

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

VIGS TABANLI STTM YAKLAŞIMIYLA MISIR (ZEA MAYS)
YAPRAĞININ SOĞUK STRESİNE VERDİĞİ YANITTA ZMA-MIR408
VE HEDEFLEDİĞİ GENLERİN İŞLEVLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BURAK AKGÜL

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. FATMA AYDINOĞLU

OCAK 2025

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**VIGS TABANLI STTM YAKLAŞIMIYLA MISIR (ZEA MAYS)
YAPRAĞININ SOĞUK STRESİNE VERDİĞİ YANITTA ZMA-MIR408
VE HEDEFLEDİĞİ GENLERİN İŞLEVLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BURAK AKGÜL

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. FATMA AYDINOĞLU

OCAK 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**EVALUATION OF MIR408 AND ITS TARGET GENES
FUNCTION ON LEAF GROWTH RESPONSE TO COLD
STRESS BY VIGS-BASED STTM APPROACH**

BURAK AKGÜL

A THESIS OF DOCTORATE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. FATMA AYDINOĞLU

JANUARY 2025

DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 30/12/2014 tarih ve 2014/68 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/01/2025 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Burak AKGÜL'ün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Fatma AYDINOĞLU

ÜYE

: Prof. Dr. Yelda Özden ÇİFTÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Bahar SOĞUTMAZ ÖZDEMİR

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Stuart James LUCAS

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR



Aileme

ÖZET

miR408, bir çok bitkide bakır (Cu) metabolizmasında yer alan genleri düzenlediği bilinen korunmuş bir bitki mikro RNA (miRNA) ailesidir. Bununla birlikte, miR408'in soğuk stresi altında mısır yaprağı büyüme ve gelişiminin düzenlemesindeki işlevi tanımlanmamıştır. Bu çalışmada, endojen zma-miR408, kısa ardışık hedef taklit (STTM) ve Virüsle indüklenmiş gen susturma (VIGS) yaklaşımları birlikte kullanılarak geçici olarak susturulmuştur. Bu amaçla, STTM-miR408a/b tasarlanmış, sentezlenmiş ve Brome mozaik virüsü (BMV) tabanlı bir vektöre klonlanmıştır. Ardından bu vektör, agroinfiltrasyon ile *Nicotiana benthamiana* ara konakçı bitkisinde çoğaltılmasının ardından elde edilen floem öz suyu ile mısır fidelerine yaprak uçlarından uygulanmıştır. Daha sonra, STTM-miR408a/b ve boş vektör ile muamele edilen ve sırasıyla STTM ve BV olarak adlandırılan deney ve kontrol gruplarında yetiştirilen fideler soğuk stresine (S) maruz bırakılmış ve fidelerin büyüme tepkisi morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve transkripsiyonel seviyede incelenmiştir. Sonuç olarak, STTM-miR408a/b muamelesinin endojen mir408a/b ifadesini başarılı bir şekilde susturduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, *in silico* analizler ile tahmin edilmiş zma-miR408a/b hedefleri olan Basic blue protein (BBP) ve Blue copper protein (BCP) ifadelerinin, STTM ve STTM^S gruplarında BV ve BV^S gruplarına kıyasla antagonistik olarak düzenlendiği ve transkripsiyon seviyelerinin arttığı saptanmıştır. Öte yandan, miR408'in varsayılan hedefi olan Lakkaz (LAC22) geni STTM grubunda BV grubuna kıyasla ifadesi artarken, BV^S ve STTM^S grupları arasında önemli bir fark ortaya çıkmamıştır. STTM-miR408a/b muamelesi mısır bitkisinin ikinci ve üçüncü yapraklarının uzama oranı (YUO)'nda sırasıyla %10 ve %19 azalışa neden olmuştur. Ayrıca, Katalaz (CAT) ve Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi STTM, BV^S ve STTM^S gruplarında %57 oranında, BV^S ve STTM^S gruplarında ise sırasıyla %29 ve %28 oranında azalırken, Askorbat peroksidaz (APX) BV^S ve STTM^S gruplarında %15 oranında artmıştır. Bu bulgular, miR408'in, hedeflediği BBP, BCP ve LAC genlerinin ifadesini ve dolaylı olarak antioksidan sistemi düzenleyerek mısır yaprağının soğuk stresi toleransı sırasında rol oynadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Soğuk Stresi, miRNA, Mısır Yaprak Büyümesi, Kısa Ardışık Hedef Taklidi, Virüsle İndüklenmiş Gen Susturma

ABSTRACT

miR408 is a conserved plant micro RNA (miRNA) family that is known to regulate genes involved in copper metabolism. However, the function of miR408 in maize leaf growth regulation and development under cold stress isn't defined. In this study, endogenous maize zma-miR408 was transiently silenced by using Virus-induced gene silencing (VIGS) combined with Short tandem target mimic (STTM) approaches. To this end, STTM-miR408a/b was designed, synthesized, and cloned into a Brome mosaic virus (BMV)-based vector. It was agroinfiltrated into *Nicotiana benthamiana* as an intermediate host to amplification, collected with phloem sap and applied into the second leaf of maize seedlings. Subsequently, STTM-miR408a/b (STTM) and mock-treated (BV) seedlings were subjected to cold stress (S) and the growth response of the seedlings was monitored morphologically, physiologically, biochemically and transcriptionally. Finally, STTM-miR408a/b-treatment successfully downregulated the expression of endogenous mir408a/b and upregulated their putative targets Basic blue protein (BBP) and Blue copper protein (BCP) antagonistically in the STTM and STTM^S groups compared to BV and BV^S groups. On the other hand, their putative target Laccase (LAC22) was upregulated in the STTM group compared to the BV group, but there were no significant expression differences between the BV^S and STTM^S groups. The elongation rate of the STTM-miR408a/b-treated second and third leaves was reduced by 10% and 19% resulting in 19% and 11% shortening, respectively. Furthermore, the activity of Catalase (CAT) and Glutathione reductase (GR) was decreased by 57% in STTM, BV^S and STTM^S groups and 29% and 28% in the BV^S and STTM^S groups and Ascorbate peroxidase (APX) was increased by 15% in BV^S and STTM^S groups, respectively. These findings illuminated miR408 role in the maize leaf growth response during cold stress tolerance via regulation of expression of BBP, BCP ve LAC genes and antioxidant system.

Keywords: Cold Stress, miRNA, Maize Leaf Growth, Short Tandem Target Mimic, Virus-Induced Gene Silencing

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi, değerlendirilmesi sırasında her zaman her türlü bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen, teşvik ve özveride bulunan danışman hocam Doç. Dr. Fatma AYDINOĞLU'na; uzun süre birlikte aynı labı paylaştığımız Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye ve ekibine; tez çalışmamda yaptığı katkılardan ötürü Prof. Dr. Nuri ÖZTÜRK'e ve ekibine; eğitimim sırasında ders aldığım, bir şeyler öğrendiğim bütün hocalarıma; son olarak sınırsız destekleri, anlayışları ve sabırları için aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xviii

1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin amacı, katkısı ve içeriği	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Mısır (<i>Zea mays</i> L.)	6
2.2. Mısır Yapragının Büyüme ve Gelişimi	7
2.3. Bitkilerde Soğuk Stresi	9
2.4. MikroRNA'lar	10
2.5. Bitki miRNA'larının Biyosentezi	11
2.6. Bitki miRNA'larının Bitki Fizyolojisindeki Roller	13
2.7. Bitki miRNA'larının Stres Faktörlerine Etkisi	14
2.8. Bitkilerde Soğuk Stresinde miRNA'ların Rolü	18
2.9. Bitkilerde Savunma Sistemi	19
2.10. Genetik Modifikasyon Metotları	20
2.11. Virüsle İndüklenen Gen Susturma (VIGS)	23
2.12. Kısa Ardışık Hedef Taklidi (Short Tandem Target Mimic; STTM)	26
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	29
3.1. Bitki Materyali ve Büyüme Şartları	29
3.2. Mısır Fidelerine Soğuk Stresi Uygulaması	29
3.3. <i>E. coli</i> ve <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Kompetant Hücre Hazırlama	30
3.4. BMV Vektörlerinin Çoğaltılması ve Transformasyonu	30
3.5. BMV Vektörlerinin Kesim Enzimleri Kullanılarak Doğrulanması	31
3.6. <i>Nicotiana benthamiana</i> Phytoene Desaturase (Nb_PDS) Geninin Çoğaltılması	31
3.7. Nb_PDS Geninin VIGS Vektörüne Klonlanması	33
3.8. Nb_PDS Susturma Vektörünün Kesim Enzimleriyle Doğrulanması	34
3.9. Nb_PDS içeren VIGS Vektörünün <i>E. Coli</i> Dh5α'ya Transformasyonu	34
3.10. Nb_PDS VIGS vektörünün <i>A. Tumefaciens</i> 'e Transformasyonu	34
3.11. Agro-transformantların <i>N. benthamiana</i> bitkisine agroinfiltrasyonla aktarımı	35
3.12. <i>Zea mays</i> Phytoene Desaturase (Zm_PDS) Geninin Çoğaltılması	35

3.13. Zm_PDS içeren VIGS Vektörünün Hazırlanması	35
3.14. Zm_PDS VIGS Vektörünün <i>E. Coli</i> Dh5 α 'ya Transformasyonu	36
3.15. Çalışmada Kullanılacak VIGS Plazmitlerinin <i>A. Tumefaciens</i> 'e Transformasyonu	36
3.16. Zm_PDS VIGS Vektörünün <i>N. benthamiana</i> Bitkisine Agroinfiltrasyonu	37
3.17. Agroinfiltrasyon Sonrası Floem Özütünün Çıkarılması ve Mısır Fidelerine Uygulanması	38
3.18. miR408'in Hedef Genlerinin <i>in silico</i> Tahmini	38
3.19. miR408 için STTM hazırlanması	39
3.20. STTM ve miR408-VIGS Plazmitinin Kesim Enzimleriyle Doğrulanması	40
3.21. Agroinfiltrasyon, Bitki Floem Özütü Ekstraksiyonu ve Mısır Bitkisine STTM-miR408a/b'nin Aktarımı	40
3.22. Yaprak Uzunluğunun Ölçülmesi ve Yaprak Uzama Oranının Belirlenmesi	41
3.23. Kantitatif RT-PCR Yöntemi ile Transkript Seviyesinin Belirlenmesi	41
3.23.1. Primerlerin Tasarımı	41
3.23.2. RNA izolasyonu	42
3.23.3. cDNA Sentezi	43
3.23.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q-RT-PCR) Yöntemi	44
3.24. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	45
3.24.1. Bitki Yaprak Dokularında Toplam Çözünebilir Protein Ekstraksiyonu ve Miktarlarının Belirlenmesi	45
3.24.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	46
3.24.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	47
3.24.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	48
3.24.5. Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	49
3.24.6. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	49
3.25. İstatistiksel Analizler	49
4. BULGULAR	50
4.1. Gen Klonlanan F3 Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz Kesim Bölgelerinin Doğrulanması	50
4.2. Nb_PDS Geninin F3 vektörüne klonlanması	50
4.3. Nb_PDS Geninin Susturulduğunun <i>N. benthamiana</i> Bitkilerinde Gösterilmesi	51
4.4. Zm_PDS Geninin F3 Vektörüne Klonlanması	53
4.5. Zm_PDS Geninin Susturulduğunun <i>Zea mays</i> Bitkilerinde Gösterilmesi	54
4.6. STTM-miR408'in F3 Plazmitine Klonlanması	56
4.7. STTM-miR408 ile muamele edilmiş mısır fidelerinin soğuk stresine karşı yaprak büyüme tepkisi	57
4.8. miR408 ve Hedeflerinin Ekspresyonları	61
4.9. Antioksidan Enzim Deneyleri	62
5. TARTIŞMA	67

6.SONUÇLAR	74
7.ÖNERİLER	76

KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	85
TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR	86



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Celcius
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
AGO	: Argonaute
APX	: Ascorbate peroxidase
BBP	: Basic blue protein
BCP	: Blue copper protein
BSA	: Bovine serum albumin
CAT	: Katalaz
CDK	: Cyclin dependent kinase
cDNA	: Komplementer DNA
cm	: Santimetre
DCL	: Dicer like enzyme
ddH ₂ O	: Çift distile su
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTP	: Deoxynucleotide
EDTA	: Ethylene diamine tetra acetic acid
EtOH	: Etil alkol
g	: Gram
GR	: Glutathione Reductase
GRF	: Growth regulating factor
GSSG	: Glutathione Disulfide
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KH ₂ PO ₄	: Potasyum fosfat
lux	: Lüks
M	: Molar
mg	: Miligram
miRNA	: mikroRNA
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MnCl ₂	: Mangan klorür
mRNA	: Mesajcı RNA
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NBT	: Nitroblue tetrazolium
nt	: Nükleotit
O ₂	: Oksijen
PDS	: Phytoene desaturase
POX	: Peroksidaz
PVP	: Polyvinylpyrrolidone
q-RT-PCR	: Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RISC	: RNA-induced silencing complex
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reactive Oxygen Species
rpm	: Revolutions per minute
SOD	: Superoxide dismutase
STTM	: Short tandem target repeat

SYO	: Son yaprak uzunluğu
UTR	: Translasyona uğramayan bölge
VİGS	: Virüsle indüklenmiş gen susturma
YUO	: Yaprak uzama oranı



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Bitki apikal meristemindeki büyüme bölgelerinin lateral kesitinin mikroskopta leteral kesit görüntüsü. SAM: Sürgün apikal meristem, P1: Plastokron1, P2: Plastakron2, P3: Plastakron3 (Strable ve Nelissen, 2021)	9
Şekil 2.2: Mikro RNA (miRNA)'lar çekirdek hücre nükleusu içerisinde DNA'da bulunan kendi gen bölgelerinden RNA polimeraz 2 ile transkribe olurlar. Üretilen öncü primer (primer) miRNA (pri-miRNA), Drosha enzimiyle kesilerek prekürsör miRNA (pre-miRNA) haline gelir. Pre-miRNA exportin isimli protein ile çekirdek nükleus dışarısına çıkartılır. Dicer endonükleaz enzimleriyle proteinleri ile kesime uğratılarak çift zincirli dubleks oluşur. Zincir açılarak son halini alan olgun miRNA'lar RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC)'ne yüklenerek hedeflediği mRNA'ya baz eşleşmesi ile bağlanarak translayonunu engeller ya da degradasyonuna sebep olur.	13
Şekil 2.3: Biyoteknolojik yaklaşımlar yoluyla mahsul geliştirme stratejileri. (a) Aşırı ekspresyon, proteine çevrilebilen hedef genin daha fazla transkripsiyonuna yol açar; b) RNA interferansı, hedef genin aşağı regülasyonuna yol açar; c) CRISPR / Cas9 yoluyla gen düzenleme, hedef bölgede mutasyonlara yol açan ekleme veya silmelere yol açar)	22
Şekil 2.4: VIGS uygulamasının şematik olarak gösterimi. Susturulmak istenen gene ait cDNA elde edilir ve vektörüne hedeflenen gen aktarıldıktan sonra, modifiye edilmiş vektör <i>Agrobacterium</i> 'a transforme edilir. Agrotransformantlar çalışmada kullanılacak bitkiye agroinfiltrasyon işlemi ile aktarılır. VIGS vektörü bitki içerisinde çoğalarak, gen susturmada görev yapan siRNA'lar üretilir. siRNA'lar hedef geni baz eşleşmesi ile bağlanarak sustururlar. VIGS plazmidinde bulunan viral genler, bitki içerisinde sistemik yayılmayı indükleyerek susturmanın yayılmasını sağlar.	24
Şekil 2.5: Kısa ardışık hedef taklidi (Short Tandem Target Mimic; STTM)'in şematik görünümü. STTM, 48-88 nt'lik bağlayıcı bir ara parça ve iki adet hedef miRNA'ya özel olarak tasarlanmış miRNA bağlanma bölgesi içerir.	27
Şekil 3.1: <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkilerine şırınga ile yapraklarının adaksiyal bölgesine agroinfiltrasyon uygulaması	37
Şekil 4.1: F3 vektörünün, <i>Nco</i> I ve <i>Avr</i> II kesim enzimleriyle lineer hale getirilip kesim noktalarının doğrulanması.	50

Şekil 4.2: PCR sonucu <i>NcoI</i> ve <i>AvrII</i> kesim bölgelerini içeren <i>N. benthamiana</i> PDS geninin %1'lik agaroz jelde boyutunun doğrulanması (a). (1. Kuyu: 100 bp ladder, 3. Kuyu: Nb_PDS geni). Nb_PDS genini içeren F3 vektörünün <i>NcoI</i> ve <i>AvrII</i> enzimleriyle kesildikten sonra, %1'lik agaroz jelde yürüterek klonlamanın doğrulanması (b). (1. Kuyu: 100 bp ladder, 2. Kuyu: boş vektör: 4. ve 6. Kuyu: içerisinde PDS geni bulunan vektör)	51
Şekil 4.3: Agroinfiltrasyon uygulanan <i>N. benthamiana</i> yapraklarının gün bazlı fenotipik değişimleri. (a:1. gün, b:3. gün, c: 6. gün, d 7. gün. +: yaprağın adaksiyal bölgesi. -: yaprağın abaksiyal bölgesi)	52
Şekil 4.4: <i>N. benthamiana</i> bitkisinde agroinfiltrasyon uygulaması sonrasında PDS geninin transkripsiyonunun azalması sonucu gözlemlenen morfolojik değişimler. (a: agroinfiltrasyon uygulandıktan 4 gün sonra yapraklardaki gözlemlenen kloroz, b: agroinfiltrasyon uygulandıktan bir hafta sonra yapraklarda gözlemlenen kloroz)	52
Şekil 4.5: <i>N. benthamiana</i> bitkisinde agroinfiltrasyon uygulamasından on gün sonra gözlemlenen sistemik yayılma (a: beşinci yaprakta görülen mozaik kloroz, b: bitkinin tamamında gözlemlenen değişimler, c: altıncı yaprakta görülen mozaik kloroz)	53
Şekil 4.6: <i>N. benthamiana</i> bitkisinde agroinfiltrasyon uygulaması sonrasında PDS geninin nispi transkript miktarının düştüğünün qRT-PCR yöntemi ile gösterilmesi (n=12, ortalama±se, **= Student t-testine göre P<0,01).	53
Şekil 4.7: <i>Z. mays</i> PDS geninin PCR sonrası %1'lik agaroz jelde boyutunun doğrulanması	54
Şekil 4.8: <i>Z. mays</i> fideleri üzerinde VIGS uygulaması. Floem özütü verilmiş yaprak + ile işaretlenmiştir (a,b: susturma sinyalinin üst yaprağa sistematik hareketi, +: Floem özütü verilmiş yaprak).	55
Şekil 4.9: VIGS uygulaması sonrasında <i>Z. mays</i> PDS geninde görülen susturma etkisi (**= Student ttestine göre P<0,01).	55
Şekil 4.10: F3 plazmidi içerisine klonlanan STTM-miR408a/b'nin <i>NcoI</i> ve <i>AvrII</i> kesim enzimleriyle doğrulanması	58
Şekil 4.11: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin ikinci yapraklarının uzama oranları (YUO). Boş (BV: Boş vektör ile muamele edilen grup), STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, (STTM), S: Soğuk stresi. Soğuk Boş (BVS), Soğuk STTM (STTMS) gruplarında yetiştirilen mısır fidelerinin ikinci yapraklarının uzama oranı (n=12, ortalama±standart hata, * tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma analizine göre gruplar arasındaki farkı göstermektedir P<0,05).	57
Şekil 4.12: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin ikinci yapraklarının son uzunluğu. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma analizine göre gruplar arasındaki farkı göstermektedir).	58

Şekil 4.13: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin üçüncü yapraklarının uzama hızı. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, * Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. P<0,05).	59
Şekil 4.14: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin üçüncü yapraklarının son uzunluğu. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, Harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. P<0,05).	60
Şekil 4.15: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin ikinci yapraklarında miR408 ve tahmini hedefleri olan Basic Blue Protein (BBP), Blue Copper Protein (BCP), Lakkaz (LAC) genlerinin ifade seviyeleri. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, Student t testi’ne göre belirlenmiştir. * P<0,01).	61
Şekil 4.16: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin yapraklarında katalaz (CAT) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, Harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. P<0,05).	62
Şekil 4.17: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata. Harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. P<0,05).	63
Şekil 4.18: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. P<0,05).	64
Şekil 4.19: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin peroksidaz (POX) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir.	65

Şekil 4.20: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. $P<0,05$).

66



TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: <i>Nicotiana benthamiana</i> PDS geninin sentezi için kullanılan PCR Koşulları	33
Tablo 3.2: miR408'in biyoinformatik araçlar kullanılarak elde edilen tahmini hedef genleri	39
Tablo 3.3: Çalışmalarda kullanılmak üzere Tasarlanan primerlerin listesi	43



1. GİRİŞ

Mısır (*Zea mays*), hayvan yemi, insan gıdası ve endüstriyel hammadde olarak kullanımı nedeniyle sürekli artan bir ekonomik öneme sahiptir (Özcan, 2009). Ayrıca, kamuya açık bol miktarda deneysel kaynağa sahip ideal bir genetik sistemdir (Nannas ve Dawe, 2015). Bununla birlikte, mısırdaki biyotik ve abiyotik stres faktörlerine bağlı verim kaybı, iklim değişikliğinin bir sonucu olarak önemli bir endişe kaynağıdır. Özellikle soğuk stresi mısır yetiştiriciliğini tehdit eden ana stres faktörlerinden biridir, çünkü tropikal kökeni nedeniyle azalan sıcaklığa duyarlıdır.

0-15 °C arasındaki düşük ve dondurucu olmayan sıcaklıklar bitkiler için önemli bir stres faktörüdür ve bitki türlerinin verimliliğini, hayatta kalmasını ve ekolojik dağılımını etkileyerek onların büyüme ve gelişimlerini olumsuz yönde etkiler hatta ölümlerine sebep olabilir (Adhikari vd., 2022). Soğuk stresi, membran bütünlüğünü bozarak fotosentez, kök fonksiyonu, su ilişkileri ve taşıma süreçlerini olumsuz etkiler (Janowiak ve Markowski, 1994, Sowinski, 1995, Richner vd., 1996, Thomashow, 1999). Sonuç olarak, hücre bölünmesi ve hücre genişlemesi olan büyüme mekanizmalarının engellenmesi nedeniyle organ boyutu azalır ve verim kaybına yol açar (Rymen vd., 2007, Sprangers vd., 2016). Birçok çalışma, mısırın soğuğa karşı toleransının özellikle erken büyüme aşamasında değerlendirilerek soğuğa karşı iklimlendirilmesinin öneminin altını çizmektedir (Bhosale vd., 2007).

Fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyelerde düşük sıcaklığa karşı bitki stres tepkisi, birçok gen kullanılarak genetik olarak iyi kontrol edilir (Shahzad vd., 2024). Yanıt, plazma membranında bulunan Ca^{2+} akış kanalları ve reseptör bağlantılı proteinler tarafından soğuk stresinin tanınmasıyla başlatılır. Bu proteinler arasındaki etkileşim, fosforilasyon yoluyla sinyal iletim yollarını korur ve kalsiyum sinyallerinin transkripsiyon faktörlerinin ve COR genlerinin (soğukta düzenlenen genler) aktivasyonuna iletilmesini kolaylaştırır. DEAR1 (dehydration-responsive element binding protein ve EAR motif protein), DREB (Dehydration responsive element-binding), ZF (zinc finger), CZF2 (C2H2 zinc finger), ZAT10(zinc finger protein) ve AZF2 (Arabidopsis zinc-finger protein) dahil olmak üzere C-tekrar Bağlayıcı Faktör/Dehidrasyona Duyarlı Element Bağlayıcı faktörler (CBF/DREB), birçok COR geninin ekspresyonunu ve ardından kriyoprotektan birikimini düzenleyen ana transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmıştır (Liu vd., 2019). Bitkilerde soğuk

stresinde, reaktif oksijen türleri (ROS) yükselir. ROS, birikimi ile daha yüksek soğuk toleransı arasındaki pozitif korelasyon nedeniyle stres toleransında kritik bir role sahiptir (Zhang vd., 2016). Ancak, ROS'un soğuk stresi sırasında ikili bir rolü vardır. Biriken ROS hücrelere zarar verirken, azalan miktarı çeşitli stres tepkilerini tetiklemek için bir sinyal görevi görür.

Soğuk stresine duyarlı genler genetik olarak hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel olarak düzenlenir. Gen düzenleyici unsurlardan biri de kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) sınıfına ait olan mikro RNA (miRNA) genleridir. miRNA'lar 20-24 nükleotid (nt) uzunluğundadır ve hedef transkriptin bozulması veya translasyonel inhibisyonu ile sonuçlanan dizi tamamlayıcılığı yoluyla hedef mRNA'lara bağlanarak gen ifadesini düzenler. RNA polimeraz II tarafından promotorlarından transkribe olurlar ancak proteinlere kodlanmazlar (Kong ve Han, 2005, Chiou vd., 2006, Zhang vd., 2022). Hedef genlerin susturulması yoluyla bitki büyümesi, gelişimi ve biyotik ve abiyotik stres toleransı gibi çok sayıda temel biyolojik süreçte düzenleyici olarak gösterilmişlerdir (Aydinoglu ve Lucas, 2019; Aydinoglu ve Kuloglu, 2023). Görev aldıkları mekanizmalar arasında, hücre farklılaşması, hormonal sinyalizasyon ve yaprak, gövde ve köklerin büyümesinin yanı sıra organ polaritesi ve organ farklılaşmasını da vardır (Phillips vd., 2007, Lu v., 2008, Khraiweh v., 2012; Sunkar ve Jagadeeswaran, 2012). Örneğin, miR408'in abiyotik stres ve Cu metabolizma yollarına katıldığı bildirilmiştir.

miR408, Uclacyanin (UCL), Plantacyanin (PCY) dahil olmak üzere hedef genlerin aşağı regülasyonu yoluyla bitki vejetatif büyümesinin, üreme gelişiminin ve stres tepkisinin bir düzenleyicisi olarak gösterilmiştir (Gao vd., 2022). Wen ve arkadaşları (2024) miR408-3p veya UCL7'yi aşırı eksprese eden pirinç varyantı üzerinde bir ısı stresi deneyi gerçekleştirmiştir. MiR408'in aşırı ekspresyonunun kuru ağırlığı, tane verimini, ATP seviyesini ve fotosentezi artırdığı görülmüştür. Bununla birlikte, H₂O₂ miktarını, antioksidan enzimin aktivitesini ve ATPaz'ı UCL7 genini aşırı eksprese eden pirinç fidelerine kıyasla azalttığı gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada, miR408'in tohum çimlenmesini engelleyen mavi bakır proteini (PCY) ile arasındaki negatif ilişki açığa çıkarılmıştır. (Jiang ve ark., 2021). Bu düzenlemede, ışıkla indüklenen çimlenme baskılayıcı Fitokrom Etkileşen Faktör 1 (PIF1)'in, miR408 promotoruna bağlanarak miR408 ekspresyonunu baskıladığı ve PCY miktarında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Burada anlatılan biyolojik işlevdeki kritik rolüne rağmen,

miR408'in soğuk stresi altında mısır yaprağı büyüme düzenlemesindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.

miRNA'ların işlevsel çalışmaları, küçük boyutları (~20 nt), çoklu eşzamanlı biyolojik işlevleri ve çok az sayıda doğal işlev kaybı mutantı nedeniyle bazı dezavantajlara sahiptir (Sieber vd., 2007). miRNA işlevini incelemek için tipik olarak kullanılan yöntemler, miRNA'nın veya hedeflediği genin aktivitesini kısıtlamayı ve miRNA'yı veya hedef genlerini aşırı eksprese etmeyi gerektirir (Gupta vd., 2020). Bununla birlikte, bir miRNA'nın aşırı ekspresyonu miRNA işlevini tam olarak ayırt edemez. Benzer şekilde, degradesyona dirençli hedeflerin aşırı eksprese edilmesi, tek bir miRNA'nın birden fazla hedefinin bulunması nedeniyle miRNA'ların işlevini ortaya çıkarmayabilir. Bu nedenle, miRNA'ların endojen miRNA'lara kısmen tamamlayıcı sekansa sahip olan hedef tuzaklar/mimikler tarafından çekilmesi yoluyla miRNA'ların susturulması ideal bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. miRNA'ları işlevleri sırasında susturmak için kullanılan yaygın yöntemler arasında miRNA hedef taklidi (TM) (Franco-Zorrilla vd., 2007), kısa tekrarlı hedef taklidi (STTM) (Yan vd., 2021), virüsle indüklenmiş gen susturma (VIGS (Sha vd., 2014), TALEN tabanlı gen susturma yöntemleri (Kim vd., 2013) ve CRISPR/cas9 (Chang vd., 2016) bulunmaktadır. Bunlar arasında STTM yöntemi, miRNA bağlanma bölgelerinin hedef miRNA'ların bozulmasını veya tasarlanan tuzaktan ayırlamamasını sağladığı için miRNA araştırmalarında kullanışlı bir yöntemdir (Teotia vd., 2016).

Virüsle enfekte olmuş bitkilerde, viral RNA'ya karşı bir RNA aracılı savunma mekanizması tetiklenir (Voinnet, 2001). Bu doğal yoldan yola çıkarak VIGS yöntemi icat edilmiştir. VIGS terimi ilk defa, viral enfeksiyona karşı bağışıklığı tanımlamak için van Kammen (1997) tarafından türetilmiştir. Son zamanlarda VIGS, transgen RNA'nın yerleştirilmesi için bir vektör olarak modifiye edilmiş bir viral vektör tarafından konak gen ifadesinin aşağı düzenlenmesini tanımlamak için kullanılmıştır (Ding vd., 2018, Zhou vd., 2018, Peng vd., 2018, Yang vd., 2018). Bir hücrenin viral bir vektörle enfeksiyonu, tek sarmallı viral RNA'nın geri katlanmasıyla veya virüs replikasyonu sırasında viral RNA'ya bağımlı bir RNA polimerazın aktivitesi yoluyla üretilen çift sarmallı RNA (dsRNA) yoluyla RNA interferansı (RNAi) mekanizmasını tetikler (Romano ve Macino, 1992, Fire ve ark., 1998). Daha sonra, dsRNA, RNase III tipi dicer benzeri endonükleaz tarafından küçük müdahaleci RNA'(siRNA'lara (21 ila 25 nükleotid uzunluğunda) bölünür. Dupleks açılır ve ortaya

çıkan tek zincirli siRNA'lar, RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) dahil edilir. Son olarak, siRNA'lar RISC'yi tamamlayıcı hedef mRNA'ya bağlanmaya yönlendirir ve bu da kesme veya translasyonel inhibisyon yoluyla gen susturulmasına yol açar. VIGS, geçici gen susturulmasına neden olan hızlı, etkili ve spesifik sistemi sayesinde diğer devre dışı bırakma stratejilerine göre birçok avantaja sahiptir. Çeşitli bitki türlerinde gen işlevini karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Ayrıca, özellikle stabil bir şekilde dönüştürülmesi zor olan monokotil türler için bitkilerde yüksek verimli fonksiyonel genomik çalışmalar için de faydalıdır (Simon vd., 2011; Zhou vd., 2018, Khraiwesh vd., 2012, Peng vd., 2018). VIGS yaklaşımları ayrıca seçili bitki miRNA'larının *in vivo* aktivitesini etkili bir şekilde engellemek için de kullanılmıştır (Sunkar vd., 2007; Simon ve Meyers, 2011).

Birçok bitki virüsü, bitkilerde geçici gen ifadesi veya susturma için vektör olarak geliştirilmiştir. Çoğu VIGS vektörü dikotiledonlarda, çok azı monokotiledonlarda ve özellikle buğday bitkilerinde uygulanmıştır (Yang vd., 2018). Bromoviridae ailesine ait olan brom mozaik virüsü (BMV), mısır, arpa, pirinç, buğday ve sorgumu enfekte etme kabiliyeti nedeniyle monokotiledonların genetik modifikasyonu için modifiye edilmiştir. (Dinant vd., 1993, Ding vd., 2018, He vd., 2021). Ayrıca, karşılaştırılabilir genom yapıları, gen ifadesi stratejileri ve protein işlevlerine sahip olan alfavirüs benzeri süper ailenin bir temsilcisidir (He vd., 2021). Enfeksiyon semptomları yaprak mozağına, klorozise ve bodurluğa neden olur. Buğdayda enfeksiyon, bitki boyunda ve kardeş sayısında azalmaya neden olur ve tane verimini %61'e kadar azaltabilir (Hodge vd., 2019). BMV, çapı yaklaşık 28 nm olan ikosahedral parçacıklar içinde kapsüllenmiştir. Viral genom organizasyonu üçlüdür ve RNA1, metiltransferazlara ve C-terminal helikazlara (Me/He) homolog olan N-terminal alanlara sahip 1a proteinini kodlar. RNA2, RNA'ya bağımlı bir RNA polimeraz (RdRp) alanı içeren 2a proteinini kodlar (Dinant vd., 1993). 2a proteininin merkezi bölgesi, RdRp enziminin katalitik bir bölgesi olarak görev yapan korunmuş ve farklı bir glisin-aspartik asit-aspartik asit (GDD) motifini kapsar (Kamer ve Argos, 1984). Hücreden hücreye hareket için gerekli olan hareket proteini (MP) ve coat proteini (CP) için kodlama dizileri, sırasıyla RNA3'ün 5' bölgesinde ve RNA3'ün 3' ucundan üretilen subgenomik RNA4'te yer almaktadır. Her bir RNA, 5' ucunda viral genom bağlantılı bir protein (VPg) ve oldukça korunan 3' tRNA benzeri bir yapı içerir (He vd., 2021).

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Mısır bitkisi, geniş bir kullanım alanına sahip önemli bir tarım ürünüdür. Ancak düşük sıcaklıklara duyarlılığı nedeniyle, soğuk stresi koşulları büyüme inhibisyonuna ve verim kayıplarına yol açar. Bu nedenle, dayanıklı çeşitler geliştirmek için soğuk stres toleransı sırasında mısır büyüme düzenlemesinde yer alan genlerin işlevini belirlemek önemlidir. miR408'in aralarında soğuk stresinin de olduğu çeşitli stres koşulları altında gen düzenlemesinde işlev gördüğü gösterilmiştir. Ancak, soğuk stresi altında mısır yaprağı büyüme düzenlemesindeki rolünü ortaya koyan işlevsel çalışmalar eksiktir. Bu nedenle, bu çalışma miR408'i ve *in silico* analizler ile tahmin edilen hedefleri BBP, BCP ve LAC genlerinin, VIGS temelli STTM yaklaşımlarıyla soğuk stresine yanıt olarak mısır yaprağının büyüme düzenlemesindeki işlevlerini değerlendirmeyi amaçlamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mısır (*Zea mays L.*)

Dünya’da ve Türkiye’de geniş alanlarda üretimi yapılan mısır (*Zea mays L.*), buğdaygiller (Poaceae=Gramineae) familyasının bir üyesi olup, yazlık ve tek yıllık bir bitkidir. Mısır bitkisi karbondioksit, güneş ışığı ve suyu C3 bitkilerine göre daha verimli kullanır (Huang vd., 2006). Kökeni ve gen merkezi Amerika olan mısır, Kristof Kolomb’un 1492 yılında Amerika’yı keşfetmesinden sonra dünyaya yayılmaya başlamıştır. 16. yüzyılda ülkemize giren mısır, yüksek düzeyde enerji depolaması, kısa yetiştirme süresi, birim alandan elde edilen yüksek verim ve birçok kullanım alanı nedeniyle önemli bitkilerden biri haline gelmiştir (İdikut vd., 2016). Tek evcikli bir bitki olan mısırın %99’u yabancı döllenenmektedir. (Kırtok, 1998). Bu özelliği nedeniyle mısır, her yeni nesil genotipi oluşturmak için gerekli genleri toplayan bir popülasyon olarak düşünülebilir. Böyle bir popülasyon içindeki her genotip diğerlerinden bir dereceye kadar farklıdır. Her birey yüksek oranda heterozigottur. Her biri kapsamlı bir şekilde çaprazlanır ve her biri farklı yavrular üretir (Cengiz vd., 2013). Mısır, ekonomik önemi sürekli artan bir tarım ürünü olup, çok önemli bir hayvan yemi (tane, silaj, işlenmiş), insan gıdası (un, taze tüketim, konserve, nişasta, cips, çerez, yağ, tatlandırıcı, şekerleme, çikolata, sos, mama) ve endüstri ham maddesi (etanol, alkol, früktoz şurubu, diş macunu, temizlik ürünleri, tekstil, kozmetik) kaynağıdır. (Özcan, 2009).

Beklenen nüfus artışı, iklim değişikliği ve azalan tarım arazileri göz önüne alındığında, artan verim talebini karşılamak için mahsullerde genetik iyileştirmeye acil bir ihtiyaç vardır. Devam eden küresel iklim krizi, tarım arazilerindeki sürekli azalma ve hızlı nüfus artışı göz önüne alındığında, mahsul verimi için mevcut yörünge, 2050 yılına kadar dünya nüfusunu beslemek için yetersizdir (Bailey-Serres vd., 2019). İnsan tüketimi, hayvan yemi ve çeşitli endüstriyel kullanımlar dahil olmak üzere çeşitli uygulamalara sahip önemli bir temel gıda ve yem bitkisi olan mısırın, dünya çapındaki gıda talebini karşılamak için yüksek kaliteli çeşitlerinin ıslah yoluyla veriminin artırılmasını gerektirmektedir (Wang vd., 2023). Bu hedefe bitki fizyolojisi, genetik ve biyoteknoloji gibi çeşitli disiplinleri entegre eden genetik ürün geliştirme yoluyla ulaşılabilir (Gupta ve Salgotra, 2022). Hibrit ıslahı, mutageniz ıslahı, markör destekli

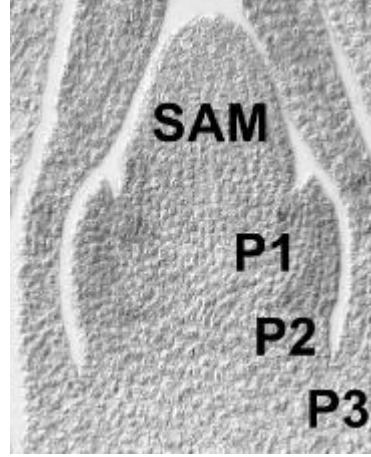
ıslah ve genetik modifikasyon dahil olmak üzere mevcut mısır ıslahında, öncelikle agronomik özellikleri geliştirmek için genetik varyasyonlardan yararlanmaya odaklanılmaktadır. Bu yaklaşımlar mısır ıslahındaki ilerlemeyi hızlandırmış olsa da genetik tabanın daraltılması ve genetik çeşitliliğin azaltılması, sonuçta verimle ilgili birçok özelliğin iyileştirilmesi potansiyelinin sınırlandırılması konusunda endişeler ortaya çıkmıştır (Dalakouras ve Vlachostergios, 2021).

Mısır, gelişmiş dizileme ve haritalama kaynaklarına sahip birkaç önemli tahıl ürününden biridir. Gramene veribankası (<http://www.gramene.org>) (Monaco ve ark. 2014), genom çapında karşılaştırmalara adanmış çevrimiçi bir kaynaktır. Mısır Genetik ve Genomik Veritabanı (MaizeGDB) (<http://www.maizegdb.org>) (Lawrence vd., 2008) ise mısır bitkisine ait genetik haritalar, mutasyonlar ve aleller hakkında bilgiler ve genetik stoklar için tohum talebine doğrudan erişim içerir. Mısır Genetiği İş birliği Bülteni (<http://mnl.maizegdb.org/>) ise, son zamanlarda yayınlananlar da dahil olmak üzere mısırla ilgili birçok hakemli yayının listesini içerir; bu bülten, dünyanın dört bir yanındaki mısır laboratuvarlarında devam eden çalışmalar hakkında yıllık gayri resmi bir iletişim yayınıdır. Bütün bu veri bankaları, karşılaştırmalı haritalama, mutant fenotipleri ve kantitatif özellikleri yorumlarken son derece yararlı olmaktadır.

2.2. Mısır Yaprağının Büyüme ve Gelişimi

Hayvanların aksine, bitki gelişimi büyük ölçüde embriyonik dönem sonrasında gerçekleşir. Kökler, gövdeler, yapraklar ve çiçekler gibi yeni organlar, hücre büyümesi ve farklılaşmasının ardından yaşam boyu yinelenen hücre bölünmelerinden kaynaklanır. Bu tür hücre bölünmeleri meristem olarak bilinen özelleşmiş bölgelerde meydana gelir. Meristemdeki hücreler pluripotenttir. Yapraklar ve çiçekler sırasıyla sürgün ve çiçek meristemlerinde oluşurken, kök meristemleri büyüyen köke sürekli olarak yeni hücreler ekler. Bitki sürgünleri, kök hücre nişi veya sürgün apikal meristemi (SAM) içinde organojenik bir kök hücre popülasyonunun sürdürülmesi yoluyla yaşam döngüsü boyunca yeni yapraklar, gövdeler ve tomurcuklar geliştirir (Grafı vd., 2004; Steward, 1970). Bitkilerin gelişimi de benzersizdir çünkü bitki hücrelerini çevreleyen sert hücre duvarları herhangi bir hücre göçünü engeller. Sonuç olarak, meristemlerde üretilen hücre sayısı ve hücre bölünme düzlemi gibi yerel hücre bölünme parametreleri, bitki dokularının organizasyonunu belirlemede önemlidir (Inze vd., 2009).

Yapraklar, fotosentez için ışık yakalayan birincil organ olarak hizmet veren bitki için önemli bir organdır (Kellog, 2015). Mısır yaprakları, C4 fotosentezini gerçekleştirmek ve üreme gelişiminden önce bitkiyi desteklemek için inşa edilmiştir. Bu vejetatif faz sırasında bitki biyokütlesinin büyük kısmı, monokotiledon bitkilerin karakteristiği olduğu gibi gövde dokusundan ziyade yaprak tarafından sürdürülür. Sonuç olarak, gelişmekte olan bir mısır bitkisinin neredeyse tüm görünür kısımları, yaprak hücrelerinden ve öncelikle yaprak ayasında fotosentetik bir işleve ve alt kında yapısal desteğe hizmet eden dokulardan oluşur (Sylwester vd., 2009). Mısırdaki hücresel düzen, yaprak başlangıcından olgunluğa kadar, tüm çim yaprakları için tipik olan bir gelişimsel gradyan aracılığıyla korunur. Bu gradyan, gelişmekte olan bir yaprağın tabanından ucuna kadar hücre şekillerindeki karakteristik değişiklikler nedeniyle epidermiste tanımlanabilir. Büyüme gradyanı, yaprak başlangıcı ile ilişkili organ polaritesi ile aynı zamana denk gelmesi de erken dönemde oluşur. Mısırdaki yaprağın fotosentezi, ekim yoğunluğu ve tane verimi yaprak yapısından güçlü bir şekilde etkilenir. Şerit şeklindeki mısır yaprağının bölgeleri özel işlevlere sahiptir. Birincil fotosentetik organ olan distal kanat, gövdeyi saran proksimal kılıf tarafından desteklenir (Strable vd., 2021). Tüm otsu bitkilerde olduğu gibi, mısır yaprakları sürgün apikal meristeminin (SAM) yan tarafında gelişir. SAM'den sonraki yaprak oluşumu olayları arasındaki gelişimsel aralığa plastokron denir. Plastokron indeksleri, SAM'a göre primordialların konumsal bilgilerini sağlar. Plastokron 0 (P0) yeni başlayan primordiumdur, P1 ilk görünür primordiumdur, P2 SAM'dan ikinci primordiumdur ve bu böyle devam eder (Foster vd., 2019). SAM'ın tepesinde, SAM'ın merkezi bölgesini oluşturan yavaş bölünen hücrelerden oluşan bir küme vardır. Bu hücreler daha büyüktür, kök hücre işlevlerine sahiptir ve meristemin bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynar. Bu merkezi bölgedeki hücre çoğalması ve büyüme oranı genellikle periferdekinden önemli ölçüde farklıdır. L1 tabakası, epidermise dönüşen promeristem tabakasıdır. L1 tabakası hücreleri, iç tabaka hücrelerinin bölünme modelini kontrol eder. L2 tabakası üç kısma ayrılır: promeristem alt epidermise, protokambiyum bir damar demetine ve temel meristem tabakası (kısmı) kortikal ve medüller ışıklara dönüşür. L3, bir öze dönüşen temel meristem katmanıdır.



Şekil 2.1: Bitki apikal meristemindeki büyüme bölgelerinin lateral kesitinin mikroskopta lateral kesit görüntüsü. SAM: Sürgün apikal meristem, P1: Plastokron1, P2: Plastakron2, P3: Plastakron3 (Strable ve Nelissen, 2021)

2.3. Bitkilerde Soğuk Stresi

Dünya üzerindeki toplam kara alanının çoğunda (yaklaşık %64) ortalama minimum sıcaklık $<0^{\circ}\text{C}$ 'dir (Rihan vd., 2017). Bununla birlikte, pirinç (*Oryza sativa*), mısır (*Zea mays*), domates (*Solanum lycopersicum*), soya fasulyesi (*Glycine max*) ve pamuk (*Gossypium hirsutum*) dahil olmak üzere birçok ürün soğuk sıcaklıklara uyum sağlama yeteneğinden yoksundur ve yalnızca tropikal veya subtropikal bölgelerde yetişebilir (Chinnusamy vd., 2007). Bu nedenle, soğuk stresi bitki büyümesini ve gelişimini olumsuz yönde etkiler, bitki türlerinin coğrafi dağılımını sınırlar ve dünya çapında mahsul verimini azaltır (Ding vd. 2019).

Stres, biyotik ve abiyotik stresler de dahil olmak üzere bitki metabolizmasını, büyümesini, gelişimini ve ürün verimliliğini kısıtlayan herhangi bir madde veya uyarıcı anlamına gelir (Lichtenthaler, 1998). Soğuk ($0-10^{\circ}\text{C}$) ve donma ($<4^{\circ}\text{C}$) dahil olmak üzere soğuk stresi, bitkilerin büyümesini ve tarımsal verimliliğini olumsuz yönde etkileyen abiyotik bir strestir (Guo vd., 2018; Liu J. vd., 2018). Soğuk stresi genellikle bitki büyümesini ve gelişimini kısıtlar ve bitki hücreleri üzerinde birkaç önemli etkiye sahiptir. İlk olarak, soğuk stresi bitki hücrelerinde membran sertleşmesini etkiler ve bu da bitkilerde büyüme ve gelişimi olumsuz etkileyen soğuk stres tepkilerini tetikleyen birincil olay olarak kabul edilir (Orvar vd., 2000). İkinci olarak, soğuk stresi proteinlerin veya protein komplekslerinin stabilitesini bozar ve

ROS temizleyici enzimler gibi enzimlerin aktivitelerini azaltır. Bu süreçler fotosentezin engellenmesi ve bozulmasının yanı sıra önemli ölçüde membran hasarıyla sonuçlanır (Siddiqui ve Cavicchioli, 2006; Ruelland vd., 2009). Üçüncü olarak, soğuk stresi RNA'da ikincil yapıların oluşumunu desteklediği için gen ifadesini ve protein sentezini etkiler (Rajkowitsch vd., 2007; Ruelland vd., 2009). Donma stresi, bitkiler için soğuk stresinden daha zararlıdır ve hatta bitki ölümüne neden olabilir. 0°C'den düşük sıcaklıklarda hücre içerisinde oluşan buz kristali oluşumları hücrenin membran ve çeper yapısına zarar verip hücre bütünlüğünü bozabileceği gibi metabolik aktiviteleri de sıvı olarak bulunan suyun azalmasından dolayı durma noktasına getirebilir (Pearce, 2001).

2.4. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar (miRNA'lar), hayvanlarda ve bitkilerde yaygın olarak bulunan küçük, kodlamayan bir RNA sınıfıdır. miRNA'lar, hücreler içinde endojen olarak üretilen saç tokası yapılarına sahip transkriptlerden işlenir (Reyes vd., 2009). miRNA'lar tipik olarak sadece 22-24 nükleotid (nt) olmalarına rağmen, çeşitli protein kodlayan genleri etkileyen en bol gen düzenleyici moleküller arasındadır. mRNA'ları hedefleyerek ve onlara bağlanarak okunmalarını engelleyerek veya degradasyonuna neden olarak gen ifadesinin düzenlenmesinde çok önemli rol oynarlar. Bu bağlamda miRNA'lar hücrel farklılaşma, çoğalma ve hayatta kalma dahil olmak üzere sayısız kritik süreçte katılırlar (Rogers vd., 2013). 1993 yılında ilk miRNA olan lin-4, nematod *Caenorhabditis elegans*'ta tanımlanmıştır. Özellikle, lin-4, nükleer protein lin-14'ün ekspresyonunu negatif yönde düzenleyerek *C. elegans*'ta postembriyonik gelişimsel olayların zamanlamasını düzenler (Lee vd., 1993). İlk keşiften yedi yıl sonra, *C. elegans*'ta ikinci bir miRNA olan let-7 keşfedilmiştir (Reinhart vd., 2000). Lin-4'e benzer şekilde miRNA ailesine dahil olan let-7, lin-14, lin-28, lin-41, lin-42 ve daf-12 hedef mRNA'larının 3' çevrilmemiş bölgesine (UTR) bağlanarak nematod gelişimini düzenlerler. *C. elegans*'ta lin-4 veya let-7'nin devre dışı bırakılması, ciddi gelişimsel anormalliklerle sonuçlandığı görülmüştür. Bu veriler miRNA'ların organizma gelişiminde çok önemli rol oynadığını göstermektedir (Vella vd., 2005).

Hayvan miRNA'ları, hücrel aktivitenin temel düzenleyicileri olan (Saliminejat vd., 2019) ve tümör mikro çevresinin analizi de dahil olmak üzere *in vivo* mikro çevrelerin durumunu tespit etmek için biyobelirteç görevi gören evrimsel olarak korunmuş bir

gen sınıfıdır (Yan vd., 2010; Volinia ve vd., 2006; Esquela-Kerscher vd., 2006; Nicoloso vd., 2009; He vd., 2020). Bununla birlikte, bitki ve hayvan miRNA'ları bağımsız olarak evrimleşmiştir ve bu nedenle karşılık gelen dizileri, öncülleri ve olgunlaşma süreçleri bakımından farklılık gösterirler (Huang vd., 2015; Zhang vd., 2012). Bitki miRNA'larının endojen genler üzerindeki düzenleyici etkileri, mahsul büyümesi ve gelişimi üzerinde önemli etkilere sahiptir ve kuraklık, soğuk ve besin eksiklikleri gibi abiyotik stresin yanı sıra patojenler ve zararlı böcekler gibi biyotik strese karşı dirençte önemli roller oynar (Ding vd., 2024). miRNA'ya bağlı türler arası düzenleyici bitki hastalık direnci mekanizmaları da rapor edilmiştir. Örneğin, Zhang ve arkadaşları, pamukta miR166 ve miR159'un, patojenik bakterilere translokasyon yaptığını, patojenitelerini düzenlediğini ve nihayetinde pamuğun *Verticillium dahliae* kolonizasyonunu inhibe ettiğini ve böylece pamuğun bakteriyel enfeksiyona karşı direncini artırdığını bulmuştur (Zhang vd., 2016). Ayrıca Chen ve arkadaşları, pirinçteki miR162a'nın kahverengi çekirge üremesini ve gelişimini susturma yoluyla olumsuz yönde düzenleyebildiğini ve kahverengi çekirge istilasına karşı pirinç savunma sisteminin önemli bir bileşenini temsil ettiğini bulmuşlardır (Chen vd., 2023).

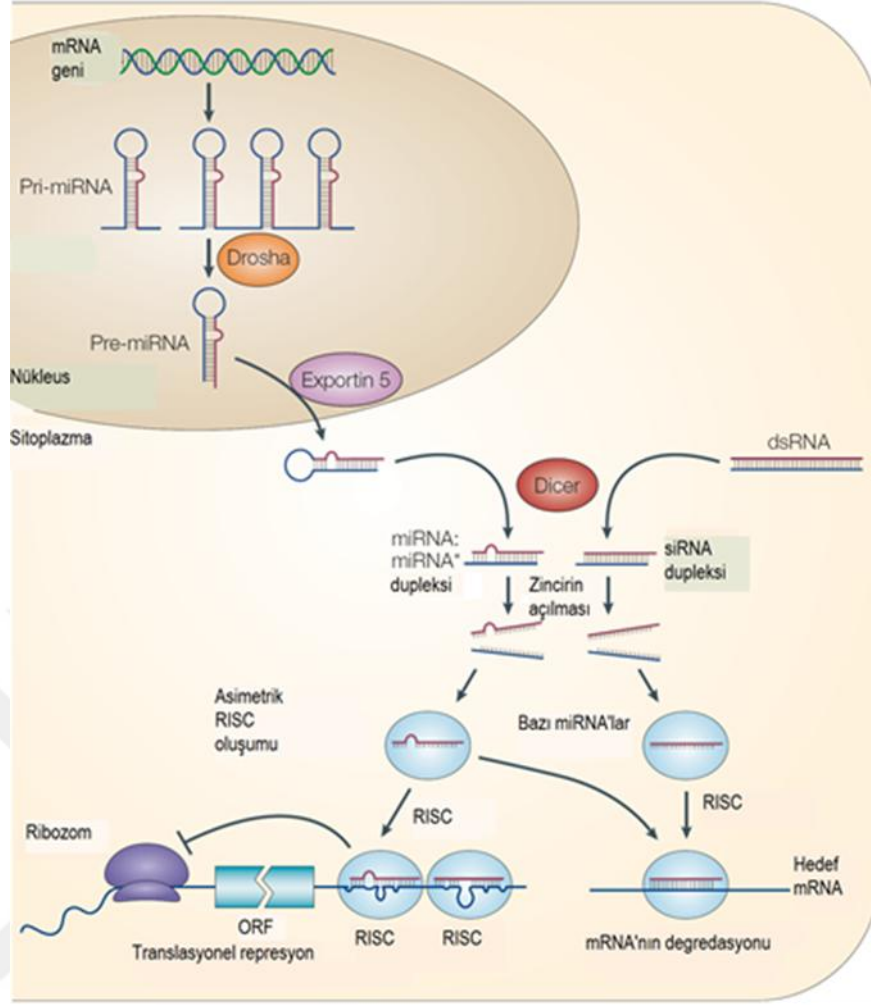
2.5. Bitki miRNA'larının Biyosentezi

Bitki miRNA'ları, transkripsiyon, öncül işleme, metilasyon ve miRNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) 'nin oluşumu kapsayan çok adımlı bir süreçle üretilir. Dize tamamlayıcılığına dayalı olarak miRNA'lar, mRNA bozulmasını, translasyonel baskılamayı ve DNA metilasyonunu doğrudan etkiler (Song vd., 2019). Daha da önemlisi, miRNA üretimi tipik olarak çeşitli türler arasında korunur (Ha vd., 2014).

Bitki miRNA genleri ağırlıklı olarak genomun intergenik bölgelerinde bulunur ve bağımsız transkripsiyonel birimler olarak işlev görür. miRNA promotörleri yapısal olarak protein kodlayan genlerinkine benzer olsa da (Tang, 2010) protein kodlayan genlerin intronik dizilerinde bulunan az sayıda miRNA, konak genleriyle birlikte transkribe edilebilir (Rajagopalan vd., 2006; Yan vd., 2012; Yang vd., 2012). miRNA'ları kodlayan genler, RNA polimeraz II'nin etkisi altında hücrenin nükleusunda transkribe edilir ve yaklaşık birkaç yüz nükleotid uzunluğunda primary miRNA (pri-miRNA)'yı oluşturur (Kim vd., 2011; Xie vd., 2005) (Şekil 2.2). Daha sonra, Dicer benzeri enzim (DCL1), precursor miRNA (pre-miRNA)'yı üretir ve işlemeye devam ederek çift sarmallı mature miRNA (ma-miRNA) oluşturur. Nihai çift

sarmallı miRNA, miRNA metiltransferaz (HEN1) (Kutter vd., 2008) tarafından, her iki sarmaldaki 3' ucunun son nükleotidinde metilasyon modifikasyonuna uğrar (Ji vd., 2012). Çift sarmallı miRNA ve tamamlayıcı ipliği (yani miRNA*), RNA ile indüklenen susturma kompleksindeki (RISC) Argonaute proteinine entegre olur ve kompleksin hedef mRNA dizisini aramasını ve bağlanmasını sağlar. Olgun miRNA'lar daha sonra bir exportin5 homologu olan HASTY tarafından sitoplazmaya taşınır veya ribozomal proteinlere bağlanmadan önce HASTY tarafından sitoplazmaya taşınır RISC gen ifadesini üç mekanizmadan biri yoluyla susturur: (i) protein çeviri düzeyinde müdahale; (ii) transkripsiyon düzeyinde mRNA'yı degrades etme veya (iii) genom düzeyinde heterokromatin oluşumu veya DNA eliminasyonu (Pratt ve MacRae, 2009; Ding vd., 2024).





Şekil 2.2: Mikro RNA (miRNA)'lar çekirdek hücre nükleusu içerisinde DNA'da bulunan kendi gen bölgelerinden RNA polimeraz 2 ile transkribe olurlar. Üretilen öncü primer (primer) miRNA (pri-miRNA), Drosha enzimiyle kesilerek prekürsör miRNA (pre-miRNA) haline gelir. Pre-miRNA exportin isimli protein ile çekirdek nükleus dışarısına çıkartılır. Dicer endonükleaz enzimleriyle proteinleri ile kesime uğratarak çift zincirli dubleks oluşur. Zincir açılarak son halini alan olgun miRNA'lar RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC)'ne yüklenerek hedeflediği mRNA'ya baz eşleşmesi ile bağlanarak translayonunu engeller ya da degradasyonuna sebep olur.

2.6. Bitki miRNA'larının Bitki Fizyolojisindeki Roller

Bitki miRNA'ları, bitki gelişimi, metabolizma, abiyotik strese yanıtlar ve patojenlere karşı savunma dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde önemli düzenleyici roller oynar. Bu miRNA'lar dahili bitki sinyalizasyonunu ve metabolik yolları etkili bir şekilde yeniden kalibre edebilir, gen ifadesini düzenleyebilir ve gen tepkilerini modüle

edebilir (Gong vd., 2015). Ek olarak, bitki miRNA'ları patojenlerde, özellikle direnç özellikleriyle ilgili gen ekspresyonunu inhibe edebilir, böylece bitkilerin enfeksiyona direnme kabiliyetini artırabilir. Bitki miRNA'ları ayrıca hücrel biyolojik tepkilerin çevresel strese ve düşük besin kaynaklarına adaptasyonunu da kontrol edebilir (Dong vd., 2022, Yang vd., 2021). Dahası, önemli çevresel tepki düzenleyicileri olarak miRNA'lar gen ifadesini düzenler ve düşük sıcaklıklar, ısı stresi, tuz stresi ve mantar stresi altında bitki büyümesi ve gelişimine aracılık eder (Gong vd., 2015). miRNA'ların incelenmesi ilerledikçe, artan sayıda kanıt, bitki hücresi farklılaşması, embriyo oluşumu, doğurganlık, bitki çiçeklenmesi ve meyve vermenin düzenlenmesinin yanı sıra bitki türü ve tohum verimini düzenlemedeki rollerini göstermiştir. Örneğin, Luo ve arkadaşları miR397'nin farklılaşmamış pirinç embriyonik iyileşme dokularında yüksek oranda ifade edildiğini ve lakkaz genlerinin aşağı regülasyonuna yol açtığını; bunun da ince duvarlı meristematik hücrelerin oluşumuna neden olduğunu bildirmiştir (Luo vd., 2006). Hou ve arkadaşları, domateslerde miR171'in aşırı eksprese edilmesinin, hedef gen ailesi GRAS'ı (SLGRAS24) baskılayarak daha büyük domates bitkileri ile sonuçlandığını bulmuşlardır (Hou vd., 2019). Benzer şekilde, Zhang ve arkadaşları, pirinçte miR397'nin aşırı ekspresyonunun tohum boyutunu artırdığını ve OsLAC ifadesini aşağı düzenleyerek başak dallanmasını teşvik ederek pirinç verimini artırdığını göstermişlerdir (Zhang vd., 2013). Ayrıca, miR397'yi aşırı eksprese eden *Arabidopsis* bitkileri daha fazla çiçek tomurcuğu üreterek tohum verimini artırdığı da gösterilmiştir (Wang vd., 2014). Han ve arkadaşları, miR528, miRNA-hedef genlerin düzenleyici ağını zenginleştiren miR528-SOD modülü aracılığıyla şalgam bitkisinin kardeşlenme sayısını ve rejenerasyon yeteneğinin düzenlemesine katıldığını gösterişlerdir (Han vd., 2023).

2.7. Bitki miRNA'larının Stres Faktörlerine Etkisi

miRNA'lar sadece bitkinin büyüme ve gelişmeyle ilgili endojen genlerinin düzenlenmesine katılmakla kalmaz, aynı zamanda bu hedef genlerin ifadelerinin abiyotik ve biyotik strese karşı tepkilerini de düzenler. Böylece mahsul çeşitlerinin agronomik özelliklerini etkiler.

Kadmiyum, alüminyum, arsenik, kurşun ve cıva gibi ağır metaller tipik olarak bitki kök sistemleri tarafından emilir ve bitki büyümesini önemli ölçüde engelleyebilir.

Kadmiyum özellikle kalıcı bir eser metal ve tehlikeli bir çevresel kirleticidir (Benáková vd., 2017) ve temel bitki metabolizması veya büyüme süreçleri için gerekli değildir (Hussain vd., 2019). Bu nedenle, Ali ve arkadaşları kadmiyum toleransı ve miR397 ifadesi arasındaki potansiyel ilişkiden sorumlu moleküler mekanizmaları araştırmak için *Arabidopsis thaliana*'da miR397 mutant hatları oluşturmuştur (Ali vd., 2023). miR397'nin aşırı eksprese edilmesinin lignin içeriğini değiştirdiğini ve lakkaz 2, 4 ve 17 ifadelerini düzenleyerek kadmiyum toleransını azalttığını bulmuşlardır. Yue ve arkadaşları, miR535'in gen ekspresyonunun azaltılmasının kadmiyum stresi altındaki pirinç bitkilerinde kadmiyum toleransını artırırken, miR535'in aşırı eksprese edilmesi yabancı tip bitkilere kıyasla tam tersi bir etki ortaya çıkardığı gösterilmiştir. (Yue vd., 2023).

Kuraklık, bitki büyümesini ve gelişimini olumsuz etkileyen ve küresel olarak önemli ürün kayıplarına yol açan önemli bir stres faktörüdür (Riyazuddin vd., 2023). Özellikle, Jiang ve arkadaşları, *A. thaliana*'da miR159 işlevinin kaybının, daha az açık stoma ve daha düşük su kaybı oranlarına bağlı olarak kuraklığa toleransı artırdığını bildirmiştir (Jiang vd., 2022). Bu arada, Li ve arkadaşları, miR169a'yı aşırı eksprese eden *Arabidopsis* bitkilerinin, yabancı tip bitkilerinden daha fazla yaprak su kaybı ve kuraklık stresine karşı daha fazla hassasiyet sergilediğini bulmuşlardır (Li vd., 2008). Ek olarak, buğday köklerinde miR1119 ifadesinin azalması MYC2 seviyelerini artırarak ve katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve süperoksit dismutaz (SOD) dahil olmak üzere belirli enzimlerin aktivitesini yukarı doğru düzenleyerek kuraklığa karşı direnci sağladığı gösterilmiştir (Shamloo-Dashtpagerdi vd., 2023).

Aşırı sıcaklıklar bitkilerdeki normal hücresel ve biyokimyasal fonksiyonları bozarak büyümelerini engelleyebilir. Yüksek sıcaklık stresi, lipid peroksidasyonu yoluyla membranları bozarak organellere zarar veren, sonuçta klorofil içeriğini azaltan ve fotosentetik kapasiteyi düşüren ROS üretilmesi yoluyla oksidatif hasara yol açar (Briantais vd., 1996; Larkindale vd., 2002). Alternatif olarak, düşük sıcaklıklar bitki büyümesini ve verimini olumsuz etkileyerek büyüme verimliliğini önemli ölçüde azaltır (Abdullah vd., 2022). Aslında, bazı bitkiler düşük sıcaklık stresinden geri dönüşü olmayan bir şekilde zarar görebilir (Knight vd., 2012). Bu zorlukları ele almak için Matthews ve arkadaşları miR156'nın yoncada yüksek sıcaklık stresini hafifletmeye yardımcı olabileceğini bulmuşlardır; miR156-aşırı eksprese eden bitkiler, ROS ile ilişkili hasarı azaltarak önemli ölçüde gelişmiş antioksidan temizleme

kapasitesi sergilerler (Matthews vd., 2019). Ayrıca, yüksek verimli tarama kullanarak, miR166e, miR319 ve bra-novel-miR3936-5p'nin bitkilerin soğuk stresine tepkilerinde önemli rolleri olabileceğini bildirmiştir (Zeng vd., 2018). Bu durum, gelişmiş soğuk ve sıcak stres toleransına sahip sha-miR319d-aşırı eksprese eden domates bitkileri inşa eden Shi ve arkadaşları tarafından da gösterilmiştir (Shi vd., 2019).

Bitkilerin tarımsal ortamlardaki besin gereksinimleri ile doğal ortamlardaki besin gereksinimleri arasında bir eşitsizlik vardır. Bununla birlikte, ortamdaki bağımsız olarak, temel elementlerdeki eksiklikler, normal bitki büyümesini ve gelişimini olumsuz yönde etkileyebilecek beslenme stresine neden olabilir (İslam vd., 2022). Azot eksikliğine yanıt olarak miR156 ifadesi yukarı doğru düzenlenir ve SQUAMOSA promotör bağlayıcı protein benzeri (SPL) genleri (Fan vd., 2015) ve NAC4, ARF2 ve AFB3 (Li vd., 2021) ifadesini düzenleyerek birincil ve yan kök büyümesini düzenleyerek bitki boyu gelişimini teşvik eder. Alternatif olarak, Xu ve arkadaşları fosfor yeterliliği ve eksikliği altında soya fasulyesi köklerinin ve yapraklarının transkriptomunu analiz etmiştir. Fosfor eksikliğinin neden olduğu stresi hafifletmek için miR169, miR395, miR397 ve miR399'un ekspresyonunun arttığını tespit etmişlerdir (Xu vd., 2013). Ayrıca, potasyum eksikliği altında, miR171 ve miR166 ifade seviyeleri buğdayda belirgin şekilde değişir; buğday fideleri daha fazla miRNA sentezler, bu da kök farklılaşmasını ve gelişimini teşvik etmek için büyüme öncesi aşamada potasyum emiliminin artmasına neden olur (Thornburg vd., 2020).

Tuzlu su koşullarına uzun süre maruz kalmak ROS üretimine yol açabilir (Safdar vd., 2019), bu da proteinler, lipitler ve DNA dahil olmak üzere hücresel bileşenlerde oksidatif hasara neden olarak kritik bitki biyokimyasal süreçlerini bozabilir (Goyal vd., 2021; Kamran vd., 2019). Ortaya çıkan doku hasarı, metabolizmanın ve büyümenin geri dönüşümlü olarak yavaşlamasına ve daha ciddi durumlarda geri dönüşümsüz hücre ölümüne yol açabilir (İslam vd., 2022). Tuz stresi altında, miR159, miR168, miR169, miR172, miR393, miR395, miR396, miR399 ve miR408 dahil olmak üzere dokuz temsili miRNA'nın ifade seviyeleri farklı bitki türlerinde değişiklik göstermektedir (Xu vd., 2021). İlginç bir şekilde, aynı miRNA'lar farklı bitki türlerinde zıt ifade modellerine sahip olabilir ve tuz stresi altında farklı rolleri yerine getirebilir. Örneğin, tütünde miR396 aşırı ekspresyonu su tutma ve prolin içeriğini iyileştirerek ROS üretimini azaltmaya ve tuz direncini artırmaya yardımcı olabilir (Chen vd., 2015). Buna karşılık, miR396'nın aşırı ekspresyonu pirinç ve *A. thaliana*'da tuzluluk stresi

toleransını azaltır (Gao vd., 2010). Aydinoglu ve arkadaşları, mısır tohumlarına *Basillus* sp. ile biyolojik alıştırmanın ardından uygulanan tuz stresine karşı bitkinin köklerinde stres toleransının arttığını gösterdikleri çalışmada, mısır köklerinde miR160'ın ARF17 geninin ifadesini düzenlendiğini göstermişlerdir (Aydinoglu vd., 2023).

Doğal ortamlarda bitkiler sıklıkla bakteriler, mantarlar, virüsler ve zararlılar dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan gelen biyotik strese maruz kalırlar. Kapsamlı araştırmalar miRNA'ların patojen enfeksiyonlarına karşı bitki direncinin etkili düzenleyicileri olduğunu göstermiştir (Ding vd., 2024)

Zhao ve arkadaşları domates miR319-TCP4'ün jasmonik asit (JA) senteziyle ilgili genlerin ifadesini düzenleyerek ve yapraklardaki endojen JA seviyelerini değiştirerek kök boğazı nematodlarına karşı bitki direncini etkilemede önemli bir rol oynadığını gözlemlemiştir (Zhao vd., 2015). Ayrıca, Pinweha ve arkadaşları, manyok bitkisi *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. tarafından enfekte edildiğinde, miR393 ve miR160 ifadesinin, hedef genler TIR1 ve ARF'yi aşağı doğru düzenleyerek antraknoza karşı bir savunma tepkisini teşvik ettiğini ve böylece büyüme hormonu sinyalini baskıladığını bulmuşlardır (Pinweha vd., 2015). Benzer şekilde, *Arabidopsis* bitkisi *Pseudomonas syringae* flagellin'e maruz kaldığında, miR393 ifadesi indüklenir ve bu da F-kutusu büyüme hormonu reseptörü TIR1'in negatif düzenlenmesine yol açar. Bu inhibisyon, büyüme hormonu sinyalini baskılayarak *A. thaliana*'da antimikrobiyal direnci teşvik eder (Navarro vd., 2006).

Bitki hastalık direncine miRNA yanıtı, öncelikle NB-LRR, kitin ve lektin gibi bitki hastalık direnci proteinlerini hedef alan bir düzenleyici mekanizma olarak işlev görür. Bitki NB-LRR proteinleri, mikrobiyal enfeksiyonu takiben bitki savunma tepkilerini başlatabilir. Domates bitkilerinde, NB-LRR proteinlerinin miR482 ve miR530 tarafından *in vivo* olarak negatif düzenlenmesi, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* enfeksiyonuna karşı direnci azaltır (Ouyang vd., 2014). *A. thaliana*'da, miR393'ün *in vivo* aşağı regülasyonu ve hedef genleri olan lektin reseptör benzeri kinazların (LecRLKs) yukarı regülasyonu, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) ile muameleden sonra meydana gelir; sonuçta bu yanıt, *A. thaliana*'nın LPS'ye karşı bazal direncini artırır (Djami-Tchatchou vd., 2019). Zhang ve arkadaşları, yaprak lekesi mantarı ile aşılانmış elma yapraklarında, MdmiR395 ifadesinin artarken, hedef genleri olan MdMRKY26 ve MdWRKYN1'in ifadesinin azaldığını; ayrıca, MdWRKY'nin aşırı

ekspresyonunun veya MdmiR395'in inhibisyonunun patogeneze ilgili genlerin ifadesini artırarak elma ağacının direncini artırdığını bildirmiştir (Zhang vd., 2017). Ayrıca, Li ve arkadaşları küçük RNA dizilimi kullanarak patates virüsü A (PVA) enfeksiyonu ile ilişkili 58 miRNA tespit etmiştir (Li vd., 2017). miR482d-3p, miR397-5p ve diğer miRNA'lar aşağı regüle edilerek patojene karşı direnç genlerinin ekspresyonunu artırır. Bu çalışma, patates yapraklarında Patates Virüsü A direncinin moleküler temeline ilişkin transkriptom çapında bilgiler sağlamaktadır.

Pirinç bitkileri viral hasara maruz kaldığında, miR528 ifadesi baskılanarak hedef geni olan L-askorbat oksidazın (AO) ifadesini teşvik eder ve ardından AO aracılı ROS birikimini azaltır (Wu vd., 2017). Ayrıca, miR528-AO savunma modülü, miR528 promotör bölgesindeki spesifik motiflere bağlanarak miR528 gen ekspresyonunu aktive eden SPL9 tarafından düzenlenir (Yao vd., 2019). Benzer şekilde, domates bitkilerinde miR398b ifadesinin azaltılması ROS birikimini azaltır ve MeJA'ya duyarlı savunma genlerini yukarı doğru düzenleyerek *Botrytis cinerea*'ya karşı bitki direncini artırır (Liu vd., 2023). Patojenik mikrobiyal istilaya karşı bitki tepkisi sırasında miR397 ifadesinin aşağı regülasyonu lakkaz aktivitesini artırır, lignin ve diğer fenolik polimerlerin sentezini indükler ve hücre duvarında hızlı birikime neden olur; sonuçta bu, patojenik mikroorganizmaların büyümesini ve istilasını sınırlar (Yu vd., 2014; Yu vd., 2020). Örneğin, patateslerin PVA ile ve mısırın şeker kamışı mozaik virüsü (SCMV) ile enfeksiyonu, miR397 ifadesinin aşağı regülasyonu, lakkaz aktivitesinin artırılması ve lignin oluşumunun arttırılması ile engellenir (Xia vd., 2018).

2.8. Bitkilerde Soğuk Stresinde miRNA'ların Rolü

Soğuk, verimi önemli ölçüde azaltan ve bitkilerin fizyolojisi ve biyokimyasının neredeyse her yönünü etkileyen başlıca abiyotik stresler arasındadır (Josine vd., 2011; Sanghera vd., 2011). Soğuk (0-10 °C) ve donma (<4°C) sıcaklıkları dahil olmak üzere düşük sıcaklığın bitkilerin hayatta kalmasını ve coğrafi dağılımını etkilediği bilinmektedir (Josine vd., 2011). Düşük sıcaklık bitki üzerinde iki şekilde stres yaratır: tek başına düşük sıcaklığın etkileri ve hücresel su donduğunda hücre ve dokuların dehidrasyonu (Beck vd., 2007). Spesifik olarak, düşük sıcaklık hücre sağkalımını, hücre bölünmesini, fotosentetik verimliliği ve su taşınmasını etkileyerek bitki büyümesi ve üretkenliği üzerinde olumsuz etki yaratır (Beck vd., 2007). Abiyotik stres sırasında normal hücresel işlevler bozulduğunda ise, bu bozulmalara yanıt vermek için

moleküler düzeyde hızlı ve geniş çaplı bir yanıt gereklidir. Bu yanıt, strese duyarlı genlerin ifadesinin transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve translasyonel düzenlenmesinin bir sonucu oluşur (Megha vd., 2018). Bitkinin stres koşullarına karşı ürettiği post transkripsiyonel yanıtlardan bir tanesi de miRNA'lardır. Geçtiğimiz on yıllar boyunca, miRNA'ların soğuk stresini düzenleyen ağda önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Sun vd., 2018). MiRNA'ların soğuk stresinde rol oynadığı ilk olarak küçük RNA kütüphanesinin taranmasıyla bulunmuştur. Küçük RNA kütüphanesi, 24 saat boyunca 0 °C'ye ve dehidrasyon ve tuzluluk gibi diğer streslere maruz bırakılan Arabidopsis fidelerinden oluşturulmuştur. Sunkar ve Zhu, soğuk stresi altında miR393 ifadesinin güçlü bir şekilde yukarı regülasyonunu ve miR319c ve miR398a ekspresyonlarının azaldığını göstermişlerdir (Sunkar ve Zhu 2004). Takip eden yıllarda, birkaç çalışma miRNA'ların çeşitli bitki türlerinde soğuk stresine tepkilerini ortaya koymuştur. Örneğin, Liu ve diğerleri, yaptıkları mikroarray analizleri sonucunda, miR396, miR393, miR319, miR408, miR169, miR168 ve miR165 dahil olmak üzere 10 miRNA'nın Arabidopsis'te soğuk stresi altında ekspresyonlarının arttığını göstermiştir (Liu vd., 2008). Ma ve diğerleri, Arabidopsis üzerinde yaptıkları çalışmada miR408'in soğuk stresinde rol aldığını göstermişlerdir. Thiebaut ve diğerleri (2020), şeker kamışında yaptıkları çalışmada miR319'un soğuk stresıyla bağlantısı olduğunu göstermişlerdir. Božić ve diğerleri (2024), beş günlük mısır fidelerinde yaptıkları çalışmada, soğuk stresine dayanıklı ve hassas olan hatları kullanarak küçük RNA kütüphanesi oluşturmuşlardır. Sonra oluşturdukları bu kütüphaneyi kullanarak beş günlük mısır fidelerinde soğuk stresinde eksprese olan 65 tane yeni miRNA tanımlamışlardır. Aydınoglu (2020) ADA313 mısır hattında yaptığı çalışmada, miR319, miR396, miR408, miR528 miRNA'larının soğuk stresinde mısır yaprağının farklı büyüme bölgelerinde farklı ekspresyon seviyelerinin olduğunu ve soğuk stresine yanıtta rol oynayabileceklerini göstermiştir. Lu ve diğerleri (2020) kışlık buğdayda yaptıkları çalışmada, miR398 ve uzun kodlanmayan RNA'ların soğuk stresi koşullarında tolerans ile ilgili CSD1 genini regüle ettiklerini göstermişlerdir.

2.9. Bitkilerde Savunma Sistemi

Doğada bitkiler sürekli olarak patojenik bakteriler, mantarlar veya virüslerin saldırısı altındadır. Bu patojenlere karşı kendilerini savunmak için bitkiler, enfeksiyon üzerine çoklu savunma mekanizmalarının aktive edildiği sofistike doğal bağışıklık sistemleri

geliştirmiştir (Dodds ve Rathjen 2010; Zhang vd., 2010; Boller ve He, 2009). Patojenle ilişkili moleküler model (PİMM) ile tetiklenen bağışıklık (PTB) ve efektörle tetiklenen bağışıklık (ETB) bitkilerde bildirilen iki doğal bağışıklık tepkisi (Jones ve Dangl 2006; Boller ve He 2009). Genel olarak PTB, korunmuş PİMM'lerin hücre yüzeyinde lokalize olmuş kalıp tanıma reseptörleri tarafından tanınması yoluyla aktive edilir (Boller ve Felix 2009). ETB ise patojen tarafından salgılanan efektörlerin konakçı proteinleri tarafından tanınması üzerine aktive olur (Bent vd., 2007). Çok sayıda çalışma PTB ve ETB'nin aktivasyonunun salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) ve etilen (ET) gibi benzer sinyal moleküllerine ve savunma sinyal yollarına ihtiyaç duyduğunu göstermiştir (Kachroo vd., 2007; Aaron vd., 2009; Tsuda vd., 2009; Boller ve He 2009; Dodds ve Rathjen 2010; Robert-Sellaniantz vd., 2011). Patojen enfeksiyonu üzerine bitkilerde ortaya çıkan bağışıklık tepkisi, farklı transkripsiyon faktörleri (TF'ler) tarafından düzenlenen geniş bir savunma ile ilgili gen setinin ifadesini içeren çoklu savunma tepkilerinin aktivasyonu ile karakterize edilir (Van Loon vd., 2006). Son yıllarda, NAC, ERF, MYB, WRKY ve bZIP ailelerine ait birçok TF tanımlanmış ve savunma ile ilgili genlerin ifadesinin düzenlenmesinde kritik rol oynadıkları gösterilmiştir (Eulgem vd., 2007; Gutterson vd., 2004).

2.10. Genetik Modifikasyon Metotları

Genetik modifikasyon yöntemleri, bir canlı organizmanın genetik bileşimini değiştiren bir grup yöntemdir. Bu yöntemler, gen fonksiyonlarının, regülasyonlarının ve biyolojik özelliklerle ilişkilendirme için birbirleri arasındaki bağlantıları analiz etmek için kullanılır (Singh vd., 2020). Bitkilerde, genetik manipülasyonlar için iki ana teknik vardır: bunlar, genetik ve genetik olmayan mühendislik yöntemleridir (Bleotu vd., 2020). En eski genetik olmayan mühendislik yöntemi, arzu edilen özellikleri (örneğin, özel fenotip veya fiziksel özellikler) karşılayan bireysel tohum popülasyonlarının seçilmesinden (birkaç nesil boyunca) oluşuyordu. Bu teknik, heterojen tohumlardan genetik olarak homojen tohumlar elde edilmesine ve yeni çeşitlerin üretilmesine olanak sağlamıştır (Moeller and Wang, 2008). Çaprazlama, araştırmacıların eşeysel olarak uyumlu iki bitkiden melezler elde etmesine olanak tanır; ancak rekombinasyon rastgele olduğundan ve istenen özelliklere sahip olanlar elde edilmeden önce çok sayıda melez ara ürün üretilmesini gerektirdiğinden bu zahmetli bir yöntemdir. Türler arası çaprazlama ya doğal yollarla (belirli koşullarda)

ya da insan müdahalesiyle gerçekleştirilebilir ve bir türden genlerin yakın akraba bir türün genomuna entegrasyonunu içerir. Bu yöntemle üretilen melezler her iki ebeveynin de özelliklerine sahiptir (Jauhar, 2006).

Somatik hibridizasyon (hücre füzyonu), farklı bitkilerden elde edilen protoplastların füzyonuna dayanan, eşeyli olmayan bir genetik yöntemdir. Hücre duvarlarının enzimatik tekniklerle uzaklaştırılması (yani polisakkaritlerin selüloz, hemiselüloz ve pektinaz ile parçalanması) ve protoplastların bir araya getirilmesi (kimyasal/elektriksel bir fuzojen varlığında) heterokaryon üretimiyle sonuçlanır (Mahgoub, 2015).

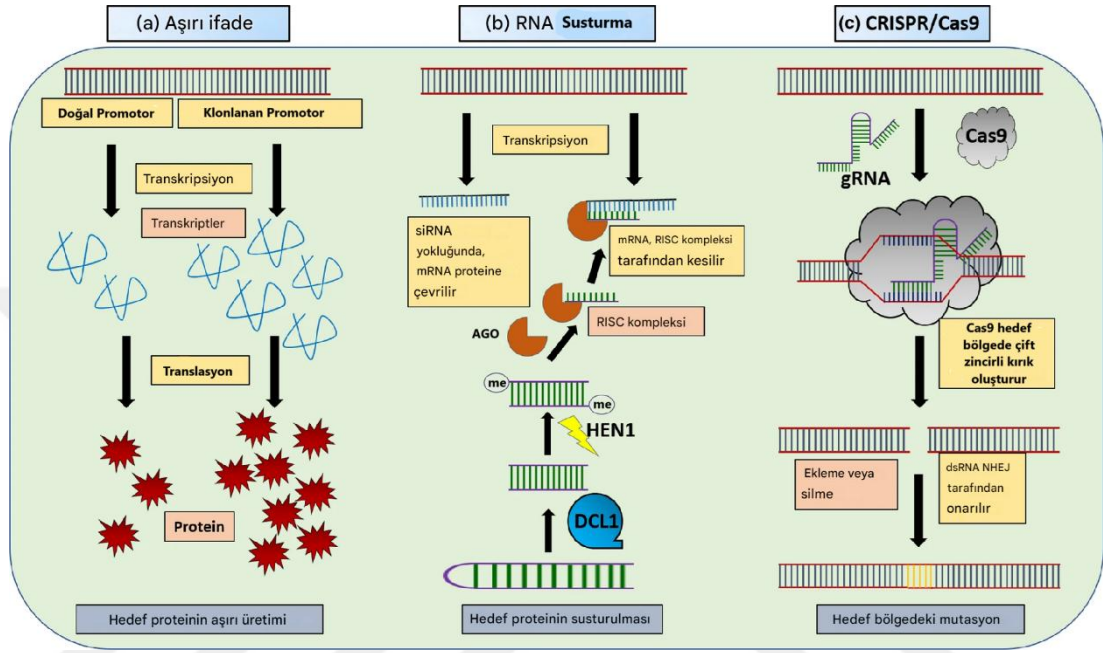
Kimyasallar ve fiziksel faktörlerin neden olduğu mutajenez, bitkilerin genomlarında rastgele değişikliklere neden olmak için kullanılır. Bu mutasyonların rastlantısallığı ve tekrarlanabilir olmaması, yöntemleri gıda için kullanışlı olmaktan çıkarmaktadır. Etil metansülfonat, kalsiyum fosfat (Chowdhury vd., 2004) ve lipofeksiyon (Kawata vd., 2003) yaygın olarak kullanılan kimyasallar; elektroporasyon, biyolistik, vakum infiltrasyonu, silikon karbür bıyıklar, iyonlaştırıcı radyasyon ve şok dalgası aracılı dönüşüm ise yaygın olarak kullanılan fiziksel faktörlerdir (Rivera vd., 2014).

Genetik mühendisliği, belirli bir sonuç üretmek için bir gen dizisinin hedeflenen şekilde değiştirilmesini içerir. Bu bağlamda, ilgilenilen proteinleri kodlayan genler tanımlanır, izole edilir, bir iletim sistemine yerleştirilir ve rekombinant DNA teknolojisi olarak bilinen karmaşık süreçler yoluyla uygun bir konağa aktarılır. Bu aktarma sonucunda bitkide çalışılmak istenilen genin aşırı ekspresyonu, ya da susturulması sağlanır (Şekil 2.3).

Çinko parmak proteinleri (ZFP, ZFN), bitki genomunda en yaygın DNA bağlanan alanlardan biri olan Cys2-His2 çinko parmak alanı ile bir transkripsiyon faktörleri sınıfındadır. ZFP, Fok'tan (bir IIS kısıtlama enzimi) türetilen bir kesilmiş alan ve bir bağlanma alanından oluşur. Bir ZFP'nin bağlanma alanı, bir çinko atomu varlığında DNA molekülünün etrafını sarar, her parmak 3-4 baz çifti (bp) ile bağlanır. ZFP, 9 bp'lik bir bölgeyi hedefleyen DNA molekülü ile kompakt bir $\beta\beta\alpha$ yapısı oluşturur (Maeder ve Gersbach, 2016). Çift iplikli DNA kırılmalarını sağlamak için, DNA substratının üst ve alt ipliklerinde ters bir oryantasyonda bulunan bir ZFP'nin iki bağlanma bölgesi dimerize olur ve nükleaz alan aktivitesini kolaylaştırır.

Transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN), TALE proteinlerine (Xanthomonas'tan köken alan) özgü bir DNA bağlama alanı ve bir DNA kesme

alanından (FokI'in katalitik parçası) oluşur. Çift iplikli DNA kırılmalarının indüksiyonu için dimer oluşumu esastır. DNA bağlayıcı alan 33-35 amino asitlik bir dizi ve ardından 20 amino asitlik tek bir tekrardan oluşur. Her bir tekrarın 12. ve 13. pozisyonlarındaki amino asitler tek bir nükleotid bazının tanınması ve bağlanmasından sorumludur (Cermak et al., 2011; Maeder and Gersbach, 2016).



Şekil 2.3: Biyoteknolojik yaklaşımlar yoluyla mahsul geliştirme stratejileri. (a) Aşırı ekspresyon, proteine çevrilebilen hedef genin daha fazla transkripsiyonuna yol açar; b) RNA interferansı, hedef genin aşağı regülasyonuna yol açar; c) CRISPR / Cas9 yoluyla gen düzenleme, hedef bölgede mutasyonlara yol açan ekleme veya silmelere yol açar)

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), bakterilerde doğal olarak bulunan ve yabancı DNA'yı tanıyıp kesen bir savunma mekanizmasıdır. Bu sistem, özellikle genom düzenleme teknolojilerinde devrim yaratan bir araç haline gelmiştir. CRISPR, bir enzim olan Cas9 ile birlikte çalışarak hedef DNA'yı kesebilir (Silva vd., 2011). CRISPR-Cas9 sistemi, önce rehber RNA (gRNA) tarafından hedef DNA dizisi belirlenir. gRNA, Cas9 enzimi ile birlikte bu DNA'yı bulur ve Cas9 enzimi bu noktada çift iplikli kırık yapar. Bu kesilen bölge, genetik materyalin değiştirilmesi için fırsat sağlar.

RNAi'nin keşfi biyoloji tarihinde bir çığır açmıştır ve bulunmasından bu yana fonksiyonel genomik, ters genetik ve mahsul ıslahında yaygın olarak kullanılmaktadır.

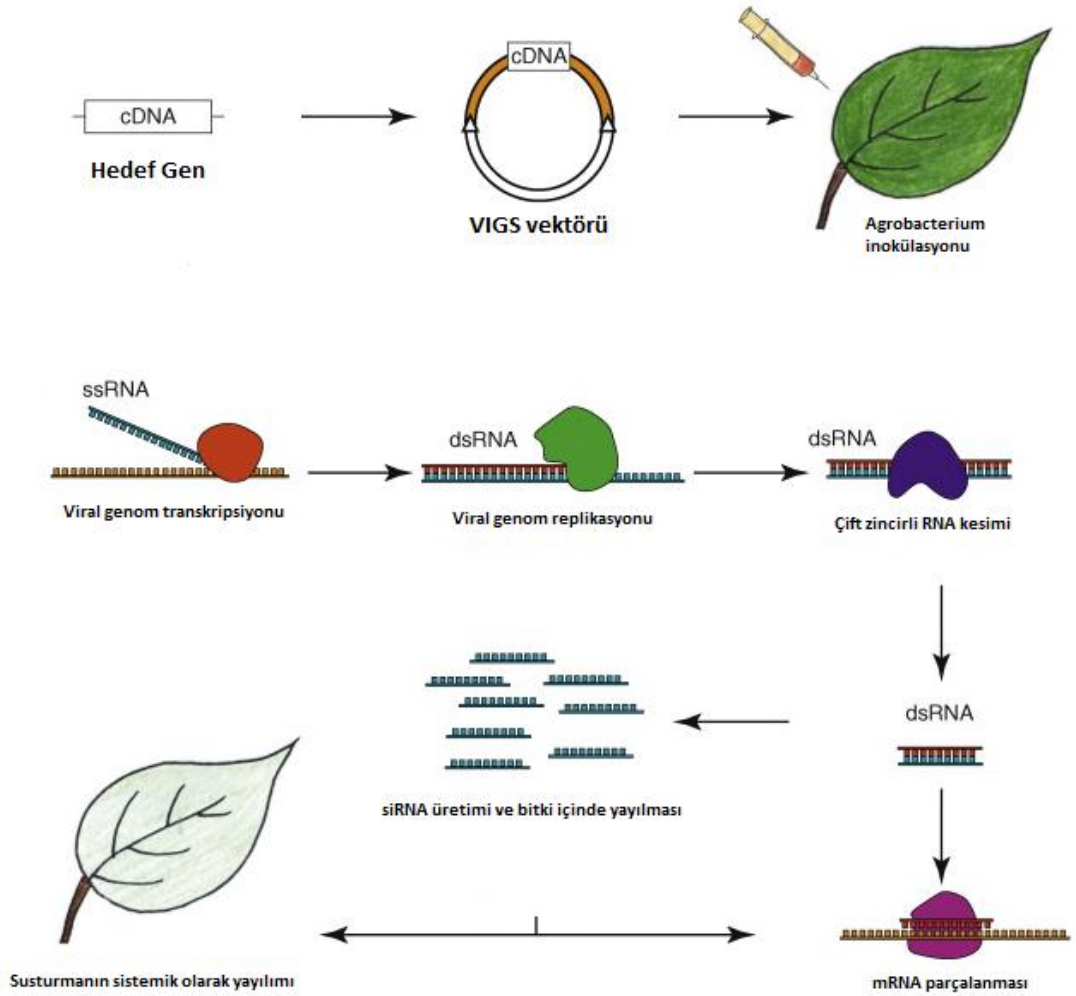
Rosa et al. 2018). RNAi yolu, hedef genlerinin susturulmasına veya epigenetik düzenlenmesine aracılık eden kısa interfering RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA), transacting siRNA (ta-siRNA) ve natural-antisense siRNA (NAT-siRNA) içeren küçük RNA'ların (sRNA) üretilmesini içerir (Prasad vd.,2019). RNAi hem transformatif hem de non-transformatif stratejilerle kullanılabilir. Transformatif RNAi, yapay miRNA (amiRNA), yapay ta-siRNA (ata-siRNA), saç tokası RNA (hpRNA), içsel doğrudan tekrar, 3' çevrilmemiş bölge (UTR) doğrudan tekrar, terminatörsüz, tek sarmallı promotör antisens ve intron teslimli promotör hpRNA gibi çeşitli modifiye formlarda kullanılmıştır (Guo vd., 2016). Transformatif olmayan RNAi tekniği, spreyle uyarılan gen susturma (SIGS), düşük uygulama maliyeti ve kullanım fizibilitesi nedeniyle yaygın ilgi görmüştür. Bitkilere çift sarmallı RNA/siRNA püskürtmeyi içerir ve çeşitli viral patojenlerin taşıyıcısı olan böcek zararlılarını kontrol etmek için başarıyla kullanılmıştır (Cagliari vd., 2019; Worrall vd., 2019).

2.11. Virüsle İndüklenen Gen Susturma (VIGS)

Post transkripsiyonel gen susturma (PTGS), bitkilerde hedeflenen genlerin ifadesini bastırmak için kullanılan RNA tabanlı bir susturmadır. Mantarlarda susturma (Cogoni vd., 1996) ve hayvanlarda RNA interferansı (RNAi) (Fire vd., 1998) olarak da tanımlanmaktadır. Genlerin fonksiyonel analizi için PTGS mekanizmasını kullanmak üzere birkaç farklı teknik geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerden biri Virüsle İndüklenen Gen Susturma (VIGS) yöntemidir (Baulcombe, 1999; Dinesh-Kumar vd., 2003). VIGS geçici, hızlı ve etkili bir yöntem olarak RNA ile indüklenen bir gen susturma sistemidir. Bu yöntem, susturulacak bitki geninin kısa bir dizisinin viral aktarım vektörüne klonlanmasını içerir. VIGS, ters genetik bir yaklaşım olarak hedeflenen gen işlevini belirlemek için diziye özgü gen susturması sağlar.

VIGS, konakçıda virüs enfeksiyonu sırasında biriken ve RNase III benzeri (Dicer benzeri) enzimler için substrat işlevi görerek küçük interfering RNA (siRNA) dubleksleri oluşturan çift sarmallı RNA'lar tarafından tetiklenir (Baulcombe, 2004; Waterhouse ve Fusaro, 2006; Ding ve Voinnet, 2007). Bu siRNA dublekslerinin tek iplikleri daha sonra konak ARGONAUTE gen ailesi tarafından kodlanan proteinleri içeren RNAi kaynaklı susturma komplekslerine dahil edilir (Montgomery vd., 2008; Vaucheret, 2008; Poulsen vd., 2013; Fang ve Qi, 2016). Tek sarmallı siRNA'lar,

hedeflenen bozulma için mRNA'ları bağlamak üzere RNAi kaynaklı susturma komplekslerinde ters tamamlayıcı kılavuzlar olarak hizmet eder. Birçok bitkide gen susturma sonucu gözle görülür fenotiplerin başlamasına yol açar (örneğin nekroz, fotosoldurma ve bodurlaşma) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: VIGS uygulamasının şematik olarak gösterimi. Susturulmak istenen gene ait cDNA elde edilir ve vektörüne hedeflenen gen aktarıldıktan sonra, modifiye edilmiş vektör Agrobacterium'a transforme edilir. Agrotransformantlar çalışmada kullanılacak bitkiye agroinfiltrasyon işlemi ile aktarılır. VIGS vektörü bitki içerisinde çoğalarak, gen susturmada görev yapan siRNA'lar üretilir. siRNA'lar hedef geni baz eşleşmesi ile bağlanarak sustururlar. VIGS plazmidinde bulunan viral genler, bitki içerisinde sistemik yayılmayı indükleyerek susturmanın yayılmasını sağlar.

Bir VIGS yapısının hazırlanması ve bitkiye aşılınması ucuz olduğundan ve yoğun emek gerektirmediğinden ve susturma sonuçları haftalar içinde elde edilebildiğinden, dikotiledon ve monokotiledon bitkilerde gen fonksiyonu çalışmaları için VIGS

teknolojisi, daha fazla reaktif ve emek gerektiren ve tamamlanması aylar süren stabil RNAi transformasyonuna göre avantajlara sahiptir (Robertson, 2004; Scofield ve Nelson, 2009; Senthil-Kumar ve Mysore, 2011; Ramanna vd., 2013; Lee vd., 2015)

VIGS sırasında en uzun süre boyunca en fazla dokuda gen susturmasını sağlayan en önemli faktör, enfeksiyon sırasında bir vektördeki yabancı genin genetik stabilitesidir (Scofield ve Nelson, 2009; Ramanna vd., 2013; van der Linde ve Doeblemann, 2013). Arpa çizgili mozaik virüsü (BSMV)'nü kullanan Bruun-Rasmussen ve arkadaşları (2007), *fitoen desatürazı* (*PDS*) temsil eden 275, 400 ve 584 nükleotidlik genlerin transforme bitkideki vektörde giderek daha kararsız olduğunu göstermiştir. Bu istikrarsızlığın, arpada (*Hordeum vulgare*) Arpa şerit mozaik virüsü tabanlı vektör kullanıldığında susturmanın geçici doğasını açıklayabileceği sonucuna varmışlardır. Dikotiledon türlerde susturma vektörü olarak Patates virüsü X (PVX) kullanıldığında, enfekte olmamış bir *Nicotiana benthamiana* bitkisine yapılan geri çaprazlamalar sonucu genler kaybolmuştur (Avesani vd., 2007). Bir yerfistiği bodurlaşma virüsü (PSV) vektörü de daha büyük PDS eklerini korumak için daha fazla kararsızlık göstermiştir (Yamagishi vd., 2015). Yakın zamanda, Mei ve arkadaşları (2016) bir Tilki Kuyruğu mozaik virüsü (FMV) susturma vektöründeki bir *PDS* gen parçasının kaybı ile transkripsiyon sonrası susturma kaybı arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

Dikotiledon bitkiler için çeşitli VIGS vektörleri geliştirilmiştir ve bu vektörler arasında Tütün çingirak virüsü (Tobacco Rattle Virus, TRV) tabanlı VIGS vektörü, *Nicotiana benthamiana* ve domates gibi *Solanaceae* üyeleri için en başarılı örnektir (Liu vd. 2002; Chakravarthy vd. 2010). Monokotiledon türler için de birkaç VIGS vektörü yapılmıştır (Scofield ve Nelson 2009). Örneğin, BSMV tabanlı VIGS vektörü, buğday ve arpada hastalık direncindeki rolleri açısından birden fazla geni karakterize etmek için kullanılmıştır (Scofield vd. 2005; Zhou vd. 2007; Hein vd. 2005; Sindhu vd. 2008). Ding ve çalışma arkadaşları BMV tabanlı bir VIGS vektörü geliştirmiş ve bu vektörün arpa, pirinç ve mısırdaki hızlı gen fonksiyon analizi için çok yönlü bir araç olduğu gösterilmiştir (Ding vd., 2006; Pacak vd., 2010; van der Linde vd., 2011; Shi vd., 2011; Biruma vd., 2012).

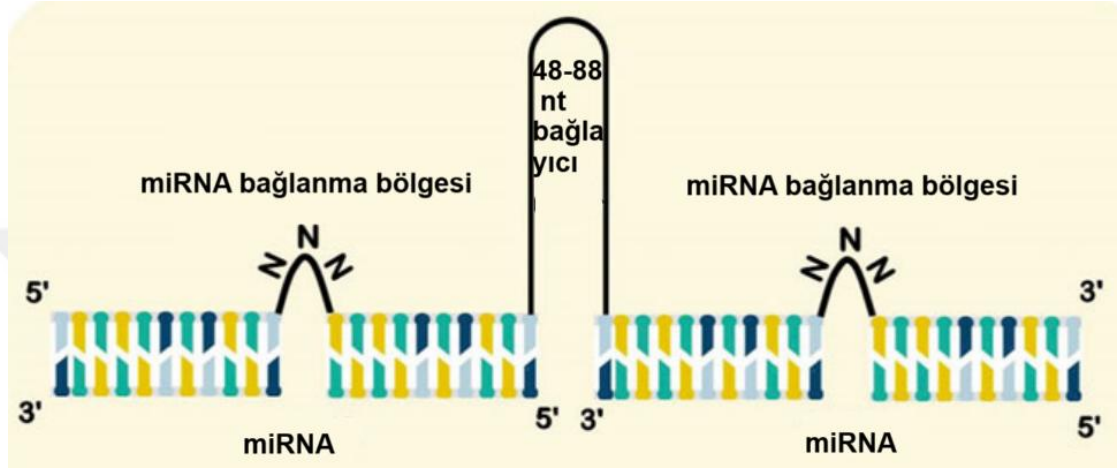
Brome Mosaic Virus (BMV) son yıllarda monokot bitkilerde VIGS uygulaması için bir vektör olarak geliştirilmiştir (Ding vd., 2006, 2007, 2010; Pacak vd., 2010; Martin vd., 2011; Shi vd., 2011; van der Linde vd., 2011, 2012; Benavente vd., 2012; Cao vd.,

2012; Hemetsberger vd., 2012; Ramanna vd., 2013; Sun vd., 2013; Kong vd., 2014; Zhu vd., 2014; Zhan vd., 2016). BMV üç parçalı, tek sarmallı, pozitif anlamlı bir RNA virüsüdür (Noueiry ve Ahlquist, 2003). BMV genomik RNA1 ve RNA2, her ikisi de virüs replikasyonu için gerekli olan sırasıyla 1a ve 2a proteinlerini kodlar (Kroner vd., 1990; Quadts ve Jaspars, 1990; Kao ve Ahlquist, 1992). BMV genomik RNA3 dikistroniktir ve bitkide virüsün hücreden hücreye hareketi için gerekli olan 3a proteinini kodlar. Virion oluşumu ve bitkideki virüs hareketi için gerekli bir kapsid proteini olan (CP) (Dasgupta ve Kaesberg, 1982; Ahlquist vd, 1984; Mise ve Ahlquist, 1995; Schmitz ve Rao, 1996) bir alt genomik RNA olan RNA4'ten üretilir. Bildirilen her iki BMV için vektörleri ile yabancı gen parçaları genomik RNA3 içine yerleştirilir (Ding vd., 2006, 2010; Pacak vd., 2010; Sun vd., 2013).

2.12. Kısa Ardışık Hedef Taklidi (Short Tandem Target Mimic; STTM)

Bitki miRNA'ları 2002 yılında birkaç araştırma grubu tarafından bulunduğundan beri (Llave vd., 2002; Mette vd., 2002; Park vd., 2002; Reinhart vd. 2002), miRNA'ları tanımlamak ve karakterize etmek için bazı yaklaşımlar kullanılmıştır. Genlerin fonksiyonel çalışması geleneksel olarak ilgilenilen genleri susturmak ve fonksiyon kaybını veya değişen fenotipleri gözlemlemeye dayanıyordu. Ancak, miRNA'ların küçük boyutları ve her miRNA'nın birçok hedef geni olması nedeniyle onları degrade etmek zordur. Hedef taklidinin keşfinden sonra, küçük RNA'ları hedeflemek için kısa ardışık hedef taklidi (**Short Tandem Target Mimic; STTM**) yöntemi geliştirilmiştir (Tang vd., 2012). STTM'in icadı, *Arabidopsis thaliana*'da miR399 aktivitesini modüle eden endojen bir mekanizma olan hedef taklidinin keşfine dayanmaktadır. INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION 1 (IPS1), miR399'a kısmen tamamlayıcı transkriptler üreten, IPS1-miR399 komplekslerinde bağlanma bölgesinin merkezinde üç nükleotitlik bir çıkıntı oluşturarak IPS1 transkriptlerinin miR399 ile ilişkili RISC'ler tarafından degradasyonunu önleyen, protein kodlamayan bir gendir. Bu şekilde, hedef geni *FOSEAT 2*'nin (*PHO2*) olan miR399'un aktivitesi, fosfat açlığına yanıt olarak IPS1 tarafından oto modülasyona tabi tutulur. miR399'un bolluğunun IPS1 tarafından etkilenmediği gerçeği göz önüne alındığında, miR399'un hedef taklidi aracılığıyla IPS1 transkriptleri tarafından baskılandığı öne sürülmüştür (Franco-Zorrilla vd., 2007).

STTM sentetik, kısa, kodlamayan bir RNA'dır (~100 nt). STTM transkripti ortada bağlayıcı görev gören bir saç tokası yapısı ve her iki tarafta iki küçük RNA bağlanma bölgesinden oluşur (Şekil 2.5). Saç tokası yapısı STTM stabilitesinde rol oynar. Bağlanma bölgeleri, STTM'in küçük RNA'ları onlar tarafından parçalanmadan yakalamasını artıran bölgesi hariç, küçük RNA'larla kısmen tamamlanır. STTM, miRNA'ları bloke edebilir veya degradasyonuna sebep olabilir (Tang vd., 2012).



Şekil 2.5: Kısa ardışık hedef taklidi (Short Tandem Target Mimic; STTM)'in şematik görünümü. STTM, 48-88 nt'lik bağlayıcı bir ara parça ve iki adet hedef miRNA'ya özel olarak tasarlanmış miRNA bağlanma bölgesi içerir.

STTM mantarlarda, hayvanlarda ve çeşitli bitkilerde miRNA'ları başarılı bir şekilde bloke etmek için kullanılmıştır. STTM, *Metarhizium robertsii* ve *Aspergillus flavus*'ta birkaç fungal miRNA'yı degrede edebildiği, gelişim ve konidyal üretimi içeren hedef genlerin de yukarı regülasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Wang vd., 2019). Buna ek olarak, Tang ve arkadaşları miR30-d ifadesinin STTM30-d fare hücrelerinde büyük ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Bu da STTM'in hayvan hücrelerinde de etkili bir şekilde işlev gördüğünü göstermektedir (Tang vd., 2012). Arabidopsis'te STTM165/166, miR165/166 ifade seviyesini azaltmış ve HD-ZIP III transkripsiyon faktörleri genlerinin ifadesini, hedef genlerini artırarak bir dizi gelişimsel değişikliğe yol açmıştır (Yan vd., 2012). Buna ek olarak, STTM160 kullanılarak domatesta miR160'ın aşağı yönlü ifadesi, miR160 ifade seviyelerinde azalma ve hedef genleri olan SLARF10A, SLARF10B ve SLARF17'nin yukarı regülasyonunu göstermiştir. Ayrıca, STTM160 uygulanan domates bitkilerinde yumurtalık deseninde, çiçek organı abisyonunda ve yanıl organ büyümesinde değişiklikler gözlemlenmiştir

(Damodharan vd., 2016). Bununla birlikte, STTM yaklaşımı son zamanlarda ağaçlardaki miRNA'ları incelemek için sadece birkaç kez uygulanmıştır (Su vd., 2018; Kumar, 2019).



3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Bitki Materyali ve Büyüme Şartları

Bu tez çalışmasında, bitki materyali olarak Sakarya Mısır Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından tescillenen ADK 866 adlı mısır hattı (*Zea mays* L.) kullanıldı (Türkiye). Mısır bitkisine VIGS uygulaması için ara konakçı olarak tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkisi kullanıldı.

VIGS uygulaması şartlarını optimize etmek için, morfolojik semptomlar meydana getirecek raportör bir gen olan *Phytoene desaturase* (*PDS*) genini susturma deneylerinde mısır ve tütün bitkileri büyümeleri için optimum şartlarda yetiştirildi. Bu yetiştirme şartları kontrol ve *PDS* geni susturulacak deney grubu için; foto-periyot 16/8 saat aydınlık/karanlık, nispi nem %70, ışık yoğunluğu 18000 lux, sıcaklık 25°C/20°C (aydınlık/karanlık) olarak belirlendi.

miR408a/b genini susturma çalışmaları için, ara konakçı olan tütün bitkileri agroinfiltrasyonun ardından hasat edilene kadar yukarıda belirtilen optimum şartlarda 0.7 L'lik içerisinde torf bulunan saksılarda yetiştirildi. Mısır bitkileri ise içerisinde torf bulunan 1.5 L'lik saksılarda, optimum şartlarda büyütüldü. Mısır fideleri ikinci yapraklarını çıkarttıkları zaman, bitkiler iki gruba ayrıldı. Boş vektör (BV) ve STTM_miR408 (STTM) içeren vektörler ile transforme olmuş *Agrobacterium tumefaciens* ile agroinfiltrasyona tabi tutulmuş ara konakçı tütün yapraklarından elde edilen floem özütü uygulanmıştır.

3.2. Mısır Fidelerine Soğuk Stresi Uygulaması

Soğuk stresi için, STTM ve BV olarak adlandırılan iki grup, kendi içlerinde tekrar iki gruba ayrılarak, soğuk STTM_miR408a/b5p (STTM^S) ve soğuk boş vektör (BV^S) grupları oluşturuldu. STTM ve BV grupları yukarıda verilen optimum şartlarda yetiştirildi. Soğuk stresine maruz bırakılan STTM^S ve BV^S grupları için yetiştirme şartları ise; foto periyot 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık, nispi nem %70, ışık yoğunluğu 18000 lux, sıcaklık 25°C/4°C (aydınlık/karanlık) olarak belirlendi.

3.3. *E. coli* ve *Agrobacterium tumefaciens* Kompetant Hücre Hazırlama

Bu tez çalışmasında, *Escherichia coli* DH5 α suşu ve *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşu kullanılmıştır. *E. coli* DH5 α hücrelerini kompetant hale getirmek için Green ve Sambrook (2020)'de önerilen Inoue Ultra Competent protokolü uygulanmıştır (Green ve Sambrook, 2020). Protokole göre; stok *E. coli* DH5 α bakteri hücrelerinden 3 ml Luria Broth (LB, Thermo Fischer Scientific)) içerisinde ön kültür başlatılmıştır ve 37°C'de, 250 rpm'de çalkalanarak gece boyu (~16 saat) büyütülmüştür. Ardından, 250 ml LB'ye aşılama yapıp aynı koşullarda spektrofotometrede (Shimadzu UV1280) 600 nm'de ölçülen optik densite (OD600) değeri 0.55 olana kadar büyütülmüştür. Daha sonra, hücre süspansiyonu 4000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılıp pelet 80 ml soğuk Inoue Ultra Competent hücre tamponunda (0.5 M PIPES, pH 6.7), çözülüp tekrar aynı koşullarda santrifüj yapılmıştır. Ardından süpernatant atılıp pelet 20 ml soğuk Inoue Ultra Competent Hücre Tamponunda (55 mM MnCl₂·4H₂O, 15 mM CaCl₂·2H₂O, 250 mM KCl) çözülüp üzerine 1.5 ml dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck) eklendikten sonra buzda 10 dk bekletilmiştir. Hemen ardından çözelti 100 μ l'lik hacimlerde alikotlanıp sıvı azot içerisinde yaklaşık 2-3 dk fikse edildikten sonra -80°C muhafaza edilmiştir.

A. tumefaciens EHA105 kompetant hücresi yapmak için stok *A. tumefaciens* EHA105 hücresinden 3 ml LB içerisinde gentamisin (Thermo Fischer Scientific) (10 mg/L) antibiyotiği kullanılarak 30°C'de, 200 rpm'de çalkalanarak ön kültür başlatılmıştır (Charrier vd., 2018). Gece boyu büyütülen ön kültür, 50 ml LB'ye aşıl原因arak OD600 değeri 0.5 olana kadar büyütülmüştür. Daha sonra hücre süspansiyonu 3000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet 1 ml 20 mM CaCl₂ ile çözülmüştür. Ardından tekrar 3000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj yapılmıştır ve süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen pellet %15 gliserol ve 20 mM CaCl₂ içeren karışım ile çözülmüştür. Elde edilen kompetant hücre süspansiyonu 100 μ l olacak şekilde ependorflara dağıtılarak -80°C'de saklanmıştır.

3.4. BMV Vektörlerinin Çoğaltılması ve Transformasyonu

VIGS uygulaması için kullanılan Brome mozaik virüs (BMV) tabanlı vektörler pC13A/F1 +2 (F1) ve pC13B/F3CP5 (F3) Noble Research Institute (Ardmore,

Oklahoma)’den tedarik edilmiştir (Ding vd., 2019). Filtre kağıdına emdirilmiş olarak gelen vektörler, TrisEDTA (TE, Thermo Fischer Scientific) buffer içerisinde çözündürülüp -20 °C’ de muhafaza edilmiştir.

Muhafaza edilen vektörleri çoğaltmak için, kompetant *E. coli* DH5a suşu kullanılmıştır. Vektörleri, *E. coli*’ye aktarmak için ısı şoku metodu kullanılmıştır. (Froger ve Hall, 2007) Transformasyon işlemi için şu protokol koşulları izlenmiştir. 50 µl vektör, buzda erimiş 100 µl kompetent hücreye eklendi ve 30 dakika beklendikten sonra bakteriler buzdan alınıp 42°C’ de 45 saniye bekletilmiştir. 42°C’ den alınan bakteriler, buzda 5 dakika bekletildi ve üzerine 850 µl LB eklendikten sonra 37 °C’de 1 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bittikten sonra 6000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant 100 µl kalacak şekilde üst sıvı atıldı, kalan süpernatantla pellet çözölmüş ve kanamisinli LB agar petrilere ekilmişlerdir. Petriler 37 °C’de gece inkübasyona bırakılmıştır. Transformantlar, 50 µg ml⁻¹ kanamisin içeren LB agar petrilere seçilmiştir. Seçilen koloniler, sıvı LB besiyerine ekildi ve gece boyu inkübe edilmiştir. Büyüyen bakteri kültüründen “ThermoFisher GeneJET Plasmid Miniprep Kiti” ile ilgili protokol adımları takip edilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmitler daha sonra kullanmak için -20°C’ de saklandı.

3.5. BMV Vektörlerinin Kesim Enzimleri Kullanılarak Doğrulanması

Tez çalışması için seçilen ve çoğaltılması gereken, pC13A/F1+2 (F1) ve pC13B/F3CP5 (F3) VIGS vektörlerinin; Ding ve arkadaşları (2019) tarafından bildirilen restriksiyon enzimleri için kesim noktalarının doğrulanması, *NcoI* (R0193S) ve *AvrII* (R0174S) restriksiyon enzimleriyle gerçekleştirildi. İçerisinde klonlama bölgesi bulunan F3 plazmidinin kesim enzimleriyle doğrulanması için, reaksiyonda 1 µg DNA, 10x tampon ve bir ünite enzim kullanılarak hacim nükleazsız ddH₂O ile 10 µl’ye tamamlanmıştır. Reaksiyonlar, 37°C’ de 3 saat inkübasyona bırakılmış ve ardından daha sonraki işlemlere kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

F3 vektörünün, restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu 10 µl alınarak %0,8 agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır.

3.6. *Nicotiana benthamiana* Phytoene Desaturase (*Nb_PDS*) Geninin oğaltılması

F3 plazmidine aktarılabak *Nicotiana benthamiana* Phytoene desaturase (*Nb_PDS*) geninin elde edilebilmesi için, *N. benthamiana* tohumları soğuk beyaz floresan lambalar altında 16 saat foto periyod ile 25±2°C sıcaklıkta 1.5 L saksılarda büyütülmüştür. Bitkiler 13 günlük olduklarında, genç yapraklarından 0,5 g doku örnekleri alınarak hızlıca sıvı azotta dondurularak -80°C’de muhafaza edilmiştir. *Nb_PDS* geninin PCR ile çoğaltma işlemi için, yaprak dokularından RNA izolasyonu Trizol metoduna göre yapılmıştır (Rymen vd., 2007). RNA izolasyonu için, tütün bitkisine ait yaprak dokuları -80°C’den sıvı azot içerisine alınmıştır. Ependorflar içerisine 4 mm çapında 2 adet paslanmaz elik bilye konulmuştur. Ependorflar homojenizatör bloklarına yerleştirilip, homojenizatör (Retsch, LB.MM400) 25 saniye/45 frekans olacak şekilde ayarlanıp çalıştırılmıştır. İşlem bitince ependorfların kapakları kontrol edildikten sonra hızlıca sıvı azota alınmıştır. Örnekler sırayla sıvı azottan alınıp, ependorf içerisine 1’er ml TRIzol (Invitrogen) solüsyonu eklendi. Örnekler iyice vortekslenmiştir. Vortekslenen rnekler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve ardından üzerlerine 200’er l kloroform eklenmiştir (1ml TRIzol’e karşılık). Tüpler 15 saniye boyunca alt st yapılarak karıştırılmış ve 2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, örnekler 11.000 rpm +4°C’de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra, süpernatant (sıvı faz) yeni steril ependorflara aktarılmıştır. Yeni ependorflara alınan süpernatant üzerine, 450 l izopropanol eklenmiştir (450 l süpernatant için). Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, örnekler 11.000 rpm +4°C’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj bitince, ependorflar içerisindeki süpernatant atılarak pelletler 1ml %75’lik Etanol (Merck, USA) ile yıkanmıştır (1ml TRIzol için). Yıkamanın ardından, örnekler, 11.000 rpm +4°C’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra, ependorflardaki Etanol dökülerek pellet kurumaya bırakılmıştır. Kurutmanın ardından pellet 35 l ddH₂O ile çözülerek -20°C’de muhafaza edilmiştir.

N. benthamiana PDS geninin eldesi için, ekstrakte edilen total RNA kalıp olarak kullanarak cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA eldesi için “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Termofisher, Applied Biosystems, 00364532) kullanılmıştır.

Elde edilen cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak,

PDS-F 5'- CCTCCTAGGCTGACGAGCTTTTCGATG -3' (26 bp, AvrII bölgesinin altı çizilmiştir)

PDS-R 5'- CTTCCATGGCATATATGGACATTTATC -3'' (27 bp, NcoI bölgesinin altı çizilmiştir)

primerleri ile Tablo 1'de verilen koşullarda PCR gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: *Nicotiana benthamiana* PDS geninin sentezi için kullanılan PCR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
97 °C	30 saniye	1
98 °C	10 saniye	30
57 °C	20 saniye	
72 °C	20 saniye	
72 °C	10 dakika	1

PCR ile çoğaltılan, *N. benthamiana* PDS geni, %1'lik agaroz jel elektroforezi ile yürütüldükten sonra ürün boyutu (370bp) kontrol edilerek doğrulanmıştır.

3.7. Nb_PDS Gen Fragmentinin VIGS Vektörüne Klonlanması

PCR ile çoğaltılan Nb-PDS fragmenti F3 plazmidine Ding ve arkadaşları (2019) tarafından önerilen metoda göre klonlanmıştır. Bu metoda göre; F3 plazmidi AvrII ve NcoI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesim reaksiyonu için kullanılan protokol şu şekildedir. 1µg vektör, 1ünite enzim, geri kalan hacim 10µl'ye nükleazsız ddH₂O kullanılarak tamamlanmıştır. AvrII ve NcoI ile muamale edilmiş vektör, %1'lik agaroz jelde yürütülmüş, ilgili bantlar jelden kesilerek Thermo Fisher Jel Ekstraksiyon kiti kullanılarak (K0691) ilgili bantların jelden geri kazanımı sağlanmıştır. AvrII ve NcoI restriksiyon enzim kesim bölgesi ihtiva eden *N. benthamiana* PDS PCR ürünü, AvrII ve NcoI restriksiyon enzimleri ile 1µg DNA, 1ünite enzim oranında reaksiyon hazırlanıp kesilmiştir. Elde edilen kesilmiş PCR ürününü saflaştırmak için PCR saflaştırma kiti (Thermo Fisher, K0691) ile muamele edilmiştir. Vektör ve PCR ürünü

T4 DNA ligaz (Thermo Fisher Scientific) enzimiyle 5:3 insert:vektör oranında karıştırılarak gece boyunca +4°C 'de ligasyona bırakılmıştır. Hazır vektör sonraki çalışmalar için -20°C'de saklanmıştır.

3.8. Nb_PDS Gen Fragmentini İçeren Susturma Vektörünün Kesim Enzimleriyle Doğrulaması

Hazırlanan F3 plazmidinin, içerisinde *N. Benthamiana* PDS genini ihtiva ettiğini kontrol etmek için, F3 vektörü tekrardan *NcoI* ve *AvrII* kesim enzimleriyle kesilip agaroz jel elektroforezinde yürütülerek doğrulaması yapılmıştır.

3.9. Nb_PDS Gen Fragmentini İçeren VIGS Vektörünün *E. coli* DH5α'ya Transformasyonu

Nb_PDS içeren VIGS vektörü kesim enzimleriyle doğrulandıktan sonra, 10µl ürün *E. coli* DH5α'ya ısı şoku metoduyla aktarılmıştır. İçerisinde VIGS vektörü bulunan transformantlar, 50 µg ml⁻¹ kanamisin içeren LB katı besiyerine ekilmiş ve gece boyu inkübe edilmiştir. Seçici besiyerinde büyüyen kolonilerden seçilerek 50 µg ml⁻¹ kanamisin içeren sıvı besiyerinde büyütülmüştür. Büyüyen bakteri kültüründen "ThermoFisher GeneJET Plasmid Miniprep Kiti" ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmitler daha sonra kullanmak için -20 °C'de saklanmıştır.

3.10. Nb_PDS VIGS Vektörünün *A. tumefaciens*'e Transformasyonu

E. coli DH5α'dan izole edilen vektörden 10 µl alınarak *A. tumefaciens* EHA105'e ısı şoku metoduyla aktarılmıştır. İçerisinde VIGS vektörü bulunan transformantlar, 100 µg ml⁻¹ kanamisin ve 50 µg ml⁻¹ gentamisin içeren LB besiyerine ekilmiş ve gece boyu inkübe edilmiştir. Seçici besiyerinde büyüyen kolonilerden seçilerek 100 µg ml⁻¹ kanamisin ve 50 µg ml⁻¹ gentamisin içeren sıvı LB besiyerinde gece boyu inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Büyüyen transformantlar 375 µl %80 gliserol, 625 µl transformant karışımı hazırlanıp -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.11. Agro-transformantların *N. benthamiana* Bitkisine Agroinfiltrasyonla Aktarımı

İçerisinde Nb_PDS gen fragmenti bulunan F3 vektörünü içeren *A. tumefaciens* ve yardımcı vektör olan F1'in içerisinde bulunduğu *A. tumefaciens* bakterileri, ayrı ayrı $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamisin ve $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamisin içeren sıvı LB besiyerinde OD 0,8 değerine kadar büyütülmüştür. Her vektör grubu ayrı ayrı 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda sıvı besiyeri atılmıştır. Geri kalan pelletler ayrı ayrı 5 ml infiltrasyon buffer (0.5 M MgCl_2 , 0.5 MES) ile çözüldükten sonra 1:1 oranında birleştirilip agroinfiltrasyon gerçekleştirilmiştir.

3.12. *Zea mays* *Phytoene Desaturase* (*Zm_PDS*) Geninin Çoğaltılması

Zea mays PDS (*Zm_PDS*) gen fragmentinin elde edilebilmesi için, *Zea mays* tohumları soğuk beyaz floresan lambalar altında 16 saat fotoperiod ile $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 1.5 L saksılarda büyütülmüştür. *Zm_PDS* geninin PCR ile eldesi için, 10 günlük olan bitkilerin genç yapraklarından Trizol metoduna göre RNA izolasyonu yapılmıştır.

Zm_PDS geninin eldesi için, izole edilen total RNA kalıp olarak kullanarak cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Termofisher, Applied Biosystems, 00364532) kullanılmıştır.

Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak,

PDS-F: 5'CCTCCTAGGGAATGGATTGGTCGAAG3' (*AvrII* kesim bölgesi içerir)

PDS-R: 5'CTTCCATGGCCATAGAAGCCAGGTATTTC3' (*NcoI* kesim bölgesi içerir) primerleri ile Tablo 1'de verilen koşullarda PCR gerçekleştirilmiştir.

PCR sonucu çoğaltılan *Zm_PDS* gen ürünü, %1'lik agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek ürününün boyutuna (250bp) göre doğrulama yapılmıştır.

3.13. *Zm_PDS* Gen Fragmentini İçeren VIGS Vektörünün Hazırlanması

F3 plazmidine, *Z. mays* PDS geninin klonlanması, Ding ve arkadaşları (2019) tarafından bildirilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. Bu metoda göre; F3 plazmidi *AvrII* ve *NcoI* restriksiyon enzimleri ile $1 \mu\text{g}$ DNA, 1 ünite enzim oranında karıştırılarak kesilmiştir. *AvrII* ve *NcoI* ile muamele edilmiş vektör, %1'lik agaroz jelde yürütülmüş,

ilgili bantlar jelden kesilerek Thermo Fisher Jel Ekstraksiyon kiti kullanılarak (K0691) geri kazanım sağlanmıştır. *AvrII* ve *NcoI* restriksiyon enzim kesim bölgelerini ihtiva eden *Z. mays* PDS PCR ürünü, *AvrII* ve *NcoI* restriksiyon enzimleri ile 1µg DNA, 1 ünite enzim oranında muamele edilip, PCR saflaştırma kiti (Thermo Fisher, K0691) ile muamele edilmiştir. Elde edilen PCR ürünü ve vektör ligasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ligasyon reaksiyonunda 1 ünite T4 DNA ligaz (Thermo Fisher Scientific) enzimi, 5/3 oranında vektör-insert kullanılmıştır. Örnekler gece boyunca 4°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.14. Zm_PDS Gen Fragmentini İçeren VIGS Vektörünün *E. coli* DH5α’ya Transformasyonu

Zm_PDS gen fragmenti içeren VIGS vektöründen 10 µl alınarak *E. coli* DH5α’ya ısı şoku metoduyla aktarılmıştır (Metot 3.2.’de ayrıntılı anlatılmıştır). İçerisinde VIGS vektörü bulunan transformantlardan seçilen koloniler, 50 µg ml⁻¹ kanamisin içeren LB’ye ekilmiş ve gece boyu inkübe edilmiştir. Büyüyen bakteri kültüründen “ThermoFisher GeneJET Plasmid Miniprep Kiti” ile vektör izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen vektörler daha sonra kullanmak için -20 °C’de saklandı.

3.15. Zm_PDS Gen Fragmentini İçeren VIGS Vektörünün *A. tumefaciens*’e Transformasyonu

Zm_PDS gen fragmenti içeren F3 ve yardımcı F1 vektörlerinin, *A. tumefaciens*’e aktarımı ısı şoku metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre; -80°C stoklarından alınan kompetant *A. tumefaciens* bakterilerinden 100µl alınıp, 10µl vektör (1µg) ile steril ependorfta birleştirilip, el ile nazikçe alt üst yapılmıştır. Karışım 10 dakika boyunca buzda bekletildi. Ependorf, 5 dakika boyunca 37°C’ de 5 dakika boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sırasında ara ara ependorf alt üst yapılmıştır. Ependorf 5 dakika boyunca buzda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, ependorfa 890 µl LB eklenerek, 3 saat boyunca 28°C, 200 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, 3000 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmış ve pellet 100µl LB içerisinde çözülerek içerisinde 100 mg/µl kanamisin ve 10 mg/µl gentamisin bulunan seçici katı besiyerine ekildikten sonra 28°C’de 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 2 gün sonunda büyüyen koloniler, içerisinde kanamisin ve gentamisin bulunan sıvı LB besiyeri içerisinde, 28°C ve 200 rpm’de gece

boyu inkübasyona bırakılmıştır. Büyüyen bakterilerden 625 µl alınıp, üzerine 375 µl %80'lik gliserol çözeltisi eklenerek -80 stoğu hazırlanmıştır.

3.16. Zm_PDS Gen Fragmentini İçeren VIGS Vektörünün *N. benthamiana* Bitkisine Agroinfiltrasyonu

80°C'ye kaldırılmış olan, içerisinde Zm_PDS bulunan F3 ve yardımcı F1 vektörleri bulunan *A. tumefaciens* bakterileri, içerisinde kanamisin ve gentamisin bulunan 3.5 ml sıvı LB besiyerinde, 28°C ve 200 rpm'de gece boyu üremeye bırakılmıştır. Üreyen bakteriler içerisinde kanamisin ve gentamisin bulunan 50ml sıvı LB besiyerinde, OD değerleri 0.6-0.8 aralığına gelene kadar, 28°C ve 200 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 3000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıp süpernatant atılmıştır. Pelletler ayrı ayrı içerisinde 10 mm MES buffer (pH=5.2) ve 10 mm MgCl₂ bulunan infiltrasyon buffer ile çözülmüştür. Çözülen pelletleri agroinfiltrasyona hazırlamak amacıyla eşit oranda birleştirip acetocyringone (Merc) eklenerek 3 saat boyunca 28°C ve 200 rpm de inkübasyona bırakılmıştır.

Agroinfiltrasyonun yapılacağı *Nicotiana benthamiana* tohumları, soğuk beyaz floresan lambalar altında 16 saat fotoperiod ile 25±2°C sıcaklıkta 1.5L saksılarda büyütülmüştür. 4 haftalık olan *N. benthamiana* bitkilerine steril şırınga ile yaprakların adaksiyal bölgesinden agroinfiltrasyon uygulanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: *Nicotiana benthamiana* bitkilerine şırınga ile yapraklarının adaksiyal bölgesine agroinfiltrasyon uygulaması

3.17. Agroinfiltrasyon Sonrası Floem Özütünün Çıkarılması ve Mısır Fidelerine Uygulanması

Agroinfiltrasyon yapılan *N. benthamiana* bitkileri 1 hafta boyunca gözlenmiştir. 7 günün sonunda agroinfiltrasyon uygulanan yapraklar toplanıp %70'lik EtOH ile yüzey sterilizasyonu yapıp sıvı azotta dondurulmuştur. Sterilizasyonu yapılan yapraklar, havan ve eli yardımıyla soğuk 10mM Na₂PO₄ içerisinde ezilerek floem özütü çıkarılmıştır.

Yaklaşık 80 µl özt alınarak, mısır yaprakların tam ortasına olacak şekilde pipet ile bırakılmıştır. Bu sayede yeni gelişen ikinci yaprakların floem özütünü yaprak uçlarından alması sağlandı. Bu işlem 3 gün boyunca yukarıda belirtilen optimum şartlarda sürdürüldü. Böylece fidelerde VIGS tetiklenmesi sağlanmıştır. Birinci gruba, içerisinde miR408 genini susturacak vektörün bulunduğu tütün floem özütü verildi ve STTM_miR408a/b (STTM) grubu olarak adlandırılmıştır. İkinci gruba ise boş vektör bulunan tütün floem özütü verildi ve boş vektör (BV) grubu olarak adlandırılmıştır.

3.18. miR408'in Hedef Genlerinin *in silico* Tahmini

miRNA'nın hedeflediği genlere ait kodlama yapan diziler (CDS), mısır genetik ve genomik veri bankasından (<https://www.maizegdb.org/>), mısır bitkisi miRNA genlerine ait diziler ise miRBase veri bankasından (www.mirbase.org/) elde edilmiştir. miRNA ve olası hedef genleri, psRNATarget web servisi (A Plant Small RNA Target Analysis Server) kullanılarak tahmin edilmiştir. Burada kullanılan parametreler şu şekildedir: max. expect değeri=3, hp size=20; target accessibility=25, flanking length=17bp upstream ve 13bp downstream ve central mismatch=9-11 nt (Dai ve Zhao, 2011).

Tablo 3.2. miR408a/b'in biyoinformatik araçlar kullanılarak elde edilen tahmini hedef genleri

miRNA_Acc.	Expectation	miRNA_start	miRNA_end	Target_start	Target_end	alignment	Inhibition	Target_Desc.
zma-miR408a CUGCACUGCCUCUUCCCUGGC	1.5	1	21	331	351		Cleavage	Zm00001d028486_T001 Chemocyanin
	3.0	1	21	646	666		Cleavage	Zm00001d051333_T001 Blue copper protein
	2.0	1	21	234	254		Cleavage	Zm00001d033709_T001 Basic blue protein (umc1431)
	3.0	1	21	1930	1950		Cleavage	Zm00001d002434_T001 aox3 - (alternative oxidase3)
	3.5	1	21	406	426		Cleavage	Zm00001d012477_T002 Laccase 22
zma-miR408b-3p CUGCACUGCCUCUUCCCUGGC	1.5	1	21	331	351		Cleavage	Zm00001d028486_T001 Chemocyanin
	3.0	1	21	646	666		Cleavage	Zm00001d051333_T001 Blue copper protein
	3.0	1	21	1930	1950		Cleavage	Zm00001d002434_T001 aox3 - (alternative oxidase3)
	3.5	1	21	406	426		Cleavage	Zm00001d012477_T002 Laccase 22
	2.0	1	21	234	254		Cleavage	Zm00001d033709_T001 Basic blue protein (umc1431)
zma-miR408b-5p CAGGGACGAGGCAGAGCAUGG	3.5	1	21	163	183		Cleavage	Zm00001d040364_T001 Peroxidase 72
	3.5	1	21	458	478		Cleavage	Zm00001d014366_T001 L-ascorbate oxidase

3.19. miR408a/b için STTM Hazırlanması

Yapılan bu çalışmada miRNA susturmak için kullanılan STTM yöntemi Tang vd, 2012'ye göre uygulanmıştır. Bu yöntemde, oluşturulan nükleotit dizisinin ortasında saç tokası yapısı oluşturacak bir tekrarlı dizi (STTM_linker) bulunmaktadır ve bu dizinin sağ ve sol taraflarına miR408a (5'CUGCACUGCCUCUUCCCUGGC3') ve mir408b-5p (5'CAGGGACGAGGCAGAGCAUGG3') dizileri eklenmiştir.

STTM_linker:

GTGCAGGTTGTTGTTGTTATGGTCTAGTTGGTTGTTGTTGTTATGGTCAAA
TTGGTCTAAAGAAGAAGAATATGGTCTAAAGAAGAAGAATCCAT

Bu şekilde tasarlanan STTM_miR408a/5p, uç kısımlarında AvrII ve NcoI kesim bölgelerini içerecek şekilde, çift zincirli olarak hizmet alımıyla (Rafigen) sentezletilmiştir.

zm-miR408-STTM-F:

5'CTAGGCCCAGGGAACCTCGCAGTGCAGGTTGTTGTTGTTATGGTCTAGTTG
GTTGTTGTTGTTATGGTCAAATTGGTCTAAAGAAGAAGAATATGGTCTAA
AGAAGAAGAATCCATGCTCTCTGGCTCGTCCCTG-3' (AvrII altı çizili)

zm-miR408-STTM-R:

5'CATGCAGGGACGAGCCAGAGAGCATGGATTCTTCTTCTTTAGACCATAT
TCTTCTTCTTTAGACCAATTTGACCATAACAACAACAACCAACTAGACCA
TAACAACAACAACCTGCACTGCGAGTTCCCTGGC-3' (*NcoI* altı çizili)

Hazırlanan STTM dizisinin sağ tarafında *NcoI*, sol tarafında *AvrII* enzim kesim uçları bulunmaktadır. F3 plazmid, *NcoI* ve *AvrII* kesim enzimleriyle çifte kesim yapıldıktan sonra, oligo ve plazmid T4 DNA ligaz (NEB) ile birleştirilmiştir. Reaksiyonda 1 ünite enzim, 5:3 vektör-insert oranında enzim ve reaksiyon buffer kullanılmış ve hacim 10 µl'ye nükleazsız distile su ile tamamlanmıştır. Örnekler gece boyunca 4°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası örnekler -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.20. STTM_miR408a/b İçeren VIGS vektörünün Kesim Enzimleriyle Doğrulaması

Hazırlanan STTM_miR408a/5p vektörü, *NcoI* ve *AvrII* enzimleri ile kesilip, %1 agaroz jelde 100V ile 30 dakika yürütülmüştür. STTM_miR408a/5p'in vektör içerisinde varlığı jelde vektör ve fragmente ait iki banta ve büyüklüklerine göre belirlendi.

3.21. Agroinfiltrasyon, Bitki Floem Özütü Ekstraksiyonu ve STTM-miR408a/b'nin Mısır Bitkisine Aktarımı

Çalışmada kullanılacak F1 ve F3 vektörleri, 3.1.8'de anlatıldığı gibi *E. coli* bakterisine transforme edilip, bakteride çoğaltıldıktan sonra miniprep kiti (Thermo Fischer Scientific) ile izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen vektörler, *A. tumefaciens* (EHA105) bakterisine transforme edildikten sonra *N. benthamiana* bitkisine agroinfiltrasyon işlemi ile uygulanmıştır. Uygulama sonrası yapraklardan floem özütü elde edilmiştir. Mısır tohumları soğuk beyaz floresan lambalar altında 16 saat fotoperiod ile 25±2°C sıcaklıkta 1.5L saksılarda büyütülmüştür. 7 günlük olan mısır fidelerinin, açılan yapraklarının iç kısmına ilk iki gün 30 µl, üçüncü gün 50 µl, dördüncü gün 80 µl özüt verilerek verilen özütü yaprak uçlarından içeri almaları sağlandı.

3.22. Yaprak Uzunluğunun Ölçülmesi ve Yaprak Uzama Oranının Belirlenmesi

Soğuk stresine maruz bırakılan STTM^S ve BV^S ve kontrol sıcaklıklarında yetiştirilen STTM ve BV gruplarında yer alan fidelerin ikinci ve üçüncü yaprakları ortaya çıktığı günden itibaren, tamamen olgunlaşmaya kadar günlük olarak ölçülmüştür. Elde edilen tüm verilerin ortalaması ve standart sapması belirlenerek yaprak uzunluğu (YU) profil grafiği oluşturulmuştur. Yaprak uzunluğunun türevi alınarak yaprak uzama oranı (YUO), her gün ölçülen yaprakların, ölçüm zaman aralıklarına bölünerek hesaplanmıştır. Ölçümler 12 bitkide gerçekleştirilmiş olup ortalama ve standart hata olarak sunulmuştur. Gruplar arasındaki farkın önem derecesi SPSS (ver 27.0.1) istatistik paketi (IBM) içinde yer alan tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'ne göre belirlenmiş ve $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kullanılmıştır.

3.23. Kantitatif RT-PCR Yöntemi ile Transkript Seviyesinin Belirlenmesi

Soğuk stresine maruz bırakılan STTM^S ve BV^S ve kontrol sıcaklıklarında yetiştirilen STTM ve BV gruplarında yer alan fidelerin ikinci yapraklarında miR408a/b ve hedeflediği genlerin ekspresyonlarını belirlemek için sırasıyla aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

3.23.1. Primerlerin Tasarımı

qRT-PCR analizi ile miRNA hedef genlerinin ifadelerini belirlemek için, genlere özgü primer tasarımı için dizi bilgileri MaizeGDB veri bankasından elde edildikten sonra, SCiTools OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) ile tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler, SCiTools OligoAnalyzer içinde yer alan araçlar ile, erime sıcaklığı (T_m) 58-61°C, 50°C'de saç tokası formasyonu $\Delta G > -3$ kcal/mol, 50°C'de kendi ve karşı dimer formasyonu $\Delta G > -6$ kcal/mol olacak şekilde kontrol edilmiştir. Primer özgünlüğü için BLASTn algoritması kullanılmıştır (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

miRNA cDNA sentezi için stem-loop RT primeri Varkonyi-Gasic vd., (2007)'e göre tasarlanmıştır. Buna göre universal bir stem-loop dizisinin son altı bazı ma-miRNA'nın 3' ucuna komplementar olacak şekilde tasarlanmıştır.

qRT-PCR analizi ile miR408a/5p ifade seviyesini belirlemek için ileri ve geri primerler Varkonyi-Gasic vd., (2007)'e göre belirlenmiştir. Buna göre ileri primerler ma-miRNA dizisinin 5' kısmını içerecek şekilde tasarlanmıştır. Geri primer ise miRNA cDNA sentezi sırasında kullanılan stem-loop kısma komplementer evrensel geri primerdir.

miR408'in hedeflediği genler için, genlerin kodlayan bölgesine spesifik ileri ve geri primerler SClTools OligoAnalyzer kullanılarak tasarlanmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm primerler Tablo 3.3'te sunulmuştur.

3.23.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için, tütün bitkisine ait yaprak dokuları -80°C'den sıvı azot içerisine alınmıştır. Ependorflar içerisine 4 mm çapında 2 adet paslanmaz çelik bilye konulmuştur. Ependorflar homojenizatör bloklarına yerleştirilip, homojenizatör (Retsch, LB.MM400) 25 saniye/45 frekans olacak şekilde ayarlanıp çalıştırılmıştır. İşlem bitince ependorfların kapakları kontrol edildikten sonra hızlıca sıvı azota alınmıştır. Örnekler sırayla sıvı azottan alınıp, ependorf içerisine 1'er ml TRIzol (Invitrogen) solüsyonu eklendi. Örnekler iyice vortekslenmiştir. Vortekslenen örnekler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve ardından üzerlerine 200'er µl kloroform eklenmiştir (1ml TRIzol'e karşılık). Tüpler 15 saniye boyunca alt üst yapılarak karıştırılmış ve 2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, örnekler 11.000 rpm +4°C'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra, süpernatant (sıvı faz) yeni steril ependorflara aktarılmıştır. Yeni ependorflara alınan süpernatant üzerine, 450 µl izopropanol eklenmiştir (450 µl süpernatant için). Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, örnekler 11.000 rpm +4°C'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj bitince, ependorflar içerisindeki süpernatant atılarak pelletler 1ml %75'lik Etanol (Merck, USA) ile yıkanmıştır (1ml TRIzol için). Yıkamanın ardından, örnekler, 11.000 rpm +4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra, ependorflardaki Etanol dökülerek pellet kurumaya bırakılmıştır. Kurutmanın ardından pellet 35 µl ddH₂O ile çözülerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3: Çalışmalarda kullanılmak üzere tasarlanan primerlerin listesi.

Gen ID		Primers (5'→3')	Uzunluk (bp)	Kesim Bölgesi
Nb_PDS (Phytoene desaturase) (AJ571700.1)	F	CCTCCTAGGCTGACGAGCTTT CGATG	26	AvrII
	R	CTTCCATGGCATATATGGACA TTTATC	27	NcoI
Zm_PDS (Phytoene desaturase) (Zm00001d019124)	F	CCTCCTAGGGAATGGATTGGT CGAAG	26	AvrII
	R	CTTCCATGGCCATAGAAGCCA GGTATTTC	29	NcoI
BBP (Basic blue protein) (Zm00001d033709)	qF	ATTTCACCTCGTTCCACACC		-
	qR	CCTTGCACTGCCTCTTC		
LAC (Laccase) (Zm00001d012477)	qF	CACCACCATCAGTTCGTT		-
	qR	CCCTCTCTGACCTCCAG		
BCP (Blue copper protein) (Zm00001d051333)	qF	TGTGGCCCGTTGTGTTA		
	qR	AGGTCCAGCATGAAGGATTC		
zm-miR408a	miRNA sequence	CUGCACUGCCUCUCCCCUGGC		
zm-miR408b-5p	miRNA sequence	CAGGGACGAGGCAGAGCAUGG		
zm- STTM-miR408	F	CTAGGCCAGGGAAGTTCGAGTGC AGGTTGTTGTTGTTATGGTCTAGT TGGTTGTTGTTGTTATGGTCAAAT TGGTCTAAAGAAGAAGAATATGG TCTAAAGAAGAAGAATCCATGCT CTCTGGCTCGTCCCTG	310	AvrII
	R	CATGCAGGGACGAGCCAGAGAGC ATGGATTCTTCTTCTTTAGACCAT ATTCTTCTTCTTTAGACCAATTTGA CCATAACAACAACAACCACTAGA CCATAACAACAACAACCTGCACTG CGAGTTCCCTGGC	310	NcoI
zm-miR408a –zm-miR408b-5b	Stem-loop-F	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTTCGCACTGGATACGACGCCA GG		
	qF	GCCTCTCTGCACTGCCTC		
	Universal-R	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Zm_β-Tub (Beta Tubulin) (NP_001105457)	qF	CTACCTCACGGCATCTGCTATGT		
	qR	GTCACACACACTCGACTTCACG		
Nb_β-Tub (Beta Tubulin)	qF	CTACCTCACGGCATCTGCTATGT		
	qR	GTCACACACACTCGACTTCACG		

3.23.3. cDNA Sentezi

MikroR408 için cDNA sentezinde, Varkonyi-Gasic ve arkadaşları (2007) tarafından önerilen metodolojiye uygun olarak High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (ThermoFisher) kullanılmıştır. Toplam 20 µl'lik bir reaksiyon hacmi hazırlanmıştır. Her reaksiyon için, toplam hacim 20 µl'ye ulaşana kadar bileşenler eklenmiştir. 2 µl 10x RT tamponu, 0,5 µl dNTP karışımı (100 mM), 0,25 µl ters transkriptaz, miR408 için 1 µl stem-loop RT primeri ve 2 µg cDNA kullanılmıştır. Son hacim nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. Tüpler PCR cihazına koyulup pulsed reverse transcription protokolü uygulandı. Cihazın döngü koşulları şu şekilde ayarlanmıştır:

16°C'de 30 dakikalık bir inkübasyon süresi, 30°C'de 30 saniye, 42°C'de 30 saniye ve 60 döngü için 50°C'de 1 saniye ve ters transkriptaz inaktivasyonu için 85°C'de 5 dakikalık bir inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra örnekler çıkarılmış ve kantitatif ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi için kullanılabilecek kadar -20°C'de saklanmıştır. miR408'in hedef genleri olan LAC, BBP, BCP ve *N. benthamiana* ile *Z. mays* PDS cDNA'ları, SuperScript III First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen) kullanılarak kit içerisinde tanımlanan protokol adımları takip edilerek sentezlenmiştir. Burada, mRNA'lar kalıp olarak kullanılarak reverse transkriptaz enzimi (RNA'ya bağlı DNA polimeraz) ve random hekzamer primerler ile cDNA'ya çevrildi. cDNA sentezi için izole edilen total RNA'lar kullanıldı. Her reaksiyon için; 13.2 µl ddH₂O, 2 µl 10x RT buffer, 0.8 µl 25x dNTP karışımı (100 mM), 2 µl 10x random primerler, 1 µl RTase ve 1 µl total RNA kullanıldı. PCR cihazı 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika, 85°C'de 5 dakika, 4°C'de ∞ olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra örnekler çıkarılmış ve kantitatif ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi için kullanılabilecek kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.23.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q-RT-PCR) Yöntemi

miRNA ve hedef genlerinin ekspresyon seviyesi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (q-RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir. Kantitatif (qRT-PCR) gerçekleştirmek amacıyla Aidlabs SYBR Green qPCR kiti ve beraberindeki protokol kullanılmıştır. miR408 ile çalışırken her bir kuyucuk için; 10 µl, SYBR Green qPCR mix, 1 µl ileri primer (10 mM), 1 µl evrensel geri primer (10 mM), 2 µl c-DNA, 6 µl ddH₂O koyulmuştur. miR408'in hedeflediği LAC, BBP, BCP ve Nb_PDS, Zm_PDS ile çalışırken ise her bir kuyucuk için; 10 µl SYBR green qPCR mix, 1 µl ileri primer (10 mM), 1 µl geri primer (10 mM), 1 µl cDNA, 7 µl ddH₂O koyuldu. qPCR cihazı (Applied Biosystem, StepOnePlus); 5 dakika boyunca 95°C'de inkübe edilip, ardından 5–35°C'de 35–45 döngü, 10 s için 60°C ve 1 s için 72°C olacak şekilde ayarlandı. Nisbi (relative) ekspresyon miktarı $\Delta\Delta C_t$ (2^{- $\Delta\Delta C_t$}) metoduna göre belirlenmiştir (Pfaffl, 2001). Normalizasyon mısıra ait *Zea mays* beta tübülün geni ile yapılmıştır (Tablo 1). Analizler 3 biyolojik ve 2 teknik tekrarlı olarak yapılmış ve sonuçlar ortalama ve standart hata şeklinde sunulmuştur. Nispi transkript miktarı her deney grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farkın önem

derecesi SPSS istatistik programı içinde yer alan tek yönlü varyans analizine (ANOVA)'ya göre belirlenmiş ve $P < 0,05$ olduğunda iki grup arasında anlamlı fark olduğu kabul edilmiştir.

3.24. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Soğuk stresine maruz bırakılan STTM^S ve BV^S ve kontrol sıcaklıklarında yetiştirilen STTM ve BV gruplarında yer alan fidelerin ikinci yapraklarında hücre içi redoks regülasyonunu gözlemleyebilmek için antioksidan enzim aktiviteleri aşağıda sırasıyla anlatılan çalışmalar ile belirlenmiştir.

3.24.1. Bitki Yaprak Dokularında Toplam Çözünabilir Protein Ekstraksiyonu ve Miktarlarının Belirlenmesi

Toplam protein ekstraksiyonu için, boş vektör ve STTM_miR408a/5p ile muamele edilip kontrol koşullarında yetiştirilen bitkiler ile boş vektör ve STTM ile muamele edilip soğuk stresine maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprakları kullanılmıştır. Bu dört şartta yetiştirilen mısır fidelerinin yapraklarından alınan yaklaşık 0,5 g doku örnekleri, hızlıca 2ml'lik ependorflara alınarak sıvı azot içerisinde fikse edilmiştir. Örnekler deney zamanına kadar -80°C'ta muhafaza edilmiştir. Karşılaştırmalı ve istatistiksel analizler yapabilmek için, soğuk stresi ve kontrollü şartlarda yetiştirilen mısır fidelerinden üçer biyolojik tekrarlı örnek alınmıştır.

Toplam protein ekstraksiyonu Kayihan ve arkadaşlarına (2016) göre gerçekleştirilmiştir. -80°C'de saklanan örnekler sıvı nitrojene alınmış ve ardından homojenizasyon bloklarına yerleştirilmiştir. Homojenizatör 30 saniye süreyle 25 Hz frekansta çalıştırılmıştır. Bu işlem numuneler tamamen toz haline gelene kadar tekrarlanmıştır. Ardından, 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.8), 1 mM EDTA ve %2 polivinilpirolidon (PVP) içeren 1 ml ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve vortekslenmiştir. Ardından, tüpler 10.000 rpm'de ve 4°C'de 30 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj edilen örneklerin süpernatantları boncuklarla temas ettirilmeden dikkatlice uzaklaştırılmış ve temiz ependorf tüplere aktarılmıştır.

Toplam protein içeriği Bradford (1976) tarafından önerilen metodolojiye uygun olarak belirlenmiştir. Bunun için, 2 mg/ml sıgır serum albümini (BSA) stok çözeltisi

hazırlanmış ve bu stok çözeltisinden 2 ml'lik ependorf tüplerinde sırasıyla 0,0 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml ve 2 mg/ml konsantrasyonlarda bir dizi seyreltilmiş standart çözelti hazırlanmıştır. Çözeltilerin spektrofotometrik değerleri kaydedilmiş ve Microsoft Excel programı kullanılarak bir standart eğri oluşturulmuş ve bu eğri daha sonra numunelerdeki protein miktarlarını belirlemek için referans olarak kullanılmıştır. Bu amaçla, her bir BSA çözeltisinden 5 µl ve bir kuyucuğa 250 µl Bradford reaktifi (SIGMA) eklenerek 96 kuyucuklu bir plaka (TPP, İsviçre) kullanılmıştır. Ölçümler üç teknik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kör numunesi oluşturmak için 255 µl Bradford reaktifi eklenmiştir. Ölçülecek BSA numunelerinin analizi için 5 µl protein çözeltisi ve 250 µl Bradford reaktifi eklenmiştir. Kuyucuklar bir pipet kullanılarak dikkatli ve hassas bir şekilde pipetlenmiştir. Örnekler karanlıkta oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ardından, çok kuyulu bir okuyucuda (Thermo Scientific Varioskan Flash) 595 nm absorbans değerinde spektral bir tarama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, örneklerin toplam protein içeriği Microsoft Office Excel programındaki standart eğri grafiğine uygun olarak mg/ml cinsinden hesaplanmıştır. Ekstrakte edilen protein örnekleri antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.24.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz enzim aktivitesinin ölçümü için, deneysel prosedürde kullanılan konsantrasyonlar; 900 µl 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 50 µl 200 mM H_2O_2 ve 50 µl toplam protein ekstraktı şeklindedir. Kör örnek ise, 950 µl 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8) ve 50 µl H_2O_2 ile hazırlanmıştır. Ölçümler 1,5 ml kuvars küvet ve Shimadzu UV1280 spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometre ölçüm amacıyla 240 nm dalga boyuna kalibre edilmiştir. Kör ve protein örnekleri 90 saniye boyunca kuvars küvette ölçülmüş ve absorbanstaki düşüş Chance ve Maehly (1995) tarafından özetlenen metodolojiye uygun olarak kaydedilmiştir.

Katalaz enzimi hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene indirgeyerek hücrenin oksidatif hasar görmesini önler. “Katalaz aktivitesi birimi” terimi, 1 M H_2O_2 'yi hidrojen ve oksijene dönüştürmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanır. Katalaz enziminin aktivitesi Aebi (1984) tarafından önerilen metodolojiye uygun olarak belirlenmiştir. Deney, üç teknik replikanın ve üç biyolojik replikanın ortalaması olarak hesaplanmış ve varyasyon derecesini belirtmek için standart hata çubukları

kullanılmıştır. Gruplar arasında gözlenen farklılıkların istatistiksel önemi, SPSS içinde yer alan tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA)'ne göre belirlenmiştir.

3.24.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD enzim aktivitesini ölçmek için Banowertz ve arkadaşları (2004)'na göre yapılmıştır. Buna göre, 44 µl 250 mM KH_2PO_4 (pH 7.8), 20 µl 75 mM NBT, 26 µl 100 mM metiyonin, 90 µl riboflavin ve 20 µl protein (5-10 mg/ml) olacak şekilde reaksiyon kurulmuştur. Bu çözelti 96 kuyulu bir TPP hücre kültürü plakasına eklenmiştir. Kör için, yukarıda bahsedilen çözelti aşağıdaki bileşenlerle hazırlanmıştır: 44 µl 250 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8): 5 mM EDTA, 20 µl 75 mM NBT, 26 µl 100 mM metiyonin, 90 µl riboflavin. 96 kuyucuklu plaka (TPP, İsviçre) Varioskan spektrofotometreye (Thermo Scientific Varioskan Flash) yerleştirilmiş ve ölçümden önce bir dakika süreyle çalkalanmıştır. Çalkalama işleminin ardından absorbans 560 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Ölçümün tamamlanmasını takiben, plaka 10 dakika süreyle floresan ışık altında inkübe edilmiştir. Daha sonra cihaza geri konmuş ve numunelerin absorbansı bir dakika daha çalkalandıktan sonra 560 nm'de bir kez daha ölçülmüştür.

SOD ölçümünde, numunelerde bulunan riboflavin, enzim ölçümünde bir kofaktör görevi görür. Riboflavin süperoksit radikalleri üretir ve bunlar daha sonra ışık varlığında SOD tarafından nötralize edilir. Süperoksit radikalleri numunelere eklenen NBT'yi indirger ve bu da absorbans değerinde bir düşüşe neden olur. Sonuç olarak, SOD nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgeyen süperoksit radikallerini nötralize eder. Bu nedenle, absorbans değeri ne kadar düşükse, numunelerde bulunan SOD enzimlerinin sayısı o kadar fazladır.

SOD enzim aktivitesi Kono (1978) tarafından önerilen metodolojiye uygun olarak hesaplanmıştır. Buna göre bir ünite enzim, 560 nm'de NBT miktarındaki değişimin neden olduğu absorbans farkını bir dakikada %50 azaltmak için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. SOD enzim aktivitesi miligram başına ünite olarak ifade edilmiştir. Deney üç teknik ve üç biyolojik replika ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasında gözlenen farklılıkların istatistiksel önemi, SPSS içinde yer alan tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA)'ne göre belirlenmiştir.

3.24.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

GR enzim aktivitesi deneyi Çakmak ve diğerleri (2006) tarafından özetlenen metodolojiye göre gerçekleştirilmiştir. GR enzim aktivitesini ölçmek için 850 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8): 0.1 mM EDTA, 50 µl 0.5 mM GSSG, 50 µl 0.12 mM NADPH ve 50 µl protein örneklerinden oluşan bir çözelti hazırlanmıştır. Kör 900 µl 50 mM potasyum fosfat (KH₂PO₄) (pH: 7,8): 0,1 mM EDTA, 0,5 mM GSSG ve 50 µl 0,12 mM NADPH ile hazırlanmıştır. Ölçümler, 1,5 ml kuvars küvet kullanılarak bir spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1280) 90 saniye boyunca 340 nm'de absorbans düşüşü izlenerek kaydedilmiştir. GR enzim aktivitesi, 25°C'de 1 µmol GSSG'yi (oksidlenmiş glutasyon) GSH'ye (glutasyon) indirgeyebilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Deney üç teknik ve üç biyolojik kopya ile üç kopya olarak gerçekleştirilmiştir. Çoğaltmaların ortalaması ve standart sapması hesaplanmıştır. Gruplar arasında gözlenen farklılıkların istatistiksel önemi, SPSS içinde yer alan tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA)'ne göre belirlenmiştir.

3.24.5. Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz enzim aktivitesi Quesada ve arkadaşları (1990)'ndaki metodolojiye göre gerçekleştirilmiştir. Peroksidaz enzim aktivitesini ölçmek için; 850 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.8), 50 µl %0.02 o-dianisidin, 50 µl 10 mM H₂O₂ ve 50 µl toplam protein ekstraktı içeren bir çözelti kullanılmıştır. Kör çözelti, 900 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8), 50 µl 10 mM H₂O₂ ve 50 µl %0.02 o-dianisidin ile hazırlanmıştır. Ölçümler 1,5 ml kuvars küvet ve Shimadzu UV-1280 spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometre ölçüm için 460 nm dalga boyuna kalibre edilmiştir. Kuvars küvet içindeki kör ve protein örneklerinin absorbansındaki değişim 90 saniyelik bir süre boyunca kaydedilmiştir. Absorbansda bir artış ve buna karşılık gelen renk değişimi gözlenmiştir. "Enzim birimi" terimi, 1 dakika boyunca 1 µM hidrojen peroksiti parçalayabilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Deney, her biri üç kopya olacak şekilde üç kez tekrarlanmış ve elde edilen verilerin ortalaması alınmıştır. Daha sonra standart sapma hesaplanmıştır. Gruplar arasında gözlenen farklılıkların istatistiksel önemi, SPSS içinde yer alan tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA)'ne göre belirlenmiştir.

3.24.6. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz enzim aktivitesi testi Nakano ve Asada (1981) tarafından özetlenen metodolojiye göre gerçekleştirilmiştir. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesini ölçmek için 850 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.0), 50 µl 5 mM askorbik asit, 50 µl 20 mM H₂O₂ ve 50 µl toplam protein ekstraktı içeren bir çözelti kullanılmıştır. Kör örnek 900 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH: 7.0), 50 µl 5 mM askorbik asit ve 50 µl 20 mM H₂O₂ ile hazırlanmıştır. Ölçümler 1,5 ml'lik bir kuvars küvet ve bir spektrofotometre (Shimadzu, UV-1280) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Absorbanstaki azalma spektrofotometre kullanılarak 290 nm'de 90 saniyelik bir süre boyunca ölçülmüştür.

Askorbat peroksidaz, peroksizomlarda, mitokondride, sitozolde ve kloroplastlarda hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasından sorumlu birincil antioksidan enzimdir. Askorbat peroksidaz, askorbik asidin (AA) indirgeyici özelliğini kullanarak hidrojen peroksidin suya ve dehidroaskorbik aside (DHA) indirgenmesini katalize eder (Das et al., 2014). “Enzim birimi” terimi, 1 dakika boyunca 1 µM askorbik asidi parçalayabilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Deney, her biri üç kopya olacak şekilde üç kez tekrarlanmış ve elde edilen verilerin ortalaması alınmıştır. Daha sonra standart sapma hesaplanmıştır. Gruplar arasında gözlenen farklılıkların istatistiksel önemi, SPSS içinde yer alan tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA)’ne göre belirlenmiştir.

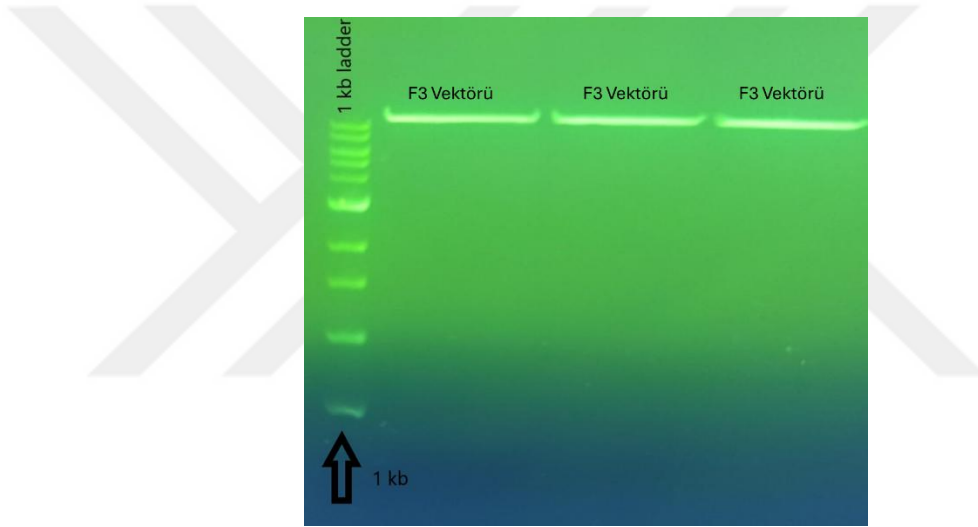
3.25. İstatistiksel Analizler

Enzimatik ve transkripsiyonel analizler, 3 biyolojik ve iki teknik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Morfolojik gözlemler için on iki biyolojik tekrar kullanılmıştır. Her bir grupta yer alan verilerin ortalaması ve standart hatası (ort±sh) hesaplanarak grafikler şeklinde sunulmuştur. Gruplar arasındaki farkın önem derecesi (P değeri) SPSS (Statistical Package of Social Science, IBM) içinde yer alan tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) ve ardından Duncan çoklu karşılaştırma analizine ve grupların ikili karşılatırılması sırasında Microsoft Office Excell (11) programını içinde yer alan Student t-testine göre belirlenmiştir. P<0,05 gruplar arasındaki anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Gen Klonlanan F3 Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz Kesim Bölgelerinin Doğrulanması

PDS ve STTM-miR408a/5p genlerinin klonlanacağı F3 vektörü, *NcoI* ve *AvrII* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. Kesim işleminin ardından, F3 vektörü %0,5 lik jelle yüklenerek yürütülmüştür. Böylece lineer hale getirilen vektörün 1kb'lık ladder ile kıyaslanarak boyutu doğrulanmıştır (Şekil 4.1).

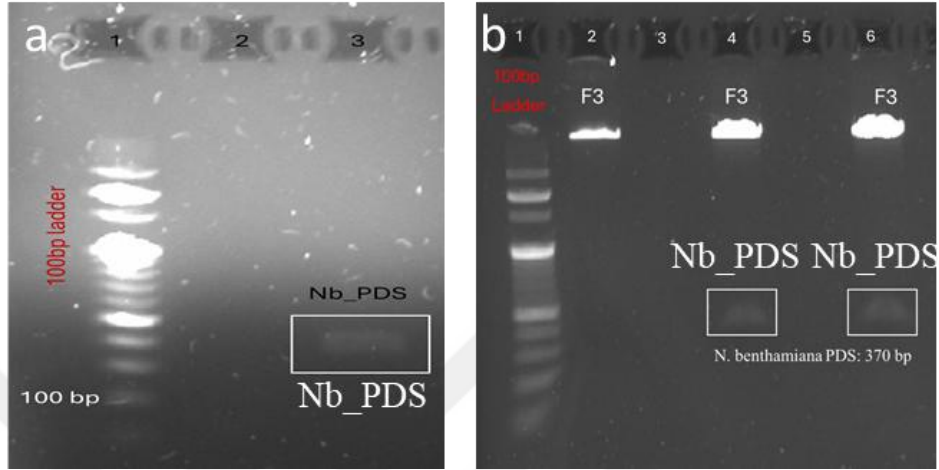


Şekil 4.1: F3 vektörünün, *NcoI* ve *AvrII* kesim enzimleriyle lineer hale getirilip kesim noktalarının doğrulanması.

4.2. *Nb_PDS* Geninin F3 Vektörüne Klonlanması

Nb_PDS genini F3 vektörüne klonlamak için ilk olarak 5' uçlarında *NcoI* ve *AvrII* restriksiyon enzim bölgeleri bulunan primerlerle *N. benthamina* yaprak dokularından elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak PDS geni çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünü %0,8'lik jelde yürütülerek *Nb_PDS*'in varlığı 370 bazlık bant eldesi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.2a). Bu *Nb_PDS* bandı PCR saflaştırma ile elde edilerek *NcoI* ve *AvrII* kesim enzimleriyle muamele edilmiştir. F3 vektörü de aynı kesim enzimleriyle muamele edildikten sonra PCR ürünü ile ligasyon işlemine tabi

tutulmuştur. Elde edilen bu klonların Nb_PDS genini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek için NB_PDS içeren F3 vektörü NcoI ve AvrII kesim enzimleriyle tekrardan kesilerek agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Sonuç olarak, jelde 1 kb ve 370 baz uzunluğunda iki bant elde edilerek klonlar doğrulanmıştır (Şekil 4.2b).

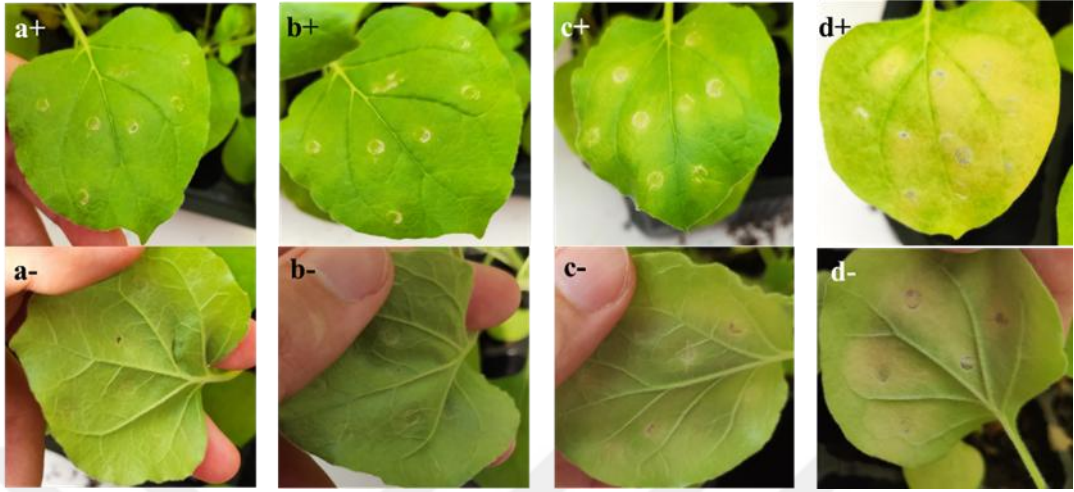


Şekil 4.2: PCR sonucu *NcoI* ve *AvrII* kesim bölgelerini içeren *N. benthamiana* PDS geninin %1'lik agaroz jelde boyutunun doğrulanması. a) 1. Kuyu: 100 bp ladder, 3. Kuyu: Nb_PDS geni. Nb_PDS genini içeren F3 vektörünün *NcoI* ve *AvrII* enzimleriyle kesildikten sonra, %1'lik agaroz jelde yürüterek klonlamanın doğrulanması b) 1. Kuyu: 100 bp ladder, 2. Kuyu: boş vektör: 4. Ve 6. Kuyu: içerisinde PDS geni bulunan vektör.

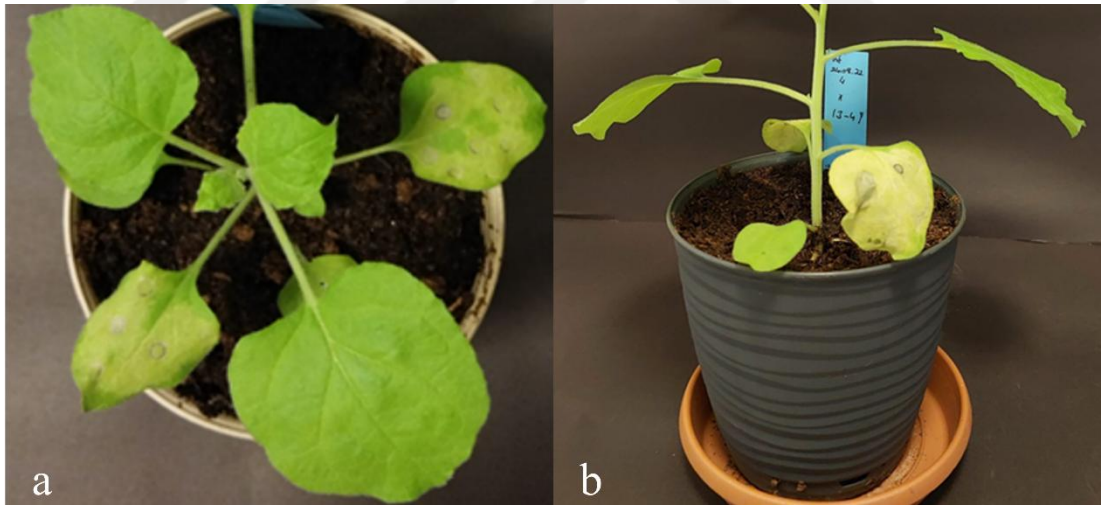
4.3. Nb_PDS Geninin Susturulduğunun *N. benthamiana* Bitkilerinde Gösterilmesi

Nicotiana benthamiana bitkileri 20 günlük olana kadar kontrol koşullarında yetiştirilmiştir. 20 günlük olan bitkilerin uygun yapraklarına, Nb_PDS gen fragmentini bulunduran F3 vektörü ve yardımcı F1 plazmidi ihtiva eden *A. tumefaciens* bakterileri 1:1 oranında karıştırılıp bitkiye agroinfiltrasyon ile verilerek VIGS uygulanması gerçekleştirilmiştir. Agroinfiltrasyon işleminden sonra, yapraklar bir hafta içinde PDS geninin ekspresyonunun azaldığının görsel bir göstergesi olan beyazlaşma (klorozis) sergilemiştir (Şekil 4.3; Şekil 4.4). Agroinfiltrasyon 10 gün sonra klorozis şeklinde gözlenen susturma sinyallerinin en üstteki en genç yapraklara iletildiği gözlenmiştir (Şekil 4.5). Nb_PDS gen fragmentini içeren F3 vektörü ile VIGS uygulamasına tabi tutulan *pds* grubunda yetiştirilen bitkilerin yapraklardan alınan doku örneklerinde PDS transkript seviyesi, boş vektör (BV) ile muamele edilen kontrol grubuna oranla

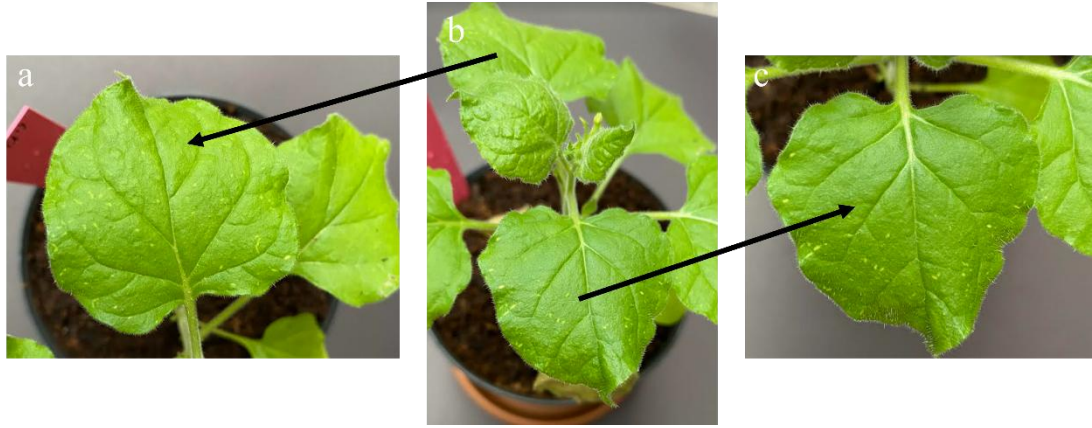
istatistiksel olarak önemli derecede %80'lik bir azalma saptanmıştır ($P<0.05$) (Şekil 4.6).



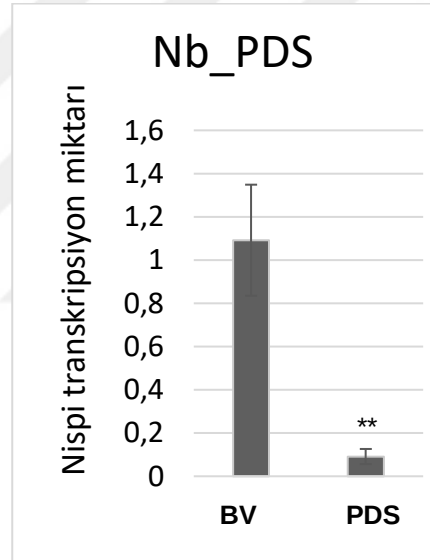
Şekil 4.3: Agroinfiltrasyon uygulanan *N. benthamiana* yapraklarının gün bazlı fenotipik değişimleri. (a:1. gün, b:3. gün, c: 6. gün, d 7. gün. +: yaprağın adaksiyal bölgesi. -: yaprağın abaksiyal bölgesi)



Şekil 4.4: *N. benthamiana* bitkisinde agroinfiltrasyon uygulaması sonrasında PDS geninin transkripsiyonunun azalması sonucu gözlemlenen morfolojik değişimler. (a: agroinfiltrasyon uygulandıktan 4 gün sonra yapraklardaki gözlemlenen kloroz, b: agroinfiltrasyon uygulandıktan bir hafta sonra yapraklarda gözlemlenen kloroz)



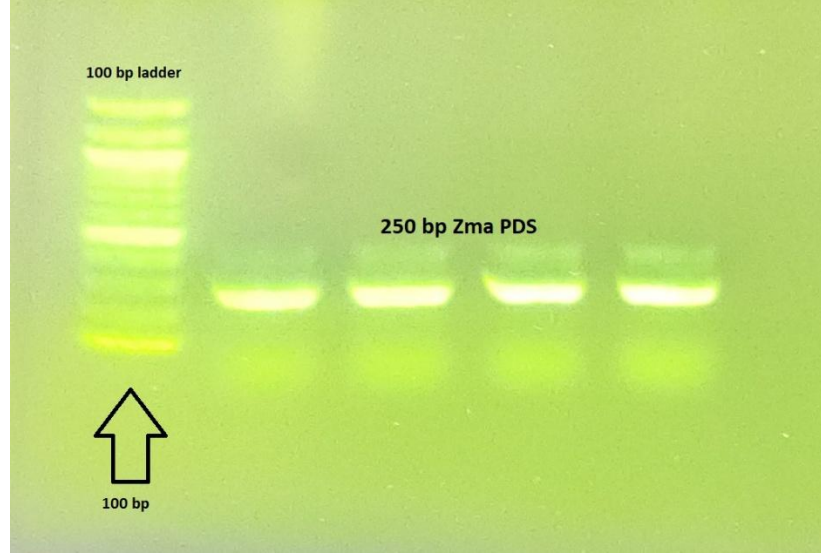
Şekil 4.5: *N. benthamiana* bitkisinde agroinfiltrasyon uygulamasından on gün sonra gözlemlenen sistemik yayılma (a: beşinci yaprakta görülen mozaik kloroz, b: bitkinin tamamında gözlemlenen değişimler, c: altıncı yaprakta görülen mozaik kloroz)



Şekil 4.6: *N. benthamiana* bitkisinde agroinfiltrasyon uygulaması sonrasında *PDS* geninin nispi transkript miktarının düştüğünün qRT-PCR yöntemi ile gösterilmesi (n=12, ortalama±se, **= Student t-testine göre $P<0,01$).

4.4. Zm_PDS Geninin F3 Vektörüne Klonlanması

İçerisinde *NcoI* ve *AvrII* kesim enzimi bölgesi bulunan primerlerle yapılan PCR sonucunda, klonlanan *Zm_PDS* gen fragmentinin boyutunun doğrulanması %0,8'lik jelde yürütülerek yapılmıştır. Buna göre jelde 250 bazlık PCR ürününün gözlenmesiyle *Zm_PDS* geninin varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.7).



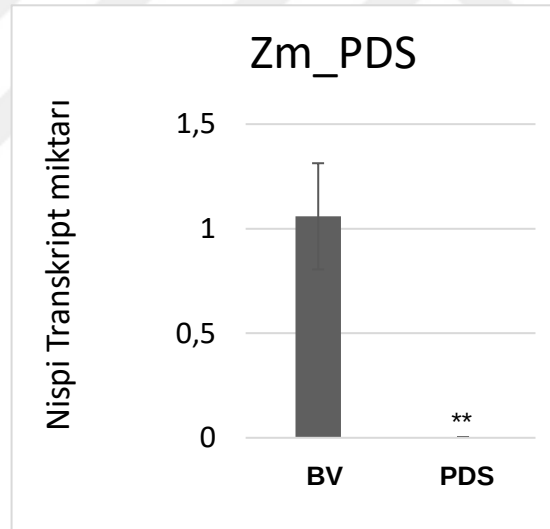
Şekil 4.7: *Z. mays* PDS geninin PCR sonrası %1'lik agaroz jelde boyutunun doğrulanması

4.5. *Zm_PDS* Geninin Susturulduğunun *Zea mays* Bitkilerinde Gösterilmesi

Nicotiana benthamiana bitkisinde PDSgeninin başarılı bir şekilde susturulmasının ardından, VIGS vektörlerinin mısır bitkisinde işlevselliğini test etmek için iyi bir raportör gen olan *pds* geni mısır bitkisinde susturulmuştur. Bunun için, mısır *Zm_PDS* gen fragmentinin klonlandığı F3 ve yardımcı F1 vektörlerini içeren *Agrobacterium* hücreleri 1:1 oranında karıştırılarak ara konukçu olarak kullanılan *Nicotiana benthamiana* bitkilerine agroinfiltrasyon yöntemiyle verildi. Böylece, vektörün klonlanan gen ile çoğalması sağlandıktan sonra, *N. benthamiana* yapraklarından floem ekstraktı çıkartıldı. Çıkarılan floem özütü 5 günlük mısır fidelerinin ikinci yapraklarının uçlarına art arda dört gün boyunca uygulandı. Sonuç olarak yaklaşık bir hafta sonra mısır yapraklarının uçlarından başlayarak klorozisin yayıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bir hafta sonra hem kontrol hem de PDS gruplarından alınan yaprak örnekleri kullanılarak qRT-PCR ile PDS gen ifade seviyesi belirlendi. Elde edilen verilere göre, mısır bitkisin de *N. benthamiana*'ya benzer şekilde PDS transkript seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede %99'luk bir azalma kaydedildi ($P<0.05$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.8: *Z. mays* fideleri üzerinde VIGS uygulaması. Floem özütü verilmiş yaprak + ile işaretlenmiştir (a,b: susturma sinyalinin üst yaprağa sistematik hareketi, +: Floem özütü verilmiş yaprak).

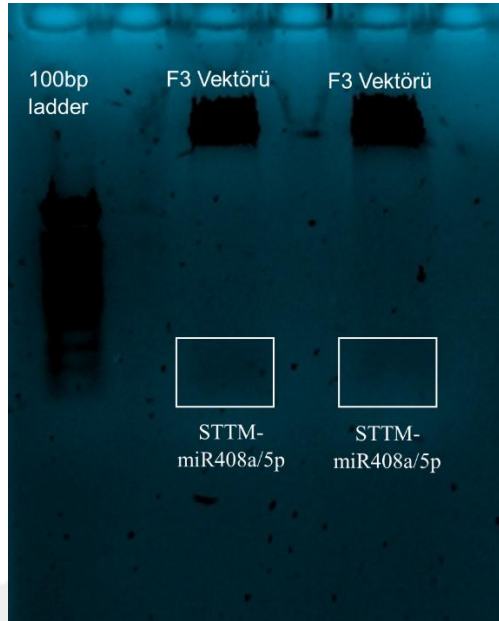


Şekil 4.9: *Zm_PDS* uygulaması sonra *Z. mays* PDS geninde görülen susturma etkisi (**= Student t-testine göre $P < 0,01$).

4.6. STTM-miR408'in F3 Vektörüne Klonlanması

NcoI ve *AvrII* enzim kesim bölgeleriyle birlikte sentezletilen STTM-miR408'in F3 vektörüne klonlanması sonucunda elde edilen klonlamanın doğrulanması için F3 vektörü *NcoI* ve *AvrII* enzimleriyle kesildikten sonra, %1'lik jelde yürütülmüştür.

Sonuç olarak jelde 1000 kb üzerinde band vektörü ve yaklaşık 100 bazlık bant STTM-miR408'in varlığını göstermiştir (Şekil 4.10).

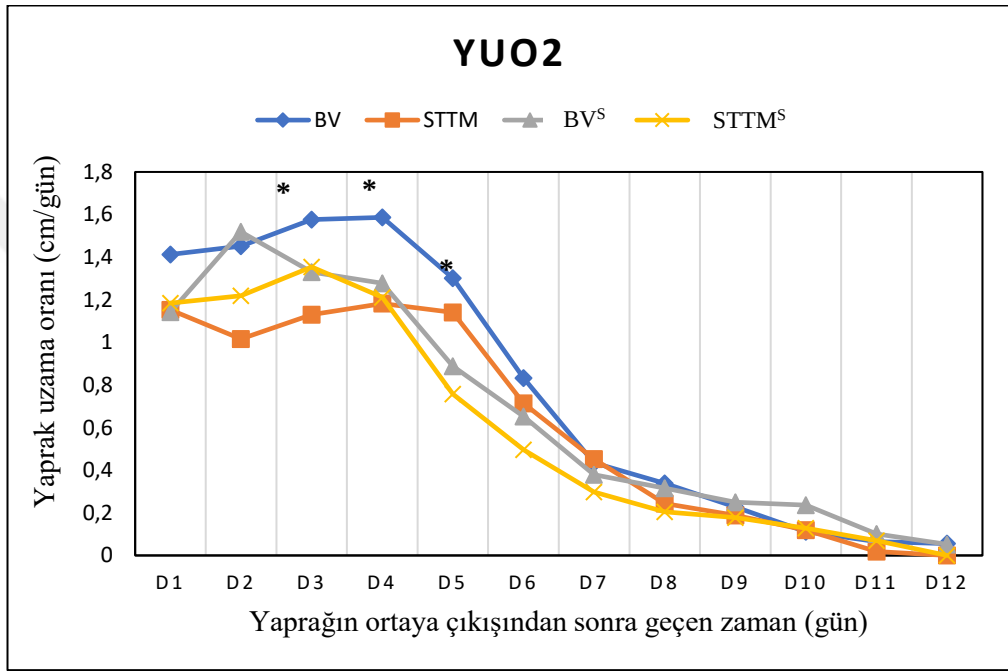


Şekil 4.10: F3 Vektörü içerisine klonlanan STTM-miR408a/b'nin *NcoI* ve *AvrII* kesim enzimleriyle doğrulanması

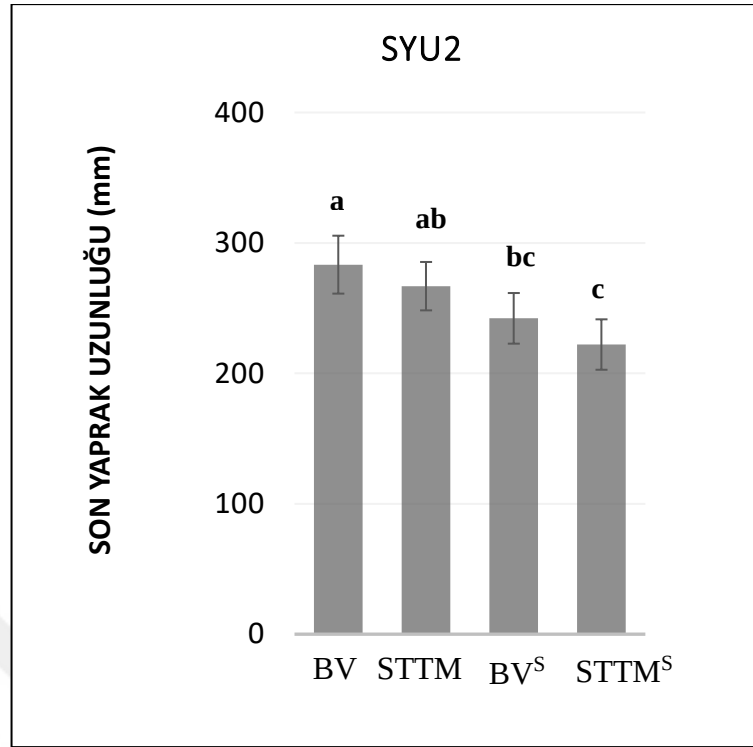
4.7. STTM-miR408 İle Muamele Edilmiş Mısır Fidelerinin Soğuk Stresine Karşı Yaprak Büyüme Tepkisi

STTM-miR408a/b ile muamele edilmiş mısır fidelerinin soğuk stresine karşı yaprak büyüme tepkisini gözlemlemek için, boş vektör (Grup BV) ve STTM-miR408 (Grup STTM) ile muamele edilmiş mısır fideleri gece boyunca soğuk stresine maruz bırakılmıştır. Yaprak uzunluğu (YU) ve yaprak uzama oranı (YUO) gibi yaprak büyüme parametreleri, morfolojik ve kinematik düzeylerde kontrol koşullarında yetiştirilen BV ve STTM ile muamele edilmiş fidelerle, soğuk stresine maruz bırakılmış BV^S ve STTM^S ile muamele edilmiş deney grupları karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bunun için, ikinci ve üçüncü yapraklar ortaya çıkışından büyümeleri durana kadar ölçülmüştür. Sonuç olarak, BV grubundaki mısır fidelerinin ikinci yaprağı iki gün boyunca kararlı bir büyüme profili sergilemiş ve daha sonra büyüme yavaşlamıştır. STTM grubundaki ikinci yaprağın büyümesi ikinci günde azalmış, ardından üç gün boyunca istikrarlı bir şekilde büyümeye devam etmiş ve dördüncü günden sonra keskin bir şekilde azalmıştır. BV'ye benzer şekilde, BV^S ve STTM^S

gruplarındaki mısır fidelerinin ikinci yaprakları 2 gün boyunca istikrarlı bir şekilde büyümüş ve üçüncü günde azalmaya başlamıştır (Şekil 4.11). Son olarak, ikinci yapraklar tüm gruplarda yaklaşık on bir günde olgunlaşmıştır. Bununla birlikte, ikinci yaprakların son yaprak uzunluğu BV'den STTM, BV^S ve STTM^S'ye doğru azalan bir sıralama sergilemiş, sırasıyla 299±43, 206±76, 242±61 ve 225±66 olmuştur. İkinci yaprağın uzama oranı BV grubuna kıyasla STTM, BV^S ve STTM^S gruplarında %31, %19 ve %25 oranında önemli ölçüde azalmıştır (P<0,05) (Şekil 4.12).

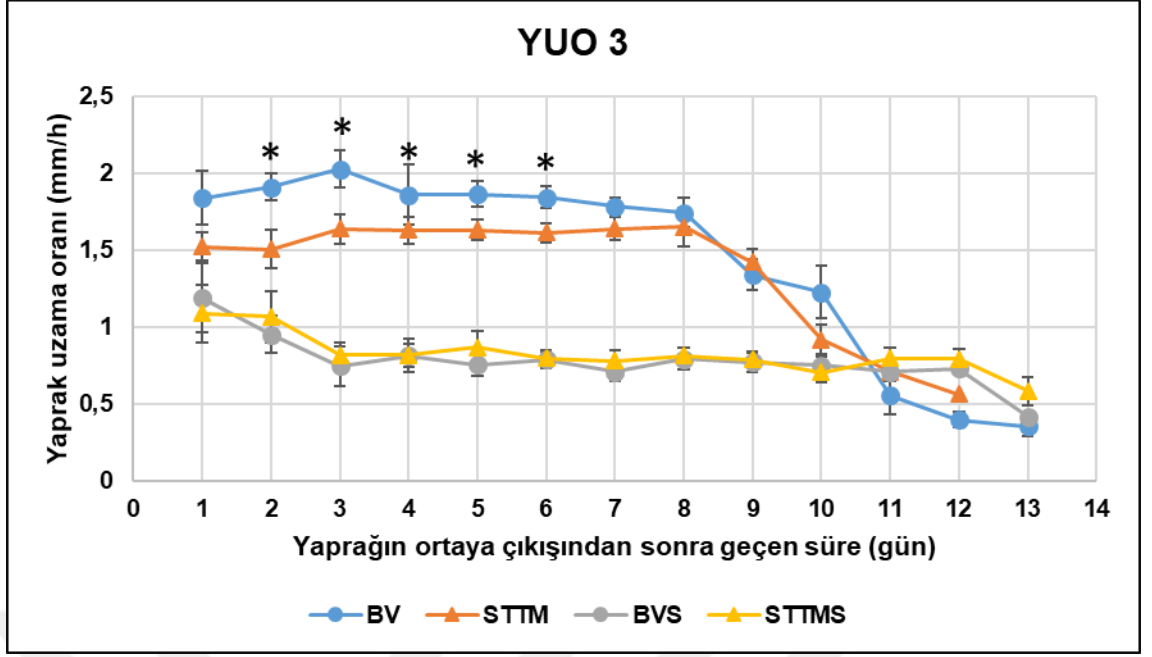


Şekil 4.11: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin ikinci yapraklarının uzama oranları (YUO). Boş (BV: Boş vektör ile muamele edilen grup), STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, (STTM), S: Soğuk stresi. Soğuk Boş (BV^S), Soğuk STTM (STTM^S) gruplarında yetiştirilen mısır fidelerinin ikinci yapraklarının uzama oranı (n=12, ortalama±standart hata, * tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma analizine göre gruplar arasındaki farkı göstermektedir P<0,05).

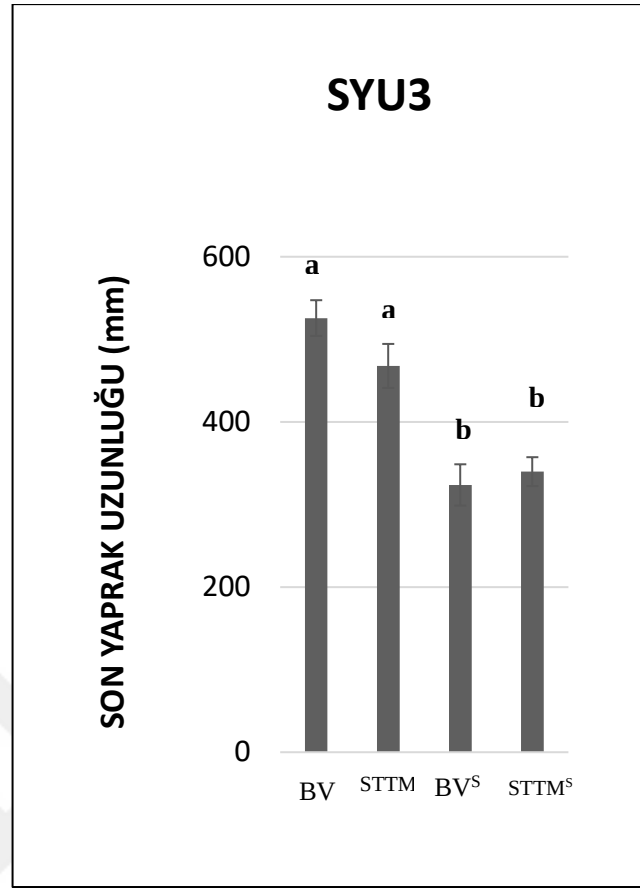


Şekil 4.12: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin ikinci yapraklarının son uzunluğu. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma analizine göre gruplar arasındaki farkı göstermektedir).

BV grubundaki mısır fidelerinin üçüncü yaprağı üç gün boyunca istikrarlı bir şekilde büyümüş, ardından yavaşlamış ve 8 gün sonra keskin bir şekilde azalmıştır. Öte yandan, S grubundaki mısır fidelerinin üçüncü yaprakları 8 gün boyunca istikrarlı bir şekilde büyümüş ve ardından keskin bir şekilde azalmıştır. Hem BV^S hem de STTM^S'nin üçüncü yaprakları iki gün boyunca istikrarlı bir şekilde büyümüş, daha sonra büyüme yavaşlamış ancak BV ve STTM grupları gibi keskin bir düşüş göstermemiştir. BV, STTM, BV^S ve STTM^S gruplarında yetiştirilen mısır fidelerinin SYU3 değerleri sırasıyla 526±61, 468±76, 324±79 ve 340±58'dir (Şekil 4.13). SYU3'ün B grubuna kıyasla STTM grubunda %11, BS grubunda %38 ve STTM^S'de %35 oranında önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (P<0,01) (Şekil 4.14).



Şekil 4.13: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin üçüncü yapraklarının uzama hızı. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, * Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. P<0,05).

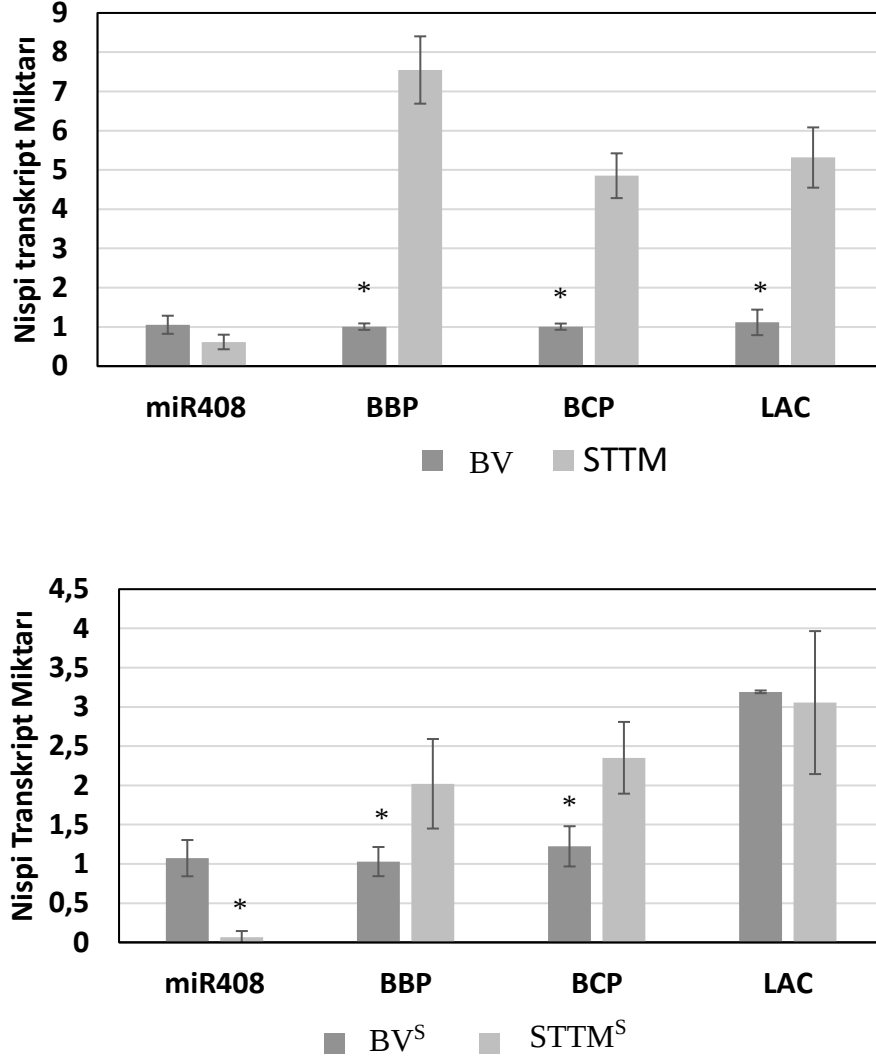


Şekil 4.14: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin üçüncü yapraklarının son uzunluğu. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, Harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. $P<0,05$).

4.8. miR408 ve Hedeflerinin Ekspresyonları

miR408'in varlığı ilk olarak stem-loop RT-PCR yoluyla tespit edilmiş, ardından qRT-PCR analizi yoluyla miR408a/b için spesifik ileri ve evrensel geri primerler tanımlanmıştır. Sonuçlar, endojen miR408 transkript seviyesinin STTM grubunda BV grubuna kıyasla önemli ölçüde ($P < 0,05$) ve STTM^S grubuna kıyasla daha da fazla ($P < 0,01$) azaldığını göstermiştir. Hedef genlerin beklenen ifade düzeylerinin aksine, tahmin edilen basic blue protein (BBP) ve blue copper proteininin (BCP) STTM ve STTM^S gruplarına kıyasla BV ve BV^S gruplarında yukarı doğru düzenlendiği tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Ek olarak, öngörülen hedef gen lacZ (LAC), B grubuna kıyasla S

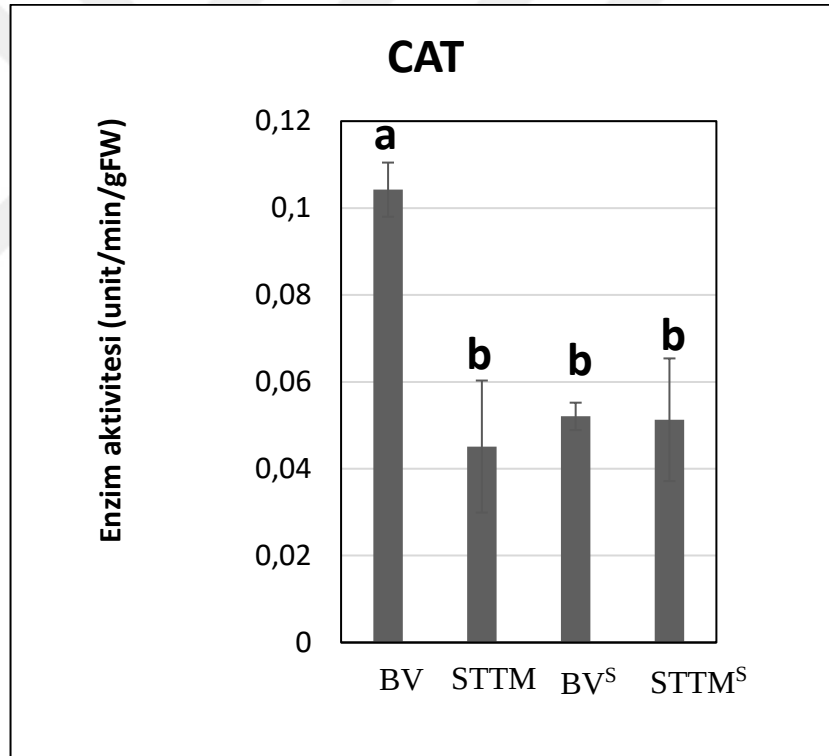
grubunda ekspresyonda artış göstermiştir ($P < 0.05$). Ancak, BV^S ve $STMM^S$ grupları arasında lacZ ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin ikinci yapraklarında miR408 ve tahmini hedefleri olan Basic Blue Protein (BBP), Blue Copper Protein (BCP), Lakkaz (LAC) genlerinin ifade seviyeleri. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, Student t-testi'ne göre belirlenmiştir. * $P < 0.01$).

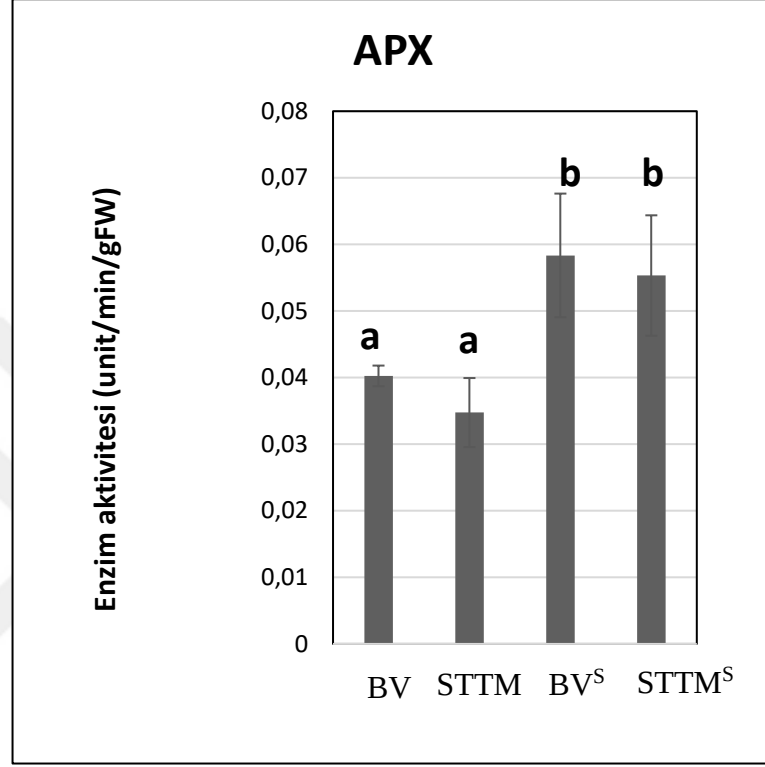
4.9. Antioksidan Enzimlerin Aktiviteleri

Soğuk stresi altındaki mısır fidelerinde STTM-miR408a/b ile muamele edilmiş yaprağın antioksidan yanıtını değerlendirmek için, Katalaz (CAT), Askorbat peroksidaz (APX), Glutasyon redüktaz (GR), Peroksidaz (POX) ve Süperoksit dismutaz (SOD) antioksidan enzimlerinin aktivitesi biyokimyasal olarak Boş vektör (BV), STTM (STTM), Boş soğuk (BV^S) ve STTM soğuk (STTM^S) mısır fidelerinin yapraklarında belirlendi. Sonuçlar, CAT aktivitesinin B grubunda en yüksek olduğunu ve STTM, BV^S ve STTM^S'de istatistiksel olarak anlamlı şekilde %57 oranında azaldığını gösterdi (Şekil 4.17) ($P < 0,05$). Stres kaynaklı bir miRNA olan miR408 ekspresyonundaki artış, normatif bir yanıt olan katalaz seviyelerindeki düşüşle ilişkili olabilir.



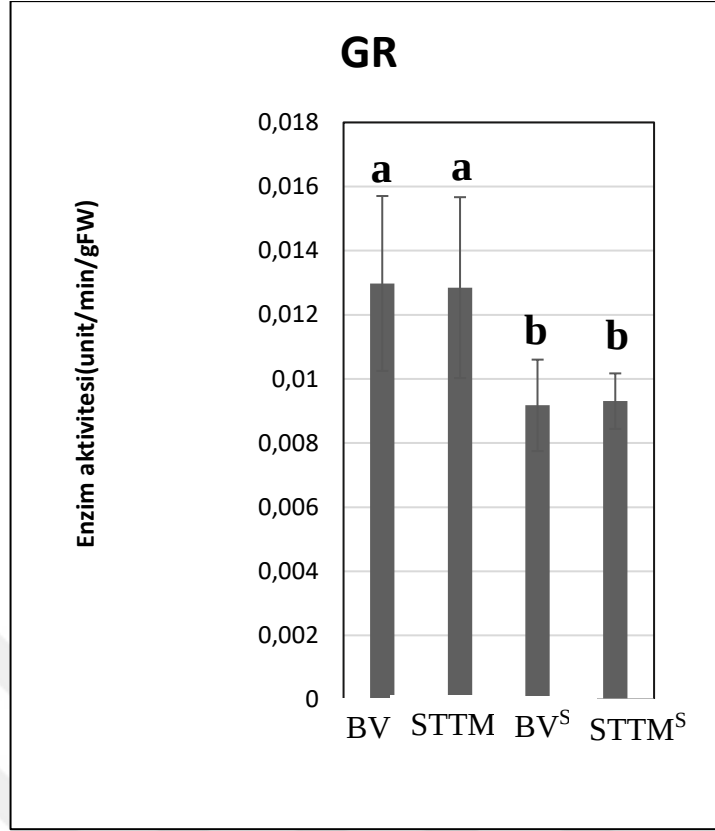
Şekil 4.16: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin yapraklarında katalaz (CAT) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, Harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. $P < 0,05$).

APX aktivitesi BV ve STTM arasında benzer olarak tespit edildi ancak BV^S ve STTM^S gruplarında BV ile karşılaştırıldığında yaklaşık %15 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (Şekil 4.18) ($P<0,05$). Bu bulgu, bitkinin askorbat peroksidaz enzimini miR408'den bağımsız olarak soğuk stresine karşı bir savunma mekanizması olarak ürettiğine işaret olabilir.



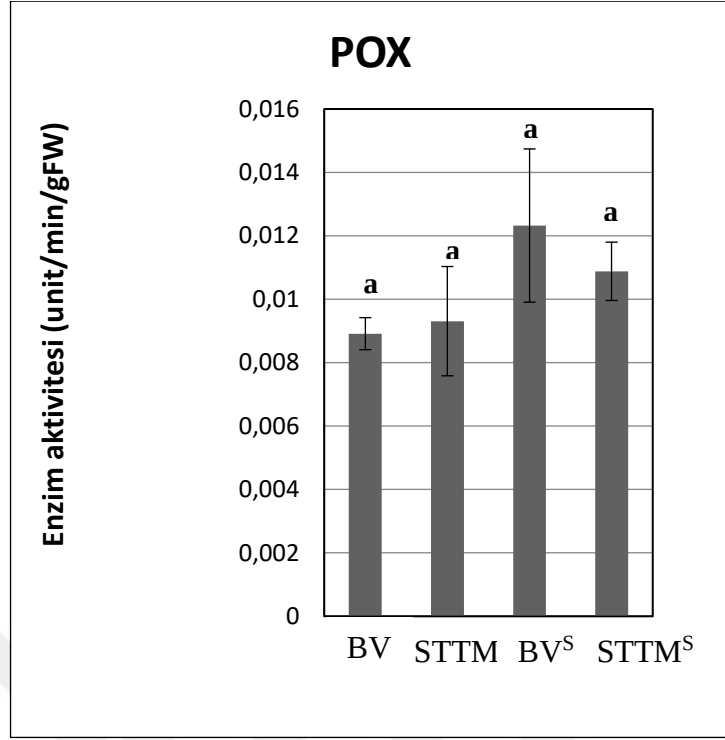
Şekil 4.17: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata. Harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. $P<0,05$).

GR aktivitesi APX'e zıt bir profil sergiledi. BV ve STTM gruplarında daha yüksek aktivite ve BV^S ve STTM^S gruplarında sırasıyla %29 ve %28 oranında önemli bir azalma görüldü (Şekil 4.19) ($P<0,05$). Bu sonuç, miR408'in istatistiksel analize dayalı glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığına işaret olabilir.

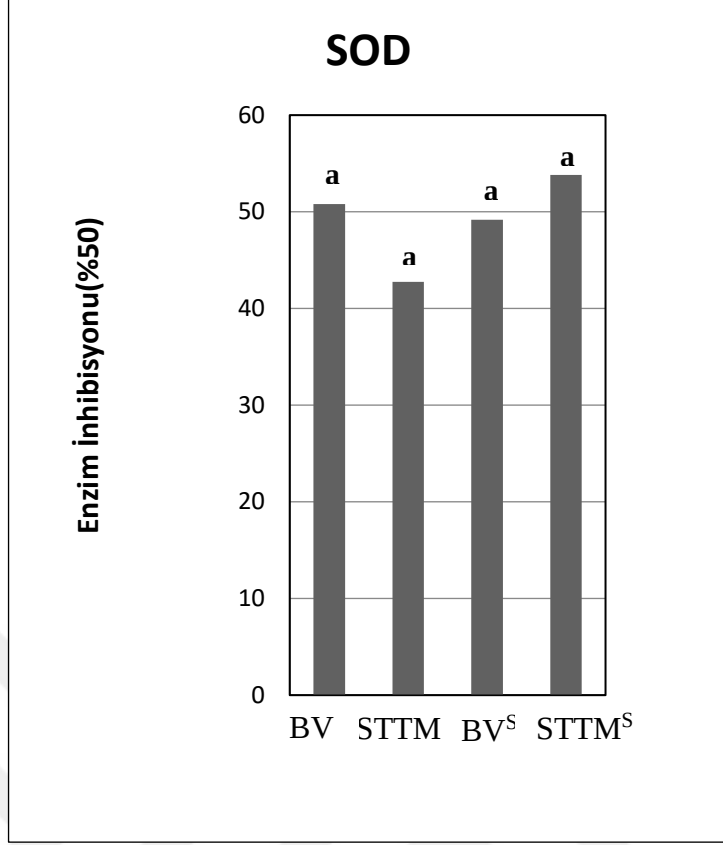


Şekil 4.18: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. $P<0,05$).

CAT, GR, APX enzimlerindeki bu değişimlere ek olarak; BV, BV^S, STTM, STTM^S deney gruplarında, POX enzim aktivitesi (Şekil 4.20) ve SOD enzim aktivitesi (Şekil 4.21) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$).



Şekil 4.19: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin peroksidaz (POX) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir.



Şekil 4.20: Soğuk stresi altında yetiştirilen mısır fidelerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi. BV: Boş vektör ile muamele edilen grup, STTM: STTM-miR408a/b içeren vektör ile muamele edilen grup, S: Soğuk stresi. (n=12, ortalama±standart hata, harfler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'ne ve Duncan çoklu karşılaştırmalı analize göre gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. $P<0,05$).

5. TARTIŞMA

Mısır, tohum çimlenmesi ve fide aşamalarında soğuk stresine karşı oldukça hassastır. Soğuk stresi bitki büyümesini sekteye uğratar ve verim kaybına neden olur. Bitkilerde soğuk stresi tolerans mekanizmaları konusunda pek çok araştırma olmasına rağmen pek çok genle kalıtılan kompleks genetik yapısından ötürü henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, mısır bitkisinde soğuk stresi toleransında görevli genlere dair sınırlı sayıda işlevsel doğrulama çalışması vardır. Diğer taraftan, miRNA'lar, birçok biyolojik süreçte ve stres tolerans mekanizmalarındaki düzenleyici rolleri nedeniyle ilgi çekmektedir. Özellikle, miR408, birkaç bitkide biyotik stres cevabına duyarlı olduğu gösterilmiştir (Djami-Tchatchou vd., Feng vd., Yin vd.). Ancak, miR408 hedef genleri ile birlikte düzenleyici mekanizması hakkındaki bilgiler resmin tamamını görmekten uzaktır. Bu nedenle, bu çalışma, VIGS-STTM kombine yaklaşımına dayalı olarak soğuk stresi altında mısır yaprağı büyümesinin düzenlenmesinde miR408 geninin işlevine dair kanıtlar sunmaktadır.

Mısır gibi monokotil bitkilerin gen fonksiyonlarını açığa çıkarmak için başvuru VIGS yaklaşımında, *konak* bitkinin güvenli bir şekilde transformasyonu için virüs titresini arttırmak amacıyla *ara konak* olarak *N. benthamiana*'yı kullanılmaktadır (Ding vd. 2006; van der Linde vd. 2011; Hemetsberger vd. 2012; Zhu vd., 2014; Zhan vd. 2016). Bu tez çalışmasında da klonlanan geni içeren modifiye viral vektörün verimli bir şekilde çalıştığını göstermek ve sonraki çalışmalarda optimizasyonu kolaylaştırmak için bir *ara konak* olarak *N. benthamiana*'nın kullanıldığı bir VIGS deney düzeneği hazırlanmıştır. Deney düzeneğinde, VIGS plazmidine görünür ışığa duyarlı ve ağartma (klorozis) semptomlarını indüklemeye kabiliyeti nedeniyle bir raportör olarak Nb-PDS (*Nicotiana benthamiana*- *Phytoene desaturase*) gen parçası klonlanmış ve *N. benthamiana* bitkisinde test edilmiştir (Kumagai ve ark., 1995). Bu şekilde VIGS vektörlerinin kararlılığı ve işlevselliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. VIGS ile muamele edilen *N. benthamiana* bitkilerinde, agroinfiltrasyon yapılan yaprağın tamamen beyazladığı ve gen ifadesinde %80 oranında azalma şeklinde güçlü *PDS* susturma belirtileri sergilediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Susturma sinyallerinin bir hafta içerisinde üst yapraklara taşındığı da gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Beyaz noktalar şeklinde kendisini gösteren susturma belirtileri, en genç üst yapraklarda ve yaprak kenarından ortaya doğru çıkmaya başlamıştır ve daha sonra tüm

yaprak yüzeyine dağıldığı görülmüştür. Bu da susturma sinyalinin sink-source iletim prensibini takip ettiğini göstermiştir (Zainali vd., 2025).

N. benthamiana bitkisinde VIGS düzeneğinin optimizasyonunun ardından, hedef, *Z. mays* PDS genini susturmak olmuştur. Bunun için, Zm_PDS gen kasetini içeren VIGS vektörlerini ihtiva eden *A. tumefaciens* bakterileri ile ara konağımız olan *N. benthamiana* bitkisi agroinfiltrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Agroinfiltrasyon işleminden sonra, uygulama yapılan yapraklardan elde edilen floem özsuğu, mısır fidelerinin ikinci yapraklarının uç kısımlarından bitkiye verilmiştir. Daha önce benzer şekilde mısır bitkisine hormon uygulandığı çalışmalar mevcuttur (Iqbal vd., 2025). Ancak, bu teknik, monokot bitkilerine VIGS uygulaması için ilk defa bu çalışmada uygulanmıştır. Sonuçlar, mısır yaprağının 24 saat içinde yaprak ucundan başlayarak tüm yaprak alanına yayılan *PDS* susturma semptomları sergilediğini göstermiştir. Transkript seviyesinde ise %99'luk bir düşüş saptanmıştır (Şekil 4.10). Bu bulgu, mısır gibi tek çenekli bir bitkide genleri susturmak için kullandığımız VIGS deney düzeneğinin etkinliğini göstermektedir.

VIGS deney düzeneğinin optimizasyonundan sonra, asıl hedef olan zmiR408'i susturmak için, çift zincirli STTM-miR408a/b tasarlanmış, sentezletilmiş ve Zm-PDS susturma deney düzeneğinde yapılan adımlar takip edilerek mısır yaprağına uygulanmıştır. Mısır miR408 ailesi, aynı ma-miRNA dizisine sahip miR408a ve miR408b olmak üzere iki üyeye sahiptir ve tamamlayıcı bir miR408b-5p dizisi içerir. Bu nedenle, dizayn edilen STTM'nin bir kolunda miR408a/b'nin hedef dizisini ve diğer kolunda miR408b-5p'nin (miR408a/b'den farklı bir dizi) hedef dizisini içermekte olup, aynı anda iki miRNA'nın susturulması hedeflenmiştir. Bu tasarımda, miRNA hedef dizisinin orta kısmında bulunan üç nükleotitlik baz uyumsuzluğu oluşturulmuştur. Bu uyumsuzluk tasarlanan dizinin endojen miRNA tarafından bölünmesinden kaçınmak için önemlidir (Teoita ve Tang, 2017). Aksi takdirde, çoğu bitki miRNA'sı ve hedefleri, hedeflenen transkriptin bozulmasıyla sonuçlanan mükemmel bir eşleşme gösterdiğinden tasarladığımız dizinin endojen miRNA tarafından parçalanma ihtimali bulunmaktadır.

STTM-miR408a/b ile muamele edilen mısır fideleri, ikinci ve üçüncü yapraklarının büyüme hızı, boş vektör (kontrol) ile muamele edilen yapraklara kıyasla yavaşlamış ve sırasıyla %19 ve %11'lik oranlarda kısalmıştır (Şekil 4.11; Şekil 4.13). Soğuk stresi altında ise, ikinci ve üçüncü yaprakların büyüme hızını önemli ölçüde düşürerek,

sırasıyla kontrol sıcaklığına kıyasla %31 ve %35 oranında azalışa neden olmuştur (Şekil 4.12; Şekil 4.14). Soğuk stresi altındaki STTM-miR408a/b ile muamele edilen ve boş vektör ile muamele edilen fidelerin yaprak büyüme yanıtları karşılaştırıldığında ise, ikinci ve üçüncü yaprak uzama oranlarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$). miR408'in soğuğa duyarlı olduğu ve mısır yapraklarının meristem, uzama ve olgun büyüme bölgelerinde soğuk stresi koşullarında ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Aydinoglu, 2020). Bu doğrultuda, miR408'in soğuk stresi altında ekspresyonunun artması, tolerans mekanizmalarında görevli genlerin ifadesini negatif yönde düzenleyerek rol aldığı sonucuna varılmıştır. Ancak, bu çalışmada, miR408 ifadesinin baskılanması nedeniyle bu fonksiyonu engellenebilir ve bu da BV^S ve STTM^S grupları arasında yaprak büyüme farklarının telafi edilmesine neden olmuş olabilir. *A. thaliana*'da, soğuk stresine maruz bırakılan bitkilerde miR408'in ekspresyonu artarken, hedefleri olan PLC, cupredoxin, UCL ve LAC3'ün ekspresyonlarının azaldığı ve soğuk stresine karşı toleransının arttığı görülmüştür (Ma et al. 2015). Benzer şekilde, *O. sativa*'da soğuk stresi koşullarının, pre-OsmiR408 ve OsmiR408'in ekspresyonunda artışa neden olarak yabancı tipe kıyasla daha fazla büyüme ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Sun vd., 2018). miR408'in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* ve *Triticum aestivum* gibi çeşitli bitki türlerinde strese toleransı, yaprak boyutunu ve ürün verimini LAC, PLC, UCL8 ve PC (plastosiyanin) olan hedef genlerinin transkripsiyonunu düzenleyerek düzenlediği gösterilmiştir. (Ma ve ark. 2015; Zhao vd., 2016; Pan vd., 2018; Song vd., 2018; Gao vd., 2022). Bu bulgular, miR408'in soğuk stresi altında yaprak büyüme yanıtının düzenlenmesinde işlevine dair ipuçları sunmaktadır.

Bitkiler stres kaynaklı ROS üretimiyle mücadele etmek için antioksidan enzimler kullanır (Qiu vd. 2023). Bununla birlikte, enzim aktivitesinin düzenlenmesi türlere, genotiplere ve stres türlerine göre farklılık gösterir. Örneğin, Gao ve arkadaşları (2022) miR408'in SOD, CAT ve POX gibi antioksidatif enzimlerin aktivitelerini artırarak hidrojen peroksit ve malondialdehit seviyelerinin azalmasına neden olduğunu bildirmiştir. *N. benthamiana*'da miR408'in aşırı ekspresyonunun tohum çimlenmesini kolaylaştırdığı ve antioksidatif enzim genleri *Nbsod*, *Nbpox* ve *Nbcat*'in ekspresyonunu yükselterek ve aktivitelerini artırarak tuzluluk kaynaklı stres altında ROS birikimini en aza indirdiği gösterilmiştir (Guo vd., 2018). Başka bir çalışmada, miR408'in SOD, CAT ve POX aktivitelerini artırarak ROS birikimini azalttığı ve

böylece kuraklığa toleransı artırdığı tespit edilmiştir (Hang vd., 2021). Bu tez çalışmasında, mısır yapraklarının redoks regülasyonunda miR408'in olası işlevini değerlendirmek için beş antioksidan enzimi incelenmiştir. CAT, APX ve GR aktivitesinin gruplar arasında önemli farklılıklar gösterdiği, POX ve SOD aktivitesinin ise değişmediği tespit edilmiştir.

Soğuk stresine yanıt olarak CAT aktivitesindeki artış birçok bitkide gösterilmiştir. Bu çalışmada, CAT aktivitesinin BV grubunda daha yüksek olduğunu ve STTM, BV^S ve STTM^S gruplarında azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.16). MiR408'in soğuk stres altındaki artan ekspresyonu göz önüne alındığında, bu bulgular, miR408'in, soğuk stres sırasında hücre içindeki CAT aktivitesini düzenleme işlevine sahip olduğunu düşündürmektedir (Aydinoglu ve Akgul, 2019). Diğer yandan, SB grubundaki CAT aktivitesindeki azalma, SOD aktivitesinin değişmemiş olmasına bağlı olarak açıklanabilir (Şekil 4.20). Çünkü, SOD, CAT'ye alternatif olarak hidrojen peroksidi temizlemekle görevlidir ve soğuk stres koşullarında yüksek miR408 seviyeleri bulunabilir.

APX aktivitesi hem BV^S hem de STTM^S gruplarında kontrol gruplarına kıyasla artmıştır (Şekil 4.17). GR enzim aktivitesinin ise, soğuk koşullarda (BV^S, STTM^S) büyütülen bitkilerde kontrol koşullarına (BV, STTM) kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, POX ve SOD enzimlerinin sonuçları, miR408'in ve stres koşullarının bu enzim aktiviteleri üzerinde büyük bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ma et al. (2015), *Arabidopsis* üzerinde yaptığı bir çalışmada, miR408 ekspresyonunun artırılmasının ROS seviyelerini düşürebileceğini ve bakır içeren proteinleri kodlayan genleri yönettiğini öne sürmüştür. Bu nedenle, miR408'in soğuk strese yanıtındaki mekanizması, yalnızca tek bir miR408 ve hedef genleri arasındaki temel etkileşimle sınırlı kalmayabilir ve ayrıca diğer transkripsiyon faktörleri ve hormonları da içerebilir (Gao et al., 2022b).

miRNA genleri üzerindeki fonksiyonel çalışmalar, küçük boyutları nedeniyle zorluklarla karşılaşmaktadır. STTM yaklaşımı, endojen miRNA ifadesini susturmak için en umut verici yöntemlerden biri olarak nitelendirilmektedir (Teoita vd., 2016). Öte yandan, miR408 üzerine yapılan birçok çalışmaya rağmen, mısırdaki özellikle hedef genleri üzerindeki düzenleyici rolü konusunda araştırma eksikliği vardır. Bu nedenle, miRNA ve hedef genleri biyoinformatik araçlar kullanılarak tahmin edilmektedir.

Bu bağlamda, biyoinformatik araçlar kullanılarak, Zm-MiR408'in LAC, BBP ve BCP genlerini hedeflediği belirlenmiş ve bu genlerin ifadeleri gruplar arasında analiz edilmiştir.

LAC, BBP ve BCP genleri, tilakoid lümeninde bulunan bakır içeren redoks proteinleri arasında yer alır ve fotosentetik elektron taşınmasında önemli roller oynar (Ma vd., 2015). Birçok çalışma miR408'in esansiyel olmayan kuproproteinler plantacyanin, cupredoxin, uclacyanin ve LAC3'ün azalmasındaki rolüne işaret ederek stresle başa çıkmak için gerekli olan kuproproteinler için bakırın kullanılabilirliğini desteklemiştir. Yapılan bir çalışmada, *Arabidopsis* bitkisinde miR408'in hedefleri olarak LAC3, LAC12, LAC13 ve PLANTACYANIN1 olarak belirlenmiştir (Abdel-Ghany ve Pilon 2008). Pirinçte, OsUCL8 ve OsUCL30'un miR408 tarafından hedeflendiği tahmin edilmiş ve RACE analizi ile doğrulanmıştır (Zhou et al. 2010). Zma-miR408'in hedefleri olan genlerin ekspresyonunu incelediğimizde, STTM-miR408a/b ile muamele edilen mısır fidelerinin kontrol ve soğuk koşullar altında, tüm genlerin ekspresyonunun STTM ile muamele edilen gruplarda arttığı ancak LAC ekspresyonunun STTM^S grubunda değişmediği tespit edilmiştir. Bu bulguya benzer olarak, Zhou et al. (2010), miR408 seviyelerinin, hedef genlerinin ekspresyon seviyeleriyle her zaman uyummadığını bildirmiştir. *O. sativa* üzerinde yapılan bir çalışma da miR408 ekspresyonunun hedef genlerinin ekspresyon seviyeleriyle her zaman paralel olmadığını ortaya koymuştur (Zhang et al., 2017).

BBP ekspresyonu STTM ve STTM^S gruplarında BB ve BV^S gruplarına kıyasla artmıştır. Benzer şekilde, BCP geninin ifadesi hem S hem de SS gruplarında BV ve BV^S gruplarına kıyasla artmıştır. LAC, STTM grubunda ekspresyon seviyesi artarken, STTM^S grubunda anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.15). BBP ve BCP genlerinin bitkide plastosiyanin, kupredoxin gibi proteinlerle bağlantıları vardır. Elde ettiğimiz sonuçlar diğer çalışmalarda da bu genlerin miR408'in ekspresyonundan etkilendiğini gösteren sonuçlarla paraleldir. miR408 ve hedefleri LAC, BBP ve BCP, bitki büyümesi ve hücre duvarı üretiminin yanı sıra fotosentezle bağlantılı olan bakır metabolizmasında rol oynamaktadır. miR408'i aşırı eksprese eden *Arabidopsis* bitkilerinin yaprak alanı, biyokütle, tohum verimi fotosentez oranı, kloroplastik bakır içeriği ve plastosiyanin (PC) seviyelerinde önemli bir artış sergilediği gösterilmiştir. Buna karşılık, miR408 hedef genleri Plantacyanin ve Laccase 13'ün aşırı ekspresyonu biyokütle ve tohum veriminde azalmaya neden olmuştur (Song vd., 2018). Hu ve

diğerlerinin (2022) elma üzerinde yaptıkları çalışmada, miR408a'nın BBP'yi ve LAC3 genlerini hedef aldığını, bitkide antosiyanin üretimini artırdığı ve bakır metabolizmasıyla ilgili yolakları ve bitkide verimi etkilediği gösterilmiştir. Birlikte ele alındığında, miR408'in hedef gen ekspresyonlarını modüle ederek bakır metabolizmasında dolaylı bir rol oynadığını göstermektedir. Bu sonuç, miR408'in susturulduğu bitkilerde bakır seviyesinin belirlenmesiyle desteklenebilir. Ayrıca, özellikle soğuk stres altında LAC22 geninin alternatif bir düzenleme yolunun varlığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

BBP, BCP ve LAC gibi bakır içeren proteinler doğada yaygın olarak bulunur ve oksijen taşınması, aktivasyon ve redoks süreçlerinde elektron transferine katılırlar. Bakır, bitkilerde en yaygın olarak bulunan geçiş metallerinden biridir. Bununla birlikte, serbest bakırın homeostazisi, eser konsantrasyonlarda bile toksisitesi nedeniyle canlı organizmalarda hassas moleküler mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir (McManus vd., 1992; Rydén vd., 1993; Mattar vd., 1994). LAC geni, multicopper oxidases (MCO) süper ailesine ait olan lakkazları kodlar. Lakkazlar, fenolik ve inorganik maddeler de dahil olmak üzere çeşitli aromatikleri oksitleyerek ve aynı zamanda moleküler oksijeni suya indirgeyerek gelişim, morfogenez ve lignin metabolizması gibi çoklu metabolik yollarda ve biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. Bitkiler, çoğunlukla spesifik fizyolojik ve biyokimyasal işlevlere sahip çok sayıda LAC geni üretir. Bu durum göz önüne alındığında, miRNA'ların böylesine önemli bir metabolik yolda yer alan proteinlerin tek düzenleyicisi olmaması muhtemeldir (Giardina vd., 2010; Turlapati vd., 2011; Balasubramanian vd., 2016). *Arabidopsis* üzerinde yapılan bir çalışma, bakır ve ışık metabolizmasını düzenleyen SPL7 ve HY5 transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak, mir408 ve onun hedefi olan LAC12 ve LAC13'ü zamana bağlı bir şekilde transkripsiyonel olarak düzenlediğini göstermektedir (Zhang ve Li 2013). Wang et al. (2024), mısırdaki 22 LAC genini tanımlamış ve bunları altı alt aileye dağıtmıştır. Ayrıca, LAC22 geninin ekspresyon seviyesinin soğuk stres altında önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Bizim bulgularımız, soğuk stres koşullarında BV ve STTM grupları arasında LAC22 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, miR408a/b'nin soğuk koşullar altındaki sessizleştirme etkisinin farklılık gösterdiği sonucuna varılabilir. Ayrıca, LAC genlerinin yalnızca miR408 tarafından değil, zaman ve koşul bağımlı olarak alternatif bir yol tarafından

düzenlendiği düşünölebilir (Giardina et al., 2010; Turlapati et al., 2011; Balasubramanian et al., 2016). Tüm bu veriler göz önüne alındığında, varsayılan hedef LAC genleri yalnızca mısır miR408 tarafından düzenlenmediği, aynı zamanda zamana ve koşula bağlı olarak çalışan alternatif bir yol olduğu sonucuna varılabilir.



6. SONUÇLAR

Bu tez çalışması ile ilk kez, STTM ve VIGS yöntemleri birlikte kullanılarak, *Zea mays* miR408 geni susturulmuştur. Bu susturma sonucunda zma-miR408 geninin kontrol ve soğuk stresi koşulları altında, bitki büyüme ve gelişimine ve bitkinin soğuk stresine olan toleransı üzerindeki etkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Nicotiana benthamiana bitkisinde PDS geni %80 oranında susturulmuştur.

Zea mays bitkisinde PDS geni %99'lara varan oranlarda susturulmuştur.

Mısır bitkisinde, miR408'in yaprak uzunluğu üzerine etkilerine bakılmıştır. 2. yaprak uzunluğu, STTM, STTM^S ve BV^S gruplarında BV grubuna kıyasla sırasıyla %19, %25 ve %31 oranında azaldığı saptanmıştır. 3. Yaprak uzunluğunun STTM grubunda %11, BV^S grubunda %38 ve STTM^S grubunda ise BV grubuna göre %35 oranında anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Antioksidan enzim aktivitesi deneyleri sonucunda, CAT aktivitesinin BV grubunda en yüksek olduğunu ve STTM, BV^S ve STTM^S'de istatistiksel olarak anlamlı şekilde %57 oranında azaldığı görülmüştür. APX aktivitesinin BV ve STTM grupları arasında benzer olarak tespit edildi ancak BV^S ve STTM^S gruplarında B ile karşılaştırıldığında yaklaşık %15 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. GR aktivitesinin BV ve STTM gruplarında daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ve BV ve STTM^S gruplarında sırasıyla %29 ve %28 oranında önemli bir azalma olduğu görülmüştür. CAT, GR, APX enzimlerindeki bu değişimlere ek olarak; BV, BV^S, STTM, STTM^S deney gruplarında, POX ve SOD aktiviteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Mısır bitkisinde miR408 geninin yaprak uzama oranları üzerine etkisine bakılmıştır. 2. Yaprak uzama oranının, Sde üçüncü günde %10, BV^S ve STTM^S gruplarında ise dördüncü günde %35 oranında anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. 3. Yaprak uzama oranına bakıldığında, BV ve STTM grupları için aralarındaki farkın %19 oranında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Ancak mısır fideleri soğuk stresine maruz bırakıldığında, her iki gruptaki fidelerin üçüncü yaprağı iki gün boyunca istikrarlı bir şekilde büyüdü ve daha sonra yaprak olgunluğuna kadar yaprak uzama oranı sürekli olarak azaldı. BV^S ve STTM^S gruplarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Soğuk stresinin, BV^S grubunda 3. Yaprak uzama

oranında %52 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olurken, STTM^S grubunda bu azalmanın %49 oranında olduğu görülmüştür.

miR408 ifadesi, miR408'in stem-loop RT-PCR sentezi ve ardından miR408a/b spesifik ileri ve evrensel ters primerlerle yapılan RT-qPCR analizi ile belirlendi. Sonuçlar, endojen miR408 transkript miktarının STTM grubunda BV grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğunu ve STTM^S gruplarında BV^S gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğunu göstermiştir. miR408 ifadesine antagonistik olarak, onun olası hedef genleri olan temel mavi protein (BBP) ve mavi bakır proteini (BCP) STTM ve STTM^S gruplarında BV ve BV^S gruplarına kıyasla transkripsiyonunun arttığı tespit edilmiştir. Diğer yandan, olası hedef Lakkaz (LAC22) geni STTM grubunda BV grubuna kıyasla transkripsiyonunun arttığı gözlemlenmiş, ancak BV^S ve STTM^S grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

7. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, miR408 ve olası hedef genleri olan LAC, BBP, BCP genleri arasındaki ilişki kontrol ve soğuk stresi koşulları altında incelenmiştir. Daha ayrıntılı analiz için miR408 geninin CRISPR yöntemi ile susturulup hedef genleri üzerindeki etkilerine bakılabilir. Ya da miR408 geninin ekspresyonu artırılarak hedef genleri üzerindeki etkisinin anlaşılması için çalışmalar yapılabilir.

CAT, SOD, POX, APX, GR enzim aktivitelerinin miR408 ekspresyonuna ve soğuk stresi sırasında verdiği cevaplar aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu enzim çalışmaları sırasında toplam protein izolasyonu yapılarak enzim ekstraktı ile çalışılmıştır. Daha ileri çalışmalar için protein spesifik çalışmalar yapılabilir. Soğuk stresi altında bu antioksidan enzimlerin kaç izoformunun üretildiği SDS-PAGE çalışması ile belirlenebilir.

KAYNAKLAR

- Agarwal M., Hao Y., Kaur H., Narayan R., Finkelstein R., (2021), “Regulatory networks in plant stress signaling: Insights from the role of miRNAs and transcription factors”, *Journal of Experimental Botany*, 72(5), 1461-1474.
- Ahsan N., Waseem M., Rehman A., Yasin N., Ahmad I., (2021), “Comparative analysis of miR156 and miR165 families reveals their potential role in cold stress response in wheat”, *BMC Plant Biology*, 21, 292.
- Amada P., (2010), “Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development”, *Journal of Experimental Botany*, 61 (5), 1277–1291.
- Avramova V., Abdelgawad H., Zhang Z., Fotschki B., Casadevall Romina, Vergauwen L., Knapen D., Taleisnik E., Guisez., Asard H., Gerrit T.S. (2015), “Drought Induces Distinct Growth Response, Protection, and Beemster Recovery Mechanisms in the Maize Leaf Growth Zone”, *Plant Physiology*, 169, 1382–1396.
- Aydinoglu F., (2020), “Elucidating the regulatory roles of microRNAs in maize (*Zea mays* L.) leaf growth response to chilling stress”, *Planta*, 2020;251:38.
- Aydinoglu F., Kahriman T.Y., Balci H. (2023), “Seed bio-priming enhanced salt stress tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings by regulating the antioxidant system and miRNA expression”, *3 Biotech* 13, 378.
- Banowetza Gary M., Dierksena Karen P., Azevedoa Mark D., Stout Richard., (2004), “Microplate quantification of plant leaf superoxide dismutases”, *Analytical Biochemistry*, 332, 314–320.
- Bartel David P., (2004), “MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function”, *Cell*, 116, 281–297.
- Bhattacharjee S., (2005), “Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants”, *Current Science*, 89, 7.
- Božić M., Ignjatović Micić D., Delić N., (2024), “Maize miRNAs and their putative target genes involved in chilling stress response in 5-day old seedlings”, *BMC Genomics*, 25, 479,
- Budak H., Akpinar B. A. (2015), “Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins”, *Funct Integr Genomics*, 15, 523–531.
- Chance B., Maehly A.C., (1995), “Assay of catalases and peroxidases”, *Methods in Enzymology*, 2, 764-775.
- Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal M. H., Ferjani E. E., (1997), “Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus Vulgaris* L.)”, *Plant Science*, 127, 139–147.

Charrier A, Vergne E, Dousset N, Richer A, Petiteau A and Chevreau E., (2019), “Efficient Targeted Mutagenesis in Apple and First Time Edition of Pear Using the CRISPR-Cas9 System”, *Frontiers Plant Science* 10:40.

Chavez-Hernandez Elva C., Alejandri-Ramirez Naholi D., Juarez-Gonzalez Vasti T., and Dinkova Tzvetanka D., (2015), “Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis”, *Front Plant Science*, 6, 555.

Chen X., Zeng H., Huang G., Wei J., Zhang S., Li S., (2019), “miR408 regulates plant cold tolerance by modulating the copper-responsive genes and antioxidant systems in maize”, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1334.

Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J., (2007), “Cold stress regulation of gene expression in plants”, *TRENDS in Plant Science*, 12, 10.

Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K., (2007), “Cold stress regulation of gene expression in plants”, *Trends in Plant Science*, 12(10), pp.444-451.

Chiou T. J., Aung K., Lin S. I., Wu C. C., Chiang S. F., Su C. L., (2006), “Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis”, *Plant Cell*, 18, 412–421.

Choudhury Feroza K., Rivero Rosa M., Blumwald E., Mittler R., (2017), “Reactive oxygen species, abiotic stress and stress Combination”, *The Plant Journal*, 90, 856–867.

Crevecoeur M., Marcela P., Greppin H., Penell C., (1997), “Peroxidase activity in shoot apical meristem from Spinaci”, *Acta histochemica*, 99, 177-186.

Demiralp B., Büyük İ., Aras S., Cansaran-Duman D. (2015), “Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(4), 351-68.

Dhindsa Rajinder S., Plump-Dhindsa P., Thorpe Trevor A., (1981), “Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase”, *Journal of Experimental Botany*, 32, 126, 93-101.

Ding Y., Shi Y., Yang S., (2019), “Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants”, *New Phytologist*, 222: 1690-1704.

Djami-Tchatchou A.T., Dubery I.A., (2015), “Lipopolysaccharide perception leads to dynamic alterations in the microtranscriptome of Arabidopsis thaliana cells and leaf tissues”, *BMC Plant Biology*, 15, 79.

Dong, C. H., Zolman B.K., Bartel B., Lee B.H., Stevenson B., Agarwal M., Zhu, J.K., (2009), “Disruption of Arabidopsis CHY1 reveals an important role of metabolic status in plant cold stress signaling”, *Molecular Plant*, 2(1), pp.59-72.

Facette Michelle R., Shen Z., Björnsdóttir Fjola R., Briggs Steven P., Smitha Laurie G., (2013), “Parallel Proteomic and Phosphoproteomic Analyses of Successive Stages of Maize Leaf Development”, *The Plant Cell*, 25, 2798–2812.

Feng H., Zhang, Q., Wang Q., Wang X., Liu J., Li M., Huang L., Kang Z., (2013), “Target of ta-miR408, a chemocyanin-like protein gene (TaCLP1), plays positive roles in wheat response to high-salinity, heavy cupric stress and stripe rust”, *Plant Molecular Biology*, 83, 433–443.

Fujii H., Chiou T. J., Lin S. I., Aung K., Zhu J. K., (2005), “A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*”, *Current Biology*, 15, 2038–2043.

Green MR, Sambrook J., (2020), “The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli*: "Ultracompetent" Cells”, *Cold Spring Harb Protoc.*, 2020 Jun 1;2020(6):101196. doi: 10.1101/pdb.prot101196. PMID: 32482900.

Gupta Om P., Meena Nand L., Sharma I., Sharma P., (2014), “Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat”, *Molecular Biology Reports*, 41, 4623–4629.

Guy C.L., (1990), “Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism”, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41(1), pp.187-223.

Han Y., Yang X., Guo J., Qiu X., Zhang Y., (2019), “Identification and functional characterization of microRNAs in response to cold stress in maize seedlings”, *Genes*, 10(6), 432.

Heath Robert L., Packer L., (1968), “Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation”, *Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.

Huang H., Long J., Zheng L., Li Y., Hua Y., Yu G., Liu H., Liu Y., Huang Z., Zhang J., Huang Y., (2016), “Identification and characterization of microRNAs in maize endosperm response to exogenous sucrose using small RNA sequencing”, *Genomics*, 108, 216–223.

Hussain S., Wang L., Luo J., Wei X., Xu L., Li T., (2018), “Transcriptional regulation and miRNA-mediated post-transcriptional regulation in plant abiotic stress response”, *Frontiers in Plant Science*, 9, 626.

Inze D., Veylder L. (2006), “Cell Cycle Regulation in Plant Development”, *The Annual Review of Genetics*, 40, 77–105.

Iqbal B., Jalal A., Ahmad N., Okla MK, Elgawad HA, El-Tayeb MA., Gaafar AZ., Li G, Du D (2025), “Exogenous naphthaleneacetic acid (NAA) mitigated the alkaline stress changes in the growth and physio-biochemical performance of maize (*Zea mays* L.) seedlings”, *Acta Physiologiae Plantarum* 47, 19 (2025).

Jaspers P., Kangasjarvi J., (2010), “Reactive oxygen species in abiotic stress signaling”, *Physiologia Plantarum*, 138, 405–413.

Jaszek M., Grzywnowicz K., Malarczyk E., Leonowicz A., (2006), “Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85, 147–154.

Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., (2004), “Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA”, *Molecular Cell*, 14, 787–799.

Kang Y., Li X., Zhang X., Zhang H., (2022), “The role of the microRNA-171 in regulating drought and cold stress in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Science*, 317, 111221.

Kantar M., Lucas Stuart J., Budak H., (2011), “miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress”, *Planta*, 233, 471–484.

Kaplan F., Guy, C.L., (2004), “ β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock”, *Plant Physiology*, 135(3), pp.1674-1684.

Kaplan F., Kopka J., Sung D.Y., Zhao W., Popp M., Porat R., Guy, C.L., (2007), “Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content”, *The Plant Journal*, 50(6), pp.967-981.

Kim D., Kwak E., Choi Hyoun T., (2006), “Increase of Yeast Survival under Oxidative Stress by the Expression of the Laccase Gene from *Coprinellus congregatus*”, *The Journal of Microbiology*, 617-621.

Kumar A., Sharmaa Krishna K., Kumar P., Ramchiaryb N., (2015), “Laccase isozymes from *Ganoderma lucidum* MDU-7: Isolation, characterization, catalytic properties and differential role during oxidative stress”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 113, 68–75.

Kumar R., (2014), “Role of MicroRNAs in Biotic and Abiotic Stress”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174: 93.

Lee B.H., Lee H., Xiong L., Zhu J.K., (2002), “A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression”, *The Plant Cell*, 14(6), pp.1235-1251.
Li, X., Song, X., Yang, Y., Zhang, J., Wang, J. (2020), “miR529c enhances drought tolerance by regulating dehydration-responsive elements in plants”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 154, 73-81.

Liu Tsan Z., Chin N., Kiser Michael D., Bigler William N., (1982), “Specific Spectrophotometry of Ascorbic Acid in Serum or Plasma by Use of Ascorbate Oxidase”, *Clinical Chemistry*, 28, 11, 1982.

Liu H., Liu Y., Zhao J., Liu S., Tian C., Zhang Z., (2021), “miR398 is involved in regulating cold tolerance in plants by targeting the copper/zinc superoxide dismutase genes”, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2905.

Liu Y., Zhang L., Huang Y., Yin J., Jiang Y., (2021), “MiR156 and its targets are involved in the regulation of cold tolerance in rice by modulating cell wall biosynthesis”, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9863.

Lu Q, Guo F, Xu Q, Cang J., (2020), “LncRNA improves cold resistance of winter wheat by interacting with miR398”, *Functional Plant Biology*, 2020;47:544.

Ma C., Burd S., Lers A., (2015), “miR408 is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*”, *The Plant Journal*, 84, 169–187.

Martín ML., Busconi L., (2001), “A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature”, *Plant Physiology*, 125(3), 1442-9.

Mayera Alfred M., Staplesb Richard C., (2002), “Laccase: new functions for an old enzyme”, *Phytochemistry*, 60, 551–565.

Mittler R., (2002), “Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance”, *TRENDS in Plant Science*, 7, 9.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem Frank V., (2004), “Reactive oxygen gene network of Plants”, *TRENDS in Plant Science*, 9, 10.

Nakano Y., Asada K., (1981), “Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts”, *Plant & Cell Physiology*, 22(5), 867-880.

Navarro L., Dunoyer P., Jay F., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O., Jones J. D., (2006), “A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling”, *Science*, 312, 436–439.

Neto André Diasde A., Tarquinio Prisco J., Enéas-Filho J., Braga de Abreu Carlos E., Gomes-Filho E., (2006), “Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes”, *Environmental and Experimental Botany*, 56, 87–94.

Pearce, R.S., (2001), “Plant freezing and damage”, *Annals of Botany*, 87(4), pp.417-424.

Pfaffl M.W., (2001), “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR”, *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.

Polyn S., Willems A., Veylder Lieven D., (2015), “Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development”, *Current Opinion in Plant Biology*, 23, 1–7.

Qiu YM, Guo J, Jiang WZ, Ding JH, Song RF, Zhang JL, Huang X, Yuan HM., (2023), “HbBIN2 Functions in Plant Cold Stress Resistance through Modulation of HbICE1

Transcriptional Activity and ROS Homeostasis in *Hevea brasiliensis*”, *International Journal Molecular Science*;24(21):15778. doi: 10.3390/ijms242115778.

Quesada Miguel A., Sánchez-Roldán C., Heredia A., Valpuesta V., and Bukovac Martin J., (1992), “Peroxidase and IAA Oxidase Activities and Peroxidase Isoenzymes in the Pericarp of Seeded and Seedless "Redhaven" Peach Fruit”, *Journal of Plant Growth Regulation*, 11:1-6.

Rihan H.Z., Al-Issawi M., Fuller M.P., (2017), “Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance”, *Journal of Plant Interactions*, 12(1), pp.143-157.

Rogers K., Chen X., (2013), “Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs”, *Plant Cell*, 25, 2383–2399.

Rosa C, Kuo Y-W, Wuriyanghan H, Falk BW., (2018), “RNA interference mechanisms and applications in plant pathology”, *Annual Review of Phytopathology*, 56:581–610.

Rymen B., Fiorani F., Kartal F., Vandepoele K., Inze D., Beemster G. T. S., (2007), “Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes”, *Plant Physiology*, 143 (3), 1429-1438.

Saijo Y., Hata S., Kyojuka J., Shimamoto K., Izui K., (2000), “Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants”, *Plant Journal*, 23(3), 319-27.

Scandalios J.G., (2005), “Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 995-1014.

Sergiev L., Alexieva E., Karanov E., (1997), “Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and markers in plants”, *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 51, 121-124.

Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M., (2016), “Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road”, *Frontier Plant Science*, 7, 187.

Sharma N., Muthamilarasan M., Prasad M., Reddy A., Khan M., (2020), “Abiotic stress-responsive microRNAs and their roles in plant stress tolerance”, *Journal of Plant Physiology*, 247, 153097.

Sharma R., Kumar S., Singh B., Ali M., Verma S., (2022), “MicroRNAs and their role in plant adaptation to abiotic stresses”, *Environmental and Experimental Botany*, 183, 104358.

Sharman B. C., (1942), “Developmental Anatomy of the Shoot of *Zea mays* L., *Annals of Botany, New Series*, 6, (22), 245-282.

Shu S., Wang J., Guo R., Huang Y., Xu D., (2021), “Functional characterization of maize miR167a in the regulation of cold stress tolerance”, *Scientific Reports*, 11, 8347.

Siddique, M.I., Lott, J.N.A., Menzies, J.G., (2019), “The role of microRNAs in crop abiotic stress tolerance: A comprehensive review”, *Physiologia Plantarum*, 167(2), 200–216.

Sun Y., Jin L., Li Z., Zhang J., Liu F., Wei H., (2021), “MicroRNA regulation of plant stress tolerance and its potential applications in crop breeding”, *Frontiers in Plant Science*, 12, 699590.

Sunkar R., (2010), “MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses”, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21, 805–811.

Sunkar R., Kapoor A., Zhu J., (2006), “Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in Arabidopsis Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance”, *The Plant Cell*, 18, 2051–2065.

Sunkar R., Li Y., Jagadeeswaran G., (2012), “Functions of microRNAs in plant stress responses”, *Trends in Plant Science*, 17, 4.

Sylvester, A. W., & Smith, L. G., (2009), “Cell Biology of Maize Leaf Development”, *Handbook of Maize: Its Biology*, 179–203. doi:10.1007/978-0-387-79418-1_10.

Thomashow, M.F., (1999), “Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms”, *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), pp.571-599.

Tiryakioglu M., Eker S., Ozkutlu F., Hustedd S., Cakmak I., (2006), “Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20, 181–189.

Wang L., Zhang, W., Zhang H., Zhao, X., Song T., (2020), “The role of miR168 and its targets in abiotic stress responses in plants”, *Plant Growth Regulation*, 91, 223–235.

Wang M., Zhang Y., Li W., Yang Y., Deng J., (2020), “MicroRNA expression profiles of chilling-tolerant maize seedlings under low temperature stress”, *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 106.

Wang Shiow Y., Jiao Hong J., Faust M., (1991), “Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thidiazuron-induced bud break of apple”, *Physiologia Plantarum*, 82, 231-236.

Web 1, (2018), www.tarim.gov.tr, (Erişim tarihi 1/06/2018).

Wei L., Zhang D., Xiang F., Zhang Z., (2009), “Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings”, *International Journal of Plant Sciences*, 170(8), 979–989.

Worrall EA, Bravo-Cazar A, Nilon AT., (2019), “Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus”, *Frontier in Plant Science*, 10:265.

Yang Y., Zhuo Fangfang Fani R., Ma F., Gong Y., Wan X., Jiang M., Zhang X., (2012), “Expression of the Laccase Gene from a White Rot Fungus in *Pichia pastoris* Can Enhance the Resistance of This Yeast to H₂O₂-Mediated Oxidative Stress by Stimulating the Glutathione-Based Antioxidative System”, *Applied and Environmental Microbiology*, 5845–5854.

Yentür S., (2003), “Bitki anatomisi”, 3. Baskı, İstanbul Üniversitesi Yayınları.

Yin J., Wang, G., Xiao J., Ma, F., Zhang H., Sun Y., Diao, Y., Huang J., Guo Q., Liu D., (2010), “Identification of genes involved in stem rust resistance from wheat mutant D51 with the cDNA-AFLP technique”, *Molecular Biology Reports*, 37, 1111–1117.

Yuan Y., Li T., Wei L., Zhao J., Zhang H., Zeng, L., (2019), “Expression and functional analysis of a maize microRNA, miR393, in response to chilling stress”, *Plant Science*, 283, 85-94.

Yujing H., Jiayi J., Hao C., Rongli L., Jie Z., Wenjing L., Xingsui W., Jie Z., Yuncong Y., (2022), “The miR408a-BBP-LAC3/CSD1 module regulates anthocyanin biosynthesis mediated by crosstalk between copper homeostasis and ROS homeostasis during light induction in *Malus* plants”, *Journal of Advanced Research*, 51 (2023), 27–44.

Zainali N., Alizadeh H., Delavault P., (2025), “Gene silencing in broomrapes and other parasitic plants of the Orobanchaceae family: mechanisms, considerations, and future directions”, *Journal of Experimental Botany*, 76(2), 243-261.

Zhang B., (2015), “MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress”, *Journal of Experimental Botany*, 66, 7, 1749–1761.

Zhang B., Pan X., Pan George P., Cobb, Anderson Todd A., (2005), “Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact”, *Developmental Biology*, 289, 3–16.

Zhang Y., Xie F., Zhou J., Liu Y., Li L., (2020), “Comprehensive analysis of the regulatory role of microRNAs in cold stress response of rice”, *Frontiers in Genetics*, 11, 415.

Zhao J., Hu, J., Chen, Y., Wang, J., Ding, Y. (2021), “MicroRNA regulation of cold tolerance in plants: A review”, *Agronomy*, 11(11), 2269.

Zhou H., Zhang H., Zhang F., Guo C., Zhang W., (2021), “A cold-induced microRNA, miR529, regulates the development of maize roots under chilling stress”, *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 1285–1295.

Zhu J., (2016), “Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants”, *Cell*, 167.

Zhu Y., Zuo M., Liang Y., Jiang M., Zhang J., Scheller Henrik V., Mingpu T., Zhang A., (2013), “MAP65-1a positively regulates H₂O₂ amplification and enhances brassinosteroid-induced antioxidant defense in maize”, *Journal of Experimental Botany*, 64, 3787–3802.

ÖZGEÇMİŞ

Burak Akgül ilk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2012 yılında Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2016 yılında eğitimini tamamladı.

2017 yılında GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. Prof. Dr. Yelda Özden Çiftçi ve Öğretim Görevlisi Dr. Fatma Aydınoğlu danışmanlığında ‘’ Mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin yaprak büyüme işlevleri üzerine mikroRNA aracılıklı redoks regülasyonunun incelenmesi.’’ konulu tez çalışmasını gerçekleştirdi. 2018 yılında Doç Dr. Fatma Aydınoğlu danışmanlığında ‘Mısır (*Zea Mays* L.) Bitkisinin Yaprak Büyüme ve Gelişimini Düzenleyen Olası Microrna Genlerinin Fonksiyonel Araştırmaları’ konulu tez çalışmasını gerçekleştirdi.



TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR

Akgul B., Aydinoglu F., (2024), “Evaluation of zma-miR408 and its target genes function on maize (*Zea mays*) leaf growth response to cold stress by VIGS-based STTM approach”, *Gene*, 938, 2025,149161.

