citrus reticulata</i>	4 öncül miRNA, 4 olgun miRNA
				<i>Citrus sinensis</i>	151 öncül miRNA, 252 olgun miRNA
				<i>Citrus trifoliata</i>	6 öncül miRNA, 6 olgun miRNA
			Salicaceae	<i>Populus euphratica</i>	4 öncül miRNA, 8 olgun miRNA
				<i>Populus trichocarpa</i>	352 öncül miRNA, 401 olgun miRNA
			Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	162 öncül miRNA, 177 olgun miRNA

Tablo 4.1 miRBase’deki bütün bitki türlerine ait öncül ve olgun miRNA dizileri (devamı)

Alem	Şube	Sınıf	Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Sayısı
Viridiplantae	Magnoliophyta	Eudicotyledons	Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	112 öncül miRNA, 147 olgun miRNA
				<i>Solanum tuberosum</i>	224 öncül miRNA, 343 olgun miRNA
			Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	163 öncül miRNA, 186 olgun miRNA
		Monocotyledons	Monocotyledons	<i>Aegilops tauschii</i>	88 öncül miRNA, 175 olgun miRNA
				<i>Asparagus officinalis</i>	101 öncül miRNA, 101 olgun miRNA
				<i>Brachypodium distachyon</i>	317 öncül miRNA, 536 olgun miRNA
				<i>Elaeis guineensis</i>	6 öncül miRNA, 6 olgun miRNA
				<i>Festuca arundinacea</i>	15 öncül miRNA, 15 olgun miRNA
				<i>Hordeum vulgare</i>	69 öncül miRNA, 72 olgun miRNA
				<i>Oryza sativa</i>	604 öncül miRNA, 757 olgun miRNA
				<i>Saccharum officinarum</i>	205 öncül miRNA, 241 olgun miRNA
				<i>Saccharum sp.</i>	16 öncül miRNA, 16 olgun miRNA
				<i>Sorghum bicolor</i>	19 öncül miRNA, 20 olgun miRNA
				<i>Triticum aestivum</i>	122 öncül miRNA, 125 olgun miRNA
				<i>Triticum turgidum</i>	1 öncül miRNA, 1 olgun miRNA
				<i>Vriesea carinata</i>	33 öncül miRNA, 65 olgun miRNA
				<i>Zea mays</i>	174 öncül miRNA, 325 olgun miRNA

4.2 BLAST Analizleri ve Eliminasyon Süreci

NCBI BLASTN programı analizleri sonucunda nükleotit (nr/nt) veri tabanından 657 veri, EST veri tabanından 200 veri ve GSS veri tabanından 4 veri elde edildi.

Yanlış pozitif sonuçların önüne geçebilmek için yürütülen yanlış eşleşme eliminasyon süreci sonucunda ise nükleotit veri tabanından 143 veri ve est veri tabanından 72 veri elde edildi. GSS veri tabanından elde edilen veriler bu eliminasyon süreci sonunda elendi.

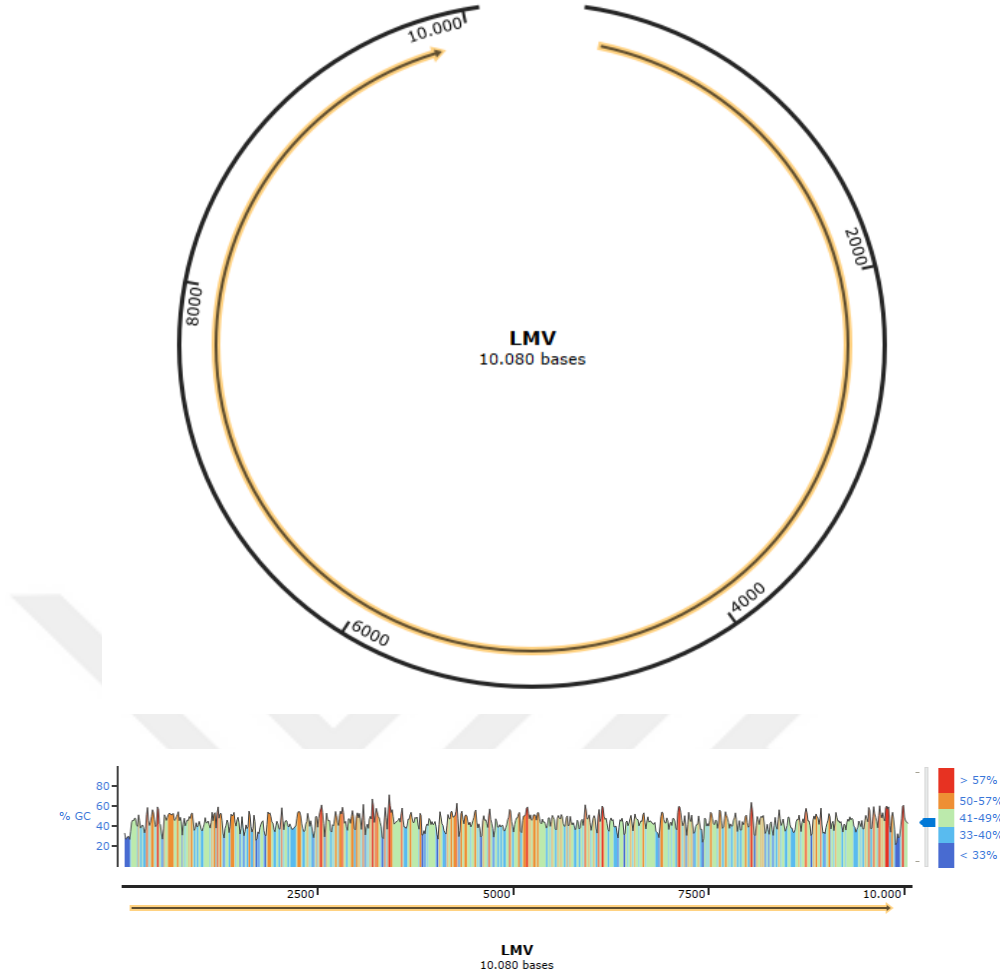
4.3 Genom Organizasyonu

Marul mozaik virüsü'nün 10.080 bç'nden oluşan tek zincirli ve lineer RNA genomu (ssRNA(+) linear), 9.768 baz (104–9871 nt) içeren, moleküler ağırlığı 367.7 kDa olan ve 3255 amino asit uzunluğunda bir poliprotein (erişim no. UED15646) kodlayan 1 adet ORF içermektedir.

LMV genom organizasyonu, sarı okla gösterilmekte olan ORF'si ve % GC içeriği Şekil 4.1'deki gibidir.

Marul nekrotik bodurluk virüsü'nün 4.772 bç'den oluşan, tek zincirli ve lineer RNA genomu (ssRNA(+) linear), sırasıyla 169-1057, 167-2623, 2645-3820, 3854-4423, 3886-4404, 4487-4663 arasında bulunan 6 tane ORF içermektedir.

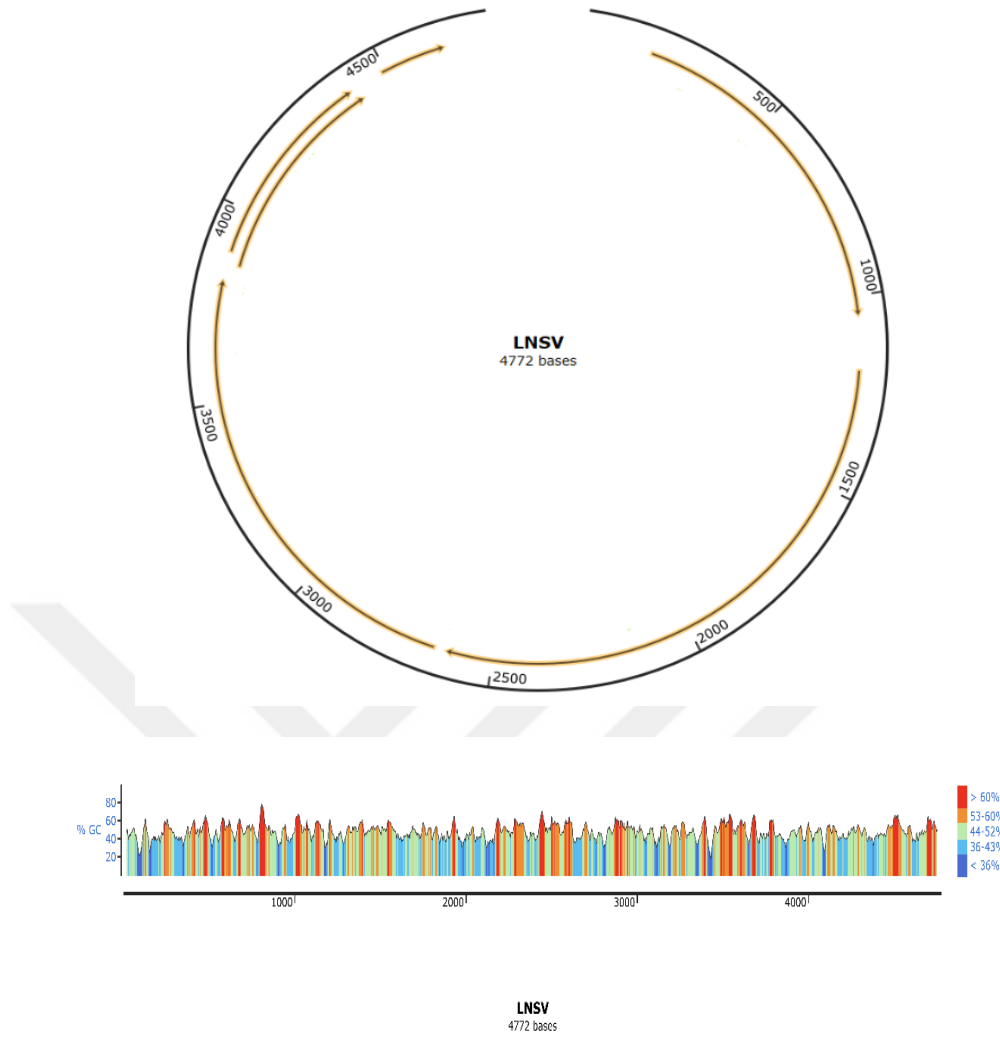
LNSV genom organizasyonu, sarı oklarla gösterilmekte olan ORF'leri ve %GC içeriği Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1 Marul mozaik virüsü genomik organizasyonu.

Marul nekrotik sarılık virüsü'nün 12.807 baz çiftinden oluşan tek zincirli ve lineer RNA genomu (ssRNA(-) linear) 6 tane ORF içermektedir.

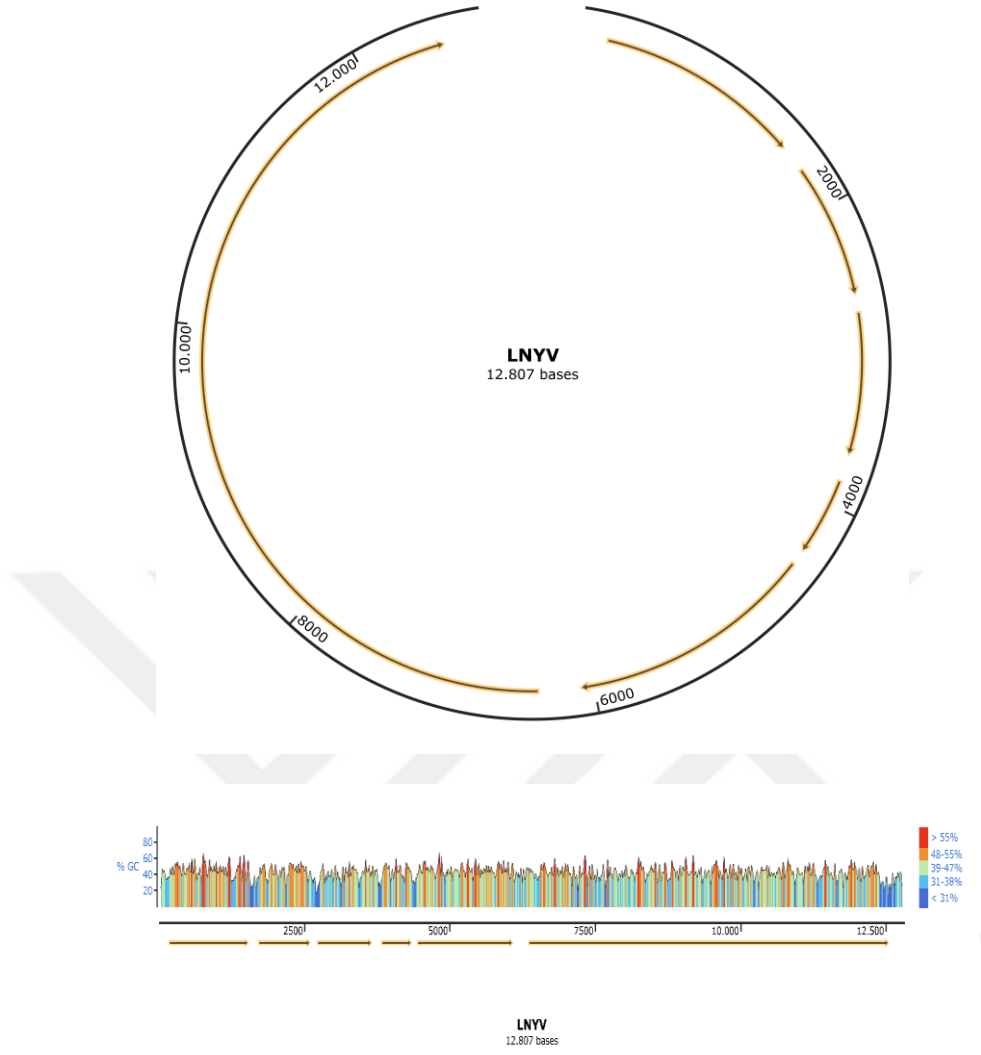
ORF1 169-1548 bazları arasında olup 459 amino asitten oluşan bir nükleokapsit proteinini (erişim no. CAG34083) kodlamaktadır. ORF2 1712-2614 bazları arasında olup 300 amino asitten oluşan bir fosfoprotein (erişim no. YP_425088) kodlamaktadır. ORF3 2758-3666 bazları arasında olup 302 amino asitten oluşan bir fosfoprotein (erişim no. YP_425089) kodlamaktadır.



Şekil 4.2 Marul nekrotik bodurluk virüsü genomik organizasyonu.

ORF4 3828-4361 bazları arasında olup 177 amino asitten oluşan bir matriks proteinini (erişim no. YP_425090) kodlamaktadır. ORF5 4445-6100 bazları arasında olup 551 amino asitten oluşan bir matriks proteini (erişim no. UYZ05906) kodlamaktadır.

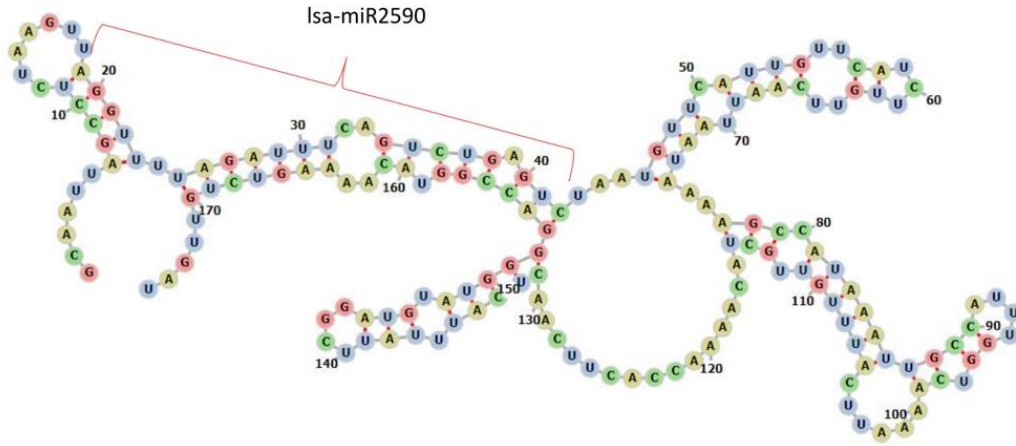
ORF6 6357-12563 bazları arasında olup 2068 amino asitten oluşan bir matriks proteini (erişim no. YP_425092) kodlamaktadır. LNYV genom organizasyonu, sarı oklarla gösterilmekte olan ORF'leri ve % GC içeriği Şekil 4.3'deki gibidir.



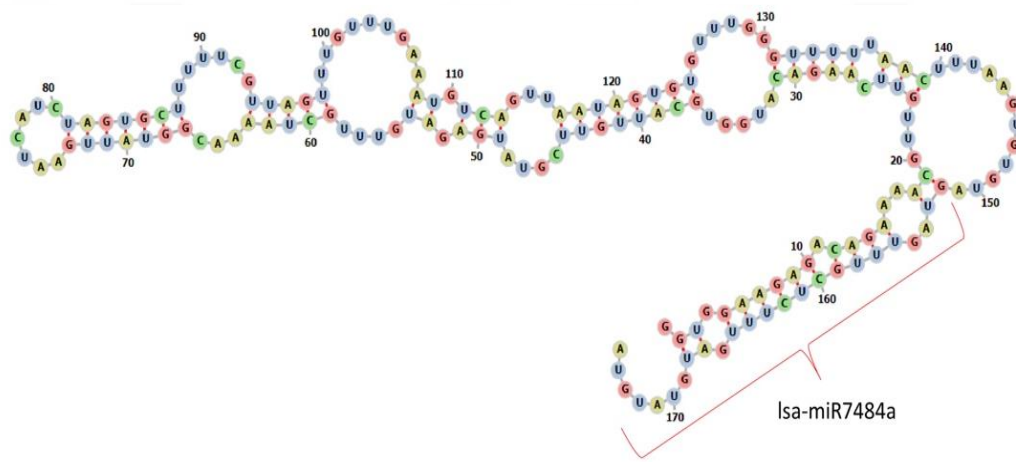
Şekil 4.3 Marul nekrotik sarılık virüsü genomik organizasyonu.

4.4 pre-miRNA İkincil Yapılarının Belirlenmesi

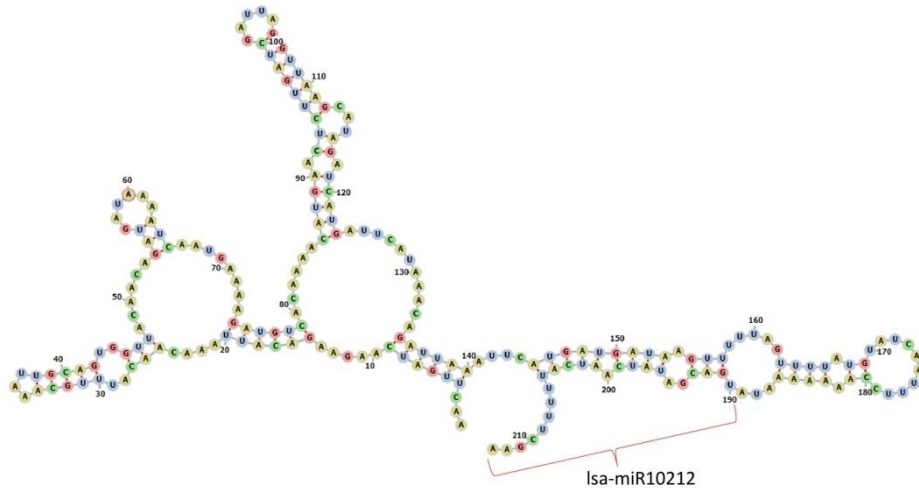
Olgun miRNA ve miRNA* arasında Watson-Crick veya G/U baz eşleşmesi dahil en az 12 baz çiftine sahip yeni tanımlanan pre-lsa-miRNA'ların ikincil stem-loop hairpin yapıları, RNAfold web sunucusu kullanılarak belirlendi. 59 miRNA'nın ikincil yapıları Şekil 4.4 – Şekil 4.62 aralığında gösterildiği gibidir. Olgun miRNA'lar kırmızı çizgilerle şekil üzerinde belirtilmiştir.



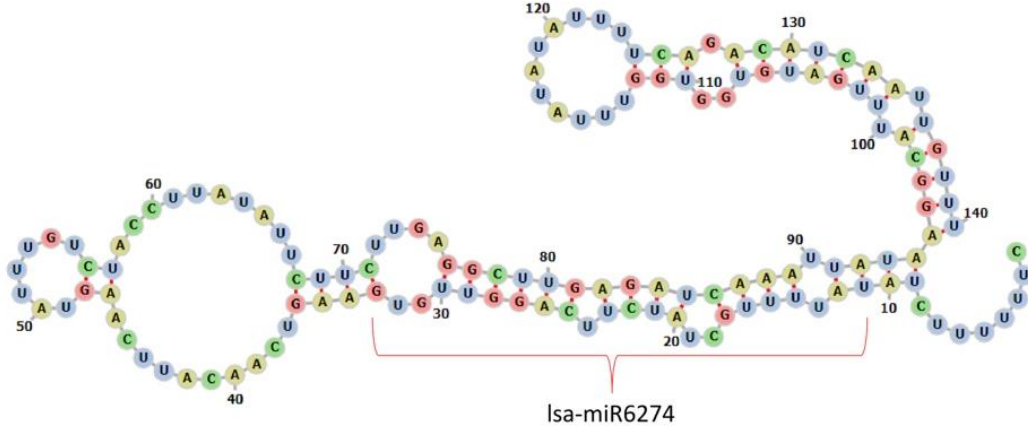
Şekil 4.4 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR2590 dizisinin ikincil yapısı.



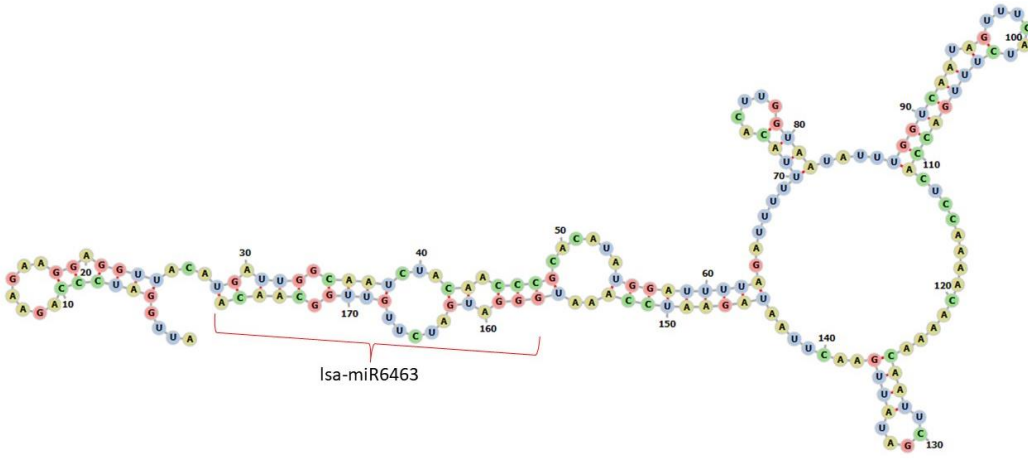
Şekil 4.5 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR7484a dizisinin ikincil yapısı.



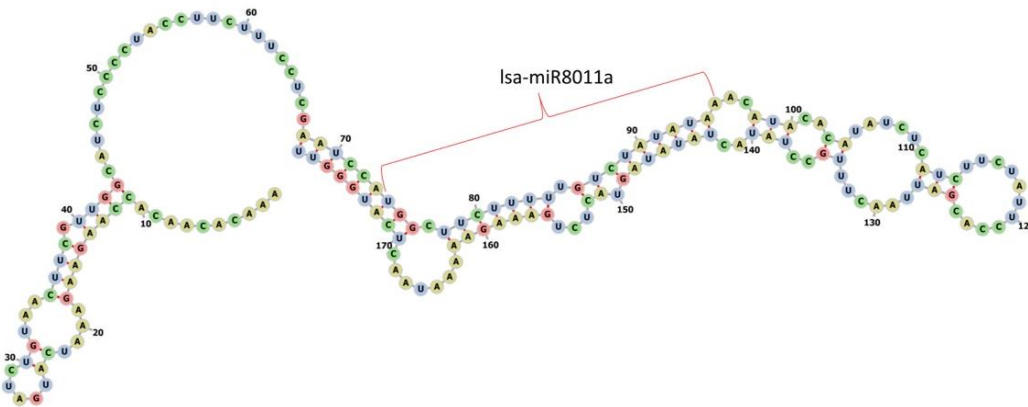
Şekil 4.6 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR10212 dizisinin ikincil yapısı.



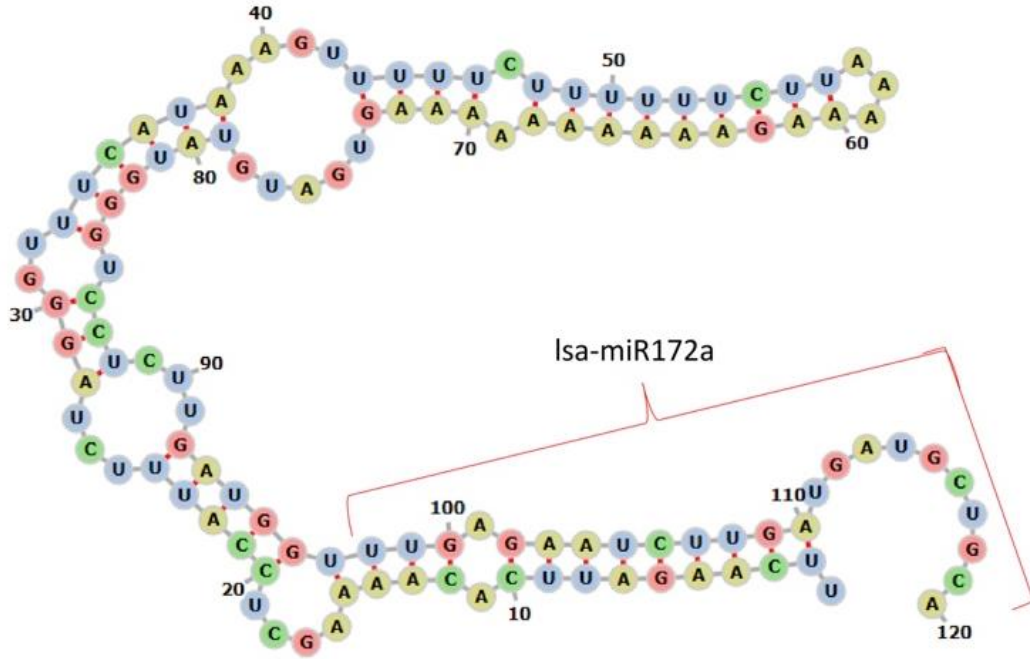
Şekil 4.7 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6274 dizisinin ikincil yapısı.



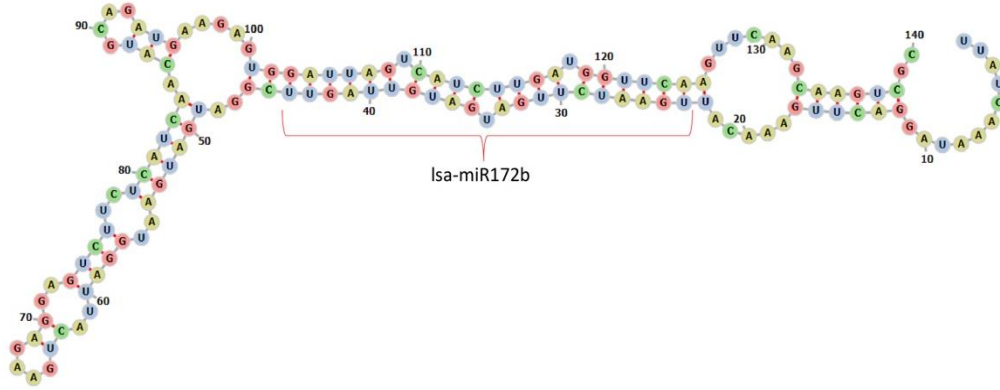
Şekil 4.8 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6463 dizisinin ikincil yapısı.



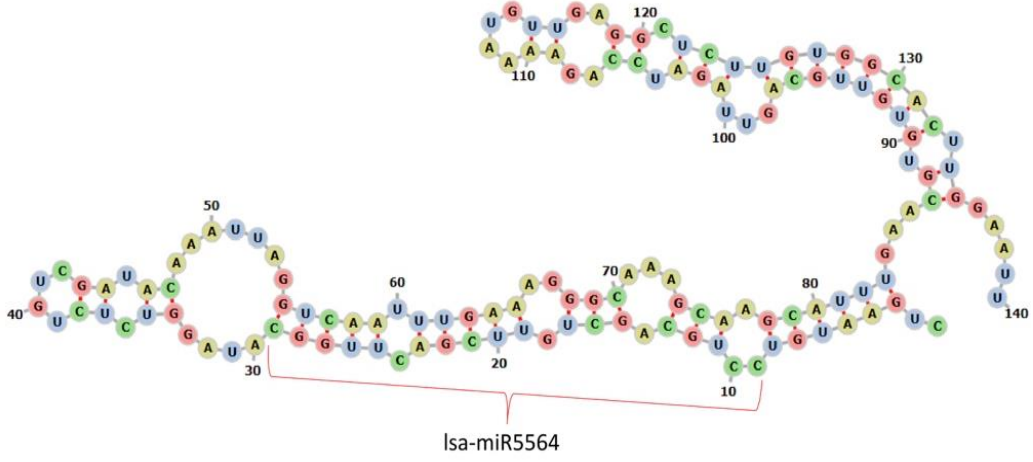
Şekil 4.9 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR8011a dizisinin ikincil yapısı.



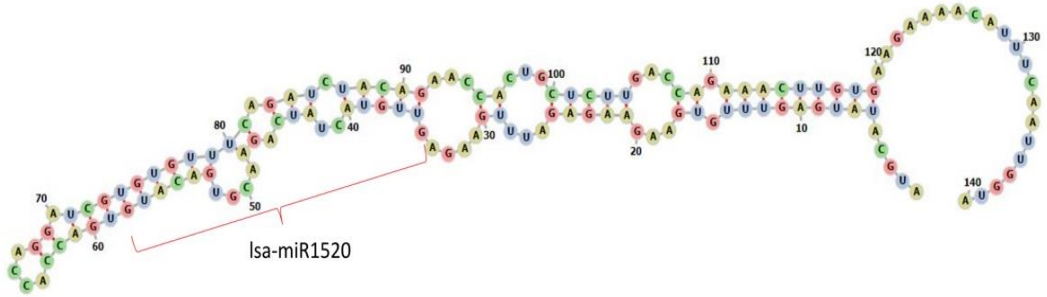
Şekil 4.10 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172a dizisinin ikincil yapısı.



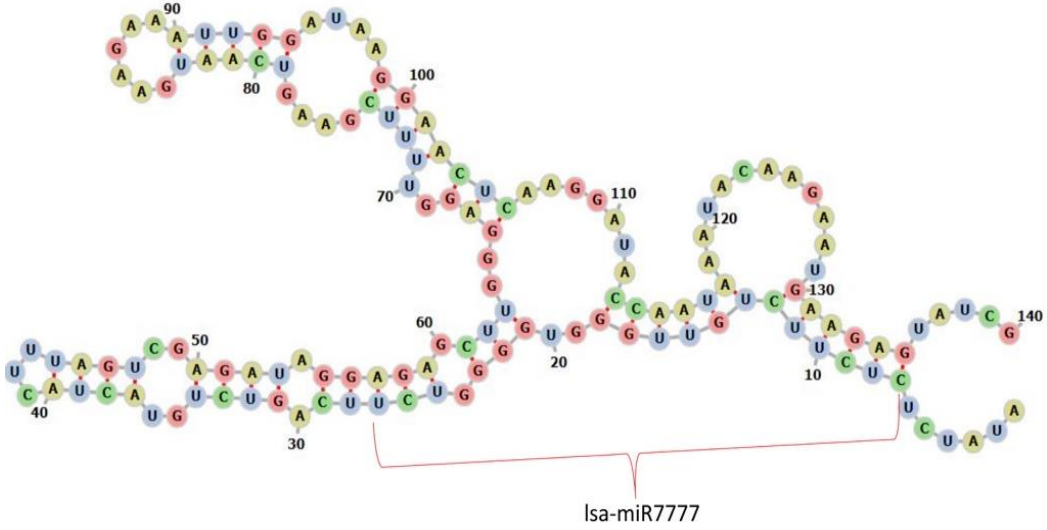
Şekil 4.11 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172b dizisinin ikincil yapısı.



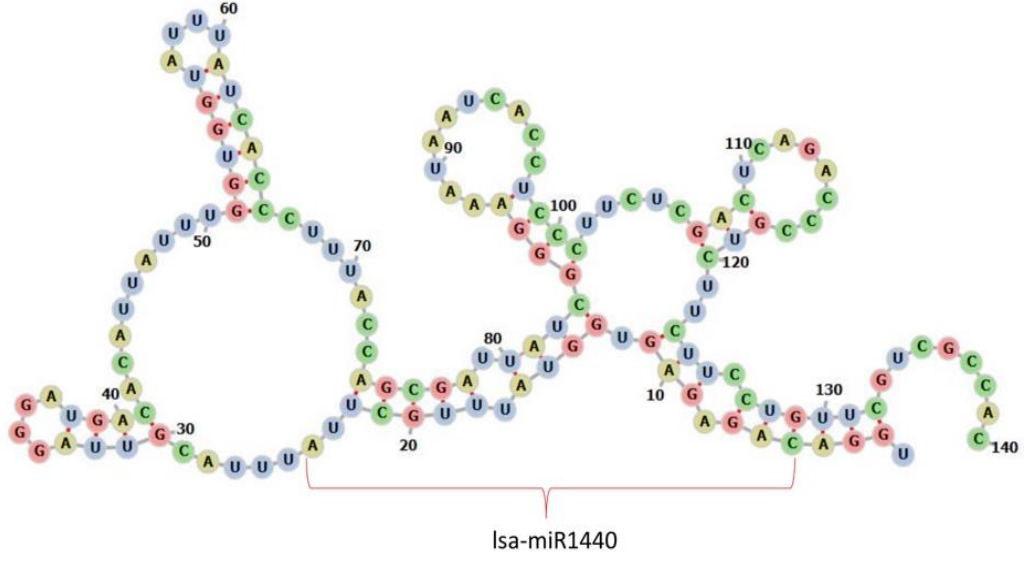
Şekil 4.12 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR5564 dizisinin ikincil yapısı.



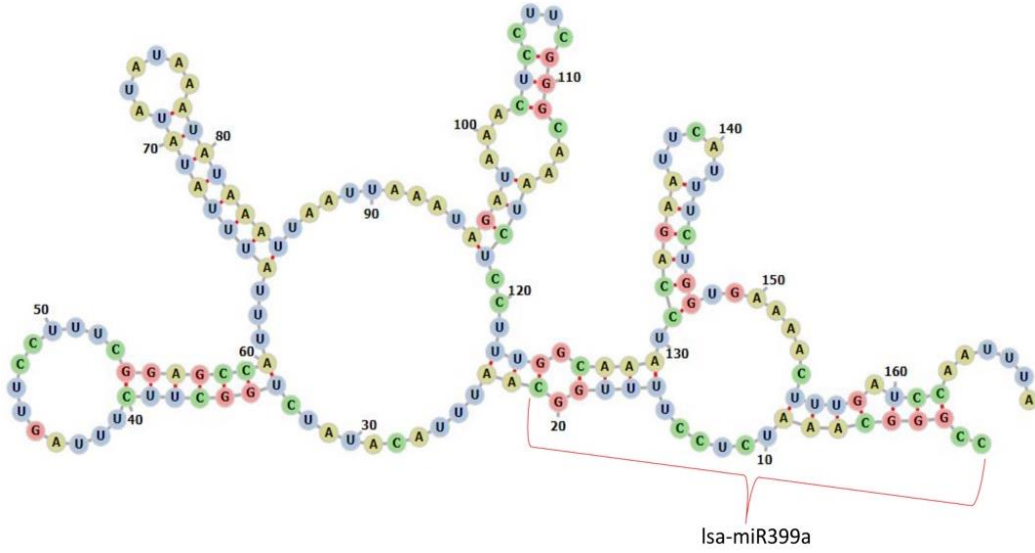
Şekil 4.13 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1520 dizisinin ikincil yapısı.



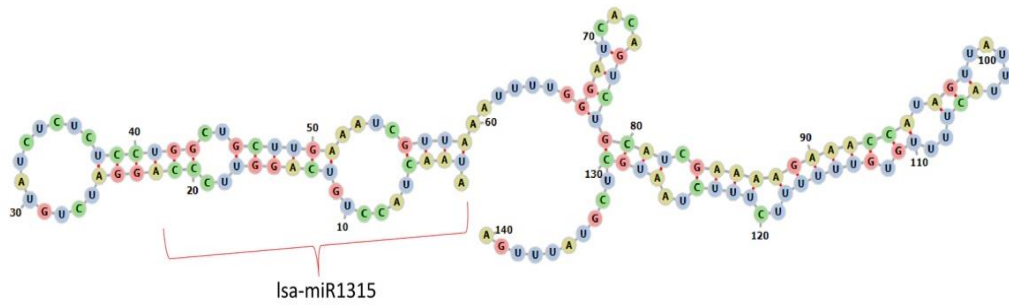
Şekil 4.14 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR7777 dizisinin ikincil yapısı.



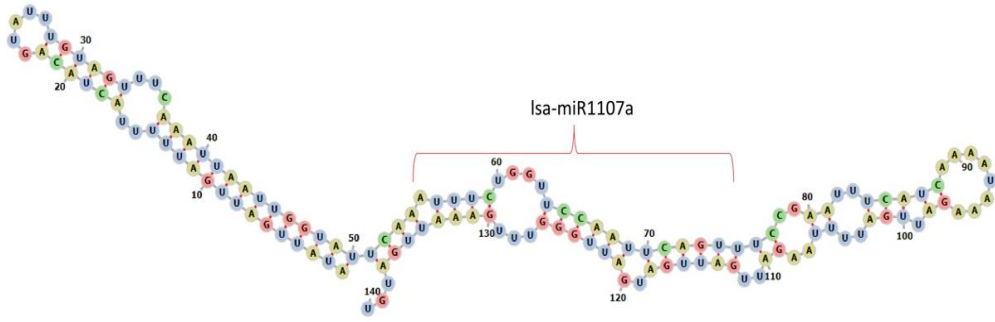
Şekil 4.15 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1440 dizisinin ikincil yapısı.



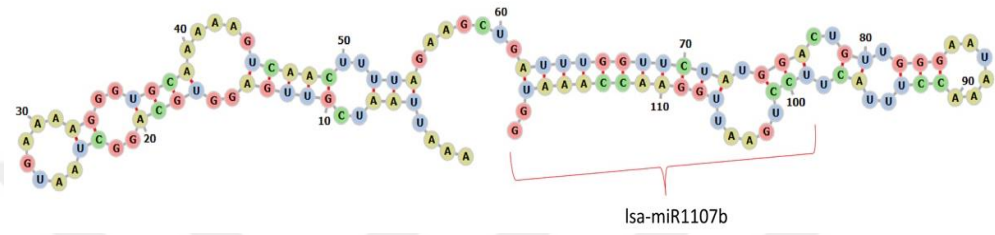
Şekil 4.16 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR399a dizisinin ikincil yapısı.



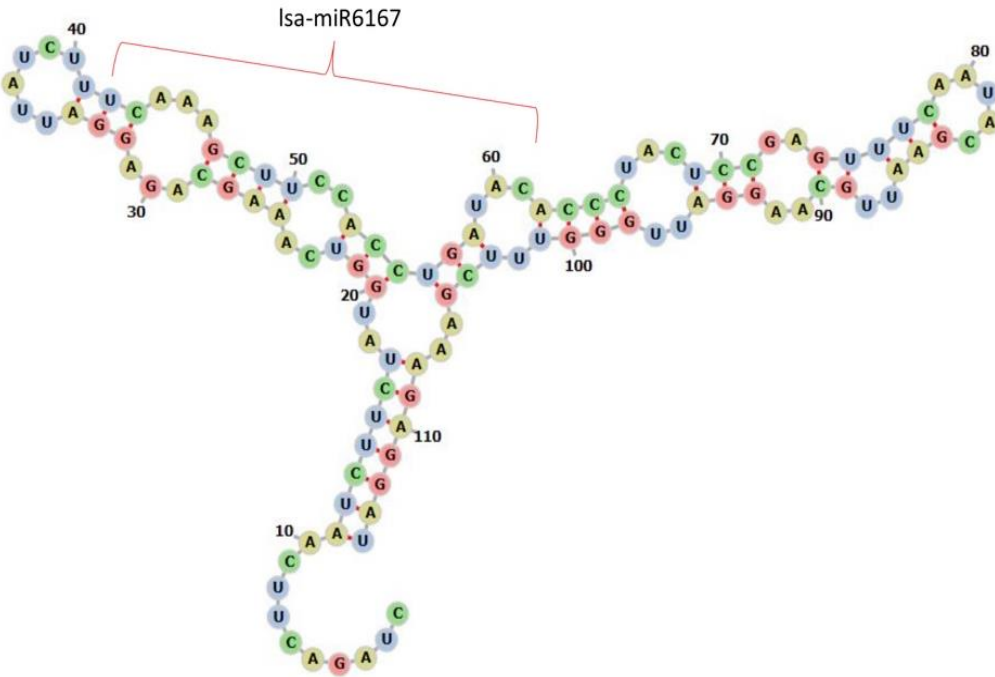
Şekil 4.17 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1315 dizisinin ikincil yapısı.



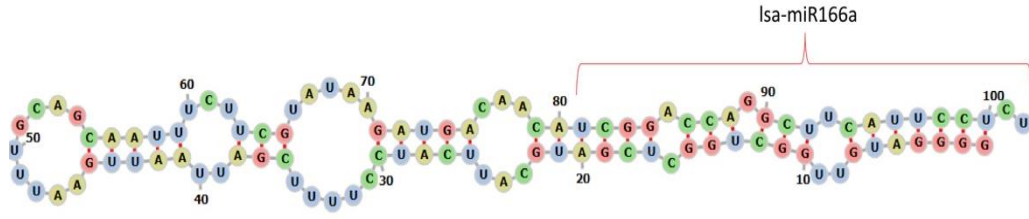
Şekil 4.18 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1107a dizisinin ikincil yapısı.



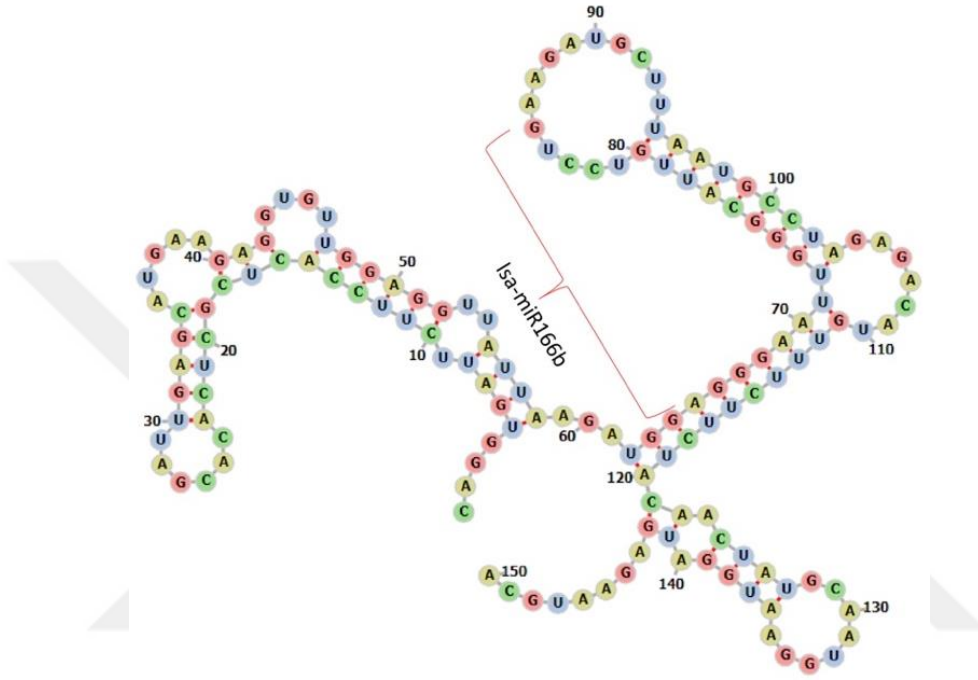
Şekil 4.19 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1107b dizisinin ikincil yapısı.



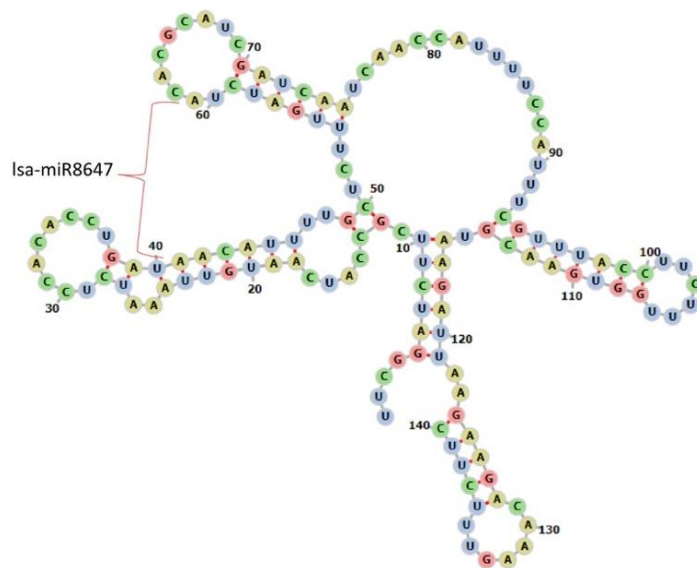
Şekil 4.20 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6167 dizisinin ikincil yapısı.



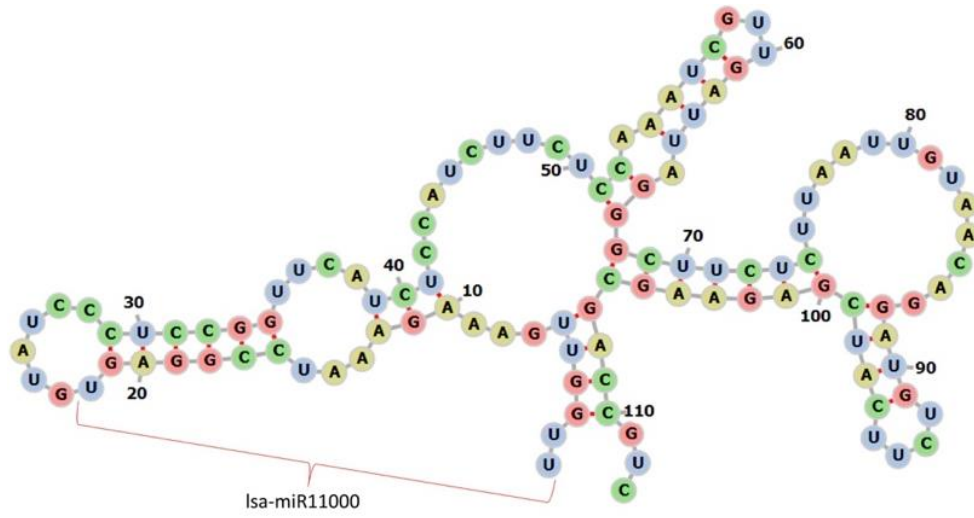
Şekil 4.21 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR166a dizisinin ikincil yapısı.



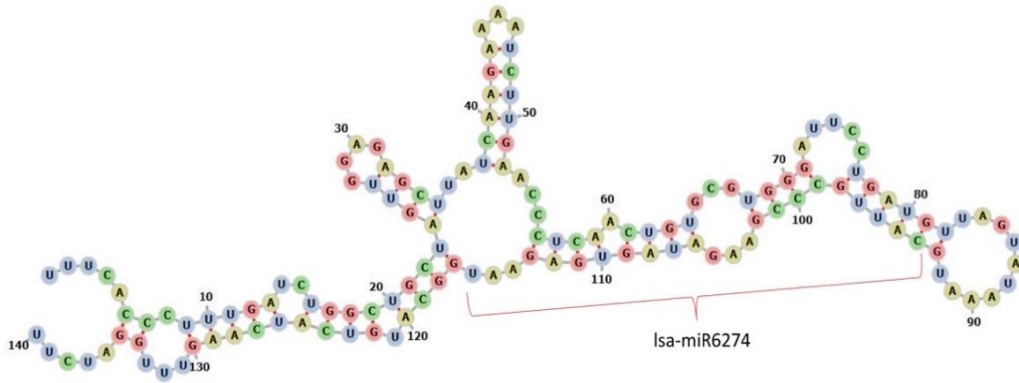
Şekil 4.22 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR166b dizisinin ikincil yapısı.



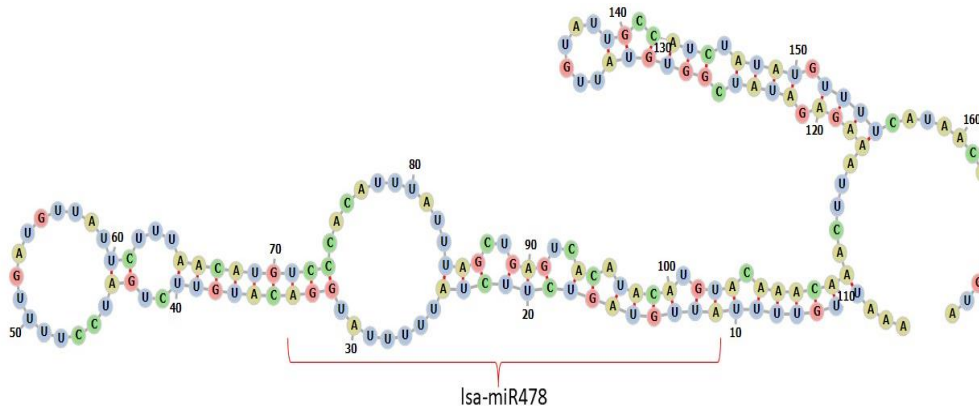
Şekil 4.23 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR8647 dizisinin ikincil yapısı.



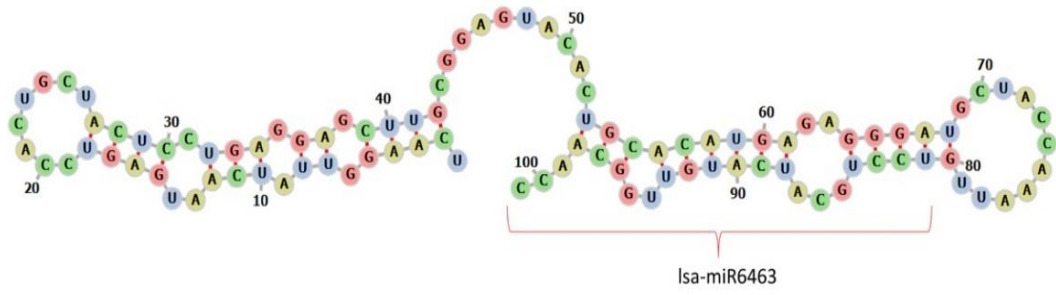
Şekil 4.24 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR11000 dizisinin ikincil yapısı.



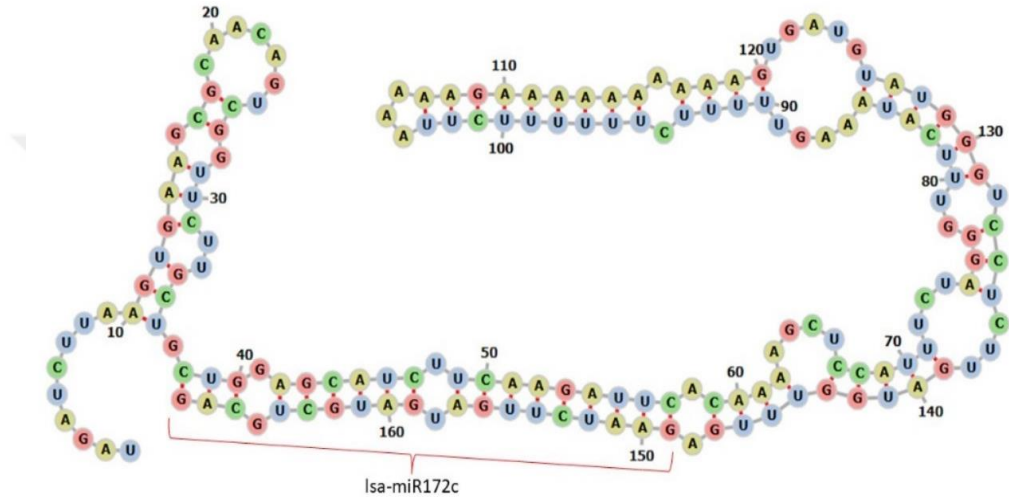
Şekil 4.25 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6274 dizisinin ikincil yapısı.



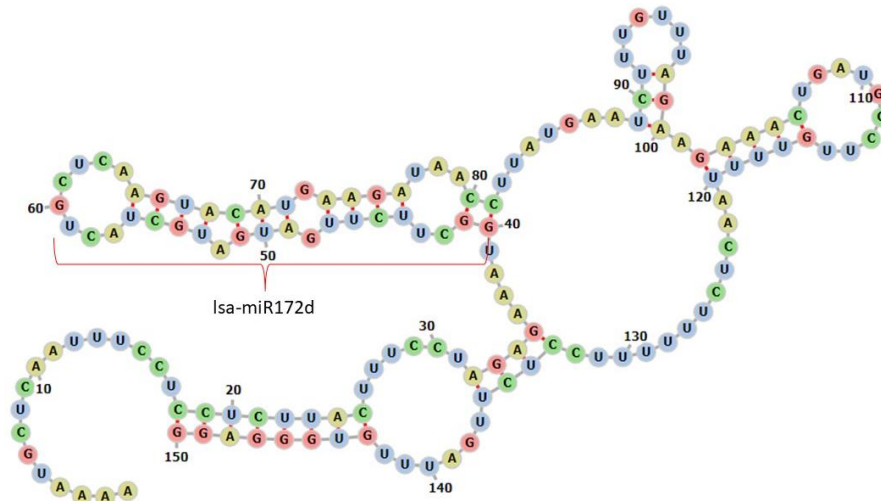
Şekil 4.26 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR478 dizisinin ikincil yapısı.



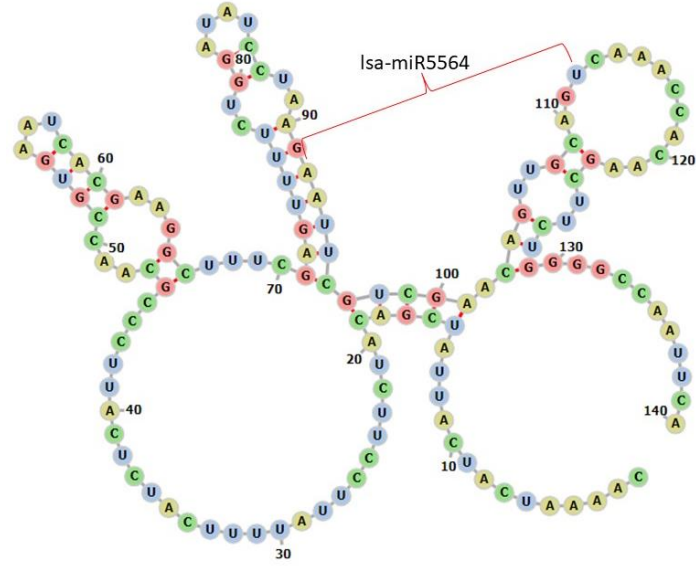
Şekil 4.27 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6463 dizisinin ikincil yapısı.



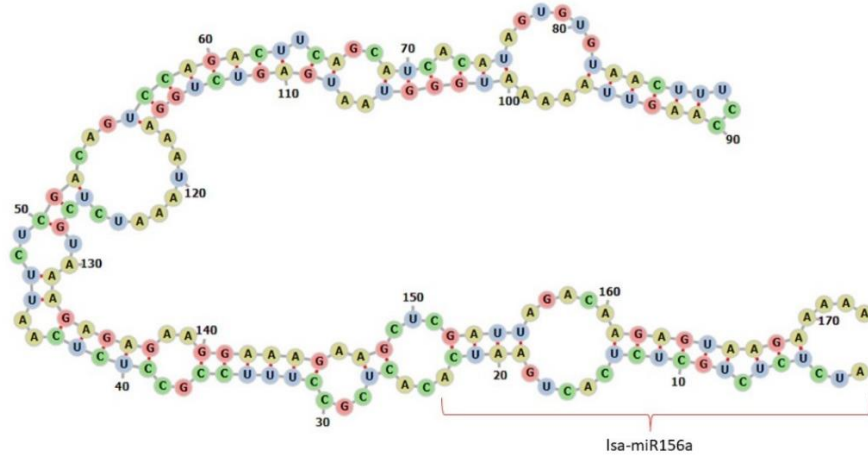
Şekil 4.28 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172c dizisinin ikincil yapısı.



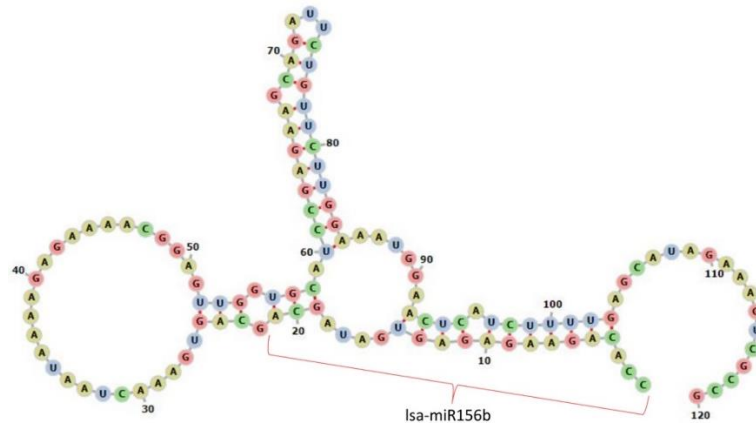
Şekil 4.29 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172d dizisinin ikincil yapısı.



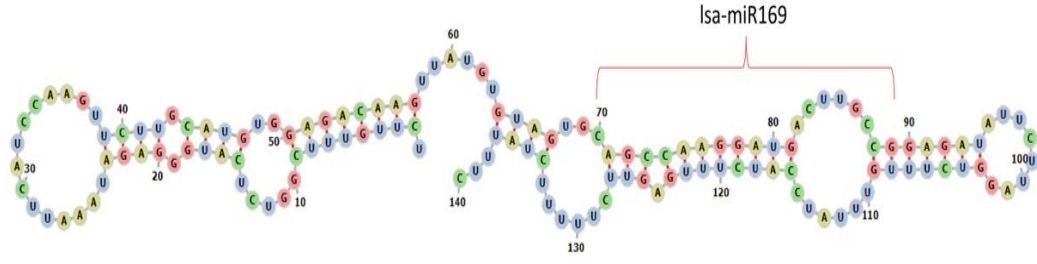
Şekil 4.30 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR5564 dizisinin ikincil yapısı.



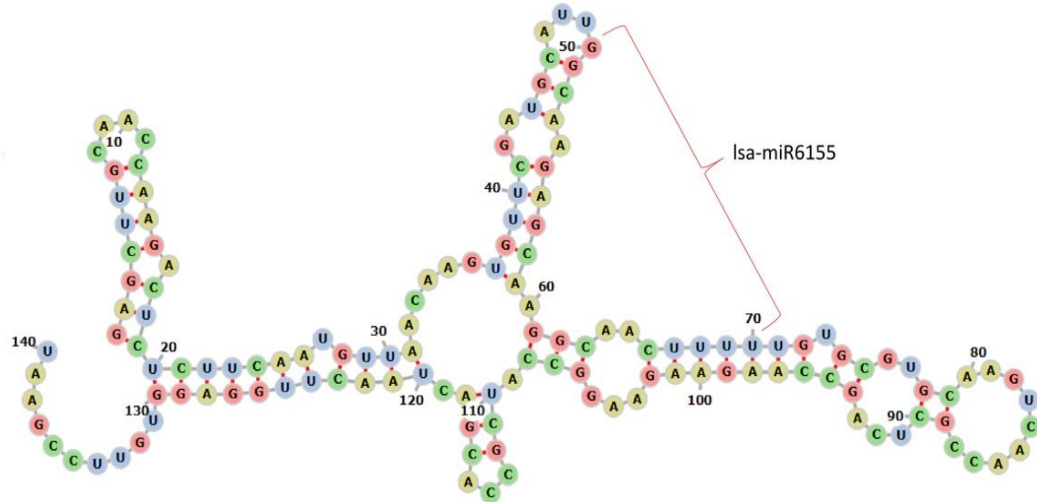
Şekil 4.31 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR156a dizisinin ikincil yapısı.



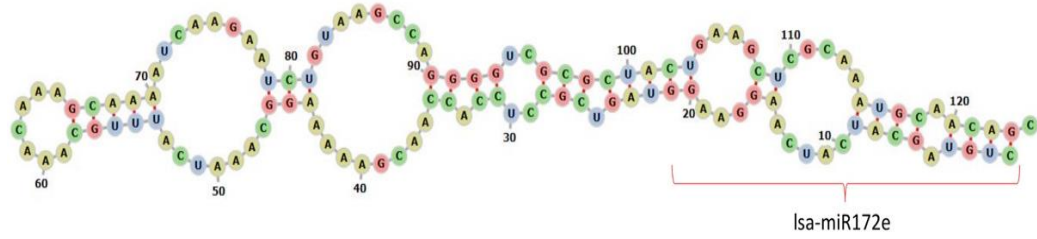
Şekil 4.32 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR156b dizisinin ikincil yapısı.



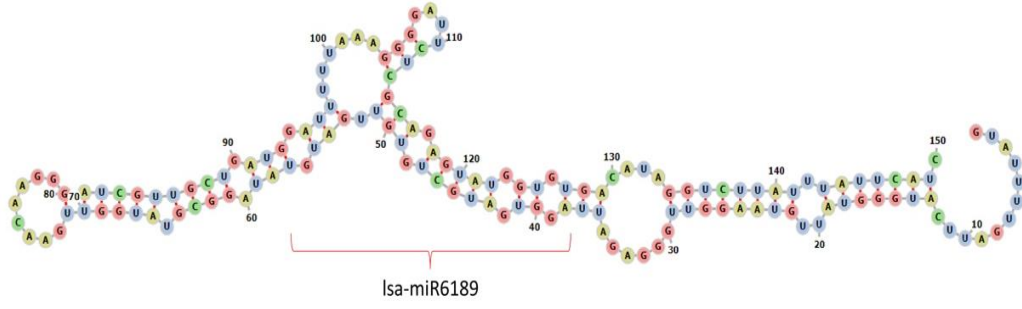
Şekil 4.33 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR169 dizisinin ikincil yapısı.



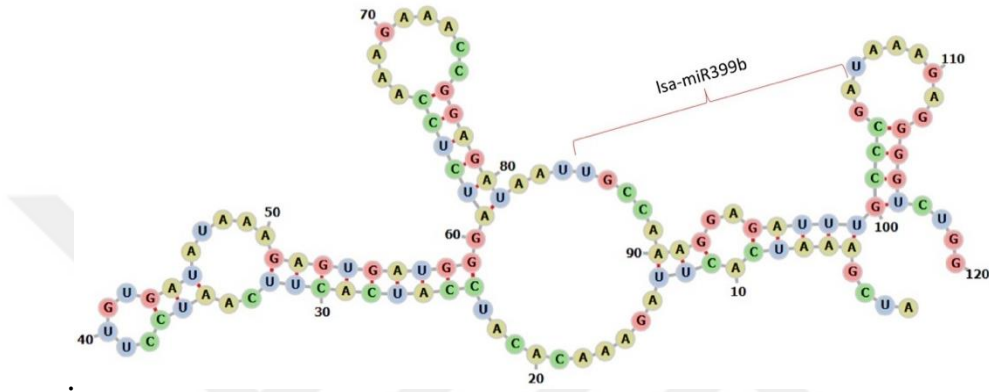
Şekil 4.34 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6155 dizisinin ikincil yapısı.



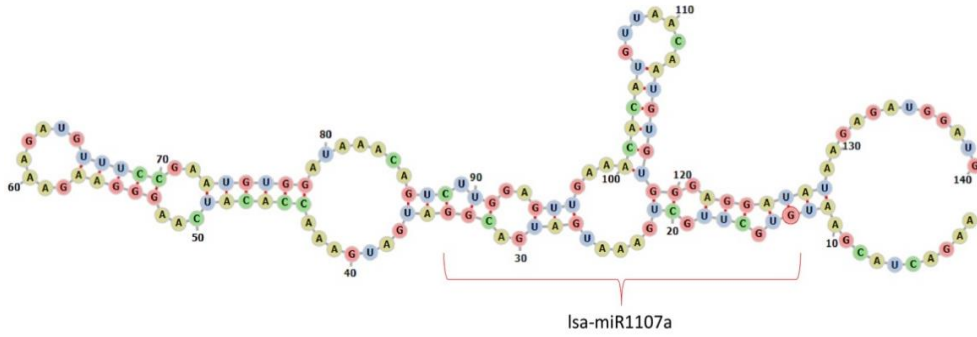
Şekil 4.35 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172e dizisinin ikincil yapısı.



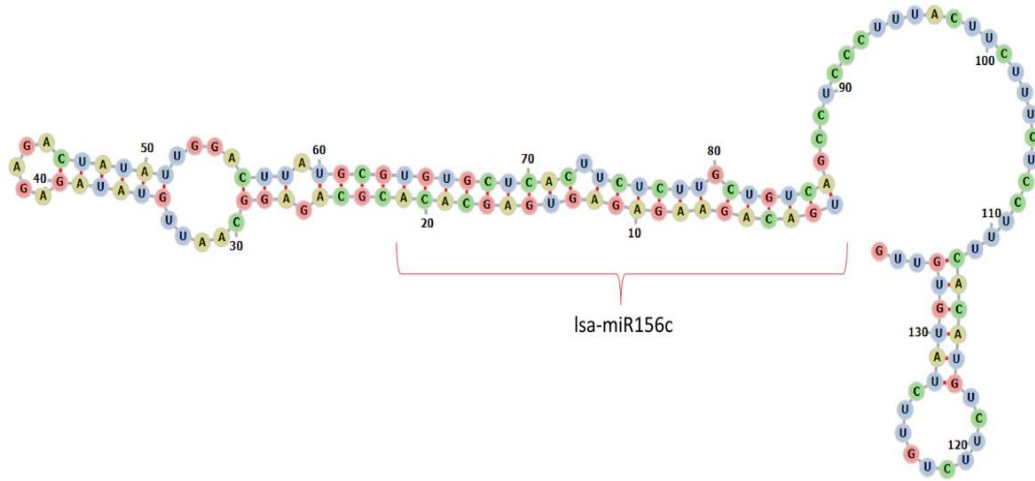
Şekil 4.36 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6189 dizisinin ikincil yapısı



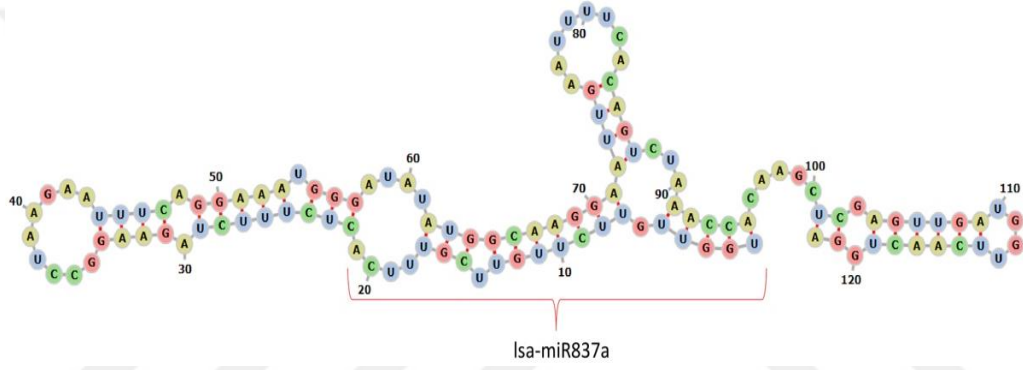
Şekil 4.37 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR399b dizisinin ikincil yapısı.



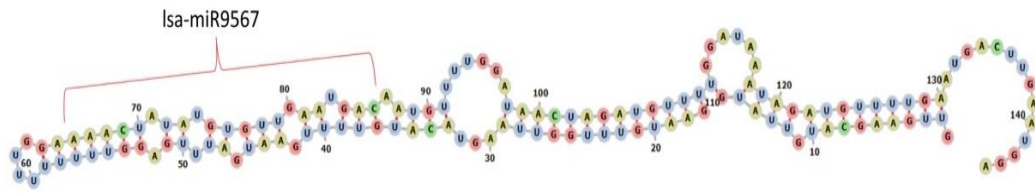
Şekil 4.38 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR1107a dizisinin ikincil yapısı.



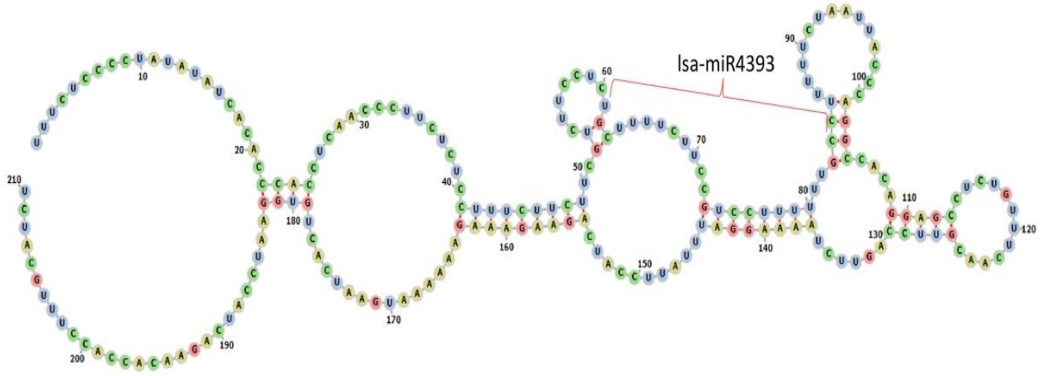
Şekil 4.39 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR156c dizisinin ikincil yapısı.



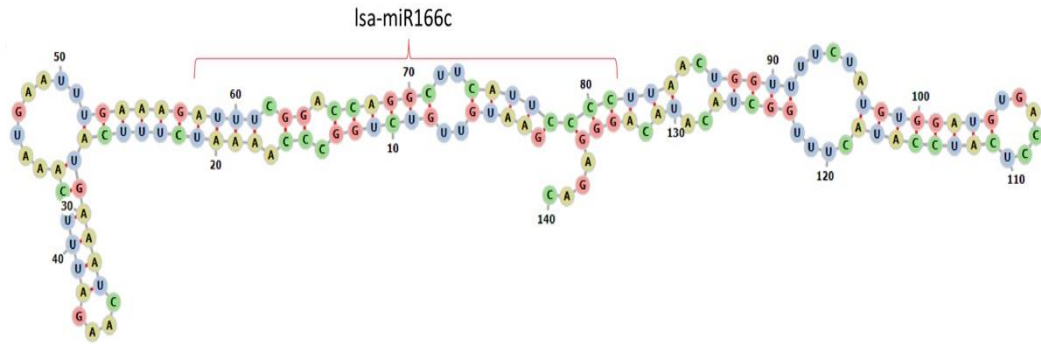
Şekil 4.40 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR837a dizisinin ikincil yapısı.



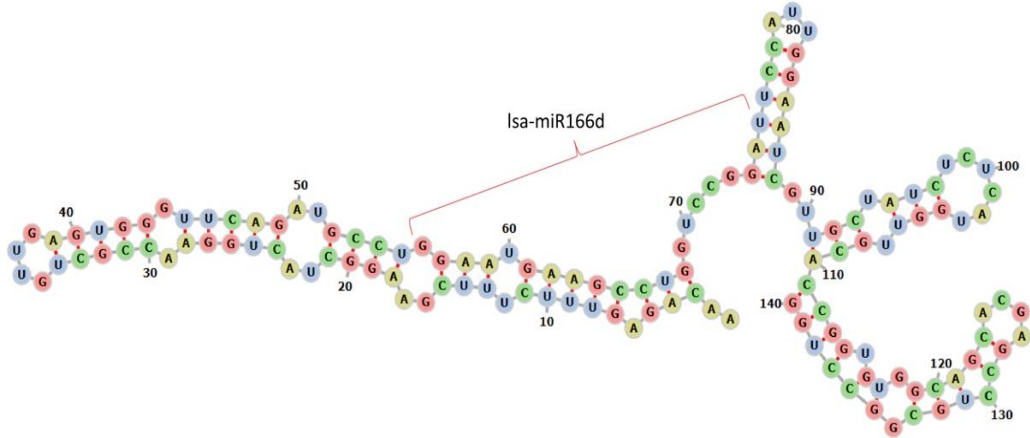
Şekil 4.41 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR9567 dizisinin ikincil yapısı.



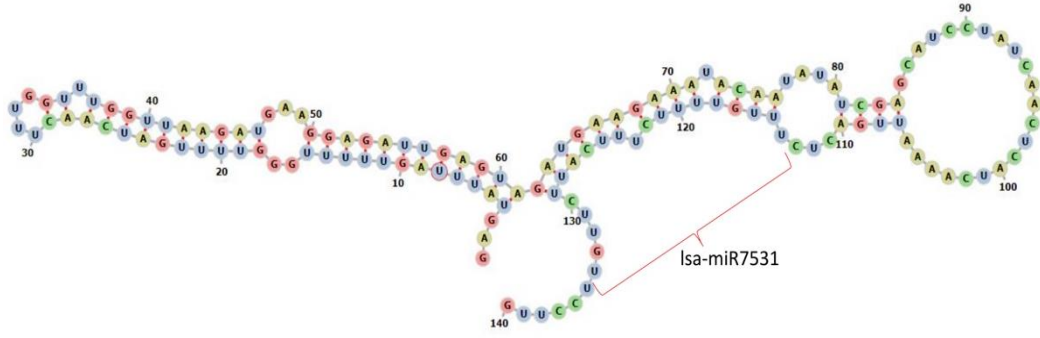
Şekil 4.42 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR4393 dizisinin ikincil yapısı.



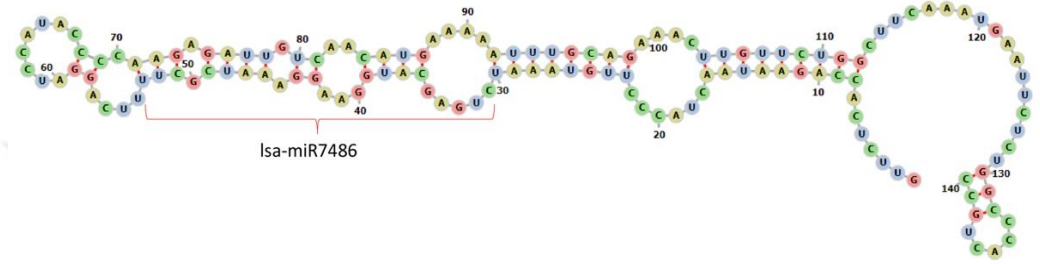
Şekil 4.43 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR166c dizisinin ikincil yapısı.



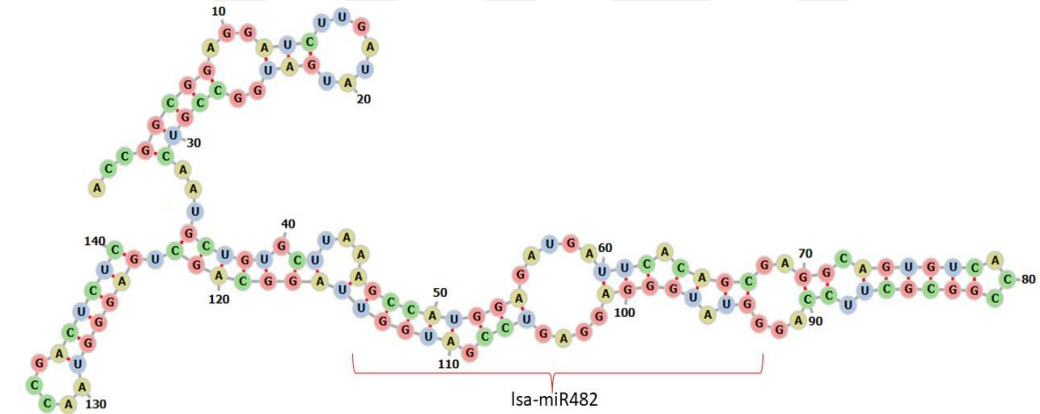
Şekil 4.44 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR166d dizisinin ikincil yapısı.



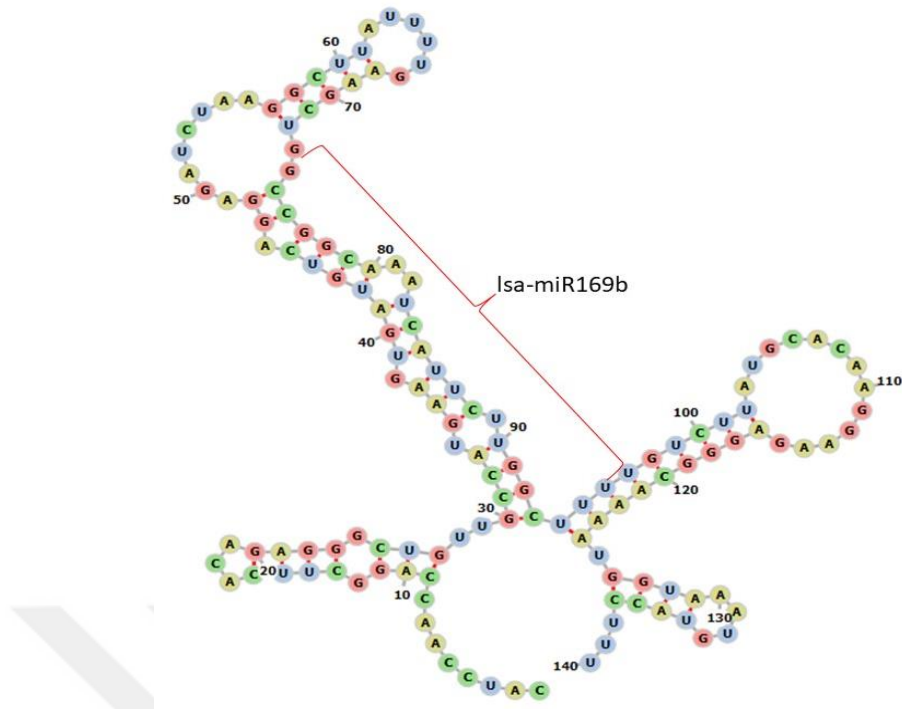
Şekil 4.45 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR7531 dizisinin ikincil yapısı.



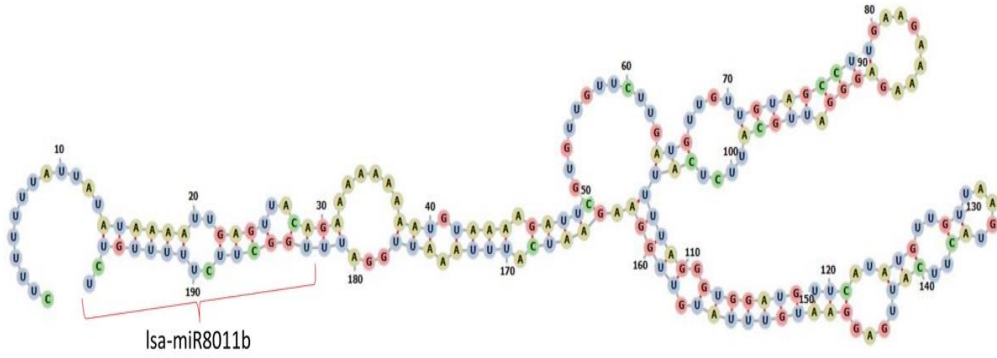
Şekil 4.46 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR7486 dizisinin ikincil yapısı.



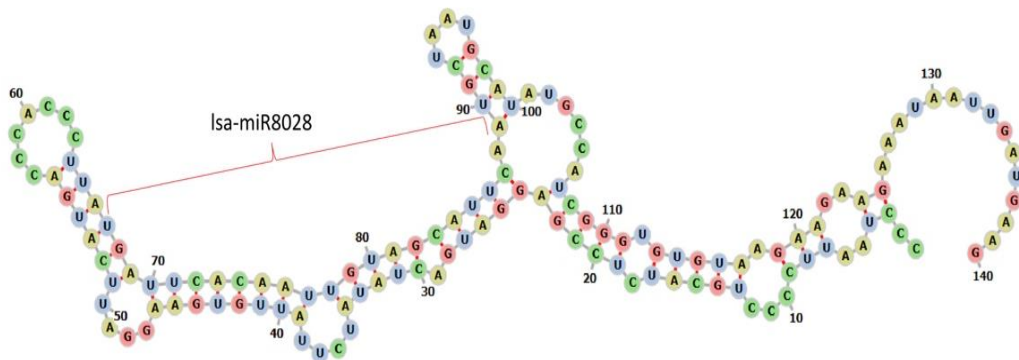
Şekil 4.47 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR482 dizisinin ikincil yapısı.



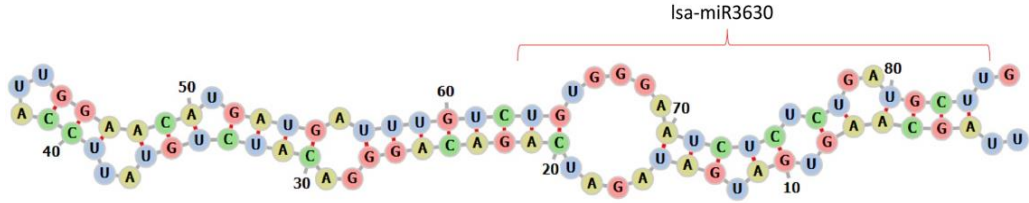
Şekil 4.48 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR169b dizisinin ikincil yapısı.



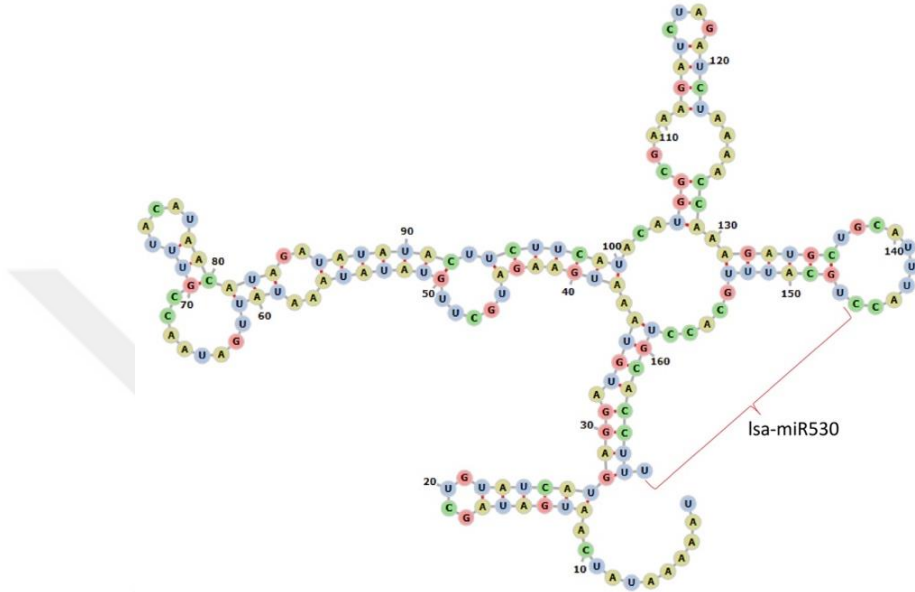
Şekil 4.49 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR8011b dizisinin ikincil yapısı.



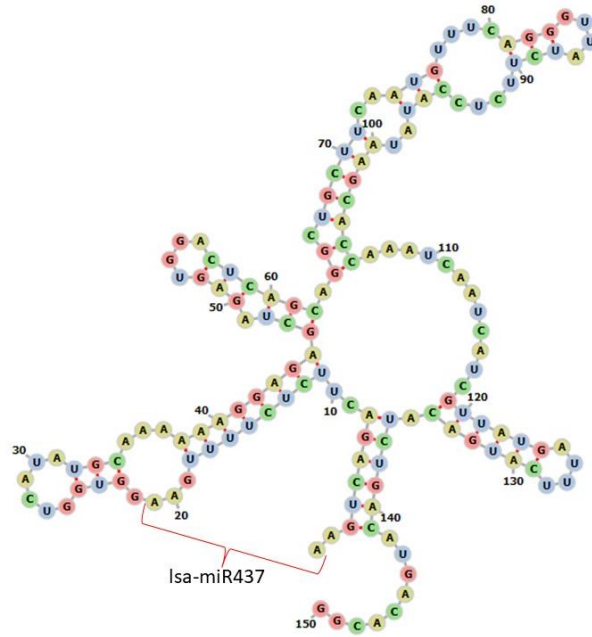
Şekil 4.50 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR8028 dizisinin ikincil yapısı.



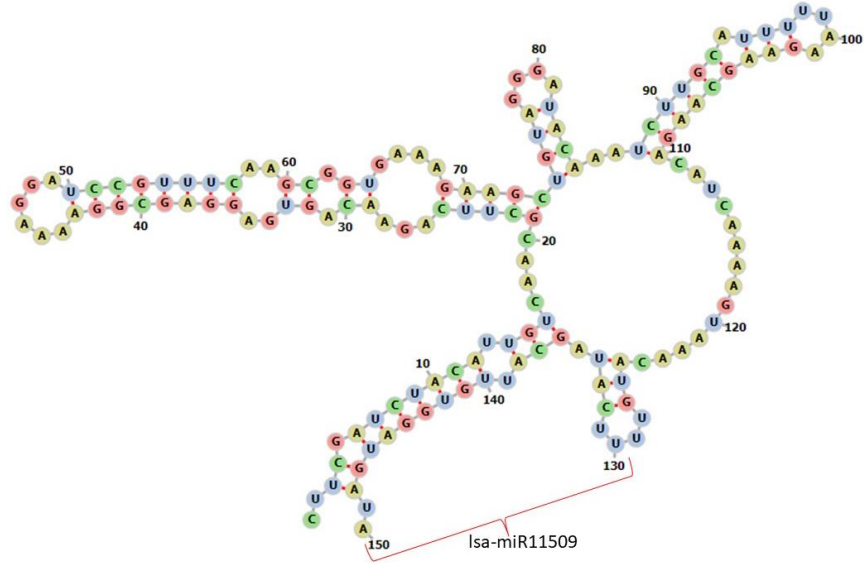
Şekil 4.51 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR3630 dizisinin ikincil yapısı.



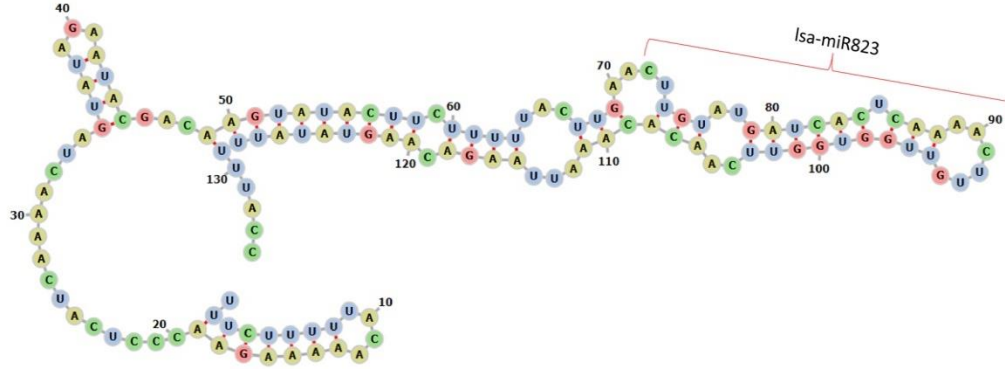
Şekil 4.52 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR530 dizisinin ikincil yapısı.



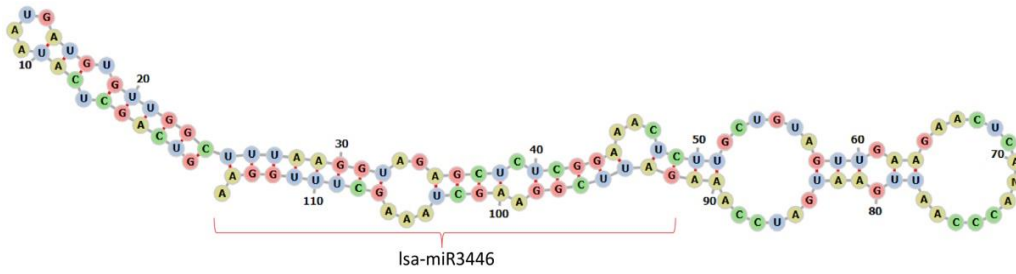
Şekil 4.53 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR437 dizisinin ikincil yapısı.



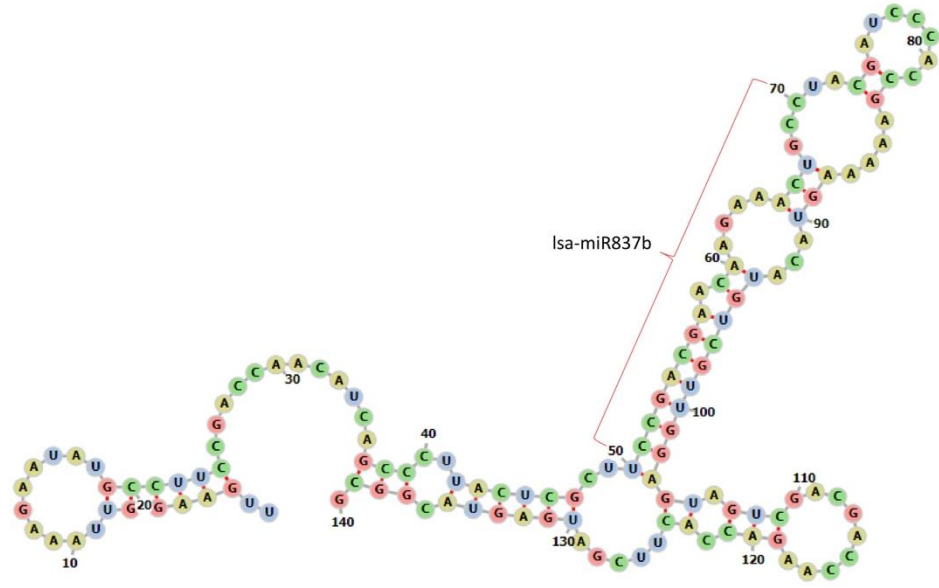
Şekil 4.54 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR11509 dizisinin ikincil yapısı.



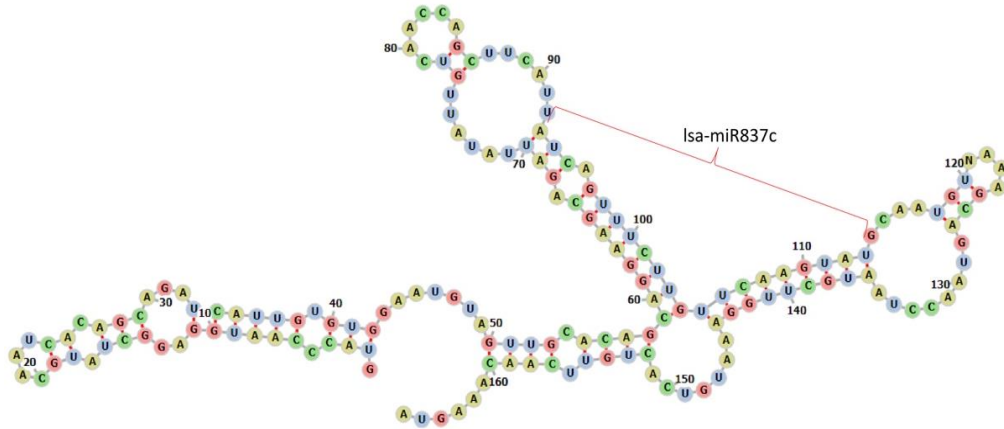
Şekil 4.55 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR823 dizisinin ikincil yapısı.



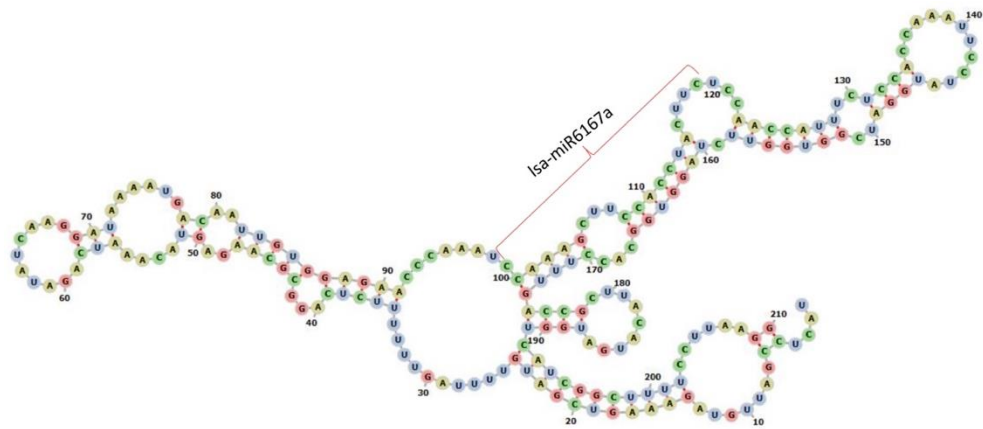
Şekil 4.56 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR3446 dizisinin ikincil yapısı.



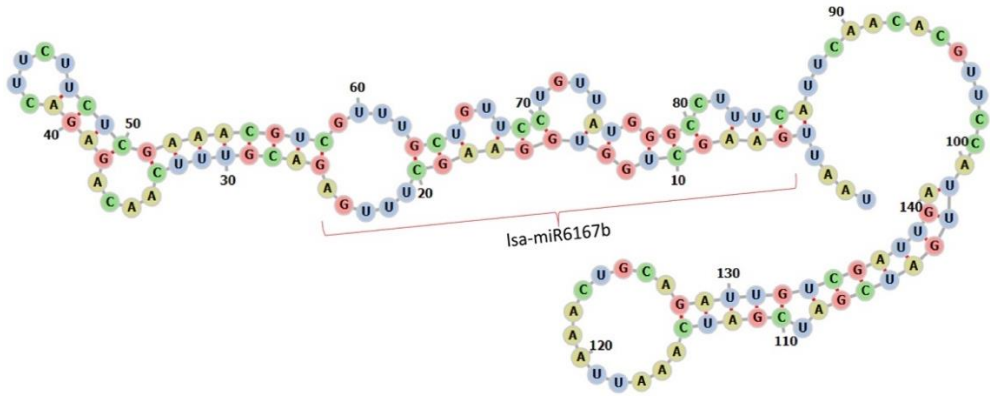
Şekil 4.57 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR837b dizisinin ikincil yapısı.



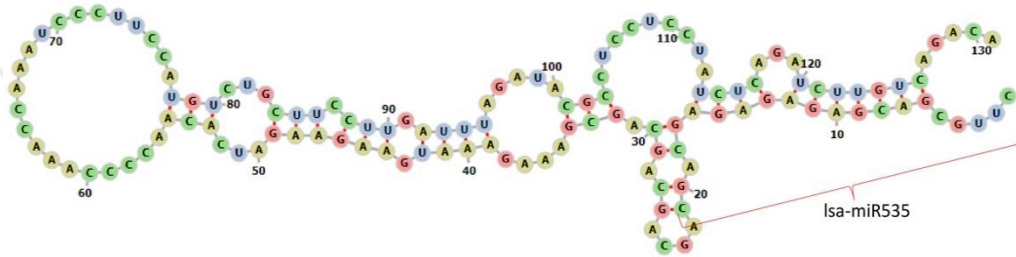
Şekil 4.58 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR837c dizisinin ikincil yapısı.



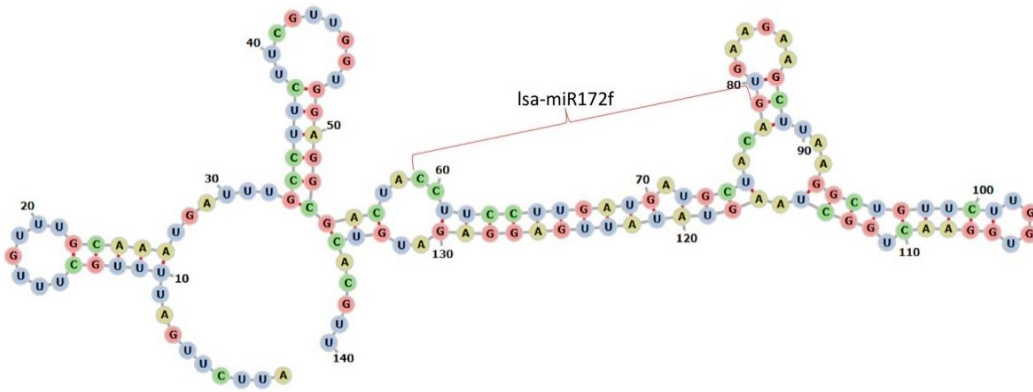
Şekil 4.59 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6167a dizisinin ikincil yapısı.



Şekil 4.60 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR6167b dizisinin ikincil yapısı.



Şekil 4.61 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR535 dizisinin ikincil yapısı.



Şekil 4.62 *Lactuca sativa* bitkisinde yeni tanımlanan lsa-miR172f dizisinin ikincil yapısı.

Yeni tanımlanan miRNA'ların MFEI, AMFE ve %GC değerleri, virüslerin her biri için RNAfold programındaki Minimum Serbest Enerji algoritmasından elde edilen verilere göre hesaplanmıştır. Bilgiler LMV için Tablo 4.2, LNSV için Tablo 4.3 ve LNYV için Tablo 4.4'de gösterildiği gibidir. Referans miRNA dizileri ile yapılan karşılaştırma sonucunda yeni tanımlanan miRNA dizilerindeki yanlış eşleşmeler kırmızı renk ile gösterilmiştir. LMV'yi hedefleyen 12 miRNA, LNSV'yi hedefleyen 25 miRNA, LNYV'yi hedefleyen 40 adet miRNA belirlendi.

Tablo 4.2 LMV'yi hedefleyen yeni tanımlanan miRNA dizileri

Yeni Tanımlanan miRNA'lar	Referans miRNA	Dizi	Pre-miRNA nt sayısı	%GC	AMFE	MFEI	MFE
lsa-miR7484a	gra-miR7484n MIMAT0034258	GTAGTTTGCTCTTTGATGTATGTA	175	37,50	109,17	2,91	26,2
lsa-miR10212	eun-miR10212-3p MIMAT0041101	TGACGATATCAATCATTTTTTCGAA	213	29,17	120,00	4,11	28,8
lsa-miR6274	ppe-miR6274a MIMAT0027301	TATTTTGCTATCTTCAGGTTGTG	140	34,78	102,17	2,94	23,5
lsa-miR6463	ptc-miR6463 MIMAT0025189	GGGATGATCTTGTGGCAACA	177	47,62	136,66	2,87	28,7
lsa-miR8011a	stu-miR8011b-3p MIMAT0030950	TGGCTTCTTTTGTCTATATAA	108	27,27	95,00	3,48	20,9
lsa-miR172a	ata-miR172 MIMAT0018221	TTGAGAATCTTGATGATGCTGCA	163	39,13	129,13	3,30	29,7
lsa-miR172b	cme-miR172f MIMAT0026099	TGAATCTTGATGATGTTAGTT	140	28,57	164,29	5,75	34,5
lsa-miR5564	sbi-miR5564c-5p MIMAT0026390	CCTGCAGCTGTTCGACTTGGC	140	61,90	135,71	2,19	28,5
lsa-miR1520	gma-miR1520h MIMAT0018255	GTTGTACTATCAGAACGTGACATG	140	41,67	101,67	2,44	24,4
lsa-miR7777	bdi-miR7777-3p.1 MIMAT0030309	CTCTTCTGTTGGGTGGGGTCT	140	57,14	141,43	2,48	29,7
lsa-miR1440	osa-miR1440a MIMAT0005990	CAGAGAGTGGTATTTGCTTA	140	40,00	140,00	3,50	28
lsa-miR399a	zma-miR399g-3p MIMAT0014022	CCGGGCAAATCTCCTTTTGGC	168	57,14	129,05	2,26	27,1

Tablo 4.3 LNSV’yi hedefleyen yeni tanımlanan miRNA dizileri

Yeni Tanımlanan miRNA’lar	Referans miRNA	Dizi	Pre-miRNA nt sayısı	%GC	AMFE	MFEI	MFE
lsa-miR1315	pta-miR1315 MIMAT0009132	TA ACTA CCTGTCAGGTTCCCA	140	47,62	122,38	2,57	25,7
lsa-miR1107a	smo-miR1107 MIMAT0005264	AT TT CTGGTTCCAATTCAG TT	140	33,33	138,57	4,16	29,1
lsa-miR1107b	smo-miR1107 MIMAT0005264	TCCTGAATTGGAACCA AATGG	119	42,86	119,05	2,78	25
lsa-miR6167	hbr-miR6167 MIMAT0024785	TCAAAGCTTCCACCTG ATAC	114	45,00	107,50	2,39	21,5
lsa-miR166a	crt-miR166b MIMAT0014085	TCGGACCAGGCTTCATTC CTCT	102	54,55	140,91	2,58	31
lsa-miR166b	crt-miR166b MIMAT0014085	AGGGAAT TGGGCATTGTCCTG	150	52,38	153,33	2,93	32,2
lsa-miR8647	gra-miR8647 MIMAT0034005	A ACAT TTTTGCTCTTTGATCTA	140	28,57	111,43	3,90	23,4
lsa-miR7484a	gra-miR7484n MIMAT0034258	G TAG TTTGCTCTTTGAT GTATGTA	175	33,33	109,17	3,28	26,2
lsa-miR11000	mdm-miR11000 MIMAT0043598	TTG GTG AAAGAAATCCGGAGT	113	40,91	93,23	2,28	20,51
lsa-miR6274	ppe-miR6274a MIMAT0027301	CATTGCCC GAAGATAGTGAGAAT	140	43,48	128,70	2,96	29,6
lsa-miR478	ptc-miR478e MIMAT0002080	ATTGTAGTCTTCTATTTTATGGA	169	25,00	90,42	3,62	21,7
lsa-miR8011a	stu-miR8011b-3p MIMAT0030950	TGGCTCTTTTTGTCTATATAA	108	27,27	95,00	3,48	20,9
lsa-miR172c	aly-miR172e-3p MIMAT0017530	GAATCTTGATGATGCTGC AG	168	45,00	245,00	5,44	49
lsa-miR172a	ata-miR172 MIMAT0018221	TTGAGAATCTTGATGATGCTGCA	163	39,13	129,13	3,30	29,7
lsa-miR172e	vvi-miR172a MIMAT0005699	GGCTTCTTGATGATGCTACTG	114	47,62	91,90	1,93	19,3
lsa-miR5564	sbi-miR5564c-5p MIMAT0026390	AATTCGTCGAACAG TTGCAGT	140	42,86	100,95	2,36	21,2

Tablo 4.3 LNSV'yi hedefleyen yeni tanımlanan miRNA dizileri (devamı)

Yeni Tanımlanan miRNA'lar	Referans miRNA	Dizi	Pre-miRNA nt sayısı	%GC	AMFE	MFEI	MFE
lsa-miR399a	zma-miR399g-3p MIMAT0014022	CCGGGCAAATCTCCTTTTGGC	168	57,14	129,05	2,26	27,1
lsa-miR156a	zma-miR156j-3p MIMAT0015175	ATCTCTCTGCTCTCACTGAATCA	173	43,48	183,04	4,21	42,1
lsa-miR156b	cca-miR156b MIMAT0024511	CCACAGAAGAGAGTGATAGCA	120	47,62	116,67	2,45	24,5
lsa-miR169	cpa-miR169 MIMAT0031805	CAGCCAAGGATGACTTGCCG	140	60,00	163,50	2,73	32,7
lsa-miR6155	nta-miR6155 MIMAT0024757	GGCAAGAGCAAGGCAACTTTT	140	47,62	160,48	3,37	33,7
lsa-miR172f	vvi-miR172a MIMAT0005699	CTGTAGCATCATCAAGGAAGG	124	47,62	129,05	2,71	27,1
lsa-miR7777	bdi-miR7777-3p.1 MIMAT0030309	CTCTTCTGTTGGGTGGGGTCT	140	57,14	141,43	2,48	29,7
lsa-miR6189	hvu-miR6189 MIMAT0024814	AGGTGATGCTGTGTTGATGT	150	45,00	132,00	2,93	26,4
lsa-miR399b	zma-miR399g-3p MIMAT0014022	TGCCAAAGGAGATTTGCCCGA	120	52,38	121,90	2,33	25,6

Tablo 4.4 LNYV'yi hedefleyen yeni tanımlanan miRNA dizileri

Yeni Tanımlanan miRNA'lar	Referans miRNA	Dizi	Pre-miRNA nt sayısı	%GC	AMFE	MFEI	MFE
lsa-miR828	atr-miR828 MIMAT0033948	GTGCTTGCTGAAATGATGACGG	140	50,00	111,82	2,24	24,6
lsa-miR156c	cca-miR156b MIMAT0024511	TGACAGAAGAGAGTGAGCACA	136	47,62	238,10	5,00	50
lsa-miR837a	ath-miR837-5p MIMAT0004258	TGGTTGTTCTTGTTCGTTTCA	122	38,10	116,19	3,05	24,4
lsa-miR9567	bra-miR9567-3p MIMAT0035694	AAACTATATGTGTTGAATGAC	144	28,57	101,90	3,57	21,4
lsa-miR4393	gma-miR4393a MIMAT0018308	TGCTTTTCTTCCGTCCTTTTTCG	210	41,67	100,00	2,40	24
lsa-miR166c	lja-miR166-3p MIMAT0043967	ATTTCGGACCAGGCTTCATTCCCC	140	54,17	203,75	3,76	48,9
lsa-miR166d	bdi-miR166f MIMAT0020658	GGAATGAAGCCTGGTCCGGAT	140	57,14	261,43	4,58	54,9
lsa-miR7531	lja-miR7531 MIMAT0029354	TTTGTTTTCTTTCATTCTTGT	140	23,81	120,00	5,04	25,2
lsa-miR7486	gra-miR7486i MIMAT0034142	CTGAGCATGGAAGGAAATCGCTT	140	47,83	103,91	2,17	23,9
lsa-miR482	aqc-miR482c MIMAT0012591	GGTATGGGAGGAGTCCGATGGT	140	59,09	181,36	3,07	39,9
lsa-miR169b	cme-miR169t MIMAT0026187	GCCGGCAAATCATTCTTGGCTTT	140	47,83	143,91	3,01	33,1
lsa-miR8011b	stu-miR8011b-3p MIMAT0030950	TGGCTTCTTTTTGTCT	198	37,50	186,88	4,98	29,9
lsa-miR8028	stu-miR8028-5p MIMAT0031206	TGATTACAAATTGTAGCATTCA	140	31,82	145,00	4,56	31,9
lsa-miR3630	han-miR3630-3p MIMAT0025526	TGTGGGAATCTCTCTGATGCTT	85	45,45	99,55	2,19	21,9
lsa-miR530	csi-miR530a-5p MIMAT0018482	TGCATTTGCACCTGCACCTTT	167	47,62	122,86	2,58	25,8
lsa-miR437	ssp-miR437c MIMAT0020282	AAGTCAGACTTCTCTTTTGAA	150	33,33	166,19	4,99	34,9
lsa-miR11509	pab-miR11509 MIMAT0045071	TTCATAGCATTGTGGATGATA	150	33,33	182,38	5,47	38,3
lsa-miR823	aly-miR823-5p MIMAT0017601	CTTGTATGATCACTCAAAAC	134	35,00	96,50	2,76	19,3
lsa-miR3446	aly-miR3446-3p MIMAT0017728	GATTCGGAAGCTAAAGCTTTGGA	115	41,67	100,83	2,42	24,2
lsa-miR837b	ath-miR837-5p MIMAT0004258	TCCGACGAACAAGAACTGCC	140	52,38	136,67	2,61	28,7
lsa-miR837c	ath-miR837-5p MIMAT0004258	ATCAGTTTCTTGTCTTGCAA	166	33,33	153,81	4,61	32,3

Tablo 4.4 LNYV'yi hedefleyen yeni tanımlanan miRNA dizileri (devamı)

Yeni Tanımlanan miRNA'lar	Referans miRNA	Dizi	Pre-miRNA nt sayısı	%GC	AMFE	MFEI	MFE
lsa-miR6167a	hbr-miR6167 MIMAT0024785	TCAAAGCTTCCACCTAACTA	210	40,00	214,00	5,35	42,8
lsa-miR6167b	hbr-miR6167 MIMAT0024785	GAAGCTGGTGGGAAGCTTTGA	140	50,00	164,00	3,28	32,8
lsa-miR535	mes-miR535c MIMAT0045980	CTTGCGACGAGAGAGAGCAGC	131	61,90	100,00	1,62	21
lsa-miR172f	vvi-miR172a MIMAT0005699	CCTTCCTTGATGATGCTACAG	140	47,62	161,90	3,40	34
lsa-miR166a	crt-miR166b MIMAT0014085	TCGGACCAGGCTTCATTCCTCT	102	54,55	140,91	2,58	31
lsa-miR166b	crt-miR166b MIMAT0014085	AGGGAATTGGGCAATTGTCCTG	150	52,38	153,33	2,93	32,2
lsa-miR7484a	gra-miR7484n MIMAT0034258	GTAGTTTGCTCTTTGATGTATGTA	175	33,33	109,17	3,28	26,2
lsa-miR478	ptc-miR478e MIMAT0002080	ATTGTAGTCTTCTATTTTTATGGA	169	25,00	90,42	3,62	21,7
lsa-miR8011a	stu-miR8011b-3p MIMAT0030950	TGGCTTCTTTTTGTCTATATAA	108	27,27	95,00	3,48	20,9
lsa-miR172a	ata-miR172 MIMAT0018221	TTGAGAATCTTGATGATGCTGCA	163	39,13	129,13	3,3	29,7
lsa-miR172d	vvi-miR172a MIMAT0005699	GGCTTCTTGATGATGCTACTG	150	47,62	121,43	2,55	25,5
lsa-miR156a	zma-miR156j-3p MIMAT0015175	ATCTCTCTGCTCTCACTGAATCA	173	43,48	183,04	4,21	42,1
lsa-miR156b	cca-miR156b MIMAT0024511	CCACAGAAGAGAGTGATAGCA	120	47,62	116,67	2,45	24,5
lsa-miR169	cpa-miR169 MIMAT0031805	CAGCCAAGGATGACTTGCCG	140	60,00	163,50	2,73	32,7
lsa-miR6155	nta-miR6155 MIMAT0024757	GGCAAGAGCAAGGCAACTTTT	140	47,62	160,48	3,37	33,7
lsa-miR2590	mtr-miR2590g MIMAT0021309	AGGTTTTAGATTTTCAGTCTGAGTC	175	37,5	103,33	2,76	24,8
lsa-miR10212	eun-miR10212-3p MIMAT0041101	TGACGATATCAATCATTTTTCGAA	213	29,17	120	4,11	28,8
lsa-miR6463	ptc-miR6463 MIMAT0025189	GGGATGATCTTGTTGGCAACA	110	47,62	117,14	2,46	24,6
lsa-miR172b	cme-miR172f MIMAT0026099	TGAATCTTGATGATGTTAGTT	140	28,57	164,29	5,75	34,5

4.5 miRNA Hedef Tahmini

Marul genomunda; LMV, LNSV ve LNYV genomlarını miRNA'ları belirlemek için RNAhibrid analizi yapıldı. Sonuçlar materyal ve metoddaki belirtilen RNAhibrid kuralları kullanılarak değerlendirildi. Toplamda 59 yeni *Lactuca sativa* miRNA'sının virüslerin genomlarını hedef aldığı tespit edildi. lsa-miR7484a, lsa-miR10212, lsa-miR6274, lsa-miR6463, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172b, lsa-miR5564, lsa-miR1520, lsa-miR7777, lsa-miR1440 ve lsa-miR399a dahil olmak üzere LMV genomundaki ORF'yi hedef alan 12 yeni marul miRNA'sı belirlendi. Bu miRNA'lar RNAhibrid sonuçları ile birlikte Tablo 4.5'de gösterilmektedir. lsa-miR1315, lsa-miR1107a, lsa-miR1107b, lsa-miR6167, lsa-miR166a, lsa-miR166b, lsa-miR8647, lsa-miR7484a, lsa-miR11000, lsa-miR6274, lsa-miR478, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172c, lsa-miR172e, lsa-miR5564, lsa-miR399a, lsa-miR156a, lsa-miR156b, lsa-miR169, lsa-miR6155, lsa-miR172f, lsa-miR7777, lsa-miR6189 ve lsa-miR399b dahil olmak üzere LNSV'yi hedef alan 25 yeni marul miRNA'sı belirlendi. Bu miRNA'lar RNAhibrid sonuçları ile birlikte Tablo 4.6'da gösterilmektedir. lsa-miR828, lsa-miR156c, lsa-miR837a, lsa-miR9567, lsa-miR4393, lsa-miR166c, lsa-miR166d, lsa-miR7531, lsa-miR7486, lsa-miR482, lsa-miR169b, lsa-miR8011b, lsa-miR8028, lsa-miR3630, lsa-miR530, lsa-miR437, lsa-miR11509, lsa-miR823, lsa-miR3446, lsa-miR837b, lsa-miR837c, lsa-miR6167a, lsa-miR6167b, lsa-miR535, lsa-miR172f, lsa-miR166a, lsa-miR166b, lsa-miR7484a, lsa-miR478, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172d, lsa-miR156a, lsa-miR156b, lsa-miR169, lsa-miR6155, lsa-miR2590, lsa-miR10212, lsa-miR6463 ve lsa-miR172b dahil olmak üzere LNYV'yi hedef alan 40 yeni marul miRNA'sı belirlendi. Bu miRNA'lar RNAhibrid sonuçları ile birlikte Tablo 4.7'da gösterilmektedir.

Tablo 4.5 LMV’yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları

miRNA	RNAhybrid Sonucu	MFE (kcal/mol)	Pozisyon
lsa-miR7484a	target 5' A CC G A U 3' AC A GUUGGAGGGCAGA CUAC UG U UAGUUUCUGUUU GAUG miRNA 3' A UA G 5'	24,5	599
lsa-miR10212	target 5' A U CAA AUUUGA U 3' UCGAAAG UGG UUGGUA UCGUC AGCUUUU ACU AACUAU AGCAG miRNA 3' A U 5'	22,8	2045
lsa-miR6274	target 5' U G CGC GC C 3' GC AGCCU G GAUGGCGGGAUA UG UUGGA C CUAUCGUUUUAU miRNA 3' G UU 5'	25,1	3299
lsa-miR6463	target 5' G UCA G A 3' GUUGUUGACAAGAUC AUC C CAACGGUUGUUCUAG UAG G miRNA 3' A G 5'	27,5	753
lsa-miR8011a	target 5' A UUACC G A 3' UAUGUGGAU AAAGGAAGC G AUAUAUCUG UUUUCUUCG U miRNA 3' A U G 5'	24,0	2283
lsa-miR172a	target 5' C AGA CGGAA U 3' UGCGGCAUCA AAGA UUUUCA ACGUCGUAGU UUCU AAGAGU miRNA 3' AG U 5'	27,3	8562
lsa-miR172b	target 5' G G A CAAA C 3' GACUGA A CAUC AAGGUUCA UUGAUU U GUAG UUCUAAGU miRNA 3' G A 5'	21,4	1817
lsa-miR5564	target 5' A GACGUUCCA C A 3' UCAAG GAACA CUGCAGG GGUUC CUUGU GACGUCC miRNA 3' C AG C 5'	27,6	5458
lsa-miR1520	target 5' U CCCUGG CACUC A 3' GUGUC UGUUCUGAUGG UACAAC UACAG GCAAGACUAUC AUGUUG miRNA 3' G U 5'	28,7	2889
lsa-miR7777	target 5' C AAUGAUGCGCAGCCU A 3' AGACCCCG CUUACAGAGGA UCUGGGGU GGGUUGUCUUCU miRNA 3' C 5'	32,3	2829
lsa-miR1440	target 5' G UAU G 3' AAGC AUACCAUUCUUUG UUCG UAUGGUGAGAGAC miRNA 3' A UU 5'	27,9	163
lsa-miR399a	target 5' A UCA GAAGA CGUU A 3' CCGA AAGGAGA UUUGCCU GG GGUU UUCUCU AAACGGG CC miRNA 3' C 5'	26,4	6948

Tablo 4.6 LNSV'yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları

miRNA	Hedef	RNAhybrid Sonucu				MFE (kcal/mol)	Pozisyon
lsa-miR1315	ORF1	target	5' A	AAUAGAGUGUGAU	CAUGACAAAGUUU	A 3'	135
	ORF2	miRNA	3' A	GGGAA CCCUU	UCUGACAG GGACUGUC	GUGGUUG CAUCAAU	
lsa-miR1107a	ORF2	target	5' G	CCU CUC G G 3'			21.4
		miRNA	3' G	GGCUG UUGGA AC GGGGAU UUGAC AACCU UG UCUUUA			
lsa-miR1107b	ORF4	target	5' C CC	GGAAAGCUGGGGU	A 3'		197
	ORF5	miRNA	3' UA	UUGGUUUCAA GG AACCAAGGUU	UUCGGGA AAGUCCU	5'	
lsa-miR6167	ORF2	target	5' C CC	C 3'			26
		miRNA	3' C UC	UGUU GUGGAGGCUUUG AUAG CACCUUCGAAAC			
lsa-miR166a	ORF1	target	5' U	GUCGGCGGCACU	GG UCUUCGGAAUCCC	G A 3'	25.9
	ORF2	miRNA	3' A	AGAGGA UCUCCU	GUG GU UAC CG	UUGGU UGA GACCA GCU	
lsa-miR166b	ORF2	target	5' A	CAC GUAU A 3'			28.7
		miRNA	3' A	CAGGGCA UGCCUGA GUCCUGU ACGGGUU	UUCUU AAGGA	5'	
lsa-miR8647	ORF1	target	5' A	CGCAAGUGGC	GUGG A 3'		20.7
		miRNA	3' A	AGAUUG UCUAGU	AAGAGCAAAG UUCUCGUUUU	GUU CAA	
	ORF2	target	5' A	UAUUU G G 3'			23.6
		miRNA	3' A	UGGAUC AUCUAG	GGAGAG AGGGUGUU UUUCUC UUUUACAA	G 5'	
lsa-miR7484a	ORF4	target	5' A A AG	UAAACCAU A A 3'			20.4
		miRNA	3' A	UACG ACA UCAA AUGU UGU AGUU	GGA CGAGCUAU UCU GUUUGAUG	C 5'	
lsa-miR11000	ORF4	target	5' A A C	CGGUA A 3'			21.5
	ORF5	miRNA	3' A	GC UCU GAUUUUU UG AGG CUAAAGA	UCAACCAG AGUUGGUU	5'	
lsa-miR6274	ORF2	target	5' G GG U	AGA G 3'			25.4
		miRNA	3' A	GUU CGCUA UUUUCGGG UAA GUGAU AGAAGCCC	AAUG UUAC	G 5'	
lsa-miR172c	ORF2	target	5' C	CAUAGGCCUCGAUG	G 3'		24.7
		miRNA	3' A	CUGUAGC GACGUCG	CGUCAAGGUUU GUAGUUCUAAG	5'	
lsa-miR478	ORF3	target	5' C CUGA	UCA U G 3'			22.2
		miRNA	3' A	CCA UAGGA AGAGG ACUGCGAU GGU AUUUU UCUUC UGAUGUUA			
lsa-miR8011a	ORF1	target	5' G	CC GUA G 3'			21.7
	ORF2	miRNA	3' A	UGUUAU GGAUGGA GAGGAGUCG AUUAU UCUGUUU UUCUUCGGU			
lsa-miR172a	ORF1	target	5' C	C G C U 3'			26.3
	ORF2	miRNA	3' A	GCAGU UCA UCAAGG UUUCGG CGUCG AGU AGUUCU AGAGUU			
lsa-miR172e	ORF2	target	5' A	UGGAAG G U C 3'			23
		miRNA	3' G	GGUGGU AU GUCAGGAA GUC UCAUCG UA UAGUUCUU CGG			
lsa-miR172f	ORF3	target	5' A CC GG	AGUAA A 3'			20.9
		miRNA	3' A	CC CCU GGUGA UGUUUGCG GG GGA CUACU ACGAUGU			
lsa-miR5564	ORF2	target	5' A	AUGAA GA U U 3'			21.5
		miRNA	3' A	ACUG AGCUGUU UGGCG AUU UGAC UUGACAA GCUGC UAA			

Tablo 4.6 LNSV'yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları(devamı)

miRNA	Hedef	RNAhybrid Sonucu	MFE (kcal/mol)	Pozisyon
lsa-miR399a	ORF1	target 5' G UA CUUUUGUAGGAGAUU GA A 3'	28.5	26
	ORF2	GCC AGAAGGAGAU UUGC CCGG CGG UUUUCCUCUA AACG GGCC		
lsa-miR156a	ORF1	miRNA 3' target 5' G UGAA CG G 3'	28.5	216
	ORF2	UGGUUUA GAGA GCAGAGGGGU ACUAAGU CUCU CGUCUCUCUA		
lsa-miR156b	ORF3	miRNA 3' CA 5'	25.1	177
	ORF3	target 5' G A GGU GCAA U 3' GCUA UGCUCUC UCUG UGG CGAU GUGAGAG AGAC ACC		
lsa-miR169	ORF1	miRNA 3' A A A 5'	24.5	784
	ORF1	target 5' A G U AUUAC A 3' GG A GUCAU CUUUGGCU CC U CAGUA GGAACCGA		
lsa-miR6155	ORF2	miRNA 3' G G U C 5'	23	1083
	ORF2	target 5' A GG GGAGAGAGUUU G G 3' AAAAG GUCUUGU UCU UGUC UUUUC CGGAACG AGA ACGG		
lsa-miR7777	ORF4	miRNA 3' 5' C G UUGG UG U 3'	23.6	284
	ORF5	AGA UCC AUCU GACGGGAGA UCU GGG UGGG UUGUCUUCU		
ORF1	ORF1	miRNA 3' G 5'	22.8	408
	ORF1	target 5' G GG G U CUUG A 3' GC CAG AC AGCA CACCU UG GUU UG UCGU GUGGA		
ORF3	ORF3	miRNA 3' UA G A 5'	29.3	19
	ORF3	target 5' A A GGU G 3' ACA CAACACAGCAUU ACC UGU GUUGUGUCGUAG UGG		
lsa-miR6189	ORF4	miRNA 3' A 5'	22.8	326
	ORF4	target 5' A UC UUUU A A 3' GCA UCGAU CCGUAUC ACC UGU AGUUG GUCGUAG UGG		
ORF5	ORF5	miRNA 3' U A 5'	22.8	294
	ORF5	target 5' A UC UUUU A A 3' GCA UCGAU CCGUAUC ACC UGU AGUUG GUCGUAG UGG		
ORF1	ORF1	miRNA 3' U A 5'	25.4	581
	ORF1	target 5' A A A CAC G 3' UGG G GGAUCUCCU UGGUA GCC C UUUAGAGGA ACCGU		
ORF2	ORF2	miRNA 3' A G A 5'		
	ORF2	target 5' A A A CAC G 3' UGG G GGAUCUCCU UGGUA GCC C UUUAGAGGA ACCGU		

Tablo 4.7 LNYV'yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları

miRNA	Hedef	RNAhybrid Sonucu	MFE (kcal/mol)	Pozisyon
lsa-miR828	ORF3	target 5' G GG AGCUG UUU A 3' CCG UGUCG UUUAGCA GCAU GGC GUAGU AAGUCGU CGUG miRNA 3' A A U 5'	22.9	501
	ORF5	target 5' G G A A C C 3' UGU GUUGU UUCAG CA AGCAC GCA UAGUA AAGUC GU UCGUG miRNA 3' G G 5'	22.8	199
	ORF1	target 5' A AAG GUUACGUUGCUGCG G 3' GUGC ACUCUC UCUGUCA CACG UGAGAG AGACAGU miRNA 3' A AG A 5'	27.6	1157
	ORF6	target 5' A AGG AGGAGA U 3' UGUGUUCG CUCU UUUGUU ACACGAGU GAGA AGACAG miRNA 3' GA U 5'	23	1757
lsa-miR156c	ORF2	target 5' U A CA GGAUUGG G 3' GG UGCUU UCUCU UUUGUU CC ACGAG AGAGA AGACAG miRNA 3' UG U 5'	21.4	284
	ORF1	target 5' C GAA G GA G 3' UGAGACGGAU GAGAA A GCCA ACUUUGCUUG UUCUU U UGGU miRNA 3' G 5'	25.1	506
	ORF4	target 5' U A G UCUCUCAUCUUAG C 3' UG AGAUGGG AGGAGC AACCA AC UUUGCUU UUCUUG UUGGU miRNA 3' G 5'	20	301
	ORF5	target 5' G C AAGA C 3' GAGAUG AGCAGGAACA ACC CUUUGC UUGUUCUUGU UGG miRNA 3' A U 5'	25.6	158
lsa-miR9567	ORF6	target 5' C GG CU G 3' GUCA UC CAUUAUUGGUU CAGU AG GUGUAUAUCAA miRNA 3' A UU A 5'	22.2	5984
	ORF3	target 5' G GG CUAU A U 3' AACU UA UUAUCAAGGU CA UUGA GU AGUAGUUCUA GU miRNA 3' UU A 5'	20	65
lsa-miR172b	ORF2	target 5' C UG CAACCUCGGUCU U 3' UAUAGCAU CAUCA GGAUGC AUAUCGUA GUAGU UCUACG miRNA 3' A U 5'	25.4	257
	ORF4	target 5' A AAUCGGUUACU UUCU U 3' GUUUUCA UCAUU GAGAUUC CGAAAGU AGUAG UUCUAAG miRNA 3' A U 5'	21	135
	ORF6	target 5' G CGU CG A 3' AGAUUUUA UUAUC GAGAUUCA UCUAUAGU AGUAG UUCUAAGU miRNA 3' 5'	23.6	4407

Tablo 4.7 LNYV'yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları (devamı)

miRNA	Hedef	RNAhybrid Sonucu	MFE (kcal/mol)	Pozisyon
lsa-miR4393	ORF5	target 5' U GGCU U UG AAUUAUG C 3' GCAGG AAGG G GGA AGAAAAGC CGUUU UUUC C CCU UCUUUUCG miRNA 3' UG U 5'	25.6	1554
lsa-miR166c	ORF1	target 5' U CAUC G ACUG UGACA C 3' GGGGA GAA GCC UGG UCCGAAA CCCCU CUU CGG ACC AGGCUUU miRNA 3' UA A 5'	28.2	578
lsa-miR166d	ORF1	target 5' C ACA ACAAGAC G A 3' UCCGGA AGGU UU AUUUC AGGCCU UCCG AA UAAGG miRNA 3' U GG G 5'	24.3	389
lsa-miR7531	ORF3	target 5' U AAACAGAUCC A 3' CAAGAAU GAGAGAAGAUAGA GUUCUUA CUUUCUUUUGUUU miRNA 3' U 5'	22	860
lsa-miR7531	ORF6	target 5' A GG G 3' GAGAGA GAGAGAAGAUAU UUCUCU CUUUCUUUUGUA miRNA 3' UA A 5'	27.2	2097
lsa-miR7486	ORF4	target 5' U UCUU G GAA U 3' GAGU GUUUC UCU GUGUUA UUCG UAAAGG AGG UACGAGU miRNA 3' C A C 5'	22.9	255
lsa-miR7486	ORF6	target 5' U U GGAUCAUAUG GGAC A 3' GGC GAU UUCUUCUAU GCUCA UCG CUA AAGGAAGGUA CGAGU miRNA 3' U C 5'	26.5	1844
lsa-miR482	ORF6	target 5' A G AU U G A 3' AC CAU GACUC CUUCCA ACU UG GUA CUGAG GAGGU UGG miRNA 3' GC A 5'	28	37
lsa-miR169b	ORF3	target 5' U U C GCUGUUUAGCA AUAG A 3' AGAGCCGGG GU GA UUUGC GGU UUUCGGUUC UA CU AAACG CCG miRNA 3' U G 5'	23.1	497
lsa-miR8011b	ORF1	target 5' C AGAG G 3' GGAUGAAGAGA AGCCA UCUGUUUUUCU UCGGU miRNA 3' 5'	22.6	512
lsa-miR8028	ORF3	target 5' A AC A G 3' GAGUGCUG AUUG UGAGUUA CUUACGAU UAAC ACUUAU miRNA 3' A GU 5'	25	611
lsa-miR3630	ORF1	target 5' U UU CAGC G C 3' AGUAUCA GAGAG GUUU CACG UCGUAGU CUCUC UAAG GUGU miRNA 3' U G 5'	24.9	779
lsa-miR3630	ORF2	target 5' A GAUGGCAUUG U A A 3' UUGCAUU GAGGAG AUUCC GUU AACGUAG UUUUC UAAGG UAA miRNA 3' G 5'	23	868
lsa-miR530	ORF2	target 5' U GUAACAUC C A UCU G A 3' AGAGGUGC AGGU GCA AGUG G UUUCCACG UCCA CGU UUAC U miRNA 3' G 5'	24.5	383
lsa-miR530	ORF4	target 5' U ACC AUUCAU C UG A A 3' AAAGG UGC AGG UGCA GAUG CA UUUCC ACG UCC ACGU UUAC GU miRNA 3' 5'	20.9	438
lsa-miR437	ORF5	target 5' A AA G A 3' UCGGA AGGGAGGU CUGACU AGUUU UCUCUUA GACUGA miRNA 3' A A 5'	27.4	968
lsa-miR11509	ORF5	target 5' U CAGAC UA U 3' UGUCG UCAC AAUGCUGUGGA AUAGU GGUG UUACGAUACUU miRNA 3' A 5'	22.3	887
lsa-miR823	ORF6	target 5' A AAAUGGAA A 3' UUUUGAG UGGUCAUAUGAG AAAACUC ACUAGUAUGUUC miRNA 3' C 5'	22.9	1712

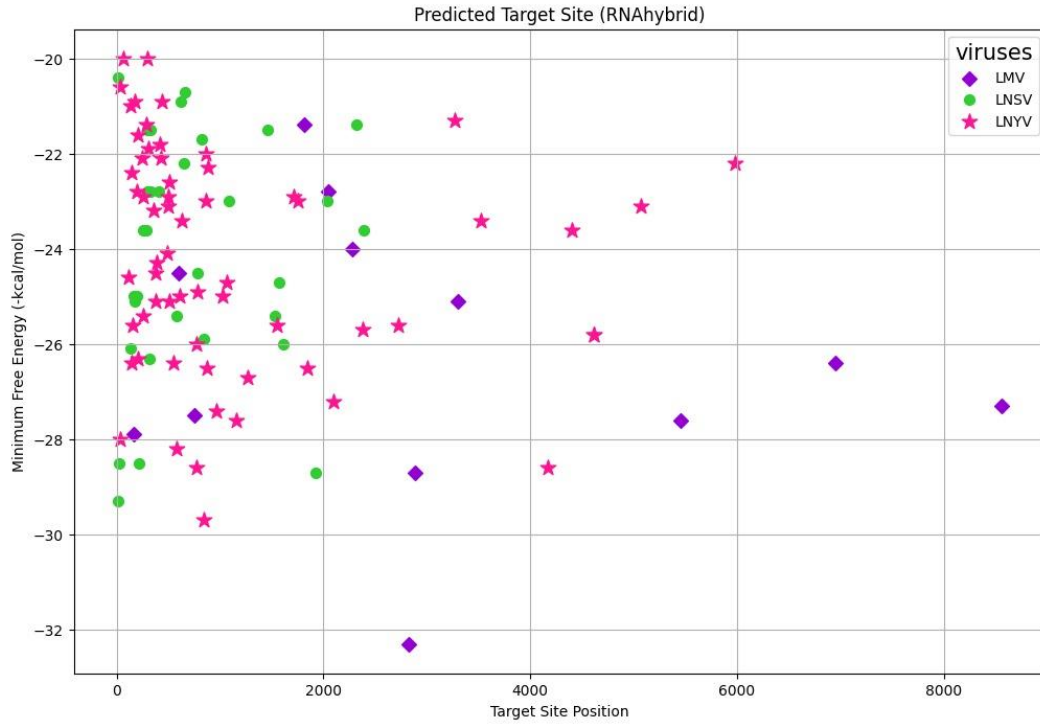
Tablo 4.7 LNYV'yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları (devamı)

miRNA	Hedef	RNAhybrid Sonucu	MFE (kcal/mol)	Pozisyon
lsa-miR3446	ORF4	target 5' C GUCUGA A G 3' UUCAGGGCU AGUUUUC AAUC AGGUUUCGA UCGAAGG UUAG miRNA 3' A AA C 5'	24.6	119
lsa-miR837b	ORF4	target 5' G CUCCGAU GAG UC U A 3' GGCA GU UUCUUGUU CGUC GA CCGU CA AAGAACAA GCAG CU miRNA 3' C 5'	22.1	242
	ORF6	target 5' U C UAAAAAGACUGAC A AGAG U 3' GGU GUUUUC UGUU CG CGGA CCG CAAAGA ACAA GC GCCU miRNA 3' U A 5'	21.3	3268
	ORF4	target 5' G U UAUCAUCAG A A 3' UGCAAG ACA GGAAACU GAU ACGUUC UGU UCUUUGA CUA miRNA 3' A U 5'	23.2	357
	ORF6	target 5' U GAAAGAG U 3' UGCU UGGGCGAGGAACUGGU AUGA ACUUGUUCUUUGACUA miRNA 3' U 5'	26.3	202
lsa-miR6167a	ORF6	target 5' G A ACA AAGGUG G 3' GGUUAGG GGA AGC UUGA UCAAUCC CCU UCG AACU miRNA 3' A A A 5'	23.1	5074
	ORF1	target 5' A C GUACG C A 3' GAG AGGU GGAGGCU UGG UUC UCCA CCUUCGA ACC miRNA 3' C A A 5'	25	1024
	ORF2	target 5' C GGAG U U G 3' CAGAGCU UC CCAG CUU GUUUUCGA GG GGUC GAA miRNA 3' A A U G 5'	23.4	631
	ORF5	target 5' G ACA AGAG A 3' GCU CUC UUCUUGUCGCAG CGA GAG GAGAGCAGCGUU miRNA 3' C A C 5'	26.5	870
lsa-miR172f	ORF2	target 5' A UGUCCC AUUCUGGCUAUG A 3' CUUCCU UGAUGAU GCUGCAG GAAGGA ACUACUA CGAUGUC miRNA 3' G 5'	28.6	773
	ORF6	target 5' G CG UG A U G 3' UGU AGCA UCAUCGAG GA AGG ACA UCGU AGUAGUUC CU UCC miRNA 3' G 5'	25.8	4620
	ORF1	target 5' U C CAAUAGGGAAGAG AUCACGGAAA G U 3' AG AGGAGUGA AGC UGGUC GA UC UCCUUACU UCG ACCAG CU miRNA 3' G 5'	26.4	146
	ORF5	target 5' G UAA U UU G 3' CAGGAUAGU GCC CA AUUUCU GUCCUGUUA CGG GU UAAGGG miRNA 3' A 5'	24.7	1061
lsa-miR7484a	ORF3	target 5' A ACC AGGAC G 3' AUAUG UAUCAAG GGGCAGACUAU UGUAU GUAGUUU CUCGUUUGAUG miRNA 3' A 5'	25.1	377
	ORF6	target 5' G GG CAACA U 3' AU ACAUCAAGAGCA GACUG UG UGUAGUUUCUCGU UUGAU miRNA 3' A UA G 5'	28.6	4170
	ORF2	target 5' C AAGCUGU CCUGU UU A 3' UCCA UAAGGA UGGAG GGCUGCAA AGGU AUUUUU AUCUU CUGAUGUU miRNA 3' A 5'	20.9	177
	ORF6	target 5' G CA A C A 3' UCC GAGGA AG GAGACUGCAA AGG UUUUU UC UUCUGAUGUU miRNA 3' UA A A 5'	23.4	3520
lsa-miR8011a	ORF5	target 5' G UC CAGCACCA C 3' UUGUAU AGACA AAAGGAGGUC AAUAUA UCUGU UUUUCUUCGG miRNA 3' U 5'	21.6	204

Tablo 4.7 LNYV'yi hedefleyen miRNA dizileri ve RNAhybrid sonuçları (devamı)

miRNA	Hedef	RNAhybrid Sonucu	MFE (kcal/mol)	Pozisyon
lsa-miR172a	ORF2	target 5' A GCCU AAACGGUCACUAUU GCG G 3' GCAGCA GUCA GGA UCUCAA CGUCGU UAGU UCU AGAGUU miRNA 3' A AG A 5'	26.4	548
	ORF6	target 5' A G AUUUGGUA U 3' G AGUAUCAU GGGAUUUUCA C UCGUAGUA UUCUAAGAGU miRNA 3' A G G U 5'	25.7	2385
	ORF4	target 5' G GUGC GG AAAGGACCUGCA A 3' UGUAGCA UCA AGGGUU UUCAU ACGUCGU AGU UUCUAA GAGUA miRNA 3' AG 5'	21.8	416
	ORF6	target 5' G CG UG A U G 3' UGU AGCA UCAUCGAG GA AGG ACA UCGU AGUAGUUC CU UCC miRNA 3' G 5'	25.8	4620
	ORF1	target 5' G CCU GC G 3' CAG UAGUAUCAUUGAGA AGC GUC AUCGUAGUAGUUCU UCG miRNA 3' G 5'	26	772
	ORF4	target 5' C CA U GUUUGACA CUA C 3' GA CAGUG GGAG CAG GGGGA CU GUCAC UCUC GUC UCUCU miRNA 3' A AA A 5'	20.6	39
lsa-miR156b	ORF4	target 5' G CU GAGAU A A 3' GUUA UCAUUUUCU UCUG GG CGAU AGUGAGAGA AGAC CC miRNA 3' A A 5'	22.4	147
lsa-miR169	ORF4	target 5' A G GAGCUCUC UUAGAACCACA U 3' UGG GAG UCAUC CUUGGUUG GCC UUC AGUAG GAACCGAC miRNA 3' G 5'	21.9	307
lsa-miR6155	ORF4	target 5' C AA UCCGAUGAGAAAAA A 3' AAAG GCCU UGUUCUUGC UUUC CGGA ACGAGAACG miRNA 3' U AA G 5'	24.1	491
lsa-miR2590	ORF2	target 5' A A AUUG A 3' GAUUCAGA UGAGAUC AGAACCC CUGAGUCU ACUUUAG UUUUGG miRNA 3' G A A 5'	29.7	839
	ORF6	target 5' G A U GG A 3' GAUU CA GCUGAGAU UUAAGCCU CUGA GU UGACUUUA GAUUUUGGA miRNA 3' C 5'	25.6	2727
	ORF2	target 5' A GUUGGUUUCAAA GAAAGCCAAUAAAAA A 3' UCGGAGGA GAU UGAUUAUGUCA AGCUUUUU CUA ACUAUAGCAGU miRNA 3' A A 5'	22.1	429
lsa-miR6463	ORF6	target 5' A G A GCG C 3' GU GC GACAAGA UAUCCC CA CG UUGUUCU GUAGGG miRNA 3' A A G A 5'	26.7	1269

Virüs-ORF'lerini hedefleyen lsa-miRNA'ların bağlanma konumu ve MFE değerleri Python 3 ile yazılan ve Google Colaboratory (<https://colab.google/>) aracılığıyla oluşturulan dağılım grafiğinde gösterilmektedir (Şekil 4.63). LNSV hedefli miRNA'ların ve LNYV hedefli miRNA'ların çoğunlukla 0 ile 2000 nt arasında konumlandığı söylenebilir. LMV hedefli miRNA'lar ise hedef genom boyunca geniş bir dağılım göstermektedir. Ayrıca MFE değeri -28 kcal/mol ve -20 kcal/mol arasında olan miRNA'ların çoğunlukta olduğu görülmektedir.



Şekil 4.63 miRNA'ların LMV, LNSV ve LNYV hedeflerine bağlanma konumu ve MFE değerleri. X eksen; miRNA'nın hedefe bağlanma konumunu, y eksen ise her MFE değerlerini göstermektedir. Renkli noktalar, virüsleri temsil etmektedir. Mor, LMV; yeşil, LNSV ve pembe, LNYV.

DNA dizisinde herhangi bir değişim olmaksınız gen anlatımında görülen kalıtsal olan ya da kalıtsal olmayan değişiklikler olarak tanımlanan epigenetik, son yıllarda giderek artan bir ilgi ile çalışılmaktadır. Bu araştırmalarda, epigenetikte rol oynayan önemli mekanizmalar birer birer aydınlatılmaya başlanmıştır ve bu mekanizmalardan biri de kodlamayan RNA'lardır. Kısa ve uzun kodlamayan RNA'lara ayrılan bu diziler, transkripsiyon sonrası ve/veya translasyon sonrası aşamalarda gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynar. Bu dizilerin stres toleransı üzerindeki etkileri bitki biyoteknolojisinde de yaygın olarak araştırılmaktadır [57], [58].

LMV; Avrupa, Amerika, Afrika, Asya, Okyanusya ve Orta Doğu dahil olmak üzere dünya çapında marul mahsullerinde en zararlı viral hastalıklardan biri olan marul mozaik hastalığına neden olan bir Potyvürüstür. Marul bitkisinin diğer iki ana patojeni olan *Tombusvirüs*'e ait LNSV ve *Cytorhabdovirüs* cinsine ait LNYV'de dünya çapında marul bitkilerine zarar vermektedir. Bitki virüslerini hedef alabilecek bazı olası bitki miRNA'larını araştıran çeşitli çalışmalar vardır ve bu çalışmalardan bazılarında, genetik olarak modifiye edilmiş ürünlerdeki miRNA anlatımının, RNA ve DNA viral genomları için bitki virüsü enfeksiyonunu azaltmadaki etkinliği gösterilmiştir [59], [60]. Dolayısıyla miRNA'ların gen anlatımını düzenleyen en önemli endojen biyomoleküllerden biri olduğu söylenebilir.

In siliko analizler bitkilerdeki potansiyel miRNA dizilerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir [61]. Bu alanda yapılan çalışmalardan birinde Ashraf vd. [62], elma klorotik yaprak lekesi virüsü (chlorotic leaf spot virus, ACLSPV) hakkında *in siliko* bir çalışma yürütmüşler ve bunun sonucunda tespit ettikleri bir elma miRNA'sının (mdm-miRNA395k) ACLSPV'yi hedef alarak replikasyonunu susturma potansiyeline sahip olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde, domates bitkisinin (*Solanum lycopersicum*) genomundan yerfıstığı tomurcuğu nekrozu ortotospovirüsünü (groundnut bud necrosis orthotospovirus) hedef alan miRNA'lar araştırılmıştır [60]. Bu çalışmalar gerçekleştirilirken

araştırmacılar araştırılan bitkilere ait olgun miRNA dizilerini miRBase veri tabanından almışlar ve var olan diziler üzerinden analizleri gerçekleştirmişlerdir. Bu tez çalışmasında incelenen marul bitkisinin miRBase veri tabanında referans alınabilecek bir dizisi yoktur. Bu nedenle, tezde ilk önce marul genomunda yeni miRNA'lar (lsa-miRNA) tanımlandı ve ardından marulda ciddi hasara neden olan üç virüsü (LMV, LNYV ve LNSV) hedefleyenler belirlendi.

Potansiyel miRNA dizilerinin ikincil stem-loop hairpin yapılarının incelenmesi sırasında, marul bitkilerinde tanımlanan pre-miRNA dizilerinde miRNA ve miRNA* arasında en az 12 nt'nin Watson-Crick veya G/U bp eşleşmesi yaptığı gözlemlendi. Benzer şekilde, Peygamber bitkisi ile yapılan bir çalışmada *Artemisia annua* L. bitkisinde miRNA-miRNA* dizileri arasında en az 12 nt eşleşme olduğu bildirilmiştir [63]. Ayrıca, çeşitli çalışmalarda olgun miRNA dizilerinin 20 ile 24 nt arasında olduğu rapor edilmektedir [64], [59], [60]. Bu tez çalışmasında da lsa-miR8011b hariç (16 nt uzunluğunda bu dizi), tanımlanan miRNA'ların bu aralıkta olduğu görüldü.

Analiz edilen diğer bir parametre ise %GC içeriğidir. LMV'yi hedefleyen yeni marul miRNA dizilerinin %GC içeriği %28,57 ile %61,90 arasında değişmekte olup ortalama %40,41'dir. LNSV'yi hedef alan yeni marul miRNA'larının %GC içeriği %25,00 ile %60,00 arasında değişmekte olup ortalama %44,62'dir. LNYV'yi hedef alan yeni marul miRNA'larının %GC içeriği %23,81 ile %61,90 arasında değişmekte olup ortalama %43,02'dir. Dizilerin min. ve maks. %GC değerlerinin ve ortalamalarının daha önceki çalışmalarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalardan birinde şeker kamışı (*Saccharum officinarum*) bitkisinde *in silico* analizler ile belirlenen miRNA dizilerinin %GC içeriği %38,09 ile %66,66 arasında (ortalama: %52,51) rapor edilmiştir [64]. Başka bir çalışmada ise *in silico* analizler kullanılarak manyok (*Manihot esculenta*) bitkisinde miRNA'lar araştırılmış ve %GC değerleri %39,69 ve %44,23 değerleri ile ortalama olarak %41,96 olarak bildirilmiştir [59].

Çalışmamızda, RNAhybrid sonuçlarına göre LMV'yi hedef alan yeni tanımlanan miRNA dizilerinin MFE değerleri -19,3 kcal/mol ile -28,7 kcal/mol arasında, ortalama -27,5 kcal/mol olarak bulunmuştur. LNSV için MFE değerleri -20,4 kcal/mol ile -49,0 kcal/mol arasında iken LNYV için MFE değerleri -20 kcal/mol ile -54,9 kcal/mol arasındadır. Benzer şekilde Ashraf vd [59] tarafından yürütülen

çalışmada manyok bitkisinin (cassava, *Manihot esculenta*) ana patojenlerinden biri olan ICMV-Ker (Indian cassava mosaic virus-Kerala) virüsünün genomunda, potansiyel mRNA-miRNA hedef tahmin analizleri, farklı *in siliko* algoritmalar kullanılarak yürütülmüş olup miRanda algoritması kullanılarak elde edilen miRNA'ların MFE değerleri -22,22 kcal/mol ortalama ile -20,15 kcal/mol ile -23,95 kcal/mol arasında değişiklik göstermekte iken RNA22 algoritması kullanılarak elde edilen miRNA'ların MFE değerleri ise -17,44 kcal/mol ortalama ile -15,80 kcal/mol ve -20,30 kcal/mol arasında olduğu rapor edilmiştir.

MFEI değerinin miRNA dizilerini diğer RNA tiplerinden ayırmada önemli olduğu ve bu değer tRNA (0,64), rRNA (0,59) ve mRNA (0,65) değerlerinden yüksek olması gerektiği bildirilmektedir [50]. Marul bitkisinde tanımlanan miRNA dizilerinin MFEI değerleri 1,62 ile 5,75 arasında bulunmuştur. Bu, marul bitkisinde yeni tanımlanan miRNA'ların yüksek doğrulukla tanımlandığını göstermektedir.

Bitki miRNA dizileri genellikle hedef mRNA dizilerini belirli bölgelerden keserek etkiler ve transkripsiyonun yanı sıra translasyon aşamasında gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynar [65]. Bu nedenle miRNA ile hedef gen arasında mükemmel veya mükemmele yakın bir eşleşme olması önemlidir [66], [67]. Bu çalışmada, virüs genomlarındaki hedef genlerin diğer bir deyişle yeni tanımlanan marul miRNA'larının hedef pozisyonlarını belirleyebilmek adına, kapsamlı biyoinformatik araçlarından biri olan RNAhybrid analizleri yapılmıştır.

Marul dünya çapında en çok üretilen üçüncü yapraklı sebze olmasına rağmen marul ve maruldaki miRNA'lar üzerine çok az araştırma bulunmaktadır. 2021'de yayınlanan bir çalışma, mikroRNA'ların düzenleyici ağlarını ve bunların maruldaki işlevlerini araştırmıştır. Bu çalışmada farklı dokulardan sRNA kütüphaneleri hazırlanarak marul miRNA'ları araştırılmış ve kapsamlı bir miRNA düzenleyici ağ oluşturulmuştur. Araştırmacılar çalışmalarının maruldaki miRNA fonksiyonlarının araştırılmasına temel oluşturduğunu ve kaynak sağladığını iddia etmektedirler [68]. Farklı bir çalışmada ise Han vd. [69], korunmuş marul miRNA'ları ve maruldaki hedefleri EST analizi ile araştırmıştır. Bunun için miRBase veri tabanından 13 bitki türüne ait olgun miRNA dizileri alınmıştır. Pre-miRNA'ların ikincil stem-loop yapılarını tahmin etmek için, bizim kullandığımız algoritmaya (RNAfold) benzer bir algoritma olan, MFOLD 3.1 adı verilen bir RNA katlama algoritması kullanılmış ve sonuç olarak marul bitkisinin gelişiminde, metabolizmasında ve stres

tepkilerinde rol oynayan 63 potansiyel miRNA hedefinin bulunduğu tahmin edilmiştir. Benzer şekilde bu tez çalışmasında da miRBase veri tabanından olgun miRNA dizileri alındı fakat tez için 82 bitki türüne ait (miRNA bildirimi yapılmış bütün bitki türleri) toplam 10.496 miRNA dizisi analiz edildi. Ayrıca, tezde sadece EST değil, nt ve GSS veri tabanlarında da miRNA'lar araştırıldı ve marul virüslerini hedefleyenler belirlendi.

Son yıllarda RNAi teknolojisinin tarımda kullanımı ile ilgili yapılan çalışmaların sayısında artış görülmektedir. Bu amaçla, özellikle patojenite ile ilgili genleri hedefleyen miRNA'lar belirlenmekte, bu diziler ya çıplak halde ya da nanopartiküllere bağlanmış halde (salım süresini arttırmak için) bitkilere uygulanmaktadır [45], [46], [25].

Bu çalışmalardan birinde Qiao vd [18], domates ve üzüm bitkilerindeki mantar patojeni *Botrytis cinerea*'yı kontrol altına almak için yapay nanopartiküller ve dsRNA spreyi kullandılar. Sentezlenen yapay nanopartiküllerin, dsRNA dağıtımına ve patojen tarafından alımına izin verdiğini ve dsRNA'nın yapay nanopartiküller içinde kapsüllenmesinin, yaprak yıkama yoluyla nükleaz bozunması ve eliminasyonundan kaçınmayı mümkün kıldığını keşfettiler. Bu geliştirilmiş stabilite sayesinde hem hasat öncesi hem de hasat sonrası bitkilerde patojene karşı RNAi aracılı koruma, çevre dostu bir şekilde mümkün hale geleceğini öne sürmüşlerdir.

He vd [25] tarafından yürütülen diğer bir çalışmada ise dünya çapında mahsul, meyve ve sebze veriminde ciddi kayıplara neden olabilen fitopatojenlerle mücadelede kullanılan fungusitlerin ciddi çevresel ve sağlık sorunlarına yol açtığından bahsedilmiştir. Mücadelede, SIGS tekniğinin ekolojik olarak sürdürülebilir bir patojen kontrol yaklaşımı olduğu ileri sürülmüştür.

Benzer şekilde Bocos-Asenjo vd [47] tarafından yürütülen çalışmada da oldukça etkili bir orman patojeni olan *Fusarium circinatum*'u kontrol altına alabilmek için SIGS'den yararlanılmış olup vezikül taşınması (*Vps51*, *DCTN1* ve *SAC1*), sinyal iletimi (*Pp2a*, *Sit4*, *Ppg1* ve *Tap42*) ve hücre duvarı biyogenezi (*Chs1*, *Chs2*, *Chs3b*, *Gls1*) metabolik yollarında yer alan mantar temel genlerini hedef alan dsRNA molekülleri tasarlanmış ve üretilmiştir. Sonuç olarak da *Fusarium*

circinatum'un uygulanan dsRNA'yı alıp patojenin virölansının inhibisyonunu tetikleyebildiği doğrulanmıştır.

Bu tez çalışması; insan sağlığına oldukça faydalı olan ve temel bitkisel besin kaynaklarından biri olması nedeniyle dünya çapında ekonomik öneme sahip olan marul bitkisinde miRNA dizilerinin ve bunların başlıca marul virüslerinin (LMV, LNSV ve LNYV) genomlarındaki potansiyel hedeflerinin araştırıldığı ilk ayrıntılı çalışmadır. Toplamda 59 yeni olgun marul miRNA'sının LMV, LNSV ve LNYV virüslerini hedef aldığı belirlendi. Diziler aşağıda liste şeklinde verildi.

✓ lsa-miR7484a, lsa-miR10212, lsa-miR11295, lsa-miR6274, lsa-miR6463, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172b, lsa-miR5564, lsa-miR1520, lsa-miR7777, lsa-miR1440 ve lsa-miR399a dahil olmak üzere 12 miRNA'nın LMV'nin ORF'sini;

✓ lsa-miR1315, lsa-miR1107a, lsa-miR1107b, lsa-miR6167, lsa-miR166a, lsa-miR166b, lsa-miR8647, lsa-miR7484a, lsa-miR11295, lsa-miR11000, lsa-miR6274, lsa-miR478, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172c, lsa-miR172e, lsa-miR5564, lsa-miR10202, lsa-miR399a, lsa-miR156a, lsa-miR156b, lsa-miR169, lsa-miR6155, lsa-miR172f, lsa-miR7777, lsa-miR6189 ve lsa-miR399b olmak üzere 25 miRNA'nın LNSV'nin ORF'lerini;

✓ lsa-miR828, lsa-miR156c, lsa-miR837a, lsa-miR9567, lsa-miR4393, lsa-miR166c, lsa-miR166d, lsa-miR7531, lsa-miR7486, lsa-miR7484b, lsa-miR482, lsa-miR169b, lsa-miR8011b, lsa-miR8028, lsa-miR3630, lsa-miR530, lsa-miR437, lsa-miR11509, lsa-miR823, lsa-miR3446, lsa-miR837b, lsa-miR837c, lsa-miR6167a, lsa-miR6167b, lsa-miR535, lsa-miR172f, lsa-miR166a, lsa-miR166b, lsa-miR7484a, lsa-miR478, lsa-miR8011a, lsa-miR172a, lsa-miR172d, lsa-miR156a, lsa-miR156b, lsa-miR169, lsa-miR6155, lsa-miR2590, lsa-miR10212, lsa-miR6463 ve lsa-miR172b olmak üzere 40 miRNA'nın ise LNYV'nin ORF'lerini hedef aldığı tespit edildi.

Ayrıca en etkili miRNA bağlanma bölgeleri ortaya çıkarılarak viral genomları susturmak amacıyla bu dizilerin kullanım potansiyelleri de değerlendirildi. Bu çalışmanın sonuçlarının, virüsleri hedef alan marul miRNA'ları hakkında umut verici yeni bir bakış açısı ve bu virüslerle mücadelede yeni ve faydalı bilgiler sunması beklenmektedir.

- [1] TÜİK, (2023). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2023-49535> (Erişim tarihi: 10.06.2024)
- [2] Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.), *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 49, Pages 19-34, ISSN 0889-1575.
- [3] Tamura, Y., Mori, T., Nakabayashi, R., Kobayashi, M., Saito, K., Okazaki, S., Wang, N., & Kusano, M. (2018). Metabolomic Evaluation of the Quality of Leaf Lettuce Grown in Practical Plant Factory to Capture Metabolite Signature. *Frontiers in Plant Science*, 9, 665.
- [4] Shi, M., Gu, J., Wu, H., Rauf, A., Emran, T. B., Khan, Z., Mitra, S., Aljohani, A. S. M., Alhumaydhi, F. A., Al-Awthan, Y. S., Bahattab, O., Thiruvengadam, M., & Suleria, H. A. R. (2022). Phytochemicals, Nutrition, Metabolism, Bioavailability, and Health Benefits in Lettuce-A Comprehensive Review. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(6), 1158.
- [5] Dinant, S., & Lot, H. (1992). Lettuce mosaic virus. *Plant Pathology*, 41(5), 528–542.
- [6] Sastry, K.S., & Zitter, T.A. (2014). Management of Virus and Viroid Diseases of Crops in the Tropics. Vol. 2 Epidemiology and Management, *Dordrecht: Springer*, 149–480.
- [7] German-Retana, S., Walter, J., & Le Gall, O. (2008). Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 127–136.
- [8] Nebreda, M., Moreno, A., Pérez, N., Palacios, I., Seco-Fernández, V., & Fereres, A. (2004). Activity of aphids associated with lettuce and broccoli in Spain and their efficiency as vectors of Lettuce mosaic virus. *Virus Research*, 100(1), 83–88.
- [9] Kerr, B. (2020). Controlling viruses in lettuce. *Farmer's Weekly*, 2020(20015), 56-56.
- [10] Wintermantel, W. M., & Anchieta, A. G. (2012). The genome sequence of lettuce necrotic stunt virus indicates a close relationship to Moroccan pepper virus. *Archives of Virology*, 157(7), 1407–1409.
- [11] Wintermantel, W. M., & Hladky, L. L. (2013). Complete genome sequence and biological characterization of Moroccan pepper virus (MPV) and reclassification of Lettuce necrotic stunt virus as MPV. *Phytopathology*, 103(5), 501–508.
- [12] Dietzgen, R. G., Callaghan, B., Wetzel, T., & Dale, J. L. (2006). Completion of the genome sequence of Lettuce necrotic yellows virus, type species of the genus Cytorhabdovirus. *Virus Research*, 118(1-2), 16–22.
- [13] Prabowo, E. Y., Valmonte-Cortes, G. R., Darling, T. L., Buckley, E., Duxbury, M., Seale, B., & Higgins, C. M. (2022). Is the Glycoprotein Responsible for the Differences in Dispersal Rates between Lettuce Necrotic Yellows Virus Subgroups?. *Viruses*, 14(7), 1574.
- [14] Jin, Y., Zhao, J. H., & Guo, H. S. (2021). Recent advances in understanding plant antiviral RNAi and viral suppressors of RNAi. *Current Opinion in Virology*, 46, 65-72.

- [15] Jin, L., Chen, M., Xiang, M., & Guo, Z. (2022). RNAi-based antiviral innate immunity in plants. *Viruses*, 14(2), 432.
- [16] Ding, S. W. (2023). Transgene silencing, RNA interference, and the antiviral defense mechanism directed by small interfering RNAs. *Phytopathology*, 113(4), 616-625.
- [17] Zhao, X., Liu, Z., Liu, Y., Lu, M., Xu, J., Wu, F., & Jin, W. (2024). Development and application of an RNA nanostructure to induce transient RNAi in difficult transgenic plants. *Biotechnology Journal*, 19(5), 2400024.
- [18] Qiao, L., Niño-Sánchez, J., Hamby, R., Capriotti, L., Chen, A., Mezzetti, B., & Jin, H. (2023). Artificial nanovesicles for dsRNA delivery in spray-induced gene silencing for crop protection. *Plant Biotechnology Journal*, 21(4), 854–865.
- [19] Kim, D., & Rossi, J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *BioTechniques*, 44(5), 613–616.
- [20] Liu, W. W., Meng, J., Cui, J., & Luan, Y. S. (2017). Characterization and Function of MicroRNA*s in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2200.
- [21] Wang, W., & Galili, G. (2019). Tuning the Orchestra: miRNAs in Plant Immunity. *Trends in Plant Science*, 24(3), 189–191.
- [22] Jeong, DH. (2016). Functional diversity of microRNA variants in plants. *Journal of Plant Biology*, 59, 303–310.
- [23] Yang, B., Tang, J., Yu, Z., Khare, T., Srivastav, A., Datir, S., & Kumar, V. (2019). Light stress Responses and Prospects for engineering light stress tolerance in crop plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(4), 1489–1506.
- [24] Mengistu, A. A., & Tenkegn, T. A. (2021). The role of miRNA in plant-virus interaction: a review. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2853–2861.
- [25] He, L., Zhou, Y., Mo, Q., Huang, Y., & Tang, X. (2024). Spray-induced gene silencing in phytopathogen: Mechanisms, applications, and progress. *Advanced Agrochem*.
- [26] Lebeda, A., Křístková, E., Kitner, M., Mieslerová, B., Jemelková, M., & Pink, D. A. (2014). Wild *Lactuca* species, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 597-640.
- [27] NCBI, (2022). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_002870075.4/ (Erişim tarihi: 20.06.2024)
- [28] Abadkhah, M., Hamidi, H., & Koolivand, D. (2021). Phylogenetic and population analysis of lettuce mosaic virus isolates based on the coat protein gene. *Journal of Genetic Resources*, 7(2), 211-219.
- [29] PlantwisePlus Knowledge Bank. (2022). Lettuce mosaic virus (lettuce mosaic), CABI International. <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/pwkb.species.30269> (Erişim tarihi: 20.05.2024)
- [30] Pavan, M.A., Krause-Sakate, R., Silva, N., Zerbini, F.M. ve Gall, O.L. (2008). Virus Diseases of Lettuce in Brazil. *Plant Viruses*, 2(1), 35-41.
- [31] Murphy, J.F., Rychlik, W., Rhoads, R.E., Hunt, A.G., and Shaw, J.G. (1991). A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA. *Journal of Virology*. 65(1), 511–513.

- [32] Adams, M. J., Antoniwi, J. F., & Fauquet, C. M. (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology*, 150(3), 459–479.
- [33] Riechmann, J. L., Laín, S., & García, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *The Journal of General Virology*, 73 (Pt 1), 1–16.
- [34] Simko, I., Pechenick, D. A., McHale, L. K., Truco, M. J., Ochoa, O. E., Micheltmore, R. W., & Scheffler, B. E. (2009). Association mapping and marker-assisted selection of the lettuce dieback resistance gene Tvr1. *BMC Plant Biology*, 9, 135.
- [35] Zhang, Y., Xie, Z., Fletcher, J. D., Wang, Y., Wang, R., Guo, Z., & He, Y. (2020). Rapid and sensitive detection of lettuce necrotic yellows virus and cucumber mosaic virus infecting lettuce (*Lactuca sativa* L.) by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *The Plant Pathology Journal*, 36(1), 76.
- [36] Darling, T. L. (2020). Population Analysis and Subgroup Diagnosis of Lettuce necrotic yellows virus within New Zealand. *Auckland University of Technology*. <https://openrepository.aut.ac.nz/server/api/core/bitstreams/04ca6b48-316f-496e-a753-4f0df8bfff451/content>
- [37] Shabalina, S. A., & Koonin, E. V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(10), 578–587.
- [38] Geley, S., & Müller, C. (2004). RNAi: ancient mechanism with a promising future. *Experimental Gerontology*, 39(7), 985–998.
- [39] Almeida, R., & Allshire, R. C. (2005). RNA silencing and genome regulation. *Trends in Cell Biology*, 15(5), 251–258.
- [40] Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297.
- [41] Bartel, D. P., & Chen, C. Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature Reviews Genetics*, 5(5), 396–400.
- [42] Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 7(4), 147–154.
- [43] Cho, S. K., Ryu, M. Y., Shah, P., Poulsen, C. P., & Yang, S. W. (2016). Post-translational regulation of miRNA pathway components, AGO1 and HYL1, in plants. *Molecules and Cells*, 39(8), 581–586.
- [44] Mezzetti, B., Smagghe, G., Arpaia, S., Christiaens, O., Dietz-Pfeilstetter, A., Jones, H., & Sweet, J. (2020). RNAi: What is its position in agriculture?. *Journal of Pest Science*, 93(4), 1125–1130.
- [45] Qiao, L., Lan, C., Capriotti, L., Ah-Fong, A., Nino Sanchez, J., Hamby, R., ... & Jin, H. (2021). Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9), 1756–1768.
- [46] Mann, C. W., Sawyer, A., Gardiner, D. M., Mitter, N., Carroll, B. J., & Eamens, A. L. (2023). RNA-based control of fungal pathogens in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12391.
- [47] Bocos-Asenjo, I. T., Amin, H., Mosquera, S., Díez-Hernando, S., Ginesy, M., Díez, J. J., & Niño-Sánchez, J. (2024). Spray-induced gene silencing

- (SIGS) as a tool for the management of Pine Pitch Canker forest disease. *BioRxiv*, 2024-03.
- [48] Blair, C. D., & Olson, K. E. (2015). The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses*, 7(2), 820-843.
 - [49] Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155–D162.
 - [50] Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 46(2), 243–259.
 - [51] 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 Research*, 15(5), 336–360.
 - [52] Marakli S. (2018). Identification and functional analyses of new sesame miRNAs (*Sesamum indicum* L.) and their targets. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2145–2155.
 - [53] Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner Zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology: AMB*, 6, 26.
 - [54] Zhang, B. H., Pan, X. P., Cox, S. B., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(2), 246–254.
 - [55] Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M., & Giegerich, R. (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(10), 1507–1517.
 - [56] Krüger, J., & Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue), W451–W454.
 - [57] Kumar, V., Khare, T., Shriram, V., & Wani, S. H. (2018). Plant small RNAs: the essential epigenetic regulators of gene expression for salt-stress responses and tolerance. *Plant Cell Reports*, 37(1), 61–75.
 - [58] Song, X., Li, Y., Cao, X. and Qi, Y. (2019). MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant–Environment Interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 489-525.
 - [59] Ashraf, M. A., Ali, B., Brown, J. K., Shahid, I., & Yu, N. (2023). In silico identification of cassava genome-encoded micrornas with predicted potential for targeting the ICMV-kerala begomoviral pathogen of cassava. *Viruses*, 15(2), 486.
 - [60] Nivedha, M., Harish, S., Angappan, K., Karthikeyan, G., Kumar, K. K., Murugan, M., & Jayakanthan, M. (2023). In silico identification and validation of microRNAs from the genome of *Solanum lycopersicum* targeting Groundnut bud necrosis orthotospovirus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 127, 102086.
 - [61] Yue, D., Liu, H., & Huang, Y. (2009). Survey of Computational Algorithms for MicroRNA Target Prediction. *Current Genomics*, 10(7), 478–492.
 - [62] Ashraf, M. A., Murtaza, N., Brown, J. K., & Yu, N. (2023). In Silico Apple Genome-Encoded MicroRNA Target Binding Sites Targeting Apple Chlorotic Leaf Spot Virus. *Horticulturae*, 9(7), 808.
 - [63] Barozai, M. Y. K. (2013). Identification of microRNAs and Their Targets in *Artemisia annua* L. *Pakistan Journal of Botany*, 45, 461-465

- [64] Ashraf, M. A., Feng, X., Hu, X., Ashraf, F., Shen, L., Iqbal, M. S., & Zhang, S. (2022). In silico identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genome encoded microRNAs targeting sugarcane bacilliform virus. *PloS one*, 17(1), e0261807.
- [65] Rosatti, S., Rojas, A. M., Moro, B., Suarez, I. P., Bologna, N. G., Chorostecki, U., & Palatnik, J. F. (2024). Principles of miRNA/miRNA* function in plant MIRNA processing. *Nucleic Acids Research*, gkae458.
- [66] Voinnet O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669–687.
- [67] Zhao, M., Meyers, B. C., Cai, C., Xu, W., & Ma, J. (2015). Evolutionary patterns and coevolutionary consequences of MIRNA genes and microRNA targets triggered by multiple mechanisms of genomic duplications in soybean. *The Plant Cell*, 27(3), 546–562.
- [68] Deng, Y., Qin, Y., Yang, P., Du, J., Kuang, Z., Zhao, Y., Wang, Y., Li, D., Wei, J., Guo, X., Li, L., & Yang, X. (2021). Comprehensive Annotation and Functional Exploration of MicroRNAs in Lettuce. *Frontiers in Plant Science*, 12, 781836.
- [69] Han, Y., Zhu, B., Luan, F., Zhu, H., Shao, Y., Chen, A., Lu, C., & Luo, Y. (2010). Conserved miRNAs and their targets identified in lettuce (*Lactuca*) by EST analysis. *Gene*, 463(1-2), 1–7.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

Ozkeser, E. And Marakli, S. Novel miRNAs in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Targeting LMV (Lettuce Mosaic Virus) Genome, 7th International Agriculture, Environment and Health Congress (ICAEH 2024), 30 May – 1 June, 2024, Bursa, Turkey

