

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Corylus avellana* L ve *Corylus colurna* L FINDIK TÜRLERİNDE
KORUNMUŞ BAZI MİKRORNA'LARIN GERÇEK ZAMANLI
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ANALİZİ**

BÜŞRA YİRMİBEŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. NEHİR ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK**

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Corylus avellena* L ve *Corylus colurna* L FINDIK TÜRLERİNDE KORUNMUŞ BAZI
MİKRORNA'LARIN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
İLE ANALİZİ**

Büşra YİRMİBEŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 19.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Semiha ERİŞEN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Kemal Özdem ÖZTABAK
İstanbul Üniversitesi



ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, tezimi iyi bir şekilde yürütebilmem için bana gerekli olanakları sağlayan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma arkadaşlarım Zehra ULU, Salih ULU, Cansu GÖNENÇ, Hatice Nur AYDIN'a ve yol arkadaşım Güneriye ÖZEN'e teşekkür ederim.

Her koşulda yanımda olan ve beni sonuna kadar maddi ve manevi destekleyen ailem; Niyazi YİRMİBEŞ, Candan YİRMİBEŞ ve Yusuf YİRMİBEŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2017

Büşra YİRMİBEŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
FINDIK VE MİKRORNA'LAR	4
2.1 Fındık ve Sınıflandırılması	4
2.1.1 Fındığın Morfolojik Yapısı ve Ekolojik Koşulları	4
2.1.2 Fındık Yetiştiriciliği	6
2.1.3 Fındığın Bileşimi	7
2.1.4 Türkiye ve Dünya'da Fındık Üretimi ve Dağılımı	8
2.2 Mikro RNA	9
2.2.1 MiRNA Kökeni ve Tarihi	9
2.2.2 MiRNA Genomik Yapısı ve Bitkilerdeki Biyogenezi	13
2.2.3 MiRNA Fonksiyonları	17
2.2.4 MiRNA'ların belirlenmesi	21
BÖLÜM 3	
METARYAL METOD	23

3.1 Bitki Metaryali	23
3.2 Total RNA İzolasyonu.....	23
3.3 Revers Transkripsiyon PCR (RT PCR).....	24
3.4 Real Time PCR (qPCR)	25
BÖLÜM 4	
SONUÇLAR	26
4.1 Total RNA İzolasyonu.....	26
4.2 Reverse Transkripsiyon PCR	26
4.3 Real-Time PCR	28
BÖLÜM 5	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ	47

SİMGE LİSTESİ

Cq	Döngü Değeri
cm	Santimetre
g	Gram
m	Metre
mg	Miligram
ml	Millitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nt	Nükleotit
Tm	Erime sıcaklığı
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

cDNA	Komplementer DNA
CK	<i>Corylus colurna</i> karanfil dokusu
CP	<i>Corylus colurna</i> püskül dokusu
CT	<i>Corylus colurna</i> tomurcuk dokusu
CY	<i>Corylus colurna</i> yaprak dokusu
dsRNA	Double strand RNA (çift zincirli RNA)
EST	Expressed sequence tags (İfade edilmiş sekans etiketleri)
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Messenger RNA
PTGS	Post-transkripsiyon gene silencing (Transkripsiyon sonrası gen susturma)
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Real-Time Pcr (Gerçek zamanlı PCR)
siRNA	Small interfering RNA (küçük interfering RNA)
TK	<i>Corylus avellana</i> karanfil dokusu
TP	<i>Corylus avellana</i> püskül dokusu
TT	<i>Corylus avellana</i> tomurcuk dokusu
TY	<i>Corylus avellana</i> yaprak dokusu

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Fındık bitkisinin dişi ve erkek organları, yaprak ve tomurcuk dokusu.....	5
Şekil 2.2 MiRNA'nın genomik yapısı.....	14
Şekil 2.3 MikroRNA biyogenezi.....	17
Şekil 4.1 Ters transkripsiyon işlemi yapılan miRNA'ların jel görüntüsü.....	27
Şekil 4.2 miR159'un Real-Time analiz grafiği.....	28
Şekil 4.3 miR160'ın Real-Time analiz grafiği.....	29
Şekil 4.4 miR171'in Real-Time analiz grafiği.....	31
Şekil 4.5 miR396'nın Real-Time analiz grafiği.....	32
Şekil 4.6 miR2919'un Real-Time analiz grafiği.....	33
Şekil 4.7 miR8123'ün Real-Time analiz grafiği.....	34

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Ters Transkripsiyon Reaksiyon Reaktifleri.....	24
Çizelge 3.2 Real-Time PCR için Kullanılan Primerler	25
Çizelge 4.1 miR159'un Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri	28
Çizelge 4.2 miR160'ın Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri	30
Çizelge 4.3 miR171'in Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri	31
Çizelge 4.4 miR396'nın Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri	32
Çizelge 4.5 miR2919'un Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri	33
Çizelge 4.6 miR8123'ün Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri	34

ÖZET

***Corylus avellena* L ve *Corylus colurna* L FINDIK TÜRLERİNDE KORUNMUŞ BAZI MİKRORNA'LARIN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ANALİZİ**

Büşra YİRMİBEŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Fındık içerdiği besin değerleriyle, özellikle sağlık açısından faydaları bulunan ve gıda sektörü, boya sanayi, odunculuk ve hayvan yemleme gibi birçok alanda kullanılan önemli bir bitki türüdür. Ekonomik değere sahip *Corylus avellena* ve anaç olarak kullanılan *Corylus colurna* en yaygın yetiştirilen türler arasında yer almaktadır. Şimdiye kadar birçok bitkide mikroRNA(miRNA) çalışmaları yapılmasına rağmen fındıkta henüz bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada, transkripsiyon sonrası düzenlemelerde rol oynayan korunmuş miRNA'ların fındıkta da tespit edilmesi amaçlanmıştır. miRNA'lar 18-25 nt uzunluğunda, kısa, tek zincirli non-coding RNA'lardır. Transkripsiyon sonrası gen düzenleyicileri olarak da adlandırılan miRNA'lar, mRNA ile etkileşim içerisine girerek, hedeflerinin baskılanmasına veya yıkımına neden olurlar. Bitkilerde özellikle hedef mRNA'nın yıkımını gerçekleştirerek, bitkinin gelişim süreçlerinde, biyotik ve tuz, kuraklık, soğukluk veya UV gibi abiyotik streslere cevap oluşturmada görev almaktadırlar. Korunmuş miRNA'lar farklı bitki türlerinde aynı fonksiyona sahip ve çok eski zamanlardan günümüze kadar var olan miRNA'lardır. Bu çalışmada Giresun Fındık Araştırma Enstitüsünden elde edilen *Corylus avellena* L. ve *Corylus colurna* L. fındık

türlerinde korunmuş bazı miRNA'ların (miR159, miR160, miR171, miR396, miR2919 ve miR8123) Real-Time PCR yöntemi ile tespitini amaçladık.

Anahtar Kelimeler : Korunmuş mikroRNA, Fındık, *Corylus avellana* L, *Corylus colurna* L., Real-Time PCR.



ABSTRACT

ANALYSIS OF SOME CONSERVED MIKRNAs IN *Corylus avellena* L AND *Corylus colurna* L HAZELNUT SPECIES USING BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Büşra YİRMİBEŞ

Department of Molecular Biology and Genetic

MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nehir OZDEMİR OZGENTRK

Hazelnut is a important plant species that is used in food industry, dye industry, woodchopping and stock farming, especially, that has benefits for health due to nutrient component. *Corylus avellena* that has economical value and *Corylus colurna* used as rootstock play a part among the most common cultivars. There is no study in hazelnut yet, although microRNA studies in many of plant were made until now. In this study, detection of miRNAs that play role in posttranscriptional regulation was aimed. miRNAs are 18-25 nt, short and single strand non-coding RNAs. miRNAs called as post-transcriptional gene regulators cause repress or cleavage of their target, binding to mRNA. In particularly in plants, they cause cleavage of mRNA and play role in developmental process, response to biotic and abiotic stresses like drought, salt, cold or UV. Conserved miRNAs are miRNAs that have same function in different plant species and are present from very old times to daytime. In this study, we aimed that analyzing of some conserved miRNAs (miR159, miR160, miR171, miR396, miR2919 and miR8123) in hazelnut (*Corylus avellena* L. and

Corylus colurna L.) that is provided from Giresun Hazelnut Research Institute using by Real-Time PCR.

Key Words: Conserved microRNA, Hazelnut, *Corylus avellana* L., *Corylus colurna* L., Real-Time PCR, cDNA



GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Türkiye başta olmak üzere, İtalya, ABD, İspanya ve diğer bazı ülkelerde de üretimi yapılan fındık bitkisi, Betulaceae (huş ağacigiller) familyasının *Corylus* cinsine ait olup, 25'ten fazla tür içeren sert kabuklu ve lezzetli bir meyveye sahiptir [1], [2]. Ekonomik değere sahip olan tombul fındık (*Corylus avellana* L.) ve anaç olarak kullanılan türk fındığı (*Corylus colurna* L.) en önemli türleri arasında yer almaktadır [2].

Zuruf denilen bir kılıf içerisinde yer alan meyvelere sahip fındık bitkisinin erkek çiçekleri (püskül) ve dişi çiçekleri (karanfil) bir arada bulunmaktadır. Dolayısıyla tek evcikliktir. Çotanak adı verilen iki ya da üç parçalı yapılar halinde bulunurlar [3]. Yuvarlak, sivri ya da badem şeklinde olan iç kabuğun şeklini alan meyvelere göre çeşitlendirilebilirler [4].

Fındık, insan sağlığı açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. İçerdiği yüksek yağ, protein, karbonhidrat ve vitaminler sebebiyle önemli bir enerji kaynağıdır. Antioksidan özelliğe sahip fenolik bileşikler açısından zengin olmasından dolayı da, diyabet, kanser, kalp ve damar hastalıkları gibi rahatsızlıklardan korunmada rolü olduğu söylenmektedir [5]. Büyük bir kısmı gıda sektöründe, özellikle çikolata yapımında kullanılan fındık, aynı zamanda eşya yapımında, boya sanayinde, hayvan yemlemede ve yakacak olarak kullanılmaktadır [6].

Gerek çevreye, gerek günlük hayata ve insan sağlığına bu şekilde faydaları olan bitki türlerinin gen ifadelerinin düzenlenmesi üzerine yapılan çalışmalar, bu bitkilerin moleküler yapısının anlaşılabilmesi için son derece önemlidir. Son yıllarda birçok bitki

üzerinde çalışılmış olan mikroRNA(miRNA)'lar, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli görevleri olan yapılardır [7]. Fındık bitkisinde de varlığının incelenmesi ve moleküler düzeydeki etkisinin araştırılması önem taşımaktadır.

1993 yılında, *C.elegans*'ta keşfinden sonra miRNA'nın popülaritesi artmaya başlamıştır [8]. 2002 yılında da *Arabidopsis*'te ilk bitki miRNA'larının keşfi gerçekleşmiştir [9]. Daha sonra yapılan çalışmalarda da pirinç [10], mısır [11], buğday [12], pamuk [13], şeftali [14], muz [15] ve zeytin [16] gibi bitki türlerinde de miRNA'lar gösterilmiş ve türe özgü miRNA'lar ile türler arasında korunmuş olan miRNA'ların olduğu belirlenmiştir.

miRNA 18-25 nükleotid arasında uzunluğa sahip, proteine dönüşmeyen yani kodlanmayan, gen düzenlenmesinde önemli rolleri olan küçük yapılardır. Geçmişten günümüze kadar hakkında birçok araştırma yapılmış ve gerek metazoan gerekse bitki aleminde gen susturmasında görev aldığı ortaya çıkmıştır [17].

Çoğu miRNA farklı bitki türlerinde aynı fonksiyona sahip genler olan homologlarına sahiptir. Böyle miRNA'lar korunmuş miRNA olarak adlandırılmaktadır. Korunmamış miRNA'lar ise sadece türe özgüdür. Keşfedilen miRNA'ların birçoğu, yosunlardan angiospermilere kadar birçok bitki gruplarında bulunmaktadır [18]. Daha önce yapılan bir çalışmada pirinçte korunmuş bazı miRNA genlerinin *Arabidopsis* bitkisinde homologları olduğu belirtilmiştir [19]. Yine başka bir çalışmada eğrelti otu ve yosunun *Arabidopsis* ile ortak miRNA genleri olduğu rapor edilmiştir [20]. Bu sonuçlar bitki miRNA'larının 125 milyon yıldan daha fazla yıl önce var olduğunu düşündürmektedir [18].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada amaç, daha önceden korunmuş olduğu tespit edilen 6 miRNA'nın (miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123) reverse transkriptaz PCR ve Real-Time PCR yöntemleri ile *Corylus avellana* L. ve *Corylus colurna* L. fındık türlerinde varlığını ispatlamaktır. Organ oluşumu, meyve ve fındık yağı eldesinde, bu oluşumların biyolojik yollarında görev alan fındık miRNA'larının tespit edilmesi, hedef genlerinin tespiti açısından ilk adım olacaktır. Fındık yetiştiriciliğinde yüksek kalitede ürün elde etmek adına, miRNA'lar ile yapılacak gen düzenlenmesi çalışmalarına elde ettiğimiz bu veriler ışık tutacaktır.

1.3 Hipotez

Gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alarak, canlının gelişim süreçlerinde önemli rolleri olan bazı korunmuş miRNA'ların fındık bitkisinde de var olması yüksek bir ihtimaldir. Deneysel çalışmalarla da bu öngörü doğrulanmaya çalışılmıştır. Yaprak, erkek organ, dişi organ ve tomurcuk olarak dört farklı dokuda tespit edilmesi amaçlanan miRNA'lar, çeşitli analiz yöntemleri ile saptanabilir.



BÖLÜM 2

FINDIK VE MİKRORNA'LAR

2.1 Fındık ve Sınıflandırılması

Fındık kelimesinin, bazı kaynaklardan edinilen bilgilere göre, Karadeniz'in antik çağdaki ismi olan 'Pont Exinus' tan türediği ve 'pontik' kelimesinden meydana geldiği söylenmektedir [3].

25'ten fazla türe sahip olan fındık , *Fegales* (Kayınağacıgiller) takımından, *Betulaceae* (Huş ağacıgiller) familyasının, *Corylus* cinsi içerisinde yer alan sert kabuklu meyvelere sahip bir bitkidir. Meyvesi açısından bakıldığında, tombul fındık olarak bilinen ve ekonomik değer sahip *Corylus avellena* L. ile türk fındığı olarak geçen ve genellikle anaç olarak kullanılan *Corylus colurna* L. en önemli türlerindendir [1], [2].

Meyvesi %80 oranında çikolata yapımında kullanılmakla birlikte, pasta, şekerleme, bisküvi ve tatlı yapımında kullanılır. Gıda olarak tüketilmesinin yanında, odunculukta ev eşyalarının yapımında, hayvan otlatmada yem olarak, kabukları yakacak olarak ve yaprakları ahır altlığı olarak kullanılır. Bu kullanımdan sonra gübre olarak değerlendirilir. Bunlarla birlikte, erozyonu önlemede role sahiptir. Toprak koruması açısından çevreye faydası vardır. Boya sanayinde kullanıldığı da bilinmektedir [6], [21]. İSLAM [22], yüksek lisans tez çalışmasında, fındık zurufu kompostunun toprakta organik madde artışını sağladığını ve aynı zamanda toprağın mekaniksel özelliklerini de olumlu bir şekilde etkilediğini rapor etmiştir.

2.1.1 Fındığın Morfolojik Yapısı ve Ekolojik Koşulları

Farklı türlerde çok farklı morfolojik özellik göstermeyen fındık yaprağının, dip kısımları yürek şeklinde, kenarları kaba ve dişlidir, ucu sivri veya damla şeklindedir.

Basit yaprağa sahip olan fındığın yaprak boyu 5-15 cm, genişliği ise 5-11 cm arasında değişmektedir (Şekil 2.1 B) [23].

Almaçlı ve çok pullu tomurcuklara sahiptir. Yaprak tomurcukları küçük ve sivri iken, çiçek tomurcukları büyük ve şişkindir. Çiçekler tek evcikli. Dolayısıyla erkek ve dişi çiçekler aynı bitkinin farklı yerlerinde bulunurlar. Erkek çiçeklere püs, püskül, kedicik veya şeton da denilebilir. Sarkık ve silindirik bir başak görünümündedir. Tek tek veya gruplar halinde gelişirler (Şekil 2.1 A). Olgunlaşmış erkek çiçek başakları, türlere göre farklılık göstermesiyle birlikte 6-10 cm uzunluğundadır ve her bir erkek çiçek başağında yaklaşık 200 kadar çiçek bulunmaktadır [4]. Tomurcukları küçük ve dik olan dişi çiçekler karanfildir. Tomurcuklar yumurta biçimindedir ve birbiri üzerine dizilmiş pulcuklardan oluşmuştur. Karanfildeki stigma sayısı da türe göre 14-24 arasındadır. Tomurcuktaki dişi çiçeklerin kırmızı stigmaları görünür haldedir (Şekil 2.1 A). Döllenme ilkbahar mevsiminde ve rüzgarla gerçekleşir. Çiçeklenmesi diğer bitki türlerine göre daha geçtir. Çiçek renkleri de değişiklik göstermektedir [4].



Şekil 2.1 Fındık bitkisinin dişi (siyah daire içi) ve erkek organları (kırmızı daire içi) (A), yaprak (B) ve tomurcuk (C) dokusu.

Türden türe değişiklik gösteren ve “zuruf” veya “kapsul” adı verilen bir kılıf içerisinde yer alan fındık meyvesi, sert kabuklu bir meyvedir. Zurufly meyveler, çotanak denilen tek, ikili veya üçlü yapıda bulunabilirler. Fındığın iç kısmı ise yenilebilen iki parçalı kotiledondan oluşmaktadır [3]. Dış kabuğun şeklini alır ve yuvarlak, sivri veya badem şeklinde olabilir.

Fındık bitkisinin boyu türlere göre değişiklik göstermekle birlikte, 5 m ile 25 m arasındadır. Örneğin ; *Corylus avellana* L., yaklaşık 5 m boylarında çalı formunda iken, *Corylus colurna* L. 15 m’den fazla boylara ulaşabilmektedir. Aynı zamanda, bu iki tür yaprak ve meyve özellikleri açısından da farklı yapılara sahiptir. *C. avellana* sivri uçlu ve üst yüzü tüylü yapraklara sahiptir. Ancak *C. colurna* yapraklarının uçları damla şeklinde gelir ve alt yüzeyinde seyrek tüyler bulundurur. Aynı zamanda, dip kısmından

uca doğru fazla miktarda ince şerite ve geriye doğru kıvrık, yapışkan tüyleri olan şerit uçlarına sahip meyve örtüsü içermesi, *C.colurna*'nın tanımlayıcı bir özelliğidir [23], [24].

Dünya üzerinde 36-41 enlemlerinde yetişen fındık [23], Karadeniz kıyılarından yaklaşık 30 km kadar içerde, 10 – 1700 m arası yüksekliklerde yetişmektedir. Örneğin; *C.avellana* 10 - 1700 m iken *C. colurna* 800 – 1700 m rakıma sahiptir. Yaz mevsiminde 20-25 °C 'de yağış miktarının minimum 700-800 mm, maksimum 1300-1500 m arasında yağış alan bölgelerde iyi yetişmekle birlikte, düzenli yağış rejimleri isterler [24], [25]. Geç gelen don olayı veya yazların kurak geçmesi elde edilen verim için riskli durumlardır. Dişi çiçeklerin açılma mevsimi ilkbahar olduğundan, bu mevsimde meydana gelebilecek don olayları, taze sürgünün ve dişi çiçeğinin fizyolojik canlılığını yitirmesine neden olur. Sonbahar mevsiminde ise püskül dediğimiz erkek çiçekler açar. Bu çiçekler nemli havalarda büyüme ve gelişmeye adapte olmuştur. Bu nedenden dolayı sonbaharda meydana gelecek olan kuraklık çiçeklenmeye engel olarak tozlaşma olasılığını düşürür [26].

Yağış düzensizlikleri veya beklenmedik kuraklıklar, meyvenin tam olarak büyümemesine ve yeni meyvenin olgunlaşmadan hasat dönemine girmesine sebep olur. Toplama zamanında elde edilmesi gerekenden daha az miktarda fındık elde edilir. Tüm bu nedenlerden dolayı fındığın nemli ve ılıman bölgelerde yetiştirilmesi son derece önemlidir [26].

Humus oranı yüksek veya tınlı-humuslu topraklar fındığın iyi yetişebildiği topraklardır. Kum oranı yüksek killi topraklarda yetiştirilmesi zordur, iyi bir verim alınamaz. Örneğin: Karadeniz Bölgesinde, killi-tınlı topraklar mevcuttur ve bunlar asitli veya nötr topraklardır. Bu nedenle organik madde oranları düşüktür. Fındık yetiştirilmesi için uygun olmasının sebebi de budur. Yüksek asitlik derecesini düşürmek adına zaman zaman topraklara kireç verilmelidir [26].

2.1.2 Fındık Yetiştiriciliği

Fındık dikiminden önce toprak ve arazi şartlarının iyi bir şekilde yapılması gerekir. Arazinin düz veya meyilli olmasına göre fındık bahçelerinin tesis edilmesi farklılık göstermektedir. Teraslama aşamasından sonra toprak hazırlığının iyi ve özenli bir şekilde yapılması şarttır [27].

Bitkinin büyüyüp beslenebilmesi için bitki, Karbon (C), Hidrojen (H), Oksijen (O), Azot (N), Fosfor (P), Potasyum (K), Kalsiyum (Ca) ve Magnezyum (Mg) gibi bazı besin maddelerine ihtiyaç duymaktadır. Aynı zamanda toprak yapısı da bitki için önem arz etmektedir. Toprağın asit miktarının kök gelişiminde rol oynamasının yanında organik maddeler açısından zengin olması ve su tutup tutmaması da önemlidir [28].

Verimi ve kalitesi yüksek ürün elde etmek için bahsedilen özelliklere göre seçim yapıldıktan sonra dikim yapılır. Düz arazilerde sıralar arasındaki mesafe 4 – 5 m civarında olmalıdır. Aralık ve mesafe önemlidir [4]. Verimin artırılması ve ekonomik ömrün uzaması için önemli rol oynayan budama işlemi, fidanlara, dikimde şekil kazandırır. Kök sürgün temizliği yapılarak da, budama işlemi, besin maddelerinin sürgünler tarafından sömürülmesini engeller. Bunların yanında düzgün ve kuvvetli taç oluşumu, kaliteli meyve verimi, daha iyi ışık alma ve havalanma ve tozlanma oranını artırma gibi etkileri de vardır [29]. Ardından organik madde açısından toprağı zenginleştirmek adına gübreleme yapılır. Aynı zamanda toprak verimliliği artar, besin maddelerinin toprakta tutunması sağlanır, toprağın havalanması ve işlenmesine olanak sağlanır [27].

Fındık yetiştiriciliğinde, yıl boyu harcanan emeğin karşılığı, önemli bir işlem olan hasat ile alınır. Hasat zamanı Ağustos ayı ortasında başlar. Hasattan sonra fındıklar harmanlanır. Belli bir zaman içerisinde kuruyan fındıklar, patoz denilen fındık ayıklama makinesine verilir ve zuruflarından ayrılır. Fındığın iyi bir şekilde kuruması önemlidir. Kurutma süresi yaklaşık 10-15 gündür. Toz, toprak, zuruflar ve içi boş kalan fındıklar vantilatör aracılığıyla uzaklaştırılır. Temizlenen fındıklar tekrar ayrı bir yerde temizlenir. Bu aşamada çeşitler ve delikli olanlar da ayıklanır [27].

2.1.3 Fındığın Bileşimi

Yaklaşık %50'si yenilebilen iç kısım olan fındığın bileşimi, iklim, toprak, büyüme koşulları ve çeşidine bağlı olarak değişim göstermektedir. Yapılan çalışmalarda fındık bileşimiyle ilgili önemli sonuçlar alınmıştır. Fındıkta en çok bulunan bileşen, %61,21 oranla yağdır. Bunu takiben, %17.30 karbonhidrat, %15.35 protein, %3.90 nem ve %2.24 ile kül gelmektedir. Ayrıca 100 gramda yaklaşık 631 kcal içerir. Dolayısıyla iyi bir enerji kaynağıdır [30]. Kemik, diş, kan, kas, sinir hücreleri için önemli olan mineral içeriğiyle de fındık önemli bir yere sahiptir.

Köksal ve arkadaşları [31], fındığın mineral içeriğinde (mg/100g) 814 mg ile potasyum ilk sırada geldiğini ve potasyumu takiben 288 mg ile fosfor, 217 mg ile kalsiyum ve 168 mg ile magnezyumun geldiğini rapor etmişlerdir.

Vitaminler açısından da zengin olan fındık yüksek miktarda E vitamini içermektedir. Bunun başında da α -tocopherol %24.0 oranla gelmektedir. [30] E vitaminini takiben B1, B2, B6, niyasin, askorbikasit ve biyotin gibi vitaminleri de içermektedir. İçerdiği vitaminler sayesinde serbest radikallerden hücreyi korumak adına antioksidant görevi vardır [30], [31].

Temel ve temel olmayan aminoasit içeriği ile de önemli bir protein kaynağıdır. Nonessential Glutamik asit incelenen tüm fındık çeşitlerinde yüksek miktarda gözlemlenmiştir. Bunu takiben de aspartik asit gelmektedir. Arjinin, histidin, izolosin, losin, metionin ve valininin de temel aminoasitler olarak varlığı gözlemlenmiştir. Bu temel aminoasitler arasında da arjinin ve lösin yüksek miktarda görülmüştür [31].

Yağ ve yağ asitleri fındığın kalitesini etkileyen, depolama süresi işlenmesiyle birlikte birçok özelliğini belirleyen, fındıkta da yüksek miktarda bulunan en önemli bileşendir. Fındık yağının vücutta sindirimi kolay ve erime noktası düşüktür. Oksitlenme ve acılanma süreleri diğer yağlara göre daha uzundur. Çeşitlere göre farklılık göstermesiyle birlikte en yüksek miktarda bulunan yağ asidi, oleik asittir ve *Corylus avellana*'da %77.8 oranla bulunmaktadır. Oleikasidi takiben palmitik asit, stereoik asit ve palmitoleik asit gelmektedir [31].

Fındık, sahip olduğu zengin içeriğinden dolayı, günümüzde sıklıkla rastlanan ve insan sağlığını önemli derecede etkileyen, şeker hastalığı, kalp-damar hastalıkları, kolesterol ve kanser gibi hastalıkları geriletmekte veya yakalanma riskini azaltmaktadır. Bu nedenle sağlığımız için oldukça faydalı bir besin kaynağıdır [32].

2.1.4 Türkiye ve Dünya'da Fındık Üretimi ve Dağılımı

Ülkemiz, yüksek kalitede fındığın üretildiği önemli yerlerden biridir. En değerli yabani türlerin doğal yaşam alanı olduğu gibi genetik kökeninin de buradan geldiği düşünülmektedir [31]. Kuzey kesimlerde, özellikle Karadeniz Bölgesi'nde doğal yetişme alanları bulunup, Batı, Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde de nadiren görülebilmektedir [26].

2016 fındık raporuna göre Türkiye’de 2016 yılında fındık üretiminin yaklaşık 705 bin hektarlık alanda yapıldığı bilinmektedir. En çok üretimi yapılan yer ise Karadeniz Bölgesi’dir. Marmara, Doğu Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinde de üretim alanları mevcuttur. Dünya yetiştiriciliğinde ise toplam fındık üretiminin yaklaşık %70’i Türkiye’den elde edilmektedir. Türkiye’yi takiben, İtalya, ABD, İspanya gelmektedir. Çin, İran, Yunanistan, Fransa, Azarbeycan, Gürcistan, Rusya, Portekiz, Ukrayna ve Kıbrıs gibi ülkelerde de yetiştiriciliği yapılmaktadır [34].

2.2 Mikro RNA

MiRNA yaklaşık 18-25 nt uzunluğa sahip kısa RNA molekülleridir [35]. Genler arası bölgelerden, intronlardan veya nadir olarak da ekzon bölgelerinden kodlanırlar [36]. Post-transkripsiyonel aşamada gen düzenlenmesinden sorumlu olan miRNA’lar, mRNA ile ya mükemmel yakın ya da tam olmayan bir komplementerlik sağlayarak, mRNA’nın yıkımından ya da baskılanmasından sorumludur [7]. Bu özelliği ile canlının gelişim süreçleri, gelişmesi ve farklılaşması [37], [38], biyotik ve abiyotik stresler karşı cevap [11], [39] gibi birçok önemli aşamada rol oynamaktadır.

2.2.1 miRNA Kökeni ve Tarihi

miRNA’ların evrimsel kökenleri hakkında birkaç farklı hipotez öne sürülmüştür. Bunlardan ilki, duplikasyon hipotezi olarak da bilinen, translasyona uğrayan genlerin duplikasyona uğraması ve sonrasında inversiyon ile oluşmasıdır. Zamanla duplikasyon içerisindeki mutasyonlar birikir. Protein kodlayan bir genden oluşan bir miRNA, o genin transkribiyle yüksek oranda eşleşebilme özelliği gösterir [17], [40]. İkincisi, miRNA’nın daha önceden var olduğu ve bunların ard arda mutasyonlar geçirerek yeni miRNA’ların oluşmasına neden olduğudur. Üçüncü hipotez, birçok canlıda fazla miktarda bulunan ve hareketli elementler olarak bilinen transpozonların, miRNA genlerinin kökeninde olduğu düşünülmektedir. Özellikle, minyatür invert tekrarlı yer değiştirebilen elementler (MITEs) miRNA genlerini oluşturmak için, DCL proteinlerine substrat olabilme potansiyeline sahiptir. Son olarak, genç miRNA’ların, rastgele bir şekilde oluşan saç tokası yapılarından oluştuğu belirlenmiştir. Tüm bu evrim mekanizma tahminlerinin yanı sıra, zamanla biriken mutasyonlar nedeniyle, korunmuş miRNA’ların atasal kökenine ulaşmak çok da kolay olmamaktadır [17], [41].

İlk keşfedilen miRNA olan *lin-4*, 1993 yılında, Victor Ambros laboratuvarında, Lee ve arkadaşları tarafından, *C.elegans*’ta keşfedilmişti. Aynı yıl içerisinde, Gary Ruvkun

laboratuvarında, Wightman ve arkadaşları tarafından yine *C.elegans*'ta *lin-14* olarak bilinen bir gen üzerinde negatif bir düzenleme yaptığı ve canlının gelişimsel sürecinde rolü olduğu gösterilmiştir [8]. Bundan 7 yıl sonra, 2000 yılında, Reinhart ve arkadaşları [42], *C.elegans* üzerinde *let-7* olarak isimlendirilen yeni bir miRNA keşfetti. Bu keşif büyük yankı uyandırdı ve miRNA üzerine yapılan çalışmalar arttı. O zamanlardan itibaren bu küçük protein kodlamayan RNA yapılarına miRNA denildi. Yapılan en önemli çalışmalardan birisi de, Fire, Mello ve arkadaşları tarafından keşfedilen RNAi mekanizmasıdır [43].

2.2.1.1 RNA interferans

İlk olarak Fire ve Mello tarafından keşfedilen, RNA interference (RNAi), transkripsiyon sonrası gen ifadesinin düzenlenmesinde rolü olan ve dsRNA'lar ile gerçekleştirilen önemli bir mekanizmadır. Bitkilerde bu mekanizma, post-transkripsiyonel gen susturması (PTGS) olarak bilinir [43]. dsRNA'lar hücre içerisine girdiğinde, benzer dizilere yani homolog dizilere sahip olan mRNA'ların yıkımı veya baskılanmasına neden olur. Bu mekanizmada, birbirine çok benzeyen fakat aynı zamanda belirgin farkları da bulunan iki molekül, miRNA ve siRNA görev almaktadır. miRNA'yı siRNA'dan ayıran ilk fark, siRNA'nın genom bütünlüğünü korumasıdır. miRNA ise endojen genlerin düzenlenmesinden sorumludur. İkincisi, siRNA'nın öncül yapısı uzun dsRNA iken, miRNA'nın saç tokası şeklinde tek zincirli bir öncül yapısı mevcuttur. Üçüncü farklılık, stres adaptasyonu ve tranpozon ya da virüslere karşı koruma görevi olan siRNA'ların yanında miRNA'lar, hücre gelişimi ve farklılaşması, gelişim süreçleri, biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma gibi görevleri vardır. Her ikisinin de mRNA yıkımından sorumlu olmasının yanında siRNA, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu, miRNA ise aynı zamanda mRNA baskılanmasından sorumludur. Yine her ikisi de mRNA ile tam komplementerlik sağlar, ancak miRNA bitkilerde iyi bir şekilde komplementer olmayan durumlara sahiptir [43], [44].

2.2.1.2 Bitkilerde miRNA

Hayvanlarda RNAi'nin keşfedilmesinden uzun zaman önce, bitkilerde post-transkripsiyonel gen susturması keşfedilmiştir. Napoli ve arkadaşları [45], “chalcone synthase (CHS)” genine sahip petunya bitkisinde, bu genin yüksek ifadesini amaçlarken, gen susturması ile karşılaşmışlardır. Petunyaların daha mor renkli olması beklenirken, alacalı bir renk gözlemlenmiştir. Ortaya çıkan bu beklenmedik durumun,

CHS geni içersindeki dsRNA bölgesinin hatalı olmasıyla ilgili olduğunu rapor etmişlerdir [46].

Bitkilerde ilk miRNA'lar 2002 yılında, Park ve arkadaşları tarafından tanımlanmaya başlanmıştır [9] ve bu tarihten sonra derin araştırmalar ve genetik çalışmalar neticesinde binlerce miRNA tanımlanmıştır. Kozomara ve Griffiths-Jones [47], miRBase veritabanının güncel halini ele almışlardır. 206 türe ait 24.521 miRNA lokusu ve 34.424 olgun miRNA ürünü rapor etmişlerdir. 2002'de miRBase'in ilk kullanılmaya başlandığı zamanlarda sadece 5 canlı türüne ait miRNA lokusu bulunmuştur. Fakat buna rağmen o zamandan sonra miRNA'ya olan ilgi ile birçok bitki ve hayvan genomlarında hızlı bir şekilde yeni veya korunmuş miRNA'lar keşfedilmiştir. Böylece sayılarda fazla miktarda artış gerçekleşmiştir [47].

miRNA mekanizmasının evrimine bakıldığı zaman, bitki ve hayvanlar için ayrı mekanizmalar ortaya çıkmaktadır. Çoğu açıdan benzer olmalarına rağmen önemli sayılabilecek farkları bulunmaktadır. Bu farklardan ilki, miRNA'lar hayvanlarda daha çok intron ve ekzonlar içerisinden oluşurken, bitkilerde genel olarak intergenik bölgelerden yani protein kodlamayan bölgelerden meydana gelmektedir [17], [48]. İkincisi, hayvan miRNA'ları genel olarak kümelenmiş biçimde bulunurlar ve birlikte transkripsiyona uğrarlar. Böylece polisistronik yapı kazanabilirler. Bitkilerde ise buna zıt olarak, monosistronik bir yapı da oluşurlar yani nadiren birbirine bağlı olarak ifade edilirler [41]. Diğer bir fark, hayvanlarda "kök bölgesi" denilen 6-8 bazlık bir bağlanma bölgesiyle miRNA'lar tam olmayan bir eşleşme sergiler ve miRNA ile hedef arasında zayıf eşleşme oluşur. Kök bölgesi Şekil 2.2'de kırmızı çizgi ile gösterilmiştir. Bu da genel olarak translasyonun baskılanmasıyla sonlanır. Bitkilerde ise, mRNA'da sadece bir tane bulunan miRNA eşleşme bölgesini hedefleyerek tama yakın ya da tam eşleşme gerçekleşir. Bu süreç sonunda da mRNA'nın yıkımı gerçekleşir ya da nadiren baskılanır [17]. Son fark, miRNA biyogeneğinde, hayvanlarda pri-miRNA kesim işleminin Drosha enzimiyle yapılması ve stoplazmaya exportin-5 denilen protein aracılığıyla aktarılmasıdır. Aynı zamanda pre-miRNA kesiminin stoplazmada gerçekleşiyor olmasıdır. Bu durum bitkilerde, Drosha yerine DCL1 enzimi kullanılması ve stoplazmaya importin-β proteini ile aktarılmasıyla farklıdır. Olgun miRNA oluşumu için kesim işlemi çekirdekte gerçekleşmektedir [48].

2.2.1.3 Korunmuş miRNA'lar

Genel olarak gelişimsel düzenlemede rolü olan korunmuş miRNA'lar, daha çeşitli rollere sahip olan korunmamış miRNA'lardan daha fazla ifade edilmektedir [49]. Bütün miRNA'lar saç tokası yapısında ve birçoğu evrimsel olarak korunmuştur. Bu nedenle farklı bitki türlerinde yeni miRNA'ların ortolog veya homologlarının varlığıyla tanımlanmaları kolaylaşmaktadır [50]. Ancak, bitkiler, hayvan miRNA'ları gibi 70-80 nükleotid gibi kısa bir öncül yapıya sahip değildir. Bitkilerde bu sayı 60 ile 500 arasında değişmektedir. Yani hayvanlarla kıyaslandığında, çok daha çeşitli yapı ve büyüklüğe sahiptir [51]. Bu durum ise hesapsal yaklaşımlarda onların tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. Zhang ve arkadaşları [18], çalışmalarında, yeni miRNA ortologlarını tanımlamak için EST depolarını araştırarak geniş bir strateji geliştirmişlerdir. Çoğu miRNA'nın açık tohumlu, kapalı tohumlu ve yosunlar gibi türlerde korunduğunu rapor etmişlerdir. 6 milyondan fazla EST sekansından, 71 farklı bitki türünde, 37 miRNA ailesine ait 481 miRNA tanımlamışlardır. Örneğin; 22 farklı bitki türünde miR-170/171'in ortologları olduğunu belirtmişlerdir. miR-171'e ek olarak, miR-159, miR-160 ve miR-396'nın da içinde bulunduğu yüksek derecede korunmuş miRNA bulmuşlardır. Willman ve Poethig [49], Arabidopsis ve mısırdaki miRNA süreçlerini karşılaştırarak, monokotil ve dikotil arasında benzerlik olduğunu ve yüksek derecede korunduğunu göstermişlerdir. Zhang ve arkadaşlarının çalışmalarına paralel olarak, sonuçta, gymnosperm, monokotil ve dikotilleri de içine alan bitki türlerinde bazı miRNA'ların korunduğu rapor edilmiştir. Dikotillerde, monokotillerdeki miRNA'ların ortologlarının bulunması, miRNA'ların 250 milyon yıldan daha önce var olabileceğini göstermektedir. Sadece miRNA genleri değil, hedef genleri de korunmuş durumdadır. Farklı türlerinde, hedefler arasında birkaç nükleotitlik değişiklik olmasına rağmen, komplementer bölgelerin sekansları yüksek miktarda korunmuştur. Floyd ve Bowman [52] çalışmalarında, miR-166'nın hedefi olan HD-ZIP genlerinin korunduğunu rapor etmiştir.

miR159: Giberellin hormonuyla ilişkili protein olan GAMYB genlerini hedefleyerek, geç çiçeklenmeye yol açmaktadır. Anter gelişimi, tuz ve kuraklık stresine cevaplarda etkilidir [53], [54]. Arabidopsis'te korunduğu bilinmekle birlikte pirinç, mısır ve buğdayda da tanımlanmıştır [11], [12], [55].

miR160: miR160'ın oksin cevap faktörü olan ARF genlerini etkileyerek, oksin sinyaline cevapta rolü olduğu rapor edilmiştir [56]. Aynı zamanda, yaprak ve kök gelişimi ile

çiçek organ belirlenmesinde de etkisi olduğu bilinmektedir. Pirinç, Arabidopsis, buğday ve mısırdaki korunmuştur [11], [12], [55].

miR171: Yapılan çalışmalarda çiçeklerde yüksek ifade edilmesi, çiçek gelişiminde rolü olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Kök gelişimi ve tuz stresine cevapta görev aldığı bilinmektedir [54], [57]. Buğdayda da belirlenmesinin yanında, pirinç, Arabidopsis ve mısırdaki korunmuş olarak bulunmaktadır.

miR396: hücre proliferasyonunda rolü olan, büyüme düzenleyici faktör GRF'leri hedef alır. Tuz, kuraklık ve alkali streslerine cevap oluşturmada da etkisi olduğu bilinmektedir [58]. Pamuk, mısır ve buğdayda bu miRNA'ya dair çalışmalar mevcuttur [11], [12], [13].

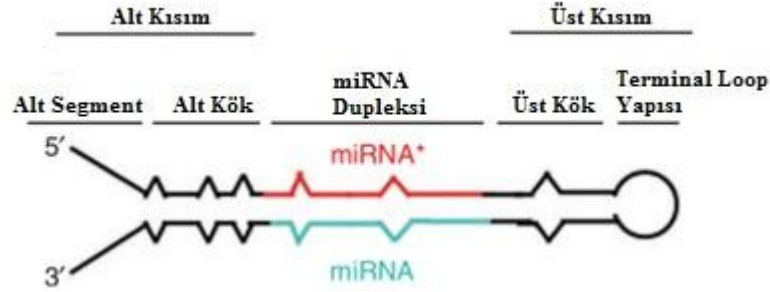
miR2919: Bu miRNA ile ilgili çok fazla çalışma olmamasının yanında, Boke ve arkadaşları [59], haşhaş bitkisinin kapsülünde miR-2919'un fazla ifade edildiğini, yaprakta ise daha az ifade edildiğini rapor etmişlerdir. Zigot ve endosperm gelişiminde rolü olan MEE 14 (Maternal effect embryo arrest 14) genini hedeflediğine dair çalışmalarda mevcuttur [14].

miR8123: Yapısal bir protein olan 40S ribosomal protein benzeri genleri hedefler. Dın ve arkadaşları [60] miR8123'ün patatesin yeraltı filizlerinde ekspre edildiğini göstermişlerdir. Baloch ve arkadaşları [61], bu miRNA'nın yapısal bir protein olan S-locus F-box protein 54'ü hedef aldığından bahsetmişlerdir. miR8123'ün görevi ile alakalı çok fazla çalışma mevcut değildir.

2.2.2 miRNA Genomik Yapısı ve Bitkilerdeki Biyogenezi

Kendi genlerinden yani MIR genlerinden oluştuğu sanılan, miRNA'lar genomda birkaç farklı yerden oluşabilmektedir. Genler arası bölgelerden, gen üzerinde ekzonik ya da intronik bölgelerden meydana gelebilir. İntron veya ekzon bölgelerinden oluşan çoğu hayvan miRNA'larından farklı olarak bitki miRNA'ları genellikle genler arası bölgelerden meydana gelmektedir [41]. Meydana geliş biçimine göre de monosistronik, disistronik veya polisistronik olabilirler. Hayvan MIR gen genlerinde kümelenmiş yani disistronik veya polisistronik bir şekilde birlikte transkribe olma durumu sık görülürken, bitki MIR genlerinde birbirine bağlı olarak transkribe olma durumu nadir görülmektedir [41].

Başta heterojen uzunlukta ve tek zincirden oluşan bitki miRNA'larının öncül yapıları, standart transkriptlerden farklı olarak, tam olmayan baz eşleşmesine sahip olmasından dolayı kendi üzerine katlanarak sap-ilmik halini almıştır [17]. Bu yapı hayvan miRNA öncüllerine kıyasla bitkilerde daha uzundur [62].



Şekil 2.2 miRNA'nın genomik yapısı. [82]

miRNA biyogenezi 4 ana süreçten geçer. İlk basamak, MIR genlerinden *primer miRNA* (*pri-miRNA*)'nın oluşumudur. İkinci basamak, *pri-miRNA*'nın çekirdek içerisinde *precursor miRNA* (*pre-miRNA*)'ya dönüşmesidir. Üçüncü basamakta *pre-miRNA* çekirdekten çıkarak stoplazmaya geçer ve olgun miRNA halini alır. Sürecin son basamağı, *olgun miRNA* belirli proteinlerle etkileşime girerek mRNA yıkımını ve nadiren de baskılanmasını gerçekleştirir (Şekil 2.3) [63].

İlk olarak, genomik DNA ya da intergenik bölgelerden, yaklaşık 100 nt uzunluğundaki *pri-miRNA*'lar, RNA pol II enzimleri tarafından sentezlenir [64]. *Pri-miRNA*, tam olmayan bir komplementerlik göstererek kendi üzerine doğru katlanır ve hair-pin şeklinde olan ikincil yapısını oluşturur. Normal miRNA gibi, *pri-miRNA* da 5' ucunda 7-metilguanozin ve 3' ucunda poly A kuyruğuna sahiptir [65]. Daha sonra *pri-miRNA* *pre-miRNA* halini alır. Bu süreçte, RNaz aktivitesi olan *dicerlike-1* (*DCL1*), asıl görevi üstlenmektedir. *DCL1* ile polyA ve metilguanozin uçlarının kesimi gerçekleşmektedir. *Pre-miRNA* bu fazlalıkların kesilmesiyle oluşan yapıdır. Ancak, *pre-miRNA* oluşumunda sadece bu protein rol almaz. Aynı zamanda, nuklear cap bağlanma kompleksi *CBC*, RNA bağlanma sürecinde görevi olan bir C2H2 çinko parmak proteini *serrate* (*SE*), *Hyponastic leaves 1* (*HYL1*) ve *Dawdle* (*ddl*) proteinlerinden oluşan kompleks işlev görür (Şekil 2.3) [66].

Olgun miRNA oluşumunun en önemli elemanlarından biri olan, *DCL* (*Dicer-Like Proteins*): dsDNA'ya özgü endonükleazların RNaz III ailesine ait bir proteindir. Yaklaşık 200kDa moleküler ağırlığına sahip ve multidomandır [67]. miRNA

biyogenenezinde, tanımlanan 4 DCL'den sadece *DCL1* görev almaktadır. *DCL4*, *DCL3* ve *DCL2* genel olarak siRNA süreçlerinde rol oynamaktadır [65].

HYL1 (*Hyponastic Leaves 1*): *DCL1*'in miRNA sürecinde katalitik bir aktivitesi varken, *hyl1* ve diğerleri doğru seçim ve etkili bir süreç olması için gereklidir. Han ve arkadaşları [68], Arabidopsis'te, *hyl1* mutanları olan bitkilerde, miR-159, miR-167 ve miR-171 in baskılandığını göstermişlerdir.

SE (*Serrate*): pri-miRNA ve pre-miRNA oluşumunda süreci etkileyen regülatör bir proteindir. Lobbes ve arkadaşları [69], *SE*'nin, *DCL1* ve *hyl1* ile protein-protein etkileşiminde yer aldığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda bazı miRNA'ları (miR163, miR164, miR168, miR171 and miR-JAW), *SE*'nin miRNA oluşumundaki rolünü incelemek için kullanmışlar ve sonuç olarak miRNA'lar için gerekli olduğunu rapor etmişlerdir. Pri-miRNA'ların seviyesi artarken, olgun miRNA'lar azalmış. *Se-1* mutantlarında yıkıma uğramış genlerin miktarında da azalma gözlenmiştir. Bu da *SE* proteinin işlev kaybında miRNA oluşumun engellendiğini ortaya koymaktadır.

Ddl (*Dawdle*): Çekirdekte lokalize olmuş bir RNA bağlama proteindir [65]. Morris ve arkadaşları [70], Arabidopsis'te, *ddl1* mutantlarının gelişimsel olaylarda gecikmeye yol açtığını, kök, gövde, çiçek ve tohumlarda anomalliklerin ortaya çıktığını belirtmiştir.

CBC (*Nuclear Cap Binding Protein*): Ökaryotik olarak korunmuş heterodimerik bir komplekstir. mRNA splicing ile meydana gelen mRNA'ların 5'm⁷G yapısına bağlanan, *CBP20* (*nuclear cap binding protein subunit 2*) ve *CBP80* (*nuclear cap binding protein subunit 1*) içerir [71]. Kim ve arkadaşları [72], Arabidopsis'te, *CBC*'nin inaktivasyonu pri-miRNA seviyelerinin arttığını ancak olgun miRNA'ların da azaldığını rapor etmişlerdir.

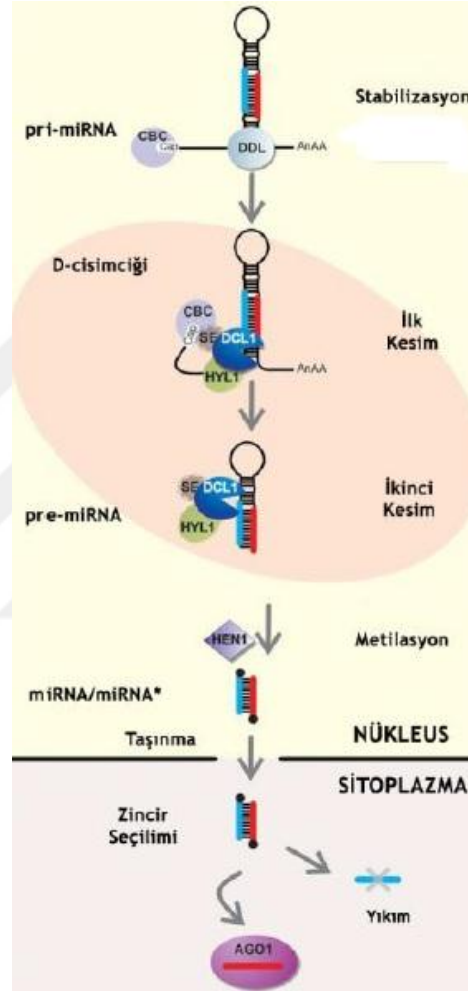
HEN1 (*HUA-enhancer 1*): İlk olarak, Arabidopsis'te çiçek kimliği belirlenmesi ve bitki gelişiminde rolü olduğu rapor edilen *HEN1*, daha sonra yapılan çalışmalarda miRNA-miRNA duplekslerini tanıyan önemli bir metiltransferaz olarak keşfedilmiştir [73]. Olgun miRNA'ların 3' ucunun metilasyonuna yol açarak erken yıkımdan korumaktadır [74]. Beklenmedik 3' uridilasyon, ekzonükleazları harekete geçirerek 3'-5' degregasyonuna yol açar. Metilasyon bu istenilmeyen olayı engellemektedir [75]. Aynı zamanda, *AGO* proteinleri ile bağlama afinitesini artırarak *RISC* kompleksi oluşumunda da fonksiyonel bir rolü olabileceği belirtilmiştir [65].

HASTY (HST) : Metillenmiş miRNA dupleksleri, *HST* aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınmaktadır. Memelilerde bu işi yapan *Exportin-5* proteini, *HST*'nin ortologudur ve *Exp-5* ile yapılan çalışmalar çok daha fazladır. Arabidopsis'te delesyona uğratarak oluşturulan *hst-3* mutantında, miRNA seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir [76], [77].

AGO (Argonute) Proteini: Sitoplazmaya geçtikten sonra ayrılan miRNA dupleksinin bir zinciri, çoklu protein içeren *RISC* kompleksinin bir elemanı olan *AGO* ile etkileşime geçer (Şekil 2.3) [78]. *AGO* yıkım aktivitesi ile bilinen bir proteindir ve aynı zamanda antiviral cevaplarda önemli rolü olduğu da belirtilmiştir [79]. Yapılan çalışmalarda, heat shock protein *HSP70* ve *HSP90*'ın, *AGO*'nun morfolojik değişikliklerini kolaylaştırmak için miRNA sürecinde bulunduğu gösterilmiştir [80].

Bitkilerde pri-miRNA boyları ve duplex pozisyonları farklı olabilmektedir. *DCL1*'in aktivitesi açısından pri-miRNA duplekslerinde alt kolun yaklaşık 15 nükleotitik bölümünün kısmen eşleşme göstermesi süreç için etkili bir başlangıçtır. Bu yüzden de pri-miRNA'nın yapısı oldukça önem taşımaktadır [81]. Zhu ve arkadaşları [82], bazı pri-miRNA'ların yapısal çeşitliliğinden dolayı çoklu dal oluşturduğunu ve *DCL1*'in bu pri-miRNA'ları iki yandan da işlediğini belirtmişlerdir. *HYL1*, dsRNA'ya bağlanır ve miRNA biyogenezinde aktive olması için iki bağlanma bölgesi yeterlidir [68]. *SE*, N-terminal aracılığı ile tek zincirli RNA'ya bağlanan bir proteindir. *DCL1*'in aktivasyonu için gerekli olan *DCL1* ile etkileşim, *SE*'nin çinko parmak domaini ile gerçekleşmektedir. Böylece *SE*, pre-miRNA'yı *DCL1*'in katalitik bölgesine de ulaştırabilmektedir [83]. Pri-miRNA'nın kesiminden sonra pre-miRNA oluşumu ve pre-miRNA'nın stemloop yapısının da kesilmesiyle duplex miRNA oluşumu, D-body (dicing body) denilen bölgede gerçekleşmektedir. İşlem boyunca, *ddl* denilen bir RNA bağlayıcı protein ile pri-miRNA'nın ikincil yapısı korunur. miRNA-miRNA dupleksinin 3' kısmının, metiltransferaz domainine sahip olan, *hen1* tarafından metillenmesi gerçekleşir [63], [74]. Metil takılması, bu küçük RNA'ları, degrade edici nükleazlardan korur [75]. Bu işlemten sonra ise hayvanlardaki *exportin-5* proteinine benzer bir protein olan *HASTY* ile olgun miRNA, çekirdekten stoplazmaya taşınır. *HASTY* proteini, *importin-β* ailesinden ve nükleostoplazmik bir taşıyıcı proteindir [76]. Bu duplekslerden sadece bir tanesi *RISC* kompleksine dahil olmaktadır. Sitoplazmaya geçiş gerçekleştikten sonra mRNA baskılanması veya yıkımının gerçekleşmesi sitoplazmada gerçekleşir. miRNalar, hedef mRNA'yı bu anlamda işleme işini asıl olarak *AGO*

proteini ile gerçekleştirir. Bir RNaz olan argonute, *RISC* (*RNA-induced silencing complex*) kompleksinin içinde yer alır ve bu iki iplikten uygun olanının seçiminde etkilidir. Seçtiği iplik guide strand olarak adlandırılır. Diğerisi ise, *RISC* için substrat olarak parçalanmaktadır. Hedef mRNA yıkımı veya baskılanması, miRNA'nın *RISC* kompleksine entegre olması ve *AGO1* aracılığıyla mRNA ile baz eşleşmesinin olmasıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.3) [84], [85].



Şekil 2.3 MiRNA biyogenezi.[17]

2.2.3 miRNA Fonksiyonları

MiRNA'ların fonksiyonları hakkında bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda miRNA'ların; hücre apoptosisi, sağ kalımı, hücre proliferasyonu, hücre gelişimi ve farklılaşması gibi olaylarda görev aldığı gösterilmiştir. Bitkiler açısından bakılacak olunursa, meristem hücre kimliği, yaprak veya organ morfogenezi [37], [56], çiçek farklılaşması ve gelişimi [86], oksin sinyali [87] ve stres yanıtları [11], [88] gibi olaylarda rolü olduğu gösterilmiştir. Kısaca birçok gelişim dönemlerinde,

çiçeklenme zamanlarında, faz değişim aşamalarında, biyotik ve abiyotik streslere karşı cevap oluşturmada görevi olduğu söylenebilir.

Lee ve arkadaşları [8], miRNA'lar ile ilgili ilk çalışmalarıyla miRNA dünyasına çok önemli bir giriş yapmışlardır. *C.elegans*'ta ilk miRNA olan *lin-4*'ün keşfinden sonra aynı yıl içerisinde, *lin-14* denilen geni hedefleyerek canlının gelişim evresinde rolü olduğunu rapor etmişlerdir. Ardından yedi yıl sonra 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları [42], *let-7* denilen ikinci bir miRNA keşfetmiş ve canlının larva döneminde gelişimde düzenleyici bir rolü olduğunu rapor etmişlerdir.

Palatnik ve arkadaşları [37], aslanağzı bitkisinde hücre bölünmesinde de rolü olan TCP transkripsiyon faktörlerinin bir üyesi, *CINCINNATA (CIN)* genlerinin miRNA, ile baskılanarak yaprak morfolojisinde değişime sebep olduğunu göstermişlerdir. *CIN* geni eksikliğinde yapraklarda buruşukluk gözlenmekte ve *CIN* mutantlarıyla bu açık bir şekilde görülmektedir. miR-Jaw olarak bulunan yeni bir mi-RNA ile *CIN* geninin baskılanmasıyla da aynı fenotipik sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışma miRNA'ların yaprak morfolojisindeki rolünü kanıtlamaktadır.

Nikovics ve arkadaşları [89], CUC2 geninin miR-164 ile kontrol edildiğini ortaya koymuşlardır. NAM/CUC3 ailesinin bitkiye özgün transkripsiyon faktörlerinden olan, *CUP-SHAPED COTYLEDONS2 (CUC2)* geninin bazıları organ sınırlarının belirlenmesinde görev alır. Yaprığın tırtıklı kısımlarının iç tarafında CUC2 ifade edilir. Dolayısıyla CUC2'nin işlev kaybına uğramasıyla yaprak kenarları düz ya da az tırtıklı olur. miR-164 fonksiyonunun kaybında ise CUC2 genini baskılayan bir miRNA olmadığından dolayı ifadesi artar ve buna bağlı olarak yaprak tırtık oranı da artış gösterir. MIR164 genlerinin mutasyonu da yine CUC2 aktivitesinin devam ettiği görülmüştür.

Poethig [90], miR156 ve miR172 arasındaki ilişki konusunda benzer çalışmalar yapmıştır. miR-156'nın Arabidopsis'te *SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE)* genlerini hedefleyerek, genç fazi uzattığını rapor etmiştir. *SPL*, bitkinin geçiş evrelerinde rol alan bir proteindir. Yabani bitkilerde, bitki yaşlandıkça miR-156 seviyesi azalır ve *SPL* ifadesi gerçekleşir. Böylece bitki genç fazdan olgun faza geçiş yapar. Çalışmanın sonucunda, miR156'nın aşırı ifadesi bitkiyi uzun süre genç fazda tutuyor, miR-156'ya dirençli olanlarda olgun faza geçiş erken gerçekleşiyor. Aynı zamanda miR-156'yı işlev kaybına uğrattıklarında çok daha kısa bir genç faz

gözleniyor. Tüm bunlar da miR-156'nın çiçeklenme zamanı ve vejetatif faz değişim aşamalarındaki rolünü kanıtlamaktadır.

Aukerman ve Sakai [86], çalışmalarında miR-172'nin *APETELA 2 (AP2)* transkripsiyon faktörlerini hedef alarak, Arabidopsis'te erken çiçeklenmeye sebep olduğunu göstermişlerdir. miR172 seviyesi arttığında AP2 benzeri proteinlerin seviyesinde azalma oluyor ve belli bir zaman sonra çiçeklenme gerçekleşiyor. Mısırdaki, yüksek ifade edildiğinde faz değişimini erteleyen *glossy15* geni gibi, AP2 benzeri transkripsiyon faktörlerinin Arabidopsis'te miR-172 tarafından hedeflendiği gözlemlenmiştir [38], [86]. Poetig ve arkadaşları [91] ise miR-156 ve miR-172'nin birbirlerine zıt bir şekilde çalıştığını ortaya koymuşlardır. miR-156 azaldığında SPL ifadesi artar, SPL'nin artması miR-172'nin aktivasyonu ile sonuçlanır. miR-172'nin ekspresyonu ile AP2 benzeri proteinler azalır ve erken çiçeklenme gerçekleşir.

Mallory ve Bartel [87], oksin cevap faktörlerinden olan *ARF10*, *ARF16* ve *ARF17*'nin miR160 tarafından hedeflendiğini rapor etmişlerdir. miR-160'a dirençli *ARF17* bitkileri oluşturup, aralarındaki ilişkiyi daha iyi bir şekilde açıklamışlardır. miR-160'a dirençli bitkilerde *ARF* aşırı ekspresyon edilmiş ve dolayısıyla gelişim bozuklukları görülmüştür. Aynı zamanda miR-167'nin de, *ARF6* ve *ARF8* genlerini hedeflediğini tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışma Wang ve arkadaşları [56] tarafından yapılmış ve miR-160'ın kök şapkası gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir.

Chiou ve arkadaşları [92] fosfat açlığı olan Arabidopsis bitkisinde, miR-399 seviyesinde bir artış gözlemlenmiştir. miR-399 ubiquitin-conjugate enzimi olan *E2* yi hedefleyerek fosfat alınımlarını gerçekleştirmektedir. Bu çalışmayla da, miRNA'ların Pi homeostasisini kontrol etmede ve dolayısıyla bitki stresine karşı cevaptaki rolü olduğunu görebiliyoruz.

Achard ve arkadaşları [53], Arabidopsis'te yaptıkları bir çalışmada, miR-159'un çiçeklenmeyi geciktirdiğini belirtmişlerdir. *GAMBY*-ilişkili proteinlerin transkriptlerini hedefleyerek, giberelline cevap oluşturmada etkisi olduğu görülmüştür. Aynı zamanda, anter gelişimini etkilediğini de göstermişlerdir.

Kutter ve arkadaşları [93], miR-824'ün stoma yoğunluk ve gelişiminde rol aldığını göstermişlerdir. Hedefi ise *AGL16*'dır. Fonksiyonunu daha iyi belirleyebilmek için, miR-824'e dirençli bitkiler oluşturmuşlar. Bunun sonucunda *AGL16* mRNA'larının yıkımı engellenerek stomaların görülme sıklığında artma gözlenmiştir. Buna zıt olarak,

yabanıl tiplerde miR-824 seviyesinin artmasıyla hedef transkript ifadesi azalmış ve buna paralel olarak stomaların oranında da azalma meydana gelmiştir.

Tuz stresine cevapta da miRNA'lar ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Başta yine *Arabidopsis* olmak üzere pirinç ve mısırdaki da çalışma bulunmaktadır. *Arabidopsis*'te tuz stresine cevapta, miR-156, miR-158, miR-159, miR-165, miR-167, miR-168, miR-169, miR-171, miR-319, miR-393, miR-394, miR-396 ve miR-397'nin ifadelerinin yüksek olması, strese karşı cevapta rolleri olduğunu göstermiştir [54]. Tuz stresine maruz kalmış mısır bitkisinde de, bitki gelişim ve organ oluşumundan sorumlu olan transkripsiyon faktörlerini hedef alan bazı miRNA'ların tuz stresine cevapta rolü olduğu gösterilmiştir. Bu transkripsiyon faktörleri ve bunları hedef alan miRNA'ların bazıları şunlardır; Myb-zma-miR159a/b, NAC1-zma-miR164a/b/c/d ve hemodomain-leucine zipper protein (HD-ZIP)-zma-miR1991/m. Bu sonuçlar *Arabidopsis* ve pirinçte de görülmüştür [11].

Tuz stresinin yanında, kuraklık stresine karşı cevapta da miRNA'ların rol aldığı yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Kuraklık stresi mevcut olduğu durumda, *Arabidopsis*'te, ABA sinyal mekanizmasından sorumlu genleri (*MYB101* ve *MYB33*) baskılayan miR-159'un yüksek miktarda ifade edildiği rapor edilmiştir [94].

Arabidopsis'te her iki strese de cevapta işlev gören miR-159, miR-167, miR-168, miR-169, miR-393 ve miR-396 gibi miRNA'lar da mevcuttur. Fakat, farklı streste farklı anlatım yapmaları daha olası bir durumdur. Örneğin; kuraklık stresinde ifade edilen bazı miRNA'lar, tuz stresinde daha az ifade edilmektedir. Kuraklık stresi altında, oksin sinyallenmesinde pozitif düzenleyici rolü olan *TIR1*'i hedefleyen miR-393, tuz stresine maruz kaldığında *F-box (bHLH) transkripsiyon faktörlerini* hedeflemiştir. Mısırdaki kuraklık stresinde miR-167, kuraklık stresine karşı dirençte düzenleyici etkisi olan *PLD*'yi (phospholipase D) hedef alırken, tuz stresinde ise ARF genlerini hedef almaktadır. Pirinçte ise miR-393 ve miR396, her iki stres ile karşı karşıya geldiğinde ifadesi artar ve *tir1* genlerini hedeflemektedir [88].

Gao ve arkadaşları [58], pirinçte yaptıkları bir çalışmada, miR-396'nın tuz ve alkali stresine cevapta negatif bir düzenleyici olduğunu rapor etmişlerdir. Tuz ve alkali stresine cevapta rolü olan transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek, strese karşı toleransın azaldığını göstermişlerdir.

2.2.4 miRNA'ların belirlenmesi

MiRNA'ların tespit edilmesi ve hedeflerinin belirlenmesi için kullanılan birkaç yöntem bulunmaktadır. Direkt klonlama, qRT-PCR, derinlemesine dizileme ve hibridizasyon bu yöntemler arasındadır [63]. Direkt klonlamada belli aşamalardan oluşan cDNA kütüphanesinin kurulması esastır. Total RNA izolasyonunun ardından küçük RNA'lar jelde ayrıldıktan sonra 3' ve 5' uçlarına adaptörler eklenir. Reverz transkripsiyon ile cDNA'ya dönüştürülür ve cDNA'lar klonlanır. Son olarak dizileme yapılır [95]. qRT-PCR, yüksek hassasiyetli, güvenilir ve pratik olmasından dolayı en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan florasan bir boya kullanılarak eş zamanlı bir çoğaltım prensibine dayanır. Çoğalma gerçekleştikçe boya DNA zincirleri arasına girer ve ışıma oluşturur. Dolayısıyla ışıma miktarı arttıkça çoğalmada artar. Fakat boya asıl istenen moleküle değil aynı zamanda non-spesifik ürünler oluştuysa onlara da bağlanabilmektedir. Bu durumu engellemek için erime eğrisi oluşturulur. Örneklerin erime sıcaklığına göre erime grafiğinde tek pig varsa kontaminasyon yok demektir [96], [97]. Bir diğer yöntem olan derinlemesine dizileme, RNAseq olarak da adlandırılmaktadır. Daha önceki çalışmalarda yıllar süren genom analizi çalışmaları bu yöntem ile birkaç güne indirgenebilir. DNA fragmentleri zarar görmeden defalarca okunabilir [97]. Son olarak, hibridizasyon yöntemi, northern blot, in situ hibridizasyon ve mikroarray tekniklerini kapsamaktadır. RNA örnekleri poliakrilamid jelde büyüklüklerine göre ayrılır. İkinci olarak RNA'lar naylon membrana transfer edilir ve son olarak RNA sekanslarına komplementer olan radyoaktif bir prop ile RNA'lar hibridize olur. İlgili miRNA'nın ifade seviyesini tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Fakat fazla miktarda örnek gerektirmesiyle ve zaman alıcı olmasıyla dezavantajlara sahiptir [98]. In situ hibridizasyon, lokalizasyon ve seviye belirlemek için, birkaç adımda yapılan klasik hibridizasyonlara kıyasla sentetik RNA problemleriyle miRNA'lar direk hibridize olabilir. Son zamanlarda locked nucleic acid (LNA) problemleri kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle olgun miRNA'lar ile yüksek bağlanma eğilimleri vardır [63]. Son hibridizasyon yöntemi microarray, cam gibi katı yüzeyler ya da naylon membranlar kullanılarak yapılır. Problemler gen veya bölgeye özel olarak dizayn edilir. Genomik boyutta gen ifade profillemesi [99], DNA polimorfizmi belirlenmesi [100], epigenetik çalışmalar [101] ve miRNA ifade profilinin çıkarılması [102] gibi birçok çalışmada kullanılmaktadır. Son zamanlarda hızlı sonuçlar elde etmeyi sağlayan biyoinformatik yöntemler de sık kullanılmaktadır. Daha önceden tespit edilmiş bir miRNA'nın başka bir canlıda olup olmadığını belirleyebilmek için miRNA genlerinin

ya da hedeflerinin homologlarının aranması gereklidir. Homolog arama çalışmalarında biyoinformatik yöntemler kullanılmaktadır [97]. Biyoinformatik yöntemlerle yapılan bir çalışmada *Brachypodium distachyon* bitkisinde 19 miRNA ailesine ait 26 miRNA tespit edilmiştir [35].



BÖLÜM 3

METARYAL METOD

3.1 Bitki Metaryali

Çalışmada kullanılan fındık dokuları Giresun Fındık Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır. *Corylus avellana* L. ve *Corylus colurna* L. olmak üzere iki fındık türünün 3'er bitki örneğinden, yaprak, püskül, tomurcuk ve karanfil dokuları kullanılmıştır. *Corylus avellana* tomurcuk dokusu (TT), *Corylus avellana* püskül dokusu (TP), *Corylus avellana* karanfil dokusu (TK), *Corylus avellana* yaprak dokusu (TY), *Corylus colurna* tomurcuk dokusu (CT), *Corylus colurna* püskül dokusu (CP), *Corylus colurna* karanfil dokusu (CK) ve *Corylus colurna* yaprak dokusu (CY) olarak adlandırılmıştır.

3.2 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu "Exiqon miRCURY™ RNA Isolation Kit" protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Her bir doku örneği 50 mg olacak şekilde tartılır ve dondurulmuş havan içerisine konulur. Sıvı azot ile muamele edilerek, iyi bir şekilde parçalanıp toz haline getirildikten sonra mikrosantrifuj tüplerine aktarılır. Bu işlemleri buz üzerinde yapmaya özen gösterilmelidir. Tüplere alınan örneklerin üzerine 600 µl lizis solusyonu eklenir. Ardından 2 dk 14.000 xg'de sentrifuj edildikten sonra pellet atılır ve supernatant başka bir RNaz'sız tüpe aktarılır. Aktarma işlemi sırasında pipet ile ölçümleri yapılarak not edilir. Not edilen ölçümlerle eşit miktarda olacak şekilde, %70'lik etanol, örneklerin üzerine ilave edilir. Ardından kitte bulunan toplama tüplerinin içerisine kolonlar yerleştirilir. Etanol eklenmiş olan her bir örnekten 600 µl alınıp, kolonlara aktarılır. 1 dk 3500 xg'de sentrifuj edilir ve kolondan geçen sıvı atılır. Tüm lizat toplama tüpüne geçmediyse, 1dk 14.000 xg'de tekrar sentrifuj yapılır. Kolon

filtresinden geçemeyip kolonda kalan maddeler çalışmada kullanacağımız RNA'lar veya miRNA'lardır. Bu işlemden sonra örneklerin üzerine 400 µl yıkama solusyonu eklenir ve 1 dk 14.000 xg'de döndürülür. Bu işlem 400 µl eklenerek iki kez daha yapılır. Son yıkama işleminde yine 400 µl yıkama solusyonu eklenerek, bu sefer 2dk 14.000 xg'de sentrifüj edilir. Her defasında kolondan geçenler uzaklaştırılır. Yıkama işleminin hemen ardından, kolonlar elusyon tüplerine yerleştirilir ve üzerine 50 µl elüsyon tamponu ilave edilir. 2 dk 200 xg ardından 1 dk 14.000 xg sentrifüj edilerek işlem tamamlanır. İzolasyon sonucunda elde edilen RNA konsantrasyonları Nanodrop spektrofotometre cihazı ile ölçülerek varlığı ve kalitesi kontrol edilmiştir.

3.3 Revers Transkripsiyon PCR (RT PCR)

cDNA sentezi, “Exiqon miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Kit” protokolüne uygun olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile ölçülen RNA örnekleri, konsantrasyon 5 ng/µl olacak şekilde ayarlanır. Kite verilen miktarlara göre her bir örnek için reaktifler eklenir.

Reaktifler eklenirken işlemlerin buz üzerinde yapılmasına ve reaktiflerin işleme sokulmadan önce nazıkçe vortekslenmesine dikkat edilmesi gerekir. 5x reaksiyon tamponundan 2 µl, nükleazsız sudan 5 µl ve 1 µl enzim karışımı eldeki örnek sayısına göre hazırlanmış her bir tüpe dikkatli bir şekilde eklenir. Son olarak 2'şer µl RNA örnekleri eklenerek total hacim 10 µl'ye tamamlanır (Çizelge 3.1). Bu aşamadan sonra, cDNA sentezinin son adımı olan inkübasyon işlemi gelir. Her bir örnek önce, 42 °C'de 60 dakika, ardından 95°C'de 5 dakika ısı işleminden geçer. Oluşan cDNA ürünleri 4°C'de depolanabilir.

Çizelge 3.1 Ters Transkripsiyon Reaksiyon Reaktifleri

REAKTİFLER	MİKTARLAR
5x Reaksiyon Tamponu	2 µL
Nükleazsız su	5 µL
Total RNA	2 µL
Enzim Karışımı	1 µL
Total Hacim	10 µL

Daha önce yapılan çalışmalarda bitkilerde korunmuş olduğu tespit edilen, miR-159, miR-171, miR-396 ve miR-8123 miRNA'ları (Çizelge 3.2), ileri ve geri primerleri olmak üzere, revers transkripsiyon işlemi için kullanıldı. Ana stokta bulunan 100

μM 'lık primerler, nükleazsız su kullanılarak $10 \mu\text{M}$ 'a seyreltildi. $1 \mu\text{l}$ ileri (forward) primer, $1 \mu\text{l}$ geri (reverse) primer, $1 \mu\text{l}$ cDNA örneği, $5 \mu\text{l}$ master mix PCR karışımı ve $17 \mu\text{l}$ RNaz'sız su eklenerek yavaşça karıştırıldı ve PCR yapıldı. PCR ürünleri elde edildikten sonra, $4 \mu\text{l}$ örnekler %1 lik agaroz jelde yürütüldü.

3.4 Real Time PCR (qPCR)

Agilent Kit protokolüne göre ilk olarak poliadenilasyon reaksiyonu gerçekleştirilir. Ardından cDNA sentezi ve Real-Time PCR yapılır.

Poli-A Reaksiyonu: $4 \mu\text{l}$ 5x poly-A tamponu, $1 \mu\text{l}$ JATP (10 mM), $12 \mu\text{l}$ RNazsız su, $1 \mu\text{l}$ polimeraz (E.coli PAP) ve $2 \mu\text{l}$ total RNA, $20 \mu\text{l}$ olacak şekilde karıştırılır. Ardından, 37°C 'de 30 dk ve sonra 95°C 'de 5 dk inkübe edilir. Ürünler -80°C 'de saklanır.

cDNA Sentezi: Poly-A reaksiyonu gerçekleşen tüpler ayrı tutularak, cDNA sentezi için yeni RNazsız tüpler isimlendirildi. $2 \mu\text{l}$ 10x Affinity buffer, $0.8 \mu\text{l}$ dNTP karışımı, $1 \mu\text{l}$ RT adapter primer, $1 \mu\text{l}$ RNaz block enzim karışımı, $4 \mu\text{l}$ poly-A reaksiyonu yapılan örnek ve $11.2 \mu\text{l}$ su olacak şekilde $20 \mu\text{l}$ 'lık karışım, 55°C 'de 5 dakika , 25°C 'de 15 dk , 42°C 'de 30 dk ve 95°C 'de 5 dk inkübe edilir.

Real-Time PCR: Elde edilen cDNA örneklerinden $1 \mu\text{l}$, master karışım $12.5 \mu\text{l}$, geri primer $1 \mu\text{l}$, ileri primer $0.33 \mu\text{l}$ ve $10.7 \mu\text{l}$ RNazsız su olmak üzere toplamda $25 \mu\text{l}$ olacak şekilde solüsyon hazırlanır. Daha sonra plate içerisine dikkatli bir şekilde eklenerek cihaza konur. Aynı zamanda her miRNA için içerisinde miRNA olmayan non-template kontrol de plate içine eklenir. Örneklerin gerçek zamanlı olarak çoğalmaları grafiksel olarak gösterildi. Real-Time PCR işleminde kullanılan primerler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Real-Time PCR için Kullanılan Primerler

Primerler	İleri	Tm	Geri	Tm
miR-159	5'-GTGGGTTTGGATTGAAGGG - 3'	57°C	5'-GTGCAGGGTCCGAGG - 3'	56°C
miR-160	5'- TTGTGCCTGGCTCCCTGT -3'	58°C	5'- GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'	56°C
miR-171	5'-GTTTTGATTGAGCCGTGCC - 3'	57°C	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'	56°C
miR-396	5'-GTTGGGGTTCCACAGCTTT - 3'	57°C	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT - 3	56°C
miR-2919	5'-TTTTTTTCCCCCCCCCCC - 3'	58°C	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'	56°C
miR-8123	5'- GTTTGGGAACACGGTAAC- 3'	57°C	5'- GTGCAGGGTCCGAGG- 3'	56°C

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

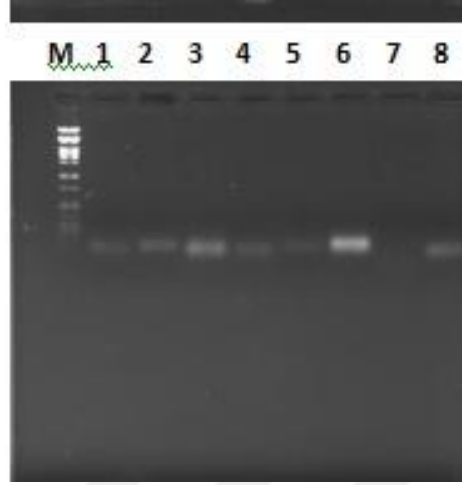
4.1 Total RNA İzolasyonu

MiRNA analizi gerçekleştirilecek olan yaprak, karanfil, püskül ve tomurcuk dokuları exiqon kiti ile izole edildikten sonra NanoDrop cihazı ile tüm örneklerin konsantrasyonları ölçüldü. NanoDrop ile ölçümden elde edilen verilere göre, *Corylus avellena* (Tombul Fındık) türünün püskül dokusundaki total RNA miktarı 69,5 ng/μL, karanfil dokusunda 37,3 ng/μL, tomurcuk dokusunda 68,8 ng/μL ve yaprakta 50 ng/μL iken, *Corylus colurna* (Türk Fındığı) türünün püskül dokusundaki total RNA miktarı 48,3 ng/μL, karanfil dokusunda 50,5 ng/μL, tomurcuk dokusunda 51,8 ng/μL, ve yaprakta 50 ng/μL olarak ölçüldü. (Çizelge 4.1) Nükleik asitlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan en iyi değer 260 nm'dir. Çünkü nükleik asitler ışığı en iyi bu değerde absorblar. Proteinler için bu değer 280 nm'dir. Bu nedenle $A_{260/280}$ oranı nükleik asitlerin saflığının belirlenmesinde kullanılır. Bu oran sonucu yaklaşık olarak 2.0 değerini vermelidir. Bu sonuca yakın değerler örneklerde protein kontaminasyonun olmadığını göstermektedir. Bizim sonuçlarımız da bu değere yaklaşık veriler elde edilmiştir. Protein kontaminasyonu mevcut değildir. NanoDrop sonuçlarına göre bu oran, TP için 1,71, TK için 2,34, TT için 2,13 ve TY için 1,6 dır. CP için 2,07, CK için 2,09, CT için 1,98 ve CY için 1,8 olarak ölçülmüştür. (Çizelge 4.1)

4.2 Reverse Transkripsiyon PCR

Total RNA konsantrasyonlarının ölçümünden sonra, RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi için Exiqon cDNA kiti ile ters transkripsiyon PCR gerçekleştirildi.

Ardından jel elekrtoferezi yapıldı. Bu işlem için miR159, miR171, miR396 ve miR8123 kullanıldı (Çizelge 3.2). Tombul fındık ve Türk fındığının püskül dokuları karşılaştırıldı.



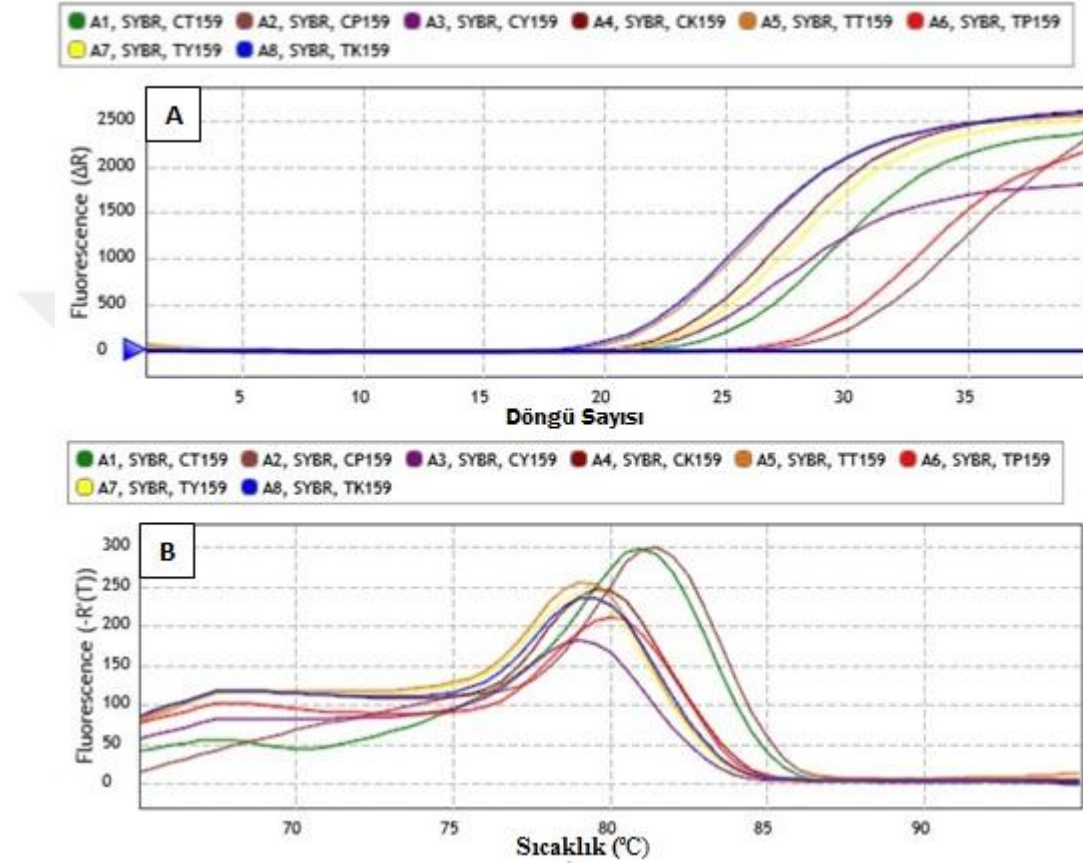
Şekil 4.1 Ters transkripsiyon işlemi yapılan miRNA'ların jel görüntüsü. M : Marker, 1: CP159, 2: CP171, 3: CP396, 4: CP8123, 5: TP159, 6: TP171, 7:

Jel elektroforez sonucuna göre TP dokusunda miR171'in diğerlerine göre daha fazla ifade edildiği görülmektedir. Aynı dokuda miR396 için herhangi bir bant görülmemektedir. CP dokusunda miR396'nın da, *Corylus colurna* türünün diğer dokularına göre daha yüksek ifade edildiği görülmektedir. cDNA'lar miRNA'lardan çoğaltıldığı için bantlar beklenen boyutta gözlenmektedir (Şekil 4.1).

Ancak primer dimer gibi herhangi bir yanlış çoğalma sonucu bir bant görüntüsü olma ihtimali üzerinde durularak Real Time PCR ile çoğalmanın daha kontrollü izlenmesi tercih edilmiştir.

4.3 Real-Time PCR

RNA izolasyonundan sonra Real-Time PCR için, Poly A Ekleme, cDNA eldesi ve Real-Time PCR işlemi olarak 3 basamaktan oluşan Agilent Kiti kullanıldı. Real-Time PCR sonuçlarına göre elde edilen grafikler her bir miRNA için çoğalma ve erime grafikleri olarak iki şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.2).



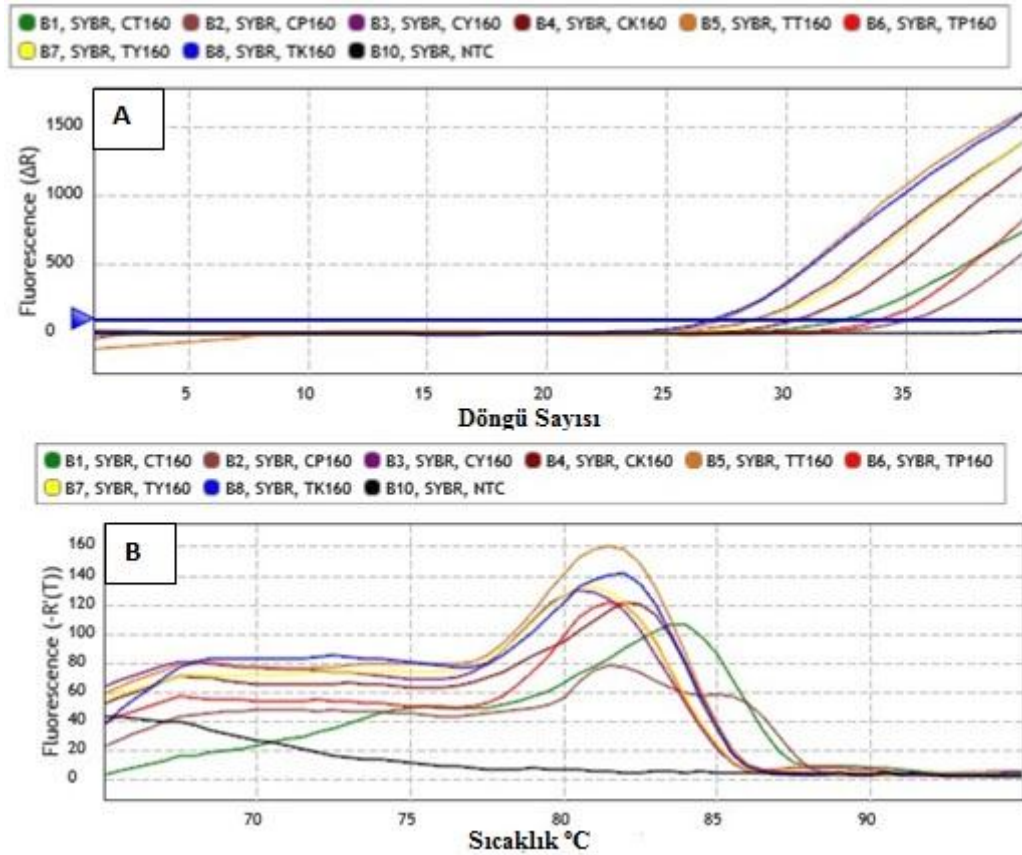
Şekil 4.2 miR159'un Real-Time analiz grafiği. A) Çoğaltım grafiği, B) Erime eğrisi grafiği

Çizelge 4.1 miR159'un Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri

Kuyucuk	Kuyucuk Adı	Hedef	ΔR Son	Cq (ΔR)	Tm Ürün 1 ($-R'(T)$)
A1	CT159	SYBR	2384,623	22,84	81,00
A2	CP159	SYBR	2331,690	27,51	81,50
A3	CY159	SYBR	1823,794	21,58	79,00
A4	CK159	SYBR	2619,521	21,04	79,50
A5	TT159	SYBR	2570,051	19,47	79,00
A6	TP159	SYBR	2186,183	26,51	80,00
A7	TY159	SYBR	2518,261	21,38	79,00
A8	TK159	SYBR	2591,781	19,01	79,50

Şekil 4.2 A'da *Corylus colurna* ve *Corylus avellana* fındık türlerinin tomurcuk, püskül, yaprak ve karanfil dokularında miR159 ile yapılan çoğaltım görülmektedir. Yeşil eğri CT dokusunu, pembe eğri CP, mor eğri CY ve bordo eğri CK dokusunu temsil ederken, turuncu eğri TT dokusunu, kırmızı eğri TP dokusunu, sarı eğri TY dokusunu ve mavi eğri TK dokusunu göstermektedir. Şekil 4.2 B'deki grafik ise erime eğrisi grafiğidir.

Floresans değeri ne kadar yüksek ise çoğalma o kadar fazla demektir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi en yüksek miR159 ifadesi bordo renk ile temsil edilen *Corylus colurna* karanfil (CK159) dokusundadır ve floresans değeri 2619,521'dir. Cq değeri çoğalma eğrisinin, threshold çizgisiyle kesiştiği yerdeki değerdir. Threshold çizgisi mavi üçgeni takip eden koyu mavi kalın çizgidir (Şekil 4.2 A). Bu değer ürünün hızlı bir şekilde ilk çoğalmaya başladığı döngü sayısı ile bağlantılıdır ve CK159'un Cq değeri 21,04'tür. (Çizelge 4.1) Diğerlerine göre en az ifade ise *Corylus colurna* yaprak (CY159) dokusundadır. Floresans değeri 1823,794 ve Cq değeri 21,58'dir. Genel anlamda bakıldığı zaman iki fındık türünün dört dokusunda da miR159'un çoğalma gösterdiği görülmektedir. Erime grafiğine bakıldığı zaman ise tüm örneklerde tek pig görülmektedir. Bu örneğin temiz olduğunu göstermektedir (Şekil 4.2 B).



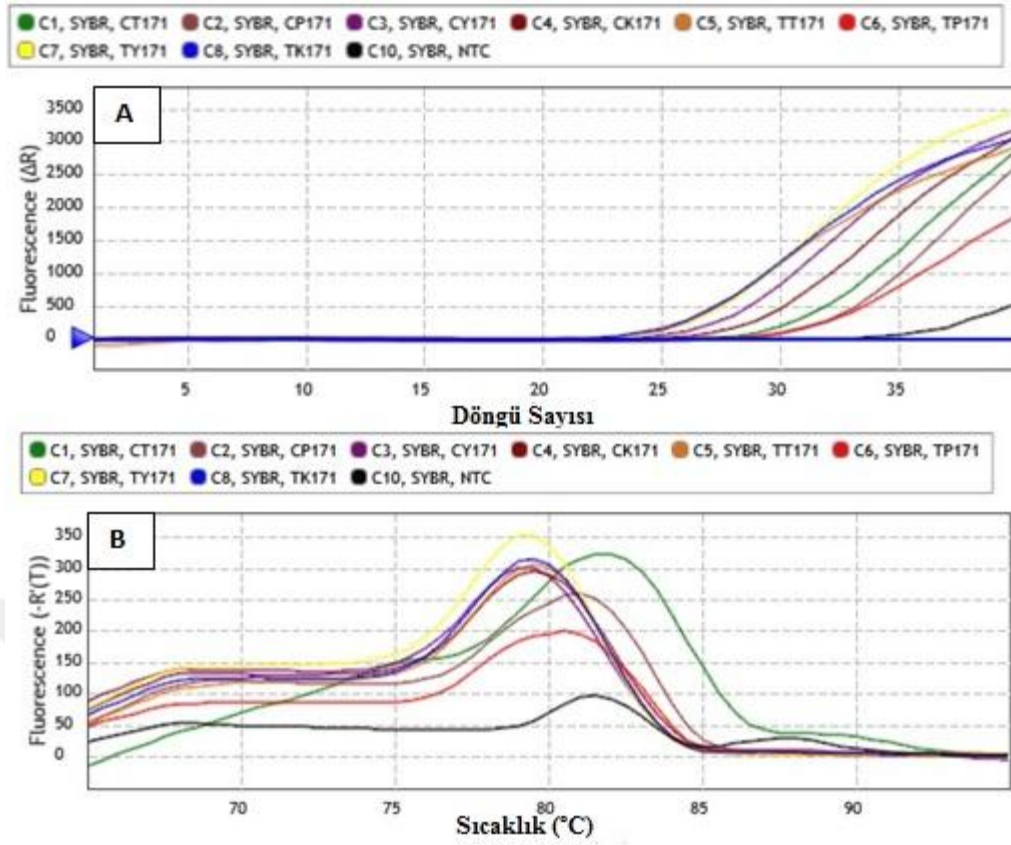
Şekil 4.3 miR160'ın Real-Time analiz grafiği. A) Çoğaltım grafiği, B) Erime eğrisi grafiği

Çizelge 4.2 miR160'ın Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri

Biyotük	Biyotük Adı	Reaksiyon	ΔR ₂₀₀₈	Cq (ΔR)	Tm (°C) (-K (1))
B1	CT160	SYBR	748,281	33,06	83,50
B2	CP160	SYBR	585,956	35,74	81,50
B3	CY160	SYBR	1407,410	29,22	80,50
B4	CK160	SYBR	1215,954	31,01	82,00
B5	TT160	SYBR	1620,338	27,74	81,50
B6	TP160	SYBR	837,025	34,44	81,50
B7	TY160	SYBR	1402,701	29,51	80,50
B8	TK160	SYBR	1601,622	27,51	82,00
B10	NTC	SYBR	10,373	No Cq	65,00

Şekil 4.3 miR160'ın çoğaltım ve erime grafiğini göstermektedir. Yeşil eğri CT tomurcuk dokusunu, pembe eğri CP dokusunu, mor eğri CY ve bordo eğri CK dokusunu temsil ederken, turuncu eğri TT dokusunu, kırmızı eğri TP dokusunu, sarı eğri TY dokusunu, mavi eğri TK dokusunu ve siyah eğri ise NTC'yi göstermektedir.

En fazla çoğalma TT ve TK dokularında görülmektedir (Şekil 4.3 A) ve floresans değerleri sırasıyla 1620,338 ve 1601,622'dir. Cq değerleri ise 27,74 ve 27,51 dir (Çizelge 4.2). En az çoğalma ise 748, 281 floresans değeri ile CT dokusunda görülmektedir. Grafikte NTC eğrisinin düz olması temiz olduğunu göstermektedir. Ancak erime grafiğine bakıldığında pembe eğri ile temsil edilen CP dokusu ufak iki pig içermektedir (Şekil 4.3 B). Bunun anlamı örnek içerisinde özgül olmayan ürünlerin olabileceğidir. Fakat NTC'de dikkate değer bir pig görülmediğinden dolayı genel anlamda az miktarda da olsa çoğalma vardır (Şekil 4.3 B).



Şekil 4.4 miR171'in Real-Time analiz grafiği. A) Çoğaltım grafiği, B) Erime eğrisi grafiği

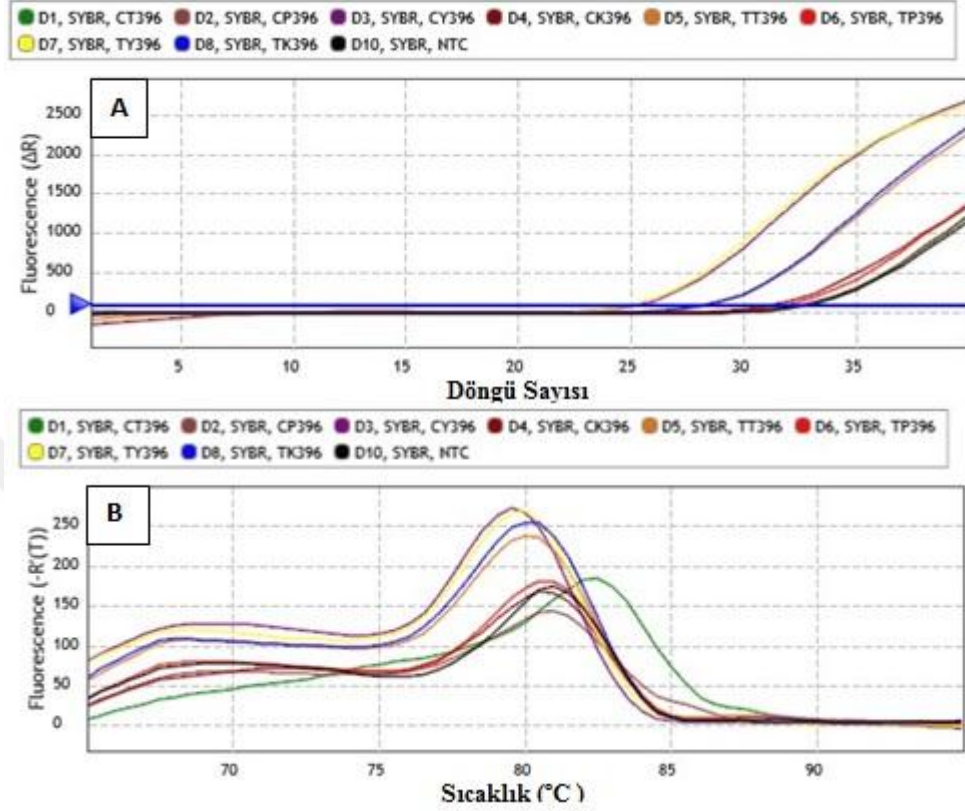
Çizelge 4.3 miR171'in Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri

Kuyucuk	Kuyucuk Adı	Hedef	ΔR Son	Cq (ΔR)	Tm Ürün 1 (-R'(T))
C1	CT171	SYBR	2866,618	27,99	82,00
C2	CP171	SYBR	2638,214	29,32	81,00
C3	CY171	SYBR	3207,895	24,96	79,00
C4	CK171	SYBR	3077,570	26,23	79,50
C5	TT171	SYBR	2919,284	23,23	79,50
C6	TP171	SYBR	1882,116	29,19	80,50
C7	TY171	SYBR	3488,026	23,85	79,50
C8	TK171	SYBR	3050,863	23,38	79,50
C10	NTC	SYBR	554,823	34,59	81,50

Şekil 4.4 miR171'in çoğaltım ve erime grafiğini göstermektedir. Yeşil eğri CT dokusunu, pembe eğri CP dokusunu, mor eğri CY ve bordo eğri CK dokusunu temsil ederken, turuncu eğri TT dokusunu, kırmızı eğri TP dokusunu, sarı eğri TY dokusunu, mavi eğri TK dokusunu ve siyah eğri NTC'yi göstermektedir.

miR171 için en fazla çoğalma her iki türün de yaprak dokusunda görülmektedir. TY'nin floresans değeri 3488,026 ve CY'nin floresan değeri ise 3207,895'tir (Çizelge 4.3). Fakat burada istenmeyen bir durum söz konusudur. Çünkü NTC'de az da olsa bir

çoğalma görülmektedir. Aynı şekilde erime grafiğinde de küçük bir pig oluşumu gözlemlenmektedir (Şekil 4.4 B). Bu kontaminasyon olduğunun bir göstergesidir. Bu nedenle kesin sonuç elde edilememiştir ve tekrarlanmalıdır.



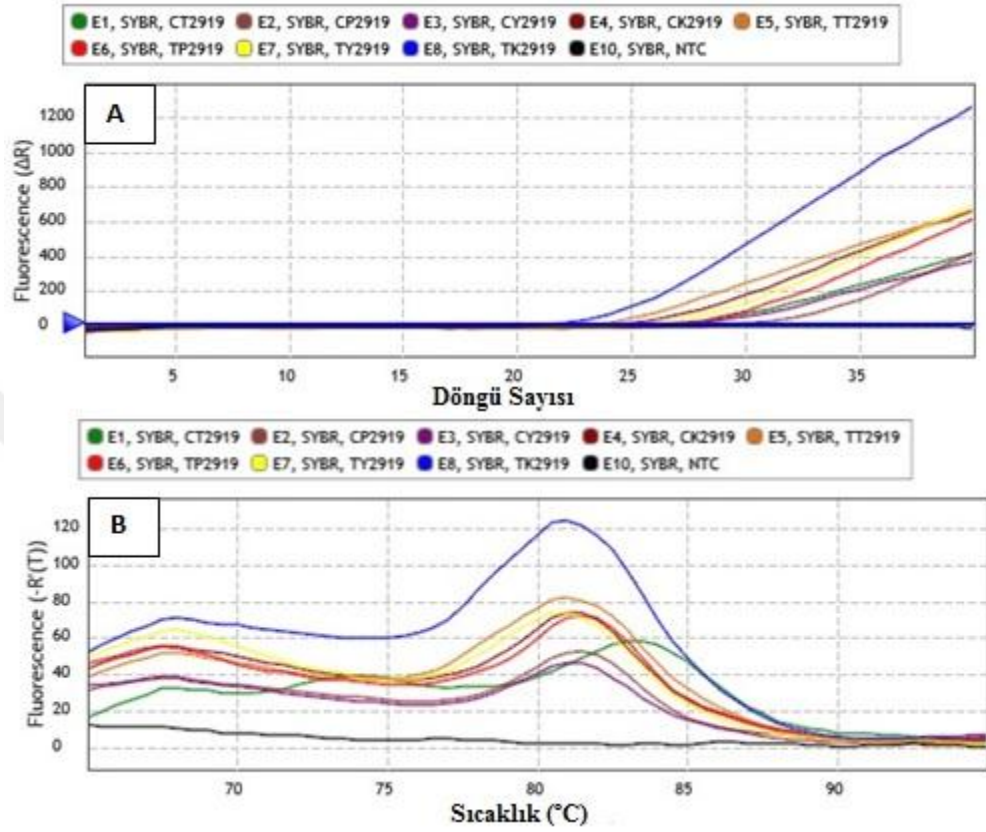
Şekil 4.5 miR396'nın Real-Time analiz grafiği. A) Çoğaltım grafiği, B) Erime eğrisi grafiği

Çizelge 4.4 miR396'nın Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri

Kuyucuk	Kuyucuk Adı	Hedef	ΔR Son	Cq ΔR	Tm Ürün 1 ($-R'(T)$)
D1	CT396	SYBR	1226,677	33,05	82,50
D2	CP396	SYBR	1217,081	33,18	81,00
D3	CY396	SYBR	2682,444	25,71	79,50
D4	CK396	SYBR	1338,959	31,84	80,50
D5	TT396	SYBR	2254,076	28,85	80,00
D6	TP396	SYBR	1384,792	32,40	80,50
D7	TY396	SYBR	2619,984	25,46	80,00
D8	TK396	SYBR	2350,404	28,90	80,00
D10	NTC	SYBR	1155,477	33,32	81,00

Şekil 4.5 miR396'nın çoğaltım ve erime grafiğini göstermektedir. Yeşil eğri türünün CT dokusunu, pembe eğri CP dokusunu, mor eğri CY ve bordo eğri CK dokusunu temsil ederken, turuncu eğri TT dokusunu, kırmızı eğri TP dokusunu, sarı eğri TY dokusunu, mavi eğri TK dokusunu ve siyah eğri NTC'yi göstermektedir.

miR396 genel anlamda çoğalmış gibi gözükmemektedir fakat erime grafiğine bakıldığı zaman belirli miktarda bir çoğalma olduğu görülmektedir. Bu da kontaminasyon olduğunu gösterir ve tekrarlanması şarttır (Şekil 4.5).



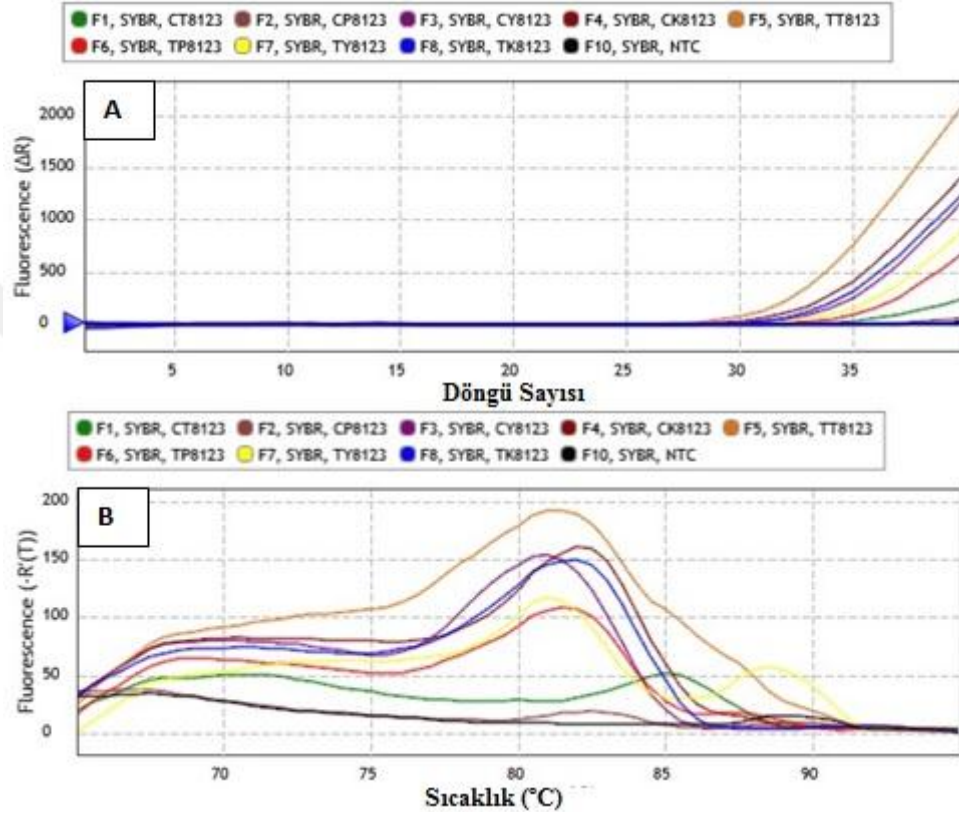
Şekil 4.6 miR2919'un Real-Time analiz grafiği. A) Çoğaltım grafiği, B) Erime eğrisi grafiği

Çizelge 4.5 miR2919'un Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri

Kuyucuk	Kuyucuk Adı	Hedef	ΔR Son	Cq (ΔR)	Tm Ürün 1 (-R'(T))
E1	CT2919	SYBR	419,374	27,95	83,00
E2	CP2919	SYBR	429,738	31,04	81,50
E3	CY2919	SYBR	378,735	28,53	81,50
E4	CK2919	SYBR	666,292	25,58	81,50
E5	TT2919	SYBR	669,536	24,48	81,00
E6	TP2919	SYBR	621,974	27,84	81,50
E7	TY2919	SYBR	701,401	26,67	81,00
E8	TK2919	SYBR	1269,060	22,47	81,00
E10	NTC	SYBR	-3,488	No Cq	65,00

Şekil 4.6 miR2919'un çoğaltım ve erime grafiğini göstermektedir. Yeşil eğri CT dokusunu, pembe eğri CP dokusunu, mor eğri CY ve bordo eğri CK dokusunu temsil ederken, turuncu eğri TT dokusunu, kırmızı eğri TP dokusunu, sarı eğri TY dokusunu, mavi eğri TK dokusunu ve siyah eğri NTC'yi göstermektedir.

miR2919, tüm miRNA'lar ile karşılaştırıldığında tüm dokularda en düşük ifade edilen miRNA olarak görülmektedir. Kendi içerisindeki dokulara kıyasla en yüksek ifade TK dokusunda görülmektedir ve floresans değeri 1269,060'tır. CY ise en düşük ifade edildiği dokudur (Çizelge 4.5). Erime grafiğinde Tm değerlerine de bakılırsa tüm örnekler tek pig içermektedir. Herhangi bir kontaminasyon görülmemektedir (Şekil 4.6 B).



Şekil 4.7 miR8123'ün Real-Time analiz grafiği. A) Çoğaltım grafiği, B) Erime eğrisi grafiği

Çizelge 4.6 miR8123'ün Real-Time Sonucuna göre Floresans, Cq ve Tm değerleri

Kuyucuk	Kuyucuk Adı	Hedef	ΔR Son	Cq ΔR	Tm Ürün 1 (-R'(T))
F1	CT8123	SYBR	250,511	35,07	85,00
F2	CP8123	SYBR	66,333	38,43	67,00
F3	CY8123	SYBR	1212,180	31,59	81,00
F4	CK8123	SYBR	1454,021	30,46	82,00
F5	TT8123	SYBR	2132,742	28,93	81,50
F6	TP8123	SYBR	708,720	33,48	81,50
F7	TY8123	SYBR	922,388	32,35	81,00
F8	TK8123	SYBR	1279,476	31,24	82,00
F10	NTC	SYBR	29,330	No Cq	67,50

Şekil 4.7 miR8123'ün çoğaltım ve erime grafiğini göstermektedir. Yeşil eğri CT dokusunu, pembe eğri CP dokusunu, mor eğri CY ve bordo eğri CK dokusunu temsil ederken, turuncu eğri TT dokusunu, kırmızı eğri TP dokusunu, sarı eğri TY dokusunu, mavi eğri TK dokusunu ve siyah eğri NTC'yi göstermektedir.

miR8123, miR2919'dan sonra en az ifade edilen miRNA'dır. Kendi içerisinde diğer dokulara göre en yüksek ifadesi TT dokusunda görülmektedir ve floresans değeri 2132,742'dir. En az ise 66,333 floresan değeri ile CP dokusundadır (Çizelge 4.6). Erime grafiği, ifade miktarı az olduğundan çok net değildir. TY dokusunda iki pik görülmektedir (Şekil 4.7 B). Bu nedenle bu doku hakkında ifadesi konusunda kesin bilgi yoktur. Fakat NTC'de herhangi bir çoğalma görülmemektedir. Dolayısıyla miR8123 fındık bitkisinde az miktarda da olsa çoğalmıştır.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Birçok moleküler yolakta yer alan ve post-transkripsiyonel aşamada önemli rollere sahip olan miRNA'lar ile ilgili günümüze dek birçok çalışma yapılmıştır. Bitkilerde genel olarak mRNA'nın yıkımından sorumlu miRNA'lar, haşhaş [97], buğday[12], pamuk[13], patates[60], muz [15], mısır[11] pirinç [10] ve çoğunlukla Arabidopsis olmak üzere çoğu bitkide çalışılmıştır. Bu çalışmada iki ayrı fındık türüne ait bazı korunmuş miRNA'ların tespiti amaçlanmıştır.

Real-Time PCR sonuçlarına göre kullandığımız 6 miRNA'nın 3 tanesi (miR160, miR2919 ve miR8123) az ya da çok çoğalma göstermiştir. miR171 ve miR396 grafiklerinde sorunlarla karşılaşmıştır. Özellikle erime grafiklerinde temiz sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle bu miRNA'lar için deneyin tekrarlanması gerekmektedir.

miR159'un çiçeklenme sürecinde etkili olup geç çiçeklenmeye sebep olduğu bilinmektedir. [53] Bitki streslerine karşı da rolü olduğu bilinen bu miRNA'yı fındıkta da tespit ettik. Her iki fındık türünde de tüm dokularda ifade edildiği görülmektedir. miR160 *Corylus avellana* türünün tomurcuk ve karanfil dokularında diğer dokulara göre fazla çoğalma göstermiştir. Her iki türde de bunu takiben yaprak dokusu gelmektedir. miR160, özellikle oksin sinyaline cevapta rol almakla birlikte yaprak ve kök gelişiminde de etkilidir.[55] Çiçeklerde yüksek ifadesi gerçekleştiği ve gelişiminde etkili olduğu bilinen miR171 aynı zamanda kök gelişimi ve tuz stresine cevapta da rol almaktadır. [54][57] Çalışmamızda her iki fındık türünde de en yüksek ifadesi yaprak dokusunda, en düşük püskül dokusunda ifade edilmiştir. Yaprakta fazla ifade edilmesi yaprak gelişiminde rol alabileceğini düşündürmektedir. Fakat NTC'sinin temiz

çıkması deneyin tekrarlanmasını gerektirmektedir. miR396'nın hem tombul hem de türk fıncığında yaprak dokusunda diğerlerine göre daha fazla ifade edildiği görülmektedir. Büyüme düzenleyici faktör proteinini hedef alarak hücre proliferasyonunda görev olan miR396'nın [58] sonuçlarımıza göre fıncıkta da yaprağın gelişim sürecinde bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. Daha önceki çalışmaları destekleyecek nitelikte bir sonuç elde edilmiştir. Ancak miR171 gibi bu miRNA'nın da NTC'si temiz değildir ve tekrarlanması şarttır. miR396 ve miR171'in NTC'lerindeki çoğalma kontaminasyon olduğunun belirtisidir. Bu nedenle bu iki miRNA için deneyin tekrardan yapılmasında yarar vardır.

miR2919 ve miR8123 hakkında literatürde fazla çalışma bulunmamaktadır. Daha önceki çalışmalarda miR2919'un haşhaş bitkisinin kapsül dokusunda fazla, yaprak dokusunda az ifade edildiği rapor edilmiştir. [59] Çalışmamızda bu miRNA haşhaş çalışmasını destekleyecek şekilde, yine diğer dokulara nazaran *Corylus avellana*'nın karanfil dokusunda fazla ifade edilirken *Corylus colurna*'nın yaprak dokusunda az ifade edilmiştir. Bu sonuca göre de dişi çiçek oluşumu veya gelişiminde etkili bir role sahip olabilir diyebiliriz. miR8123 daha önce patates bitkisinde incelenmiş ve patatesin yeraltı filizlerinde ifade edildiği belirtilmiştir.[60] Veri sonuçlarımıza göre bu miRNA en çok *Corylus avellana* türünün tomurcuk dokusunda ifade edilmiştir. *Corylus colurna*'nın püskül dokusunda ise her miRNA'ya ve her dokuya göre en az ifade edilmiştir.

miR8123 TY dokusu ve miR160'ın CP dokusunun erime grafiğinde iki pik görülmektedir. Bu, o örnekler için spesifik olmayan ürünlerin varlığını gösterir. Sadece bu iki doku için deneyin tekrar edilmesinde fayda görülmektedir.

Real-Time PCR işleminden sonra yapılması gereken ilk şey miRNA'ların dizilenmesidir. Tam olarak kesin bir sonuç ancak o zaman elde edilebilir. Biz bu dokularda bu miRNA'ların var olup olmadığını gösterdik. İleriki aşama transkriptomik çalışmalarla biyoinformatik destekli deneylerle bu miRNA'ların hedeflediği genleri göstermek ve miRNA literatürüne faydalı olacak yeni bilgiler eklemektir.

KAYNAKLAR

- [1] Polat, S., (2004). “ Türk Fındığı (*Corylus colurna*)’nın Türkiye’deki Yeni Bir Yayılış Alanı”, Marmara Coğrafya Dergisi, 29: 136-149.
- [2] Turan, A., (2007). “ Giresun İli Bulancak İlçesi Tombul Fındık Klon Seleksiyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [3] Duman, M., (2008). “ Fındık Kitabı – Türk Kültüründe Fındık”, Kitabevi.363, İstanbul.
- [4] T.C. MEB., (2011). “Bahçecilik-Fındık Yetiştiriciliği, Ankara.
- [5] Fındık Tanıtım Grubu, Fındık ve Sağlık, [ttp://www.ftg.org.tr/tr/turk-findigi-findik-ve-saglik.html](http://www.ftg.org.tr/tr/turk-findigi-findik-ve-saglik.html), 25 Ekim 2017.
- [6] Fiskobirlik, Fındığın Anatomisi, <http://www.fiskobirlik.org.tr/findigin-anatomisi/>, 25 Ekim 2017.
- [7] Axtell, M. J. ve Bowman, J. L., (2008). “Evolution of Plant MicroRNAs and Their Targets”, Trends in Plant Science, 13: 343-349.
- [8] Lee, R. C., Feinbaum, R. L. ve Ambros, V., (1993). “The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *Lin-14*”, Cell, 75: 843-854.
- [9] Park, W., Li, J., Sang, R., Messing, J. ve Chen, X., (2002). “ CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog and HEN1, a Novel Protein, Act in MicroRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana*”, Current Biology, 12: 1484-1495.
- [10] Sunkar, R., Girke, T., Jain, P.K. ve Zhu, J.K., (2005). “Cloning and Characterization of microRNA from Rice”, The Plant Cell, 17: 1397-1411.

- [11] Ding, D., Zhang, L., Wang, H., Liu, Z., Zhang, Z. ve Zheng, Y., (2008). "Differential Expression of miRNAs in Response to Salt Stress in Maize Roots", *Annals of Botany*, 103: 29-38.
- [12] Yao, Y., Guo, G., Sunkar, R., Du, J., Zhu, J.K. ve Sun, O., (2007). "Cloning and Characterization of microRNAs from Wheat (*Triticum aestivum* L.)", *Genome Biology*, 8: R96-R96.13.
- [13] Zhang, B. ve Pan, X., (2009). "Expression of MicroRNAs in Cotton", *Mol Biotechnol*, 42: 296-274.
- [14] Barakat, A., Sriram, A., Park, J., Zhebentyayeva, T., Main, D. ve Abbott, A., (2012). "Genome Wide Identification of Chilling Responsive MicroRNAs in *Prunus persica*", *BMC Genomics*, 13: 481.
- [15] Chai,J., Feng, R., Shi, R., Ren, M., Zhang, Y. ve Wang, J., (2014). "Bioinformatic Identification and Expression Analysis of Banana MicroRNAs and Their Targets", *Plos One*, 10(4): e0123083. doi:10.1371.
- [16] Yanik, H., Turktas, M., Dundar, E., Hernandez, P., Dorado, G. Ve Unver, T., (2013). "Genome-Wide Identification of Alternate Bearing-Associated MicroRNAs (miRNAS) in Olive (*Olea europaea* L.)", *BMC Plant Biology*, 13: 10.
- [17] Koptekin, D. ve Aktaş, L. Y., (2013). "Bitki MikroRNA'ları: Biyogenezi, Köken ve Evrimi", *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6: 140-148.
- [18] Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Copp, G. P. ve Anderson, T. A., (2006). "Conservation and Divergence of Plant MicroRNA Genes", *The Plant Journal*, 46: 243-259.
- [19] Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B. ve Bartel, D. P., (2002). "Prediction of Plant MicroRNA Targets", *Cell*, 110: 513-520.
- [20] Axtell, M. J. ve Bartel, D. P., (2005). "Antiquity of MicroRNAs and Their Targets in Land Plants", *The Plant Cell*, 17: 1658-1673.
- [21] Karadeniz, T., Bostan, Z., Tuncer, C. ve Tarakçıoğlu, C., (2008). "Fındık Yetiştiriciliği", *Ziraat Odaları İl Koordinasyon Kurulu Yayınları*, No 1, Ordu, 1545.
- [22] İslam, E., (2016). "Fındık Zurufu Kompostunun Toprak Mekaniksel Özellikleri Üzerine Etkisi", *Yüksek Lisans Tezi*, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- [23] Giresun Ticaret Borsası, (2015). *Piyasa Analizleri*, Yayın no: 1, Giresun.

- [24] Ağaçlar.org, *Corylus colurna*, <http://www.agaclar.org/agac.asp?id=229>, 11 Eylül 2016.
- [25] Ağaçlar.org, *Corylus avellena*, <http://www.agaclar.org/agac.asp?id=345>, 11 Eylül 2016.
- [26] Doğanay, H., “Türkiye Fındık Meyveciliğindeki Yeni Gelişmeler”, Doğu Coğrafya Dergisi, 1-22.
- [27] Ünye Ticaret Borsası, (2013). “Fındık Toplama-Hasat Kurutma Yöntemleri Üzerine Araştırma ve Fizibilite Çalışması”, Ordu.
- [28] Özkan, A.H., (2011). “Türkiye’deki Fındık Üretimi ve Pazarlama Sorunlarına Global Bakış”, Çankırı Karatekin Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 2(2): 183-192.
- [29] Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Fındık Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, (2013). Fındıkta Budama, Yayın No: 2, Giresun.
- [30] Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyonopthinana, C. M. ve Ohshima, T., (2003). “Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellena* L.) 1. Compositional Characteristics”, Agricultural and Food Chemistry Dergisi, 51: 3790-3796.
- [31] Köksal, A. İ., Artik, N., Şimşek, A. Ve Güneş, N., (2006). “Nutrient Composition of Hazelnut (*Corylus avellena* L.) Varieties Cultivated in Turkey”, Food Chemistry, 99: 509-515.
- [32] Şimşek, A. ve Aslantaş, R., (1999). “Fındığın Bileşimi ve İnsan Beslenmesi Açısından Önemi”, GIDA, 24(3): 209-216.
- [33] Duman, M., (2004). “Bazı Eski Kaynaklarda Fındık”, Kebikeç İnsan Bilimleri için Kaynak Araştırmaları Dergisi, 18: 303-316.
- [34] T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü, (2017). “2016 Yılı Fındık Raporu”, Mart 2017, Ankara.
- [35] Ünver, T. ve Budak, H., (2009). “Conserved MicroRNAs and Their Targets in Model Grass Species *Brachypodium distachyon*”, Planta, 230: 659-669.
- [36] Nazowa, M. Miura, S. ve Nei, N., (2012). “Orgins and Evolution of MicroRNA Genes in Plant Species”, Genome Biology and Evolution, 4: 230-239.
- [37] Palatnik, J. E., Allen, E., Wu, X., Schammer, C., Schwab, R., Carrington, J. C. ve Wiegel, D., (2013). “Control of Leaf Morphogenesis by MicroRNAs”, Nature, 425: 257-263.

- [38] Lauter, N., Kamponi, A., Carlson, S., Goebel, M. ve Moose, S. P., (2005). "MicroRNA 172 Down-Regulates Glossy15 to Promote Vegetative Phase Change in Maize", PNAS, 102: 9412-9417.
- [39] Chinnusamy, V., Zhu, J. ve Zhu, J. K., (2007). "Cold Stres Regulation of Gene Expression in Plants", Trends in Plant Science, 12: 444-451.
- [40] Allen, E., Xie, Z., Gustafsa, A. M., Sung, G. H., Spatofora, J. W. ve Carrington, J. C., (2004). "Evolution of MicroRNA Genes by Inverted Duplication of Target Genes Sequences in *Arabidopsis thaliana*" Nature Genetics, 36: 1282-1290.
- [41] Vionnet, O., (2009). "Origin, Biogenesis and Activity of Plant MicroRNAs", Cell, 136: 669-687.
- [42] Reinhart, B. J., Slack, F. C., Rougvie, A. E., Harvitz, F. R. ve Ruxkun, G., (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA Regulates Developmental Timing in *Ceanorhabditis elegans*", Nature, 403: 901-906.
- [43] Dugas, D. V. ve Bartel, B., (2004). "MicroRNA Regulation of Gene Expression in Plants", Science Direct, 7: 512-520.
- [44] Aras, S., Soydam-Aydın, S., Fazlıoğlu, A., Duman, D.C., Büyük, İ. ve Derici, K., (2015). "Bitkilerde RNA İnterferans", Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 72: 255-262.
- [45] Napoli, C., Lemieux, C. ve Jorgensen, R., (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans", The Plant Cell, 2: 279-289.
- [46] Lai, E. C., (2003). "MicroRNAs: Runts of the Genome Assert Themselves", Current Biology, 13: 925-936.
- [47] Kozomara, A. ve Griffiths-Jones, S., (2014). "miRBase: Annotating High Confidence MicroRNAs Using Deep Sequencing Data", Nucleic Acids Research, 42: 68-73.
- [48] Milliar, A. A. ve Waterhause, P. M., (2005). "Plant and Animal MicroRNAs: Similarities and Differences", Functional and Integrative Genomics, 5: 129-135.
- [49] Willmann, M. R. ve Poethig, R. S., (2007). "Conservation and Evolution of miRNA Regulotary Programs in Plant Development", Science Direct, 10: 503-511.
- [50] Li, A. ve Mao, L., (2007). "Evolution of Plant MicroRNA Gene Families", Cell Research, 17: 212-218.
- [51] Bartel, D. P., (2004). "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanisims and Function", Cell, 116: 281-297.

- [52] Floyd, S. K. ve Bowman, J. L., (2004). "Ancient microRNA Target Sequences in Plant", *Nature*, 428: 485-486.
- [53] Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C. ve Harberd, N. P., (2004). "Modulation of Floral Development by a Giberellin-Regulated MicroRNA", *Development*, 131: 3357-3365.
- [54] Liu, H., Tion, X., Li, Y., Wu, C. ve Zhang C., (2008). "Microarray-based Analysis of Stress-Regulated MicroRNAs in *Arabidopsis thaliana*" *RNA Dergisi*, 14: 836-843.
- [55] Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kang, D., Duan, M. ve Luo, L., (2010). "Genome-Wide Identification and Analysis of Drought-Responsive microRNAs in *Oryza sativa*", *Journal of Experimental Botany*, 61: 4157-4168.
- [56] Wang, J. W., Wang, L. J., Mao, Y. B., Cai, W. J., Xue, H. W. ve Chen, X. Y., (2005). "Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in *Arabidopsis*", *The Plant Cell*, 17: 2204-2216.
- [57] Kantar, M., Unver, T. ve Budak, H., (2010). "Regulation of Barley miRNAs upon Dehydration Stress Correlated with Target Gene Expression", *Funct Integr Genomics*, 10: 493-507.
- [58] Gao, P., Bai, X., Yang, L., Li, Y., Cai, H. J. W., Guo, D. ve Zhu, Y., (2010). "Over-Expression of osa-MIR396c Decreases Salt and Alkali Stress Tolerance, *Planta*, 231: 991-1001.
- [59] Böke, H., Ozhuner, E., Turктаş, M., Parmaksız, I., Ozcan, S. ve Unver, T., (2015). "Regulation of the Alkaloid Biosynthesis by miRNA in opium poppy", *Plant Biotechnology*, 409-420.
- [60] Dın, M., Barozai, M. Y. K. ve Baloch, I. A., (2014). "Identification and Functional Analysis of New Conserved microRNAs and Their Targets in patao (*Solanum tuberasum* L.)", *Turkish Journal of Botany*, 38: 1199-1213.
- [61] Baloch, I. A., Barozai, M. Y. K. ve Dın, M., (2015). "Identification and Characterization of 25 microRNAs and Their Targeted Proteins in Apricot (*Prunus armeniaca* L.)", *The Journal of Animal & Plants Science*, 25: 1466-1476.
- [62] Kim, V. N., (2005). "MicroRNA Biogenesis: Coordinated Cropping and Dicing", *Nature*, 6: 376-385.
- [63] Eldem, V., Okay, S. ve Ünver, T., (2013). "Plant microRNAs : New Players in Functional Genomics", *Turk J Agric For*, 37: 1-21.

- [64] Lee, Y., Kim, M., Ha, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. ve Kim, V. N., (2004). "MicroRNA Genes are Transcribed by RNA Polymerase II", The EMBO Journal, 23: 4051-4060.
- [65] Guo, W., Liew, J. Y. ve Yuan, Y. A., (2013). "Structural Insights into the Arms Race Between Host and Virus Along RNA Silencing Pathways in *Arabidopsis thaliana*", Biological Reviews, 89: 337-355.
- [66] Pekmezci, M. Y., (2015). "Yabancı Zeytinde (*Olea europaea* L. subsp. *oleaster*) Yüksek Verimli RNA Dizilemesi ile Yaprak ve Pedisel Dokularındaki Korunmuş ve Yeni miRNA ve Hedef Genlerinin Karakterizasyonu" Yüksek Lisans Tezi, Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çankırı.
- [67] Carmell, M. A. ve Hannon, G. J., (2004). "RNAse III Enzymes and the Initiation of Gene Silencing", Nature Structural & Molecular Biology, 11: 214-218.
- [68] Han, M., Goud, S., Song, L. ve Fedoroff, N., (2004). "The Arabidopsis Double-Stranded RNA-Binding Protein HYL1 Plays a Role in MicroRNA-Mediated Gene Regulation", Proceeding of the National Academy of Science, 101: 1093-1098.
- [69] Lobb, D., Rallopalli, G., Schmidt, D. D., Martin, C. ve Clarke, J., (2006). "SERRATE: A New Player on the Plant MicroRNA Scene", EMBO reports, 7: 1052-1058.
- [70] Morris, E. R., Chevalier, D. ve Walker, C., (2006). "DAWDLE, a Forkhead-Associated Domain Gene, Regulates Multiple Aspects of Plant Development", Plant Physiology, 141: 932-941.
- [71] Izaurraldo, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Dorzynkiewicz, E. ve Mattaj, I. W., (1994). "A Nuclear Cap Binding Protein Complex Involved in Pre-mRNA Splicing", 78: 657-668.
- [72] Kim, S., Yang, J. Y., Xu, J., Jang, I. C., Prigge, M. J. ve Chua, N. H., (2008). "Two Cap-Binding Proteins CBP20 and CBP80 are Involved in Processing Primary MicroRNAs", Plant and Cell Physiology, 49: 1634-1644.
- [73] Chen, X., Liu, J., Cheng, Y. ve Jia, D., (2002). "HEN1 Functions Pleiotropically in *Arabidopsis* Development and Acts in C Function in the Flower", Development, 129: 1085-1094.
- [74] Yu, B., Yang, Z., Li, J., Mirakkhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward, R. ve Chen, X., (2004). "Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis", Science, 307: 932-935.

- [75] Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. ve Chen, X., (2005). "Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'End Uridylation Activity in *Arabidopsis*", *Current Biology*, 15: 1501-1507.
- [76] Bollmann, K. M., Aukerman, M. J., Park, M. Y., Hunter, C., Benardiri, T. Z. ve Poethig, R. S., (2003). "HASTY, the *Arabidopsis* ortolog of exportin 5/MSN5, Regulates Phase Change and Morphogenesis", *Development*, 130: 1493-1504.
- [77] Park, M. Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. ve Poethig, R. S., (2005). "Nuclear Processing and Export of MicroRNAs in *Arabidopsis*", *PNAS*, 102: 3691-3696.
- [78] Mi, S., Cai, T., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Lang, C., Chen, S., Hannon, G. J. ve Qi, Y., (2008). "Sorting of Small RNAs into *Arabidopsis* Argonute Complexes Is Directed by the 5'Terminal Nucleotide", *Cell*, 133: 116-127.
- [79] Baumberger, N. ve Baulcombe, D. C., (2005). "*Arabidopsis* ARGONUTE1 is an RNA Slicer that Selectively Recruits MicroRNAs and Short Interfering RNAs", *PNAS*, 102: 11928-11933.
- [80] Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakoguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T. ve Tomari, Y., (2010). "Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes", *Molecular Cell*, 39: 292-299
- [81] Xie, M., Zhang, S. ve Yu, B., (2015). "MicroRNA Biogenesis, Degradation and Activity in Plants", *Cellular and Molecular Life Science*, 72: 87-99.
- [82] Zhu, E., Zhou, Y., Gonzalez, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y. T., Duan, L., Li, Z., Axtell, M., Wang, X. J. ve Zhang, X., (2013). "Bidirectional Processing of Pri-miRNAs with Branched Terminal Loops by *Arabidopsis* Dicer-Like1", *Nature Structural & Molecular Biology*, 20: 1106-1115.
- [83] Machida, S., Chen, H. Y. ve Yuan, Y. A., (2011). "Molecular Insights into miRNA Processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE", *Nucleic Acids Research*, 39: 7828-7836.
- [84] Vaucheret, H., Vazquez, F. ve Crete, P., (2004). "The Action of ARGONUTE1 in the miRNA Pathway and Its Regulation by the miRNA Pathway are Crucial for Plant Development", *Genes & Development*, 18: 1187-1197.
- [85] Mallory, A. ve Vaucheret, H., (2010). "Form, Function and Regulation of ARGONUTE Proteins", *The Plant Cell*, 22: 3879-3889.

- [86] Aukerman, M. J. ve Sakai, H., (2003). "Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETELA2-Like Target Genes", *The Plant Cell*, 15: 2730-2741.
- [87] Mallory, A. C., Bartel, D. P. ve Bartel, B., (2005). "MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes", *The Plant Cell*, 17: 1360-1375.
- [88] Pradhan, A., Naik, N. ve Sahoo, K. K., (2015). "RNAi Mediated Drought and Salinity Stress Tolerance in Plants", *American Journal of Plant Science*, 6: 1990-2008.
- [89] Nicovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M. ve Laufs, P., (2006). "The Balance Between the MIR164A and CUC2 Genes Controls Leaf Margin Serration in *Arabidopsis*", *The Plant Cell*, 18: 2929-2945.
- [90] Poethig, R. S., (2009). "Small RNAs and Development Timing in Plants", *Current Opinion in Genetics & Development*, 19: 374-378.
- [91] Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wong, J., Wiegell, D. ve Poethig, R. S., (2009). "The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis", *Cell*, 138: 750-759.
- [92] Chiou, T., Aung, K., Lin, S., Wu, C., Chiang, S. ve Su, C., (2006). "Regulation of Phosphate Hemostasis by MicroRNA in Arabidopsis", *The Plant Cell*, 18: 412-421.
- [93] Kutter, C., Schöb, H., Stadler, M., Meins, F. ve Si-Ammour, A., (2007). "MicroRNA-Mediated Regulation of Stomatal Development in *Arabidopsis*", *The Plant Cell*, 19: 2417-2429.
- [94] Reyes, J. L. ve Chua, N. H., (2006). "ABA Induction of miR159 Controls Transcript Levels of Two MYB Factors During Arabidopsis Seed Germination", *The Plant Journal*, 49: 592-606.
- [95] miRCat microRNA Cloning Kit Technical Manual, <http://oligoset.com/pages/docs/default-source/user-guides-and-protocols/user-guide-mircat.pdf?sfvrsn=9>, 1 Aralık 2017.
- [96] Valden, V.H.J., Hochhaus, A., Gazzaniga, G., Szczepaski, T., Gabert, J. ve Dongen, J.J.M., (2003). "Detection of Minimal Residual Disease in Hematologic Malignancies by Real-Time Quantitative PCR: Principles, Approaches and Laboratory Aspects, *Leukemia*, 17: 1013-1034.
- [97] Böke, H., (2013). "Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) MikroRNA'larının (miRNA) Tanımlanması ve miRNA Hedef Gen Ekspresyon Analizlerinin Belirlenmesi", Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

- [98] Pall, G.S., Hamilton, A.J., (2008). "Improved Northern Blot for Enhanced Detection of Small RNA, *Nature*, 3: 1077-1084.
- [99] Ünver, T., Bakar, M., Shearman, R.C. ve Budak, H. (2009). "Genome-Wide Profiling and Analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and Transcriptomes in Response to Foliar Glyphosate Application", *Mol Genet Genomics*, 283: 397-413.
- [100] Hiyama, E., Yamaoka, H., Kamimatsuse, A., Onitake, Y., Hiyama, K., Nishiyama, M. ve Sueda, T., (2006). "Single Nucleotide Polymorphism Array Analysis to Predict Clinical Outcome in Neuroblastoma Patients", *Journal of Pediatric Surgery*, 41: 2032-2036.
- [101] Steensel, B. ve Henikoff, S., (2003). "Epigenomic Profiling Using Microarrays", *BioTechniques*, 35: 346-357.
- [102] Davison, T.S., Johnson, C.D. ve Andruss, B.F., (2006). "Analyzing Micro-RNA Expression Using Microarrays", *Methods in Enzymology*, 411: 14-33.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Büşra YİRMİBEŞ
Doğum Tarihi ve Yeri :18.09.1991, İstanbul
Yabancı Dili :İngilizce - Almanca
E-posta :yirmibesbusra@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji Ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2017
Lisans	Biyoloji	Pamukkale Üniversitesi	2014
Lise	Sayısal	Rami Atatürk Lisesi	2009

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2012-2012	Özel Gaziosmanpaşa Hastanesi	Stajyer (Mikrobiyoloji)

YAYINLAR

Bildiriler

1. Özgentürk, N.Ö., Yirmibeş, B., Ulu, Z., Aydın, H.N. ve Ulu, S., “Detection of Some Conserved microRNAs in Hazelnut (*Corylus colurna* L. and *Corylus avellena* L.)” International Green Biotechnology Congress, September 11-13 2017, ISTANBUL, TURKEY.
2. Yirmibeş, B., Aydın, H.N., Ulu, Z.Ö., Ulu, S., Özgentürk, N.Ö. “Analysis of Some Protected miRNAs in *Corylus avellena* L.” Ahi Evran University, International DNADay and Genome Congress, April 24-28 2017, KIRŞEHİR, TURKEY.

