

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MODEL BİTKİ ARABİDOPSİS THALİANA’NIN
KRİYOPREZERVASYON SÜRECİNDE GERÇEKLEŞEN
TRANSKRİPSİYON SONRASI DÜZENLENMELERİN
MİRNA’LAR İLE TARANMASI

MUHAMMED HAMİT EKİNCİ
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2020

T.R.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MODEL BİTKİ ARABİDOPSİS
THALİANA’NIN KRİYOPREZERVASYON
SÜRECİNDE GERÇEKLEŞEN
TRANSKRİPSİYON SONRASI
DÜZENLENMELERİN MİRNA’LAR İLE
TARANMASI

MUHAMMED HAMİT EKİNCİ
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE
2020

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**SCREENING OF POST-TRANSCRIPTIONAL
REGULATION OF MODEL PLANT
ARABIDOPSIS THALIANA DURING
CRYOPRESERVATION WITH MIRNAS**

MUHAMMED HAMİT EKİNCİ
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE
2020



DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/07/2020 tarih ve 2020/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 13/07/2020 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Muhammed Hamit EKİNCİ'nin tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU

ÜYE

: Doç. Dr. Ergun KAYA

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜL ŞEKER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA / MÜHÜR

ÖZET

Kriyoprezervasyon, -196°C'ta sıvı azot (SA) içerisinde bitki germplazmasının korunabilmesi için güvenli ve uygun maliyetli uzun süreli bir saklama tekniğidir. Kriyoprezervasyon sırasında, *in vitro* kültürlenmiş bitki hücreleri ve dokuları kuraklık, soğuk ve oksidatif gibi çeşitli abiyotik streslere maruz kalırlar. Bununla birlikte, şimdiye kadar, kriyoprezervasyon sonrası hayatta kalmayı etkileyen moleküler düzenleyici mekanizmalar, bitkilerde net bir şekilde açıklanamamıştır. mikroRNA'lar (miRNA'lar) bitkilerin gelişim sürecinde gen anlatımını düzenlemenin yanında, aynı zamanda stres durumunda gen anlatımını transkripsiyon sonrası degradasyon yolu ile kontrol eder. Bu nedenle, bu tez çalışması kapsamında, farklı çimlenme sürelerinde (48 ve 72 saat) çimlendirilmiş *Arabidopsis thaliana*'da kriyoprezervasyonun farklı aşamalarında miRNA tabanlı transkripsiyon sonrası düzenlemeleri ortaya çıkarmak amaçlanmıştır. Taranan 10 miRNA ve bunların hedef genleri arasında, kriyoprezervasyon aşamalarındaki maruziyetine göre test edilen iki çimlenme süresinde tespit edilen farklılaşan anlatım düzeyleri bakıldığında, 6 miRNA (miR393, miR397, miR398, miR159, miR169 ve miR172) 48 saat grubunda karışık bir artış-azalış gösterirken, 6 miRNA (miR397, miR398, miR159, miR169, miR172 ve miR408) 72 saat grubunda kontrole kıyasla OD (Ozmokoruma-Dehidratasyon) ve LD (Sıvı Azot-Dilüsyon) örneklerinde önemli ölçüde anlatımı azalmıştır. En çarpıcı gen anlatım değişikliği miR393'te, 48 saat LD örneklerde 15 kat artış ile elde edilirken, kriyoprezerve edilmiş 72 saat örneklerde nispeten daha düşük miktarda artış (2 kat) kaydedilmiştir. Ayrıca miR393'ün hedef genleri TIR1 ve HOS1'in anlatımında eşzamanlı azalış ve 48 saat örneklerinde HOS1 tarafından düzenlenen CBF1 ve CBF3 ve bunların alt genlerinin (COR15 ve COR47) anlatım düzeylerinde artış gözlenmiştir. Tez çalışmasında kriyoprezervasyon sırasında miRNA'ların, hedef genlerinin ve bunlarla etkileşim halinde olan soğuk ilişkili genlerin anlatım düzeylerindeki değişimlerin, başarılı kriyoprezervasyon protokollerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, Kriyoprezervasyon, miRNA, Abiyotik stres, Oksidatif stres.

SUMMARY

Cryopreservation is a safe and cost-effective long-term storage technique which helps to conserve plant germplasm in liquid nitrogen (LN). During cryopreservation, *in vitro* cultured plant cells and tissues exposure to several stresses among which drought, cold and oxidative are the main abiotic stresses that seriously affect plant growth in cryostorage. However, up to now, the molecular regulatory mechanisms that effect survival after cryopreservation have not been satisfactorily elucidated in plants. microRNAs (miRNAs) not only regulate gene expression in developmental process of plants, but also control gene expression in stress condition by post-transcriptional degradation. Thus, the aim of the study concerned to reveal out miRNA-based post-transcriptional regulations during different stages of cryopreservation in 48-h and 72-h *in vitro* germinated *Arabidopsis thaliana*. Among the screened 10 miRNAs and their selected target genes, differential expression levels detected in two tested germination time according to exposure of cryopreservation stages, as 6 miRNAs (miR393, miR397, miR398, miR159, miR169 and miR172) showed a mixed pattern in 48-h germinated seedlings while 6 miRNAs (miR397, miR398, miR159, miR169, miR172 and miR408) were significantly down-regulated in OD (Osmoprotection-Dehydration) and LD (Liquid nitrogen-Dilution) samples in comparison to control in 72-h germinated ones. The most striking expression changes was obtained in miR393 as it was up-regulated 15-fold in LN treated 48-h seedlings while relatively lower amount induction (2-fold) was recorded in cryopreserved 72-h seedlings. The concomitant down-regulation of its target TIR1 and HOS1 expression and up-regulation of CBF1 and CBF3 and their downstream genes (COR15 and COR47) were also observed in cryopreserved 48-h germinated seedlings. Thus, the alteration of expression levels of cold induced genes related-miRNAs and their target genes play a crucial role in development of successful cryopreservation protocols.

Key Words: *Arabidopsis thaliana*, Cryopreservation, miRNA, Abiotic stress, Oxidative stress.

TEŞEKKÜR

Hem yüksek lisans hem de doktora öğrenimim boyunca yanımda olan, desteğini sürekli arkamda hissettiğim, bilgisini, anlayışını ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, akademik duruşu ile ufkumu açan ve bana ilham veren sevgili danışman hocam, Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin yürütülmesi sırasında önemli katkılar ve önerilerde bulunan tez izleme komitemin değerli jürileri Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e ve Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCULOĞLU'na teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarını esirgemeyen ve destekleri ile yanımda olan Dr. Öğt. Üyesi Mine GÜL ŞEKER, Dr. Özlem AKKAYA, Dr. Öğt. Üyesi Ceyhun KAYIHAN, Dr. Doğa Selin KAYIHAN, Dr. Öğt. Üyesi Ceyhun KAYIHAN, Dr. Metin ÇETİN, Dr. Pelin BALÇIK ERÇİN ve Arş. Gör. Emrah ÖZÇELİK'e teşekkür ederim.

GTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı ve GTÜ-MAR Bitkisel ve Bakteriyel Metabolit Biyosentez Laboratuvarı (BiBaMeB) lisansüstü eğitimlerine devam eden değerli ekip arkadaşlarım Burcu UZAN EKEN, İrem BAKŞAN İLTER, Merve ALBAYRAK, Nil TÜRKÖLMEZ, Selin Gül ÜNSAL, Nicat CİBRAİLOĞLU, Gül Çiçek KILIÇ, Nida ARSLAN, Melike TEPE, İlkay ÜNAL, Ömer İLTER, Serap SAKARYA, Busenur URAL ve Arş. Gör. Sinem KURT'a destekleri için teşekkür ederim.

Tüm bunların yanında, en zor zamanlarımda süpriz bir şekilde hayatıma giren, hayatın bana verdiği en özel armağanı olduğunu hissettiğim ve birbirimize verdiğimiz sözler ile çıktığımız bir ömür yolunda her zaman yanımda olacağına inandığım biricik yol arkadaşım Burcu KILIÇ'a bana olan inancı ve tüm destekleri için çok teşekkür ederim.

İdealist, eğitimci bir babanın vasiyetini yerine getirmek için ömrünü çocuklarının eğitimlerine adayan ve bu uğurda hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, hayatımda değer verilecek her şeyin üzerinde tuttuğum canım ANNEME ve her an yanımda olan, varlıkları ile kendimi şanslı hissettiğim KARDEŞLERİME sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 2018-A102-17 numaralı Gebze Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Kriyoprezervasyon	5
2.2. Oksidatif Stres	16
2.3. Transkripsiyon Sonrası Düzenleme	20
2.3.1. miRNA'lar	21
2.3.1.1. miRNA'ların Biyogenezi	22
2.3.1.2. miRNA'ların Bitki Gelişimindeki Rolü	24
2.3.1.3. miRNA'ların Abiyotik Stres Cevabındaki Rolü	26
2.3.1.4. miRNA'ların Oksidatif Stres Cevabındaki Rolü	27
2.4. Model Organizma <i>Arabidopsis</i>	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Bitki Materyali	33
3.1.2. Kullanılan Malzemeler	33
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Besi Ortamı ve Tohumların Eldesi	37
3.2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> 'nın Kriyoprezervasyonu	40
3.2.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> 'nın Canlılık Testi	42
3.2.4. Moleküler Analizler	43

3.2.4.1. miRNA'ların, Hedef Genlerinin ve Soğuk İlişkili Genlerin Belirlenmesi ve Gen Anlatım Analizleri	43
3.2.4.2. Total RNA İzolasyonu	44
3.2.4.3. Total RNA'ların Ters Transkripsiyonu ve Sap-İlmik (stem-loop) qRT-PCR	45
3.3. Verilerin Toplanması ve İstatistiksel Analizler	49
4. BULGULAR	50
4.1. <i>Arabidopsis</i> Fidelerinin Kriyoprezervasyon Sürecindeki Canlılığı	50
4.2. Moleküler Analizler	52
4.2.1. Total RNA İzolasyonu	52
4.2.2. Total RNA'lardan cDNA Sentezi	53
4.2.3. cDNA'lar Kullanılarak qRT-PCR Analizleri	54
4.2.3.1. 48 Saatlik Fidelerde miRNA'ların ve Seçilen Hedef Genlerin Anlatımı	55
4.2.3.2. 72 Saatlik Fidelerde miRNA'ların ve Seçilen Hedef Genlerin Anlatımı	57
4.2.3.3. Soğuk İlişkili Genlerin (CBF'ler ve COR'lar) Anlatımı	59
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ	69
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	92
EKLER	93

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
%	: Yüzde
Δ	: Delta
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
λ	: <i>HindIII</i> Marker
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
kb	: Kilobaz
M	: Molar
Mb	: Megabaz
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
nt	: Nükleotid
sn	: Saniye
-	: Eksi
+	: Artı
$\pm$	: Artı Eksi
/	: Taksim
$\leq$	: Küçük eşit
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
CoCl_2	: Cobalt klorür
CuSO_4	: Bakır sülfat
dH_2O	: Deiyonize/distile su
EtOH	: Etil alkol
FeSO_4	: Demir sülfat
H_2O_2	: Hidrojen peroksit

H ₃ BO ₃	: Borik asit
HCl	: Hidroklorik asit
KH ₂ PO ₄	: Potasyum fosfat
KI	: Potasyum iyodür
KNO ₃	: Potasyum nitrat
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
MnSO ₄	: Manganez sülfat
Na ₂ EDTA	: Disodyum etilendiamin tetraasetik asit
Na ₂ MoO ₄	: Sodyum molibda
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NH ₄ NO ₃	: Amonyum Nitrat
O ₂ ⁻	: Süperoksit
OH ⁻	: Hidroksil radikali
pH	: Hidrojenin gücü
ZnSO ₄	: Çinko sülfat
ABA	: Absciscic acid, Absisik asit
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism, Çoğaltılmış Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi
AFP	: Antifiriz proteinler
AGOs	: Argonautes, Argonatlar
AMP	: Amplified DNA Methylation Polymorphism, Amplifiye DNA metilasyon polimorfizmi
ANOVA	: Analysis of Varians, Varyans Analizi
APX	: Ascorbate peroxidase, Askorbat peroksidaz
AsA	: Ascorbic acid, Askorbik asit
CAT	: Catalase, Katalaz
CBC	: Cap-Binding Complex, Cap-Bağlanma Kompleksi
CBF1	: C-repeat Binding Factor 1, C-tekrar Bağlanma Faktörü 1
CBF3	: C-repeat Binding Factor 3, C-tekrar Bağlanma Faktörü 3
cDNA	: Complementary DNA, Komplementer DNA
COR15	: Cold-Responsive gene 15, Soğuğa Duyarlı Gen 15
COR47	: Cold-Responsive gene 47, Soğuğa Duyarlı Gen 47
CPA	: Cryoprotective Agent, Kriyokoruyucu Ajan

CRT	: C-RepeaT, C tekrarı
CSD1	: Copper/zinc Superoxide Dismutase, Bakır/çinko Süperoksit Dismutaz
Ct	: Cycle of threshold, Eşikdeğer döngüsü
DCLs	: Dicer-like Proteins, Dicer benzeri proteinler
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DH	: Dehydration, Dehidratasyon
DHAR	: Dehydroascorbate reductase, Dehidroaskorbat redüktaz
DL	: Dilüsyon
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DRE	: Dehydration Responsive Element, Dehidratasyon duyarlı element
DREB	: DRE bağlanma proteini
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsRNA	: Double-strand DNA, Çift zincir DNA
EG	: Etilen glikol
F	: Forward, İleri
GK	: Geri Kazanım
GR	: Glutathione reductase, Glutatyon redüktaz
GSH	: Glutathione, Glutatyon
GTÜ	: Gebze Teknik Üniversitesi
HEN1	: HUA ENHANCER1, Bir RNA-spesifik metiltransferaz
HSI	: Hızlı Soğutma ve Isıtma
HOS1	: High expression of osmotically responsive gene 1
HST1	: Nuklear transfer proteini HASTY
HYL1	: Hyponasty leaves 1
ICE1	: Inducer of CBF Expression, CBF ekspresyonunun induseri
IRAP	: Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism, Retrotranspozonlar Arası Çoğaltılmış Polimorfizm
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat, Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
K	: Kontrol
-K	: Negatif kontrol

LAC3	: Lakkaz 3
LAC4	: Lakkaz 4
LCR	: Leaf Curling Responsiveness, Yaprak Kırılma Duyarlılığı
LD	: Liquid Nitrogen-Dilution, Sıvı Azot-Dilisyon
LSD	: Least Significant Difference, En az anlamlı farklılık
MDA	: Malondialdehyde, Malondialdehit
MDHAR	: Monodehydroascorbate reductase, Monodehidro askorbat redüktaz
miRNA	: Mikro RNA
miRbase	: miRNA veritabanı
MS	: Murashige Skoog Besi Ortamı
MSAP	: Methylation Sensitive Amplification Polymorphism, Metilasyona Duyarlı Amplifiye Polimorfizm
NCBI	: National Center for Biotechnology Information, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ncRNA	: Non-coding RNA, Kodlama yapmayan RNA
NTC	: Non-template Control, Kalıp olmayan kontrol
OD	: Osmoprotection-Dehydration, Ozmokoruma-Dehidratasyon
OK	: Ozmokoruuma
PAZ	: sRNA bağlanma domaini
PCA	: Principal Component Analysis, Temel Bileşen Analizi
PCR	: Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilen glikol
PIWI	: sRNA bağlanma domain
PLB	: Protokorm benzeri yapılar
POD	: Peroxidase, Peroksidaz
PTGS	: Post-Transcriptional Gene Silencing, Transkripsiyon Sonrası Gen Susturma
PVS	: Plant Vittrification Solution, Bitki Vittrifikasyon Çözeltisi
qRT-PCR	: Kantitatif Ters Transkriptaz PCR
R	: Reverse, Geri
RAF	: Random Amplified DNA Fingerprint, Rastgele amplifiye DNA parmak izi

RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA, Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
RDRs	: RNA-bağımlı RNA polymerase, RNA-bağımlı RNA polimerazlar
REMAP	: Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism, Retrotranspozon Mikrosatellit Çoğaltılmış Polimorfizm
RISC	: RNA-induced silencing complex, RNA-bağımlı susturma Kompleksi
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferaz
ROS	: Reactive Oxygen Species, Reaktif Oksijen Türevleri
SA	: Sıvı Azot
SDN	: sRNA Degrading Nuclease, sRNA degrades edici nukleaz
SE	: Standard error, Standart hata
siRNA	: Small interfering RNA, Küçük interferaz RNA
SL	: Stem Loop, Sapilmek
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPL10	: Squamosa Promoter Binding Protein-like 10
sRNA	: Small RNA, Küçük RNA
SSR	: Simple Sequence Repeat, Basit Tekrarlı Diziler Polimorfizm
TAIR	: The <i>Arabidopsis</i> Information Resource, <i>Arabidopsis</i> Bilgi Kaynağı
TCP4	: TCP family transcription factor 4
TIR1	: Transport Inhibitor Response 1
TRIzol	: Total RNA İzolasyon Çözeltisi
TTC	: 2,3,5 trifenil tetrazolium klorid
TZ	: Tetrazolium
UBC	: Ubiquitin-Konjugasyon enzimi
UBQ5	: Ubukitin 5
UV	: Ultraviyole
VIV	: Vacuum Infiltration Vitrification, Vakum İnfiltrasyon Vitrifikasyon
ZAP	: RNaz Dekontaminasyon Çözeltisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyon aşamaları.	10
2.2: Monovalent oksijen redüksiyonu ve oluşan ROS'lar.	17
2.3: Abiyotik strese yanıt olarak ncRNA'ların düzenlenmesi.	21
2.4: miRNA'ların biyogenezi ve fonksiyonu.	23
2.5: Soğuk stresi sırasında HOS1 bağımlı CBF ve COR genlerinin anlatımı.	27
2.6: <i>Arabidopsis</i> 'te stres yanıtı miRNA'ların düzenlenme ağı.	30
2.7: <i>Arabidopsis thaliana</i> 'nın gövde (a) ve çiçek (b) görünümü.	32
3.1: 15 gün çimlenen <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 tohumları.	39
3.2: Sera koşullarına aktarılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkileri a) Toprağa aktarılan <i>Arabidopsis</i> fideleri, b) Fideleri koruyan şeffaf malzeme.	39
3.3: 48 ve 72 saat çimlenen <i>Arabidopsis thaliana</i> tohumlarından elde edilen fidelerin kriyoprezervasyon protokol şeması.	42
4.1: 48 (a) ve 72 saat (b) <i>in vitro</i> çimlendirilmiş <i>A. thaliana</i> fidelerinin kriyoprezervasyon sırasındaki canlılık yüzdeleri.	50
4.2: 48 ve 72 saat <i>in vitro</i> çimlendirilmiş <i>A. thaliana</i> fidelerinin kriyoprezervasyon sırasında ve sonrasındaki canlılık testi görüntüleri.	51
4.3: MS0 besi ortamında 15 günlük inkübasyonun ardından 48 saat (a) ve 72 saat (b) <i>in vitro</i> çimlenmiş ve kriyoprezerve edilmiş <i>A. thaliana</i> fidelerinin geri kazanımı.	51
4.4: 48 saat çimlenen <i>Arabidopsis thaliana</i> fidelerinin tüm kriyoprezervasyon aşamalarından izole edilen total RNA'ların %1'lik agaroz jelde görünümü.	53
4.5: 72 saat çimlenen <i>Arabidopsis thaliana</i> fidelerinin tüm kriyoprezervasyon aşamalarından izole edilen total RNA'ların %1'lik agaroz jelde görünümü.	53
4.6: UBQ5 primeri ile gerçekleştirilen kontrol PCR ürünlerinin %1 agaroz jel elektrovez görüntüsü. a) 48 saat ve b) 72 saat.	54

4.7:	48-saat <i>in vitro</i> çimlendirilmiş <i>A. thaliana</i> fidelerinin kriyoprezervasyon aşamalarında farklılaşmış olarak anlatılan miRNA'ların (a) ve bunların hedef genlerinin (b) kantitatif analizi.	56
4.8:	72-saat <i>in vitro</i> çimlendirilmiş <i>A. thaliana</i> fidelerinin kriyoprezervasyon aşamalarında farklılaşmış olarak anlatılan miRNA'ların (a) ve bunların hedef genlerinin (b) kantitatif analizi.	58
4.9:	48-saat (a) ve 72- saat (b) <i>in vitro</i> çimlendirilmiş <i>A. thaliana</i> fidelerinin kriyoprezervasyon aşamalarında farklılaşmış olarak anlatılan soğuk ilişkili genlerin (CBF'ler ve COR'lar) kantitatif analizi.	60
4.10:	48- ve 72-saat <i>in vitro</i> çimlendirilmiş <i>A. thaliana</i> fidelerinin kriyoprezervasyon aşamalarında farklılaşmış olarak anlatılan miRNA'ların (a, b), bunların hedef genlerinin (c, d) ve soğuk-ilişkili genlerin (e, f) qRT-PCR analizlerinin ısı haritası.	61
5.1:	48 saat (a) ve 72 saat (b) çimlenme sonrası kriyoprezerve edilmiş <i>A. thaliana</i> fidelerinde kuraklık, soğuk ve oksidatif stres ile ilişkili miRNA'ların (iç daire), onların seçilmiş hedef genlerin (dış daire) ve soğuk-ilişkili genlerin stres durumunda düzenlenme mekanizmalarının diagramı.	64

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Bitki gelişiminde miRNA'ların rolü.	25
2.2: Stres yanıtı ile ilişkili belirli miRNA'lar.	29
2.3: Tez kapsamında kullanılan miRNA ve hedef genleri.	31
3.1: Doku kültüründe kullanılan bileşenler.	34
3.2: Kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan bileşenler.	35
3.3: Total RNA izolasyonunda kullanılan bileşenler.	35
3.4: cDNA, PCR, qRT-PCR reaksiyonlarında ve agaroz jelin hazırlanıp görüntülenmesinde kullanılan bileşenler.	36
3.5: Tez kapsamında kullanılan cihazlar.	37
3.6: MS besiy ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).	38
3.7: MS + 2 M gliserol + 0.4 M sukroz çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).	41
3.8: PVS2 çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler (200 mL).	41
3.9: MS + 1.2 M sukroz çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).	41
3.10: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit protokolü.	45
3.11: qRT-PCR için reaksiyon hacmi ve konsantrasyonu, PCR koşulu.	46
3.12: Tez kapsamında kullanılan miRNA'lar, hedef genleri ve soğuk-iliskili genlerin primer listesi.	48
4.1: 48 saat ve 72 saat grubuna ait RNA izolatlarının NanoDrop sonuçları.	52

1. GİRİŞ

Canlı hücre, doku, organ ya da organizmaların sıvı azot içerisinde ultra düşük sıcaklıklarda (-196°C) saklanması için olanak veren kriyoprezervasyon ile bitki türleri başarılı bir şekilde korunabilir. Germplazmanın uzun süre saklanabilmesi için önemli bir gereç olarak düşünülen kriyoprezervasyon minimum yer ve bakım gerektirir.

Son 20 yılda, kriyogenik saklama sırasında buz oluşumunun neden olabileceği hücre ölümünü önleyerek camsı yapıya kavuşmasını sağlayan vitrifikasyona dayalı kriyoprezervasyon teknolojileri bitki türlerinin uzun saklanabilmeleri için geliştirilmiştir [Chen et al., 2015]. Bitki vitrifikasyon solüsyonları (PVS) hücrelerin hayatta kalabilmesi için önemli olmasına karşın, aynı zamanda, ozmotik hasar ve dehidratasyon stresi gibi bazı karmaşık streslere de neden olabilmektedir. Kriyobiologların bir hipotezine göre, dondurma ve çözme süreçleri reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretimini artırmakta ve böylelikle hücrelerin redoks durumu değişmekte ve sonunda stres yanıtına yol açmaktadır [Dowling and Simmons 2009]. Oksidatif stres kriyo-hasarında önemli bir faktördür. Vitrifikasyon yoluyla kriyoprezervasyondan sonra bitkilerin geri kazanılma durumu, ROS ile uyarılan oksidatif stres ile negatif ilişkilidir [Chen et al., 2015]. Skyba ve arkadaşları (2011), kriyoprezerve edilen *Hypericum perforatum* gövde uçlarında ROS üretiminin arttığını ve hem gövde uçlarında hem de rejenere olan bitkilerin yapraklarında yüksek miktarda H₂O₂ dönüşümünün olduğunu gözlemişlerdir.

Kriyoprezervasyon sürecinde bazı stres ile ilgili genlerin ve proteinlerin uyarıldığı bilinmektedir [Lin and Thomashow 1992; Basu 2008; Volk et al. 2011; Ren et al. 2013; Chen et al. 2015]. Örneğin, *Arabidopsis* gövde ucunun kriyoprezervasyonu sırasında kriyokoruyucularla uygulamaya cevaben özellikle dehidratasyon yanıtı olarak bazı genler daha fazla ifade edilmektedir [Volk et al., 2011]. Basu, (2008), ozmotik olarak duyarlı genlerin düşük ifadesiyle *los4*'ün bu süreçte uyarıldığını belirlemiştir. Xu (2006), *Arabidopsis*'in kriyoprezervasyonu sırasında bazı kararlı ısı proteinlerinin önemli bir şekilde arttığını ve bu proteinlerdeki artışın PVS2 tarafından uyarıldığını bulmuştur. Ek olarak, buz kristali oluşumu ve büyüme hızını yavaşlatarak pozitif bir etkiye sahip bazı proteinler de bitkilerin kriyoprezervasyonunda keşfedilmiştir. Örneğin, COR15 donmaya karşı değişken soğuk enzimini ve laktat dehidrogenaz enzimini etkili bir şekilde korur ve güçlü bir kriyokoruyucu aktiviteye

sahiptir [Lin and Thomashow 1992]. Antifiriz proteinler (AFP) buz çekirdeğine bağlanarak, buz kristali oluşumunu engeller bu da sitoplazmanın donma noktasını düşürür ve böylece sıfırın altındaki sıcaklıklarda hayatta kalmaya izin verir [Griffith et al., 1992], [Moffatt et al., 2006]. Guo (2007) AFP'lerin longanın (*Dimocarpus longan*) kriyoprezervasyonundan önce düşük sıcaklıklarda önkültürü sırasında uyarıldığını bulmuştur.

Stres yanıtının oluşturulması sırasında bazı genler daha fazla anlatılırken, bazıları ise baskılanır. Bunun sonucu olarak, stres durumunda, stresle uyarılan genlerin ürünü olan proteinler birikir. Çoğu araştırma gen anlatımının transkripsiyonel aktivitesi üzerine yoğunlaşsa da, gelişmekte olan kanıtlar gen ürünlerinin biriktirilmesinde belirli mRNA'ların artışı, translasyonun artmasını, proteinlerin stabilize edilmesini sağlayan, protein aktivitesini değiştiren transkripsiyon sonrası düzenleme mekanizmalarının da görev aldığını ortaya koymaktadır. Ancak bununla beraber bitkilerin stres koşullarına uyum sağlamalarında rol oynayan transkripsiyon sonrası görev alan mikroRNA'lar (miRNA) ile kriyoprezervasyon sürecinde bitkilerin maruz kaldığı soğuk, kuraklık ve oksidatif stresler arasındaki ilişki henüz aydınlatılamamıştır.

21-22 nt uzunluğunda kodlama yapmayan küçük endojen RNA'lar olan miRNA'lar bitki gelişiminde, sinyal iletiminde, protein degradasyonunda, organ farklılaşmasında, hücre bölünme yapılarında, kendi biyogenezlerinin düzenlenmesinde, biyotik ve abiyotik strese yanıt gibi pek çok gelişim sürecinde merkez rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin negatif düzenlenmesinde kritik rol oynarlar.

miRNA'ların anlatım düzeylerinin analiz edilmesi, bitkilerin gelişim süreçlerini daha iyi anlayabilmenin yanında kuraklık, soğuk ve oksidatif stres gibi abiyotik stres durumlarında aktif olan miRNA'ların ve onların hedef genlerinin birbirleri ile ilişkisini aydınlatmak için de önemlidir. Bu ilişkinin belirlenmesi kriyoprezervasyon gibi bitki biyoteknolojisinin uygulama alanlarının daha etkili kullanılabilmesini sağlayacaktır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Kriyoprezervasyon birçok bitkide başarıyla uygulanmakla birlikte halen daha bazı bitkilerde kriyoprezervasyon sonrası canlılık yüzdesi düşüktür [Akdemir vd., 2013], [Koc vd., 2013]. Kriyoprezervasyon sonrası canlılığı artırabilmek için öncelikle kriyoprezervasyon sürecinde donma öncesi ve sonrasında etkili olan stresleri ve bu streslere karşı verilecek yanıtı etkileyen faktörleri belirlemek gerekmektedir. Güncel çalışmalar kriyoprezervasyon başarısını en çok etkileyen faktörün, bitkilerin dondurma süreci boyunca maruz kaldıkları oksidatif stres olduğunu ortaya çıkarmışlardır [Chen et al., 2015]. Ancak, stres koşullarında aktif olan ve bu nedenle kriyoprezervasyon sonrası canlılıkta etkili olabilecek miRNA'ların rolü bitkilerde daha önce belirlenmemiştir.

Bu nedenle, tez kapsamında:

- model bitki *Arabidopsis thaliana* kullanılarak ultra düşük sıcaklıklarda bitkilerin hayatta kalabilmesi için gerekli olan fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler süreçlerde miRNA'ların dolaylı rolünün ortaya çıkartılması,
- bu miRNA'ların kendi hedef genleri ile ilişkisinin irdelenmesi,
- seçilen hedef genlerin ise stres-ilişkili yollardaki genler ile etkileşimlerinin gözlemlenmesi,
- ve tüm çalışma sonunda kriyoprezervasyon sırası ve sonrasında miRNA'lar, hedef genleri ve ilişkili genlerin anlatım değişimlerini ifade eden bir ısı haritası oluşturularak çalışılan miRNA'ların rolünün özetlenmesi,

amaçlanmıştır.

Bu tez; kuraklık, soğuk ve oksidatif stres tarafından indüklendiği bilinen miRNA'ların (miR156, miR159, miR169, miR172, miR319, miR393, miR394, miR397, miR398 and miR408) ve onların hedef genlerinin SPL10 (squamosa promoter binding protein-like 10; squamosa promoteri bağlayıcı protein benzeri), TCP4 (TCP family transcription factor 4; TCP4 ailesi transkripsiyon faktörü), TIR1 (transport inhibitor response 1, taşıma inhibitörü yanıtı 1), HOS1 (high expression of osmotically responsive gene 1, ozmotik olarak duyarlı genin yüksek anlatımı 1), LAC4 (laccase 4, lakkaz 4), CSD1 (copper/zinc superoxide dismutase 1, bakır/çinko

süperoksit dismutaz 1), LCR (leaf curling responsiveness,yaprak kırılmasına duyarlılık), LAC3 (laccase 3, lakkaz 3) ve PLANTACYANIN ve soğuk-ilişkili yolaklarındaki genlerin [CBF1 ve CBF3 (C-repeat binding factor, C-tekrar bağlanma faktörü), COR15 ve COR47 (cold-responsive genes, soğuk-duyarlı genler)] *Arabidopsis thaliana*'nın kriyoprezervasyonu sırası ve sonrasındaki anlatım profillerini saptamaya odaklanmıştır.

Tez kapsamında, miRNA'lar ile soğuk ve oksidatif stres ilişkili genlerin anlatım düzeylerindeki değişimler incelenerek gelecekte, başarılı kriyoprezervasyon protokollerinin geliştirilmesine önemli bir katkıda bulunacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon tohum, zigotik embriyo, gövde ucu, nodal tomurcuklar, hücre ve kallus kültürleri, somatik embriyolar gibi çeşitli bitki materyallerinin metabolik aktivenin durduğu çok düşük sıcaklıklarda (-196 °C) sıvı azot (SA) içerisinde uzun süreli saklanmasıdır [Helliott and de Boucaud, 1997], [Engelmann, 2004]. Kriyoprezervasyon bitki genomunun uzun süreli depolanması için en güvenilir araç olarak tanımlanmaktadır [Sakai and Engelmann, 2007]. Kriyoprezervasyon süresince, hücre bölünmesi, metabolik ve biyokimyasal süreçler askıya alınmakta [Niino et al., 1992], [Niino et al., 1995] ve teorik olarak hücreler sınırsız bir süre özelliklerini değiştirmeden korunmaktadır [Niino et al., 1995], [Paul et al., 2000]. Ayrıca, kriyoprezervasyon saklanan germplazmaların fenotipik ve genotipik özelliklerinin maksimum kararlılığını sağlamaktadır [Ashmore, 1997].

Kriyoprezervasyon, laboratuvar ortamında muhafazası mümkün olmayan mutant, ya da transforme hücre hatlarının da kayıplarını önlemek amacıyla dondurularak saklanmasına imkân sağlar ve bunlar koleksiyon olarak tutulabilir [Ericsson et al., 2006].

Armut, elma, dut, narenciye, süs bitkileri ve otsu bitkiler de dahil olmak üzere birçok bitki türü başarılı bir şekilde SA'da muhafaza edilmiştir [Niino et al., 1992], [Mycock et al., 1995]. Herhangi bir kriyoprezervasyon protokolünün başarılı gelişimi için en önemli unsur donma için kullanılan eksplantlarda optimal fizyolojik durumun seçimi [Wu et al., 1999], [Zhao et al., 1999] ve dondurulma-çözdürülme sırasında hücre içi buz kristallerinin oluşumunun önlenmesidir.

Kriyoprezervasyonun diğer birçok koruma yöntemine göre basit ve uygulanabilir olmasının yanında geniş bir genotip yelpazesine uygulanabilirliği açısından her zaman avantajlı olduğu bildirilmiştir [Paunescu, 2009]. Ayrıca, kriyojenik saklama, kontaminasyon riskleri içermez ve bakım gereksinimlerini en aza indirecek şekilde küçük bir hacimde uygulanmaktadır [Younis, 2012]. Dolayısıyla kriyoprezervasyon genellikle uzun süreli koruma için güvenli ve uygun maliyetli olarak kabul edilir.

Dondurulma ve çözündürülme sırasında hücre içi suyun yaratacağı buz kristalinin oluşumu, kriyoprezervasyona maruz kalan hücrelerin hayatta kalmasını etkileyen ana faktör olarak kabul edildiğinden, başarılı bir kriyoprezervasyon protokolündeki temel amaç, öldürücü buz oluşumunu önlemek için donma potansiyeli olan tüm hücre içi suyun fiziksel veya ozmotik dehidratasyon kullanılarak dokulardan uzaklaştırılması ve bunu takiben hızlı bir dondurma işlemi gerektirir [Reed et al., 2004]. Sonuç olarak; suyun uzaklaştırılması, donma hasarının önlenmesi ve çözülme sonrası canlılığın muhafaza edilmesi için çok önemlidir [Gonzalez-Arno and Engelmann, 2006]. Bu; soğuğa alıştırma, ABA'ya (absisik asit) maruz bırakma ve/veya yoğun şeker çözeltilerine daldırma gibi çeşitli ön muameleler ile sağlanabilmektedir [Ashmore, 1997], [Shibli et al., 1999], [Shibli, 2000].

Türlerin hatta genotiplerin çoğuna uygun olan tek bir protokol ya da yöntem olmadığı için [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], bitki germplazmalarının korunması için birçok kriyoprezervasyon teknikleri geliştirilmiştir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997], [Engelmann et al., 1997]. İlk protokol, doku ön muamelesi ve doku dehidratasyonu için kontrollü bir hızda yavaş bir şekilde soğutma ve bunu takiben SA'ya daldırmayı içeren klasik iki adımlı dondurma tekniğidir [Ashmore, 1997]. Bu yöntemde, kriyoprezerve edilecek eksplantlar ince uzun tüplere ya da kriyotüplere alınır ve kriyokoruyucularla muamele edilir [Matsumoto, 2017]. Akabinde -7°C'ta buzda inkübe edilir ve dehidratasyon için programlanabilir bir dondurucu kullanılarak dakikada 0,3 – 0,5°C azaltılarak -40°C'a kadar dondurulur ve daha sonra SA'ya daldırılır [Kumu et al., 1983]. Donma oranının ve ön donma sıcaklığının ayarlanması, kalan hücre içi su miktarının değişmesine izin vermekte ve böylece suyun kristalleşmesine neden olan zararı azaltmaktadır [Villalobos and Engelmann, 1995]. Ancak, bu teknik zaman alıcı ve karmaşık olmasının yanı sıra istenilen hassas soğutma sıcaklığını sağlayan görece pahalı bir soğutucu cihaz gerekmektedir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Bu amaçla günümüzde yavaş soğutma sırasında sıcaklığı dakikada 1°C azaltılmayı sağlayan Thermo Scientific Mr Frosty™ donma kabı kullanılarak bitki eksplantlarının mekanik dondurulması sağlanmaktadır. Çoğunlukla, yavaş soğutma aşamasında hücreyi öldürebilecek buz oluşumu da gerçekleşebilmekte ve bu nedenle ilgili teknik düşük hayatta kalma oranı sağlamaktadır [Sakai vd., 1990], [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997].

Son yıllarda doğrudan ve tek aşamalı dondurma teknikleri geliştirilmiştir [Touchell et al., 1994], [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997], [Swan et al., 1999]. Bu teknikler arasında enkapsülasyon-dehidratasyon [Fabre and Dereuddre, 1990], vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon, damlacık vitrifikasyon, alüminyum kriyo-plaka [Matsumoto, 2017] ve vakum infiltrasyon vitrifikasyon (VIV) [Nadarajan and Pritchard, 2014] yer almaktadır. Bu yöntemlerin hepsinde, ön aşamaları takiben doğrudan azota aktarma ile sağlanan hızlı bir dondurma kullanılmakta [Lipavska and Vreugdenhil, 1996] ve böylece, zararlı hücre içi buz oluşumu önlenmektedir [Ashmore, 1997].

Birçok kriyoprezervasyon protokolü olmasına karşın, son 20 yılda en çok tercih edilen yöntem, kriyojenik depolama sırasında hücre içinde ölümcül buz kristallerinin oluşumunu önleyerek camsı durumuna geçişi sağlayan vitrifikasyon yöntemidir. Bu amaçla, bitki genetik kaynaklarının uzun süreli korunması için, kriyokoruyucu ajanlar (CPA) olarak çeşitli bitki vitrifikasyon çözeltileri (PVS'ler; PVS1 [Uragami et al. 1989], PVS2 [Sakai et al. 1990] ve PVS3 [Nishizawa et al. 1993]) geliştirilmiştir [Reed 2008].

Kriyoprezervasyon süreci; (i) soğuğa alıştırma, (ii) osmotik olarak aktif bileşiklerden oluşan besli ortamında ön kültürleme, (iii) kriyokoruyucu maddelerle muamele, (iv) SA'da saklama, (v) çözme ve çözme sonrası muameleleri içeren birçok adımdan oluşmakta [Moges et al., 2003] ve her adım kriyoprezervasyonun başarısını etkilemektedir [Razdan and Cockling, 1997].

- Soğuğa Alıştırma

Kriyoprezervasyon denemelerinde kullanılmak için bitkiler, önce soğuğa alıştırma aşamasında, farklı bitki türlerine göre değişmekle birlikte, 10 °C ya da daha düşük sıcaklıklarda, birkaç hafta bekletilmektedir [Ozudogru vd., 2010]. Örneğin; krizanteme ait nodal segmentler 10°C'ta ve 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda 3 hafta [Martin and Gonzalez-Benito, 2005], alev ağacının gövde kültürü 4°C'ta karanlık ortamda 2-3 hafta [Ozden Tokatli ve Akdemir., 2010], *in vitro* büyütülen yılan otu bitkileri 5°C'ta 50 güne kadar 26 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda [Tanaka et al., 2004] ve at kestanesi bitkisinin embriyonik kallusu 4°C'ta karanlık ortamda 5 gün [Lambardi et al., 2005] tutularak, kriyoprezervasyon öncesi soğuğa alıştırılmıştır.

- Ön Kültürleme

Bitki materyalinin donma toleransı, SA'ya maruz kalmadan önce yüksek ozmotik ajanlar eklenen besi ortamında ön kültürleme ile arttırılabilmektedir [Scottez et al., 1996]. Genellikle ön kültürlenip SA'da saklanan bitki materyalleri, ön kültürlenmeyenlere göre çözme işleminden sonra daha yüksek hayatta kalma oranı göstermektedirler [Scottez et al., 1996]. Ön kültürleme, ozmotik etkiye sahip olan ya da donma stresinden hücre zarlarını, proteinleri ve enzimatik bağlanma yerlerini koruyan sukroz, sorbitol veya mannitol gibi ozmotik ajanların eklendiği besi ortamlarında biyolojik materyalin kültürlenmesini içermektedir [Villalobos and Engelmann, 1995]. Ozmotik ajanların derişimi ve onlara maruz kalma süreleri bitki türlerine ve bitkiden alınan eksplantın çeşidine bağlı olarak değişmektedir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Sukrozun kullanıldığı ön kültürleme, SA'da gövde uçlarının hem dehidratasyona hem de donma stresine direncinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır [Swan et al., 1998]. Swan ve arkadaşları (1998), enkapsülasyon-dehidratasyon yöntemi ile yaptıkları kriyoprezervasyon çalışmasında SA öncesi sukroz ile ön kültürlemenin, gövde uçlarının dehidratasyona ve donma stresine karşı daha fazla dirençli olmasını sağladığını rapor etmişlerdir. Bazı bitkiler tarafından birincil fotosentetik ürün olarak üretilen ve metabolize edilebilen bir şeker alkolü olan mannitol de osmotik ajan olarak kullanılabilmektedir [Swan et al., 1999], [Tahtamouni and Shibli, 1999], [Moges et al., 2003]. Bir başka şeker alkolü olan sorbitol ise gövde gelişimini engellemektedir [Gnanapragasam and Vasil, 1992], [Moges et al., 2003].

- Kriyokoruyucu Maddelerle Muamele

Bitki materyalleri SA'da dondurulmadan önce kriyokoruma için dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol, polietilen glikol (PEG), etilen glikol (EG), amino asitler ve şekerler gibi çeşitli kriyokoruyucu maddelere maruz bırakılmaktadırlar [Ashmore, 1997], [Shibli et al., 2001]. Bazı istisnai durumlarda tek bir kriyokoruyucu DMSO etkilidir. Ancak, DMSO, gliserol ve sukroz, prolin, mannitol ya da sorbitol gibi üçüncü bir bileşikten oluşan bir kriyokoruyucu karışımı genellikle çok daha etkilidir [Withers, 1991]. Kriyokoruyucular uygun derişimlerde kullanılmalı ve hücrelere toksik olmamalıdır [Withers, 1991], [Moges et al., 2003]. Kriyokoruyucular hücre içi buz kristali oluşumunu azaltma için hücrenin donma davranışını değiştirerek camsı yapıya kavuşturmakta (vitrifikasyon) ve hücre içeriğinin donma noktasını düşürmektedir.

Böylece hücre içeriği ve zarının ultra düşük sıcaklara dayanıklı olması sağlanmaktadır [Dumet et al., 1993].

- SA'da Saklama

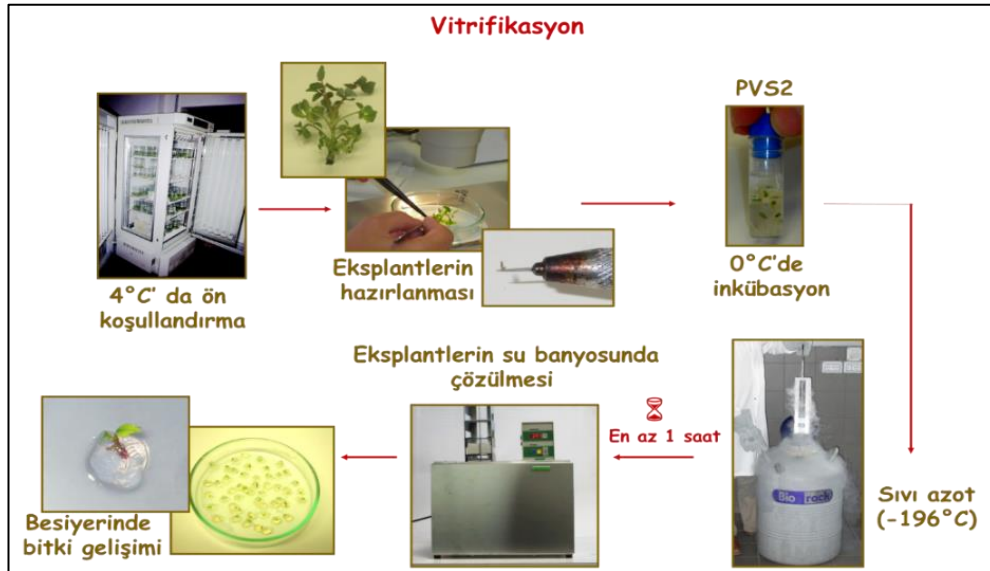
SA'da saklama süresinin kriyoprezerve edilen bitki materyallerinin tekrar rejenere olmasına etkisi kritik değildir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Bitki materyalleri SA içerisine daldırıldıklarında, hücre içerisinde hiçbir biyokimyasal ya da biyofiziksel olay meydana gelmemektedir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997].

- Çözme ve Çözme Sonrası Muameleler

Çözme işlemi, kristallenme veya yaklaşık 40°C steril suda çalkalama ile oluşabilecek herhangi bir buz zararı riskini önlemek için hızlı bir şekilde yapılmalıdır [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Çözme, hem oda sıcaklığındaki laminar hava akımlı bir kabin içerisinde [Gonzalez-Arno et al., 1993], [Al-Ababneh et al., 2003] hem de su banyosunda yapılabilmektedir [Ashmore, 1997]. Çözme işleminden sonra çözünen materyali, dehidratasyon ve büzülme nedeniyle hücre zarı yüzeyinin kaybından dolayı herhangi bir deplazmolitik yaralanmayı önlemek ve kriyokoruyucuların etkisini ortadan kaldırmak için birçok kez yıkamak gerekmektedir [Shibli et al., 2006].

Vitrifikasyon yöntemi ise, öncelikle hayvan hücrelerinin kriyoprezervasyonu için kullanılmış [Fahy et al., 1987], daha sonra % 30 gliserol, % 15 etilen glikol, % 15 dimetilsülfoksit (DMSO) ve 0.4 M sukroz içeren bitki vitrifikasyon çözeltisi 2 (Plant vitrification solution2, PVS2)'nin geliştirilmesi [Sakai et al., 1990] ile bitki hücrelerinin kriyoprezervasyonunda da kullanılmaya başlanmıştır. PVS2; hücre, doku ya da organlarda hem hücre içi hem de hücre dışında kayda değer bir buz oluşumu olmadan sıcaklık geçişlerinde bitkinin yavaşça soğutulmasını sağlayan kriyokoruyucu bir çözeltidir [Moges et al., 2003]. Bu yöntemlerde dondurma işlemi son derece basit olduğundan, programlanabilir bir dondurucu gerekli değildir ve kriyoprezervasyon basit bir ekipman kullanılarak sağlanabilmektedir. Buna ek olarak, klasik yaklaşımların kullanımı ile karşılaştırıldığında daha büyük organlar daha hızlı bir şekilde kriyoprezerve edilebilmektedir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997].

Vitrifikasyon kriyogenik saklama sırasında buz oluşumunun neden olabileceği hücre ölümünü önleyerek camsı yapıya kavuşmasını sağlar. Vitrifikasyon prosedürleri biyolojik materyalin geri kazanımını sağlamak amacıyla genel olarak, ozmokoruma, vitrifikasyon çözeltileri ile dehidratasyon, hızlı dondurma, hızlı çözme, vitrifikasyon çözeltilerinin dilüsyonu aşamalarını içerir (Şekil 2.1), [Ekinci ve Özden-Çiftçi, 2019]. Ozmokoruma hücre ozmolaritesini yükseltir ve vitrifikasyon çözeltilerinden doğan ozmotik hasarı düşürür. Dehidratasyon ise hızlı soğutma sırasında öldürücü buz oluşumunu önler [Sakai et al., 2008]. Volk ve Walters (2006) vitrifikasyon çözeltilerinin üç önemli fonksiyonu olduğunu açıklamıştır. (i) hücresel suyu değiştirmek, (ii) hücrede kalan suyun donma davranışını değiştirmek ve (iii) fazla su kaybını engellemek.



Şekil 2.1: Vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyon aşamaları.

Kriyoprezervasyonun amacı yalnızca bitki materyalini korumak değil aynı zamanda korunan türlerde genetik bir değişim olmamasını (genetik olarak kararlı) da sağlamaktır. Eksplantların kriyojenik olarak korunduğu kriyoprezervasyon sürecinde, tüm metabolik aktiviteler teorik olarak durmaktadır. Bu nedenle, bitki materyalinin kriyoprezervasyon sonrası canlılığını durduğu yerden devam ettirmesi beklenmektedir [Panis et al., 2002], [Kaczmarczyk et al., 2012]. Sonuç olarak, başarılı bir kriyoprezervasyon ancak, kriyoprezervasyondan sonra genetik kararlılığın değişmemesi durumunda elde edilir [Zarghami et al., 2008]. Bununla birlikte, kriyoprezervasyon protokollerinde; kriyoprezerve edilen eksplantlar ön kültür,

kriyokoruma, dehidratasyon, SA'ya hızlı daldırma, çözülme, geri kazanım ve bitki rejenerasyonu sırasında bir dizi potansiyel stres yaratabilecek durumlara maruz kalmaktadır [Reed, 2008]. Bu yüzden, kriyoprezerve edilmiş bitkilerde genetik değişiklik meydana gelme olasılığı araştırmacılar için büyük bir endişe kaynağı olmuştur. Birçok kriyobiyolog, kriyoprezerve edilmiş ve geri kazanılmış rejenere bitki dokularındaki genetik değişikliklerin önlenmesine yönelik çalışmalara odaklanmışlardır [Fukai and Oe, 1990], [Dixit-Sharama et al., 2005], [Urbanova et al., 2006], [Skyba et al., 2010], [Vasanth and Vivier, 2011]. Bunlar arasında ilk ve en kapsamlı çalışma Harding (2004) tarafından yapılmış ve kriyoprezerve edilen germplazmadaki kararlılığı değerlendirmek için kullanılan yöntemleri şöyle özetlenmiştir:

- Fenotipik değerlendirmeler: kısa ve uzun süreli geri kazanımın aşamalarında görsel değerlendirmeler
- Morfolojik değerlendirmeler: *in vitro* özellikler (farklılaşma, adventif sürgün gelişimi), meristematik kimeralar, rejenere bitkilerde üreme ve vejetatif gelişimi.
- Biyometrik çalışmalar: bitki gelişiminin farklı aşamaları için PCA (Principal component analysis, temel bileşen analizleri) kullanılarak yapılan karşılaştırmalı çalışmalar.
- Histolojik ve sitolojik analizler: doku bütünlüğü, kromozom kararlılığı, ploidi durumu.
- Biyokimyasal ve metabolit analizleri: sekonder metabolitlerin üretimi.
- Protein, enzim analizleri: izoenzim profilleri, proteomik teknolojileri, 2D elektroforezi.
- Moleküler genetik analizler: genom yapısı, DNA-DNA hibridizasyonu, PCR tabanlı teknikler: RAPD (Random amplified polymorphic DNA; Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), SSR (Simple sequence repeat, Basit tekrarlı diziler), AFLP (Amplified Fragment length polimorfizm; Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) analizi ve transgenlerin kararlılığı.
- Epigenetik değerlendirmeler: (Mendel olmayan kalıtım) kromatin analizleri, DNA-metilasyon, metilasyona özgü PCR.

Bugüne kadar, kriyoprezerve edilmiş germplazmaların ve kriyobankalardan rejenere edilen bitkilerin genetik olarak kararlı olduklarına dair bir görüş birliği olmasının yanında, farklı türlere uygulanan çeşitli teknikler kullanarak kararlılığı doğrulayan çok sayıda çalışma mevcuttur [Benson et al., 2011a]. Hirai and Sakai (2001) kriyoprezervasyon sonrası örnekler arasında morfolojik olarak önemli bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Kriyoprezerve edilip geri kazanılan tıbbi bitkilerin sekonder metabolit içeriği biyokimyasal bir yaklaşımla analiz edildiğinde, kriyoprezervasyon sonrasında geri kazanılan örnekler ile kontrol örneklerinin sekonder metabolit içeriği aynı bulunmuştur [Yoshimatsu et al., 1996]. Fenotip ve karyotip analizi enkapsülasyon-dehidratasyon ile kriyoprezerve edilen *Cyrtopodium hatschbachii*'de kararlılığı göstermiştir [Surenciski et al., 2007]. Enkapsülasyon-dehidratasyon yöntemi kullanılarak kriyoprezerve edilen *Solanum spp.*'de ploidi durumu korunmuştur [Ward et al., 1993], [Benson et al., 1996a].

Bitkilerin genetik kararlılığının değerlendirilmesi için birtakım moleküler belirteçler de kullanılmıştır (Harding, 2004). Bu alanda kullanılan en popüler belirteçler RAPD ve AFLP'dir [Mikula et al., 2011]. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda birden fazla moleküler markör kullanılmıştır, örn. *Carica papaya* için RAF (Random amplified DNA fingerprint, Rastgele amplifiye DNA parmak izi) ve AMP (Amplified DNA methylation polymorphism, Amplifiye DNA metilasyon polimorfizmi) yöntemleri [Kaity et al., 2008], [Kaity et al., 2009], *Quercus suber* L. için SSR [Fernandes et al., 2008] ve *Malus pumila* ve *Fragaria gracilis* için AFLP ve MSAP (Methylation sensitive amplified polymorphism, Metilasyona duyarlı amplifiye polimorfizm) yöntemleri kullanılmıştır [Hao et al., 2001], [Hao et al., 2002a].

Enkapsülasyon-dehidratasyon kullanılarak dondurulmuş *Melia azedarach*'ın stabil RAPD profilleri [Scocchi et al., 2004] ve PVS2 kullanılarak kontrollü yavaş soğutma ile kriyoprezerve edilmiş *Populus tremula* x *Populus tremuloides*'in RAPD profilleri [Jokipii et al., 2004] farklılık göstermemiştir. Enkapsülasyon-dehidratasyon kullanılarak kriyoprezervasyona tabi tutulan *S. tuberosum*'da çekirdek ve kloroplast DNA'sının DNA-DNA hibridizasyonu ve mikrosatellit analizleri dâhil olmak üzere, patates germplazması üzerinde çeşitli moleküler çalışmalar genetik kararlılığı göstermiştir [Harding and Benson, 2000], [Harding and Benson, 2001]. Schäffer-Menuhr ve arkadaşları (1997) damlacık vitrifikasyon kriyoprezerve edilen patates germplazmalarının büyük ölçekte koleksiyonu için RFLP (Restriction fragment length

polymorphism, Restiksiyon fragmentlerinin uzunluk polimorfizmi) tekniği, sitolojik ve fenotipik analizler uygulanarak genetik kararlılığı doğrulamıştır. Kontrollü soğutma ile kriyoprezerve edilmiş germplazmalardan elde edilen maun ağacında da stabil RFLP profilleri gözlenmiştir [Harding et al., 2000]. PVS2 kullanılarak kriyoprezervasyon yapılan *Arachis* germplazması için RAPD markör analizi kararlılığı doğrulamıştır [Gagliardi et al., 2003]. Elma [Liu et al., 2008] ve narenciyede [Hao et al., 2002b] vitrifikasyon tekniği ile yapılan kriyoprezervasyonu takiben gelişen geri kazanım örneklerinde genetik olarak kararlı ISSR ve RAPD profilleri gözlenmiştir.

Bazı çalışmalarda, genetik kararlılığı izleme amacıyla çoklu yaklaşımlar da uygulanmıştır. Bu doğrultuda; PVS2, enkapsülasyon-dehidrasyon veya kontrollü hızda soğutma yöntemleri kullanılarak kriyoprezerve edilmiş olan *Prunus* germplazmından türetilen bitkilerde genetik kararlılığı doğrulamak için fenotipik, sitolojik, RAPD ve AFLP analizleri gerçekleştirilmiştir [Helliott et al., 2002a]. Benzer şekilde, enkapsülasyon-dehidrasyondan sonra geri kazanılan *Dioscorea bulbifera* bitkilerinde kararlı morfolojiler, biyosentez yetenekleri ve RAPD profilleri bulunmuştur [Dixit et al., 2003]. Vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezerve edilmiş germplazmlardan geri kazanılan elma bitkisinde protein, izozim, RAPD ve AFLP profillerinde önemli farklılıklar bulunmamıştır [Liu et al., 2004]. Farklı bir yaklaşımla, PVS2 vitrifikasyon protokolü kullanılarak kriyoprezerve edilmiş transgenik Avrupa kestanenin embriyojenik hatlarında entegre transgenlerin stabilitesi doğrulanmıştır [Corredoira et al., 2007]. Enkapsülasyon-dehidratasyon ve damlacık vitrifikasyon teknikleri kullanılarak kriyoprezerve edilen pistachio gövde uçlarının RAPD analizleri sonucunda yüksek oranda genetik kararlılık olduğu bildirilmiştir [Akdemir vd., 2013]. Damlacık vitrifikasyon tekniğinin kullanıldığı bir başka çalışmada ise alev ağacı gövde uçları kriyoprezerve edilmiş ve geri kazanım sonrası yapılan IRAP (Inter-Retrotransposon amplified polymorphism, Retrotranspozonlar arası çoğaltılmış polimorfizm) ve REMAP (Retrotransposon microsatellite amplified polymorphism, Retrotranspozon mikrosatellit çoğaltılmış polimorfizm) analizleri sonucunda moleküler olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir [Ekinci, 2013]. Wasabi gövde uçları kullanılarak vitrifikasyon yöntemiyle kriyoprezerve edilen ve geri kazanılan bitkilerin genetik kararlılığı, morfolojik, biyokimyasal ve 5 RAPD primeri ile moleküler olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir [Matsumoto et al., 2013].

Kriyoprezervasyon sonrasında kararlılığın değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, *in vitro* olarak kültürlen bitki materyalinin kriyoprezervasyonu sonrasında epigenetik değişikliklerin bazı kanıtları fark edilmiştir [Harding, 2004], [Mikula et al., 2011]. Genetik değişikliklerden farklı olarak; epigenetik modifikasyonlar genellikle DNA metilasyonundaki değişikliklerle karakterize edildiğinden, orijinal DNA dizisi epigenetik modifikasyonlarla değişmez [Boyko and Kovalchuk 2008], [Smulders and Klerk, 2011]. Bu değişikliklerin gen transkripsiyonunu etkileyebilmesine rağmen; epigenetik modifikasyonlar genellikle geçicidir ve bitkiler normal fenotiplerine nispeten kolay geri dönebilirler [Smulders and Klerk, 2011]. Yine de, bazı epigenetik değişiklikler uzun süreli olabilir ve hatta eşeyli üreme sırasında yavrulara miras bırakılabilir [Brettell and Dennis; 1991]. DNA metilasyonu doku kültürü ve kriyoprezervasyon sırasında çevresel koşullardan ve streslerden çok etkilenir. Etkilenme sonucunda bitki canlılığı ve morfogenezini etkilemektedir [Chen et al., 2011]. Son zamanlarda, metilasyon durumunu incelemek için güçlü bir teknik olan MSAP [Peredo et al., 2008], [Rey et al., 2013], bitkilerde metilasyon düzeylerini tespit etmek için uygulanmıştır. *Humulus lupulus* L bitkisinin kriyoprezervasyonu sonrasında RAPD ve AFLP kullanılarak hiçbir genetik değişiklik saptanmamış, ancak MSAP ile metilasyon değişiklikleri saptanmıştır [Peredo et al., 2008]. Bu teknik kriyoprezervasyonun sonrası epigenetik varyasyonu tanımlamak için başka bitkilerde de başarıyla kullanılmıştır [Peredo et al., 2008], [Maki et al., 2015]. Kriyoprezervasyon sonrası epigenetik varyasyonlar farklı bitki türlerinde, *Carica papaya* [Kaity vd., 2008], *Fragaria gracilis* [Hao et al., 2002a], *Citrus sinensis* [Hao et al., 2002b], *Malus pumila* [Hao et al., 2001], *Ribes* [Johnston et al., 2009], *Carica papaya* [Kaity et al., 2008], [Kaity et al., 2009] ve *Prunus dulcis* [Channuntapipat et al., 2003] rapor edilmiştir.

Kriyoprezerve edilmiş germplazmalardan geri kazanılan rejenere bitkilerde, gelişme yetkinliğinde değişme ve/veya genetik kararsızlık ile ilgili raporlar da vardır. Kararsızlık ve/veya değişmiş fenotipik ve genotipik karakterler içeren kriyoprezervasyon uygulamalarına şu örnekler verilebilir: (i) Ultra hızlı dondurulma yöntemi kullanılarak kriyoprezerve edilmiş *S. tuberosum*'da ribozomal RNA geni DNA metilasyonu [Harding 1997], (ii) *Abies cephalonica*'nın DMSO ile muamele edilmiş (kriyoprezerve edilmemiş) embriyogenik kültürlerindeki RAPD profillerinde varyasyon [Aronen et al., 1999], (iii) PVS2 kullanılarak narenciye kriyoprezervasyonunda DNA-metilasyon değişiklikleri [Hao et al., 2002b], (iv)

Enkapsülasyon-dehidrasyon yöntemi ile çilekte [Hao et al., 2002a] ve kontrollü hızlı soğutma tekniği kullanılarak ise maunda kriyoprezervasyon sonrası epigenetik kromatin değişiklikleri [Harding et al., 2000], (v) enkapsülasyon-dehidrasyon kullanılarak kriyoprezerve edilmiş *Dendranthema grandiflora*'nın bir rejenerasyonunda değişmiş bir RAPD profili [Martín and González-Benito, 2005], (vi) kontrollü hızlı soğutma kullanılarak kriyoprezerve edilen beyaz ladinde olası somaklonal varyasyon [DeVerno et al., 1999], (vii) damlacık vitrifikasyonu sonucu elde edilen papaya bitkilerinde RAF ve AMP işaretleyicilerine dayanan genotip bağımlı genetik değişkenlik bildirilmiştir [Kaity et al., 2008].

Kriyoprezerve edilmiş germplazmalardaki kararlılığı değerlendirmek, her çeşit biyolojik örneğin uzun süreli depolanması ve saklanması için yüksek kalite standartlarında uygulamalar geliştirmek, genetik kararsızlık riskini en aza indirmek kritik öneme sahiptir [Stacey, 2004]. Bitki germplazması için, bu zorluklar doku kültüründe bitkilerin somaklonal varyasyon gösterme eğilimi ile karıştırılmaktadır. Bu aynı zamanda stres koşullarına yanıtta epigenetik ve genetik değişiklikler ile daha da artar. Sonuç olarak Harding (2004), rejenere edilmiş kriyoprezerve germplazmalardaki stabiliteyi değerlendirmek için daha sağlam ve pratik yaklaşımlar geliştirme ihtiyacının altını çizerek “kriyobiyonomik” kavramını ortaya çıkarmıştır. Bu kavram, genetik stabilite ile onun muhtemel nedenleri (örn., Kriyojeni ve somaklonal varyasyon) arasındaki ilişkilerin anlaşılmasına ve bunların stabilite ve kaliteyi nasıl etkilediğini açıklamaya odaklanmaktadır [Benson et al., 2011a].

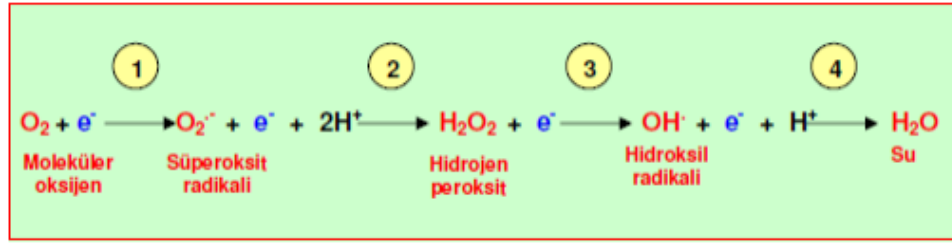
Kriyoprezervasyon protokollerinde bitkiler, ultra düşük sıcaklıklara, dehidratasyona ve PVS2 içeriğindeki DMSO gibi belirli toksik kriyokoruyuculara maruz kalırlar. Tüm bu durumlar bitkilerde, fizyolojik stres ile sonuçlanabilir [Panis and Lambardi, 2005]. Kriyoprezervasyonda sırasında yeterli hücresel dehidratasyonu sağlamak hayati bir adım olan CPA'lar ile maruziyetin süresi kontrol edilmelidir [Kaczmarczyk et al., 2012]. Çünkü, CPA'ların daha fazla nüfuz etmesi hücreleri kriyo hasarından korumak için yararlı olsa da [Meryman 1974], aşırı maruz kalma, hücrelere toksik ve dehidratif olarak hasar verir [Uchendu et al. 2010]. Ayrıca kriyokoruyuculardan kaynaklanan kriyoprezervasyon sürecinde oluşan hasar, serbest radikallerin oluşumuna neden olabilir [Benson and Bremner, 2004]. Su kaybının yarattığı strese benzer şekilde, kriyoprezervasyon öncesi yüksek ozmotik muamelesi ve dehidratasyon süresince meydana gelen stres, süperoksitler (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerini ($OH^\cdot$) gibi reaktif oksijen türevlerinin (ROS)

[Bremner and Benson 2004] oluşumuna yok açacak oksidatif streslere neden olabilir (Mittler 2002). Böylelikle hücrelerin redoks durumu değişir ve sonunda stres yanıtına yol açar [Dowling and Simmons 2009]. Oksidatif stres kriyo-hasarında önemli bir faktördür [Chen et al., 2015].

2.2. Oksidatif Stres

Diğer aerobik organizmalar gibi bitkiler de etkili bir şekilde enerji üretebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Ancak oksijenin varlığı hücresel yapıların ve reaksiyonların sürekli oksidatif bir tehdit altında olmasına da yol açmaktadır [Alscher et al., 1997]. Bitki hücrelerinde oksijenin suya tam olarak indirgenmesi, gerekli enerjinin açığa çıkmasını sağlarken; oksijenin tam olarak indirgenememesi ise oldukça reaktif olan süperoksitler (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerini ($OH\cdot$) gibi ROS'ların oluşumuna neden olmaktadır [Dat et al., 2000]. Kloroplast ve mitokondrilerdeki redoks reaksiyonları sırasında, çeşitli stres faktörleri nedeniyle elektronların asıl alıcı molekül yerine moleküler oksijene (O_2) verilmesi sonucu ROS'lar oluşmaya baslar. Ağır metaller, kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklık, mekanik yaralanma, UV ışık, fotoinhibisyona yol açan yüksek ışık yoğunluğu, patojen infeksiyonu ve hava kirliliği gibi stres faktörlerinin de ROS oluşumuna neden olduğu bilinmektedir [Bray et al., 2000], [Öncel et al., 2000].

Oksijen temel durumunda iken (O_2 , moleküler oksijen, atmosferik oksijen), sahip olduğu paylaşılmamış iki elektronunun paralel spinli olmasından dolayı çok fazla reaktif değildir. Bu nedenle paylaşılmamış elektronları ters spinli olan (antiparalel) bir molekülden, bir elektron çifti alamaz. Çünkü Pauli prensibine göre, ancak ters spinli olan elektronlar bir elektron çifti oluşturabilirler. Bir elektronun spinini ters çevirmek için gereken zaman fazla olduğu için oksijen, başka moleküllere elektron vermek yerine kendisi elektron alma eğilimindedir. Bu durumda moleküler oksijenin indirgenmesi, birbirini takip eden, her basamakta tek bir elektronun oksijen tarafından alınmasını ve farklı ROS'ların oluşumunu sağlayan dört aşamadan ibarettir. Bu olaya “monovalent redüksiyon” adı verilir [Salin, 1987], [Dat et al., 2000], [Edrewa, 2005]. Monovalent oksijen redüksiyonu yoluyla oluşan çeşitli ROS'lar şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2.2: Monovalent oksijen redüksiyonu ve oluşan ROS'lar.

Süperoksit radikali orta derecede reaktif bir moleküldür. Biyolojik membranları geçemez ve hızla hidrojen perokside dönüştürülür. Hem oksidasyon hem de redüksiyon yeteneğine sahip olan süperoksit radikali bazen kendiliğinden de hidrojen perokside dönüştürülebilir. Bir serbest radikal olmayan hidrojen peroksit de süperoksit radikali gibi orta derecede reaktiviteye sahiptir [Vranova et al., 2002]. Hidrojen peroksit demir, bakır ve mangan gibi geçiş metallerinin katalizörlüğünde “Haber-Weiss” veya “Fenton” reaksiyonu yoluyla oldukça reaktif olan hidroksil radikalini oluşturabilir. Hem süperoksit radikalının hem de hidrojen peroksidin canlı hücreler için oluşturduğu asıl tehdit budur.

Hücrelerin normal redoks durumundaki bozukluklar peroksitlerin ve serbest radikallerin üretimi yoluyla toksik etkilere sebep olabilir. Bu serbest radikallerin birçoğu, eşleşmemiş elektron içerirler ve bu nedenle de özgün olmayan bir şekilde komşu moleküllerle reaksiyona girerek, elektron çiftlerinden birini kendine aktarmakta ve radikal oluşumu için zincir reaksiyonu başlatmaktadır [Kaczmarczyk et al., 2012]. Bu reaksiyonlar, protein, lipit ve DNA gibi makromoleküllerde işlev kaybına ya da yapısal değişikliklere neden olabilmektedir [Halliwell and Gutteridge, 2007].

$O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 ve $OH^{\bullet}$ gibi yüksek derecede reaktif ve toksik kimyasal türler olan ROS'ların birikimi ve biyosentezi oksidatif stres ile ilgili metabolizmanın merkezidir [Gill and Tuteja 2010]. ROS'un etkileri dozuna bağlıdır. Düşük düzeylerdeki ROS hücresel fonksiyonları düzenlemede sinyal molekülü olarak hareket eder, ancak yüksek düzeylerde oksidatif strese neden olur [Tatone et al., 2010]. Xu ve arkadaşları (2014), kriyoprezervasyon sırasında ROS oluşumunun *Lilium x siberia* polenlerinin canlılığını iyileştirebildiğini bulmuşlardır. Whitaker ve arkadaşları (2010), aşırı $O_2^{\bullet -}$ oluşumunun kriyoprezervasyonu takiben *Trichilia dregeana*'nın embriyonik akseslerinin düşük hayatta kalma oranından sorumlu olabileceğini bildirmişlerdir. Skyba ve arkadaşları (2011), kriyoprezerve edilen *Hypericum perforatum* gövde

uçlarında ROS üretiminin arttığını ve hem gövde uçlarında hem de rejenere olan bitkilerin yapraklarında yüksek miktarda H_2O_2 dönüşümünün olduğunu gözlemişlerdir.

Membran lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) stres koşulları altında bitkilerde artmakta ve ROS'un fazla üretilmesi ile indüklenmektedir [Alscher et al., 2002]. Fang ve arkadaşları (2008), $OH^\cdot$ ve lipid peroksidasyonu ile indüklenen oksidatif stresin *Theobroma cacao*'nun somatik embriyoların kriyoprezervasyonunda canlılık kaybının ana nedeni olduğunu doğrulamışlardır.

Bitkilerde, ROS'ların toksik etkilerinden korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan etkili bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Antioksidan sistemin enzimatik bileşenleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) ve peroksidaz grubundan olan diğer enzimler sayılabilir. Enzimatik olmayan bileşenler ise askorbik asit (AsA), glutatyon (GSH), α -tokoferol ve karotenoidlerdir [Dat et al., 2000], [Foyer et al., 1995], [Edrewa, 2005], [Gill and Tuteja 2010].

SOD, süperoksit radikalının moleküler oksijen ve hidrojen perokside parçalanmasını sağlayan reaksiyonu katalizleyen bir enzimdir [Bowler et al., 1991]. SOD enzimi, süperoksidin fazla miktarda üretildiği kloroplast, mitokondri ve sitosolde bulunur. Bunun dışında SOD'nin peroksizomal, nuklear ve hücre dışı izoformları da belirlenmiştir [Ogawa et al., 1996]. Oluşan hidrojen peroksit, askorbat-glutatyon döngüsüne girer ve sonuçta su ve oksijene kadar parçalanır. CAT doğrudan H_2O_2 dönüşümünün uyarabilir ve stres durumunda ROS detoksifikasyonu için elzemdir [Ahmad and Sharma, 2008].

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında AsA, enzimatik ve enzimatik olmayan birçok reaksiyonda electron verici özelliğinden ötürü, güçlü bir ROS temizleyicisidir [Gill and Tuteja 2010]. GSH oksidatif stres ile uyarılan ROS'un inhibitör etkisini ortadan kaldırmak amacıyla hücrenin normal indirgenmiş durumunu korumak için gereklidir [Meyer 2008]. GSH aynı zamanda AsA-GSH döngüsüyle oluşturulan antioksidan savunma sisteminde anahtar rol oynar [Foyer and Halliwell 1976].

Dendrobium 'Sonia-28' 'in kriyoprezerve protokorm benzeri yapıları (PLBs), CAT enziminin düşük düzeyinden dolayı aşırı oksidatif strese maruz kaldığından, çözündürme sonrası geri kazanma aşamasında kriyoprezerve PLB'lerin düşük hayatta

kalma oranına sebep olmuştur [Poobathy et al., 2013]. Antioksidan takviyeleri aynı zamanda, kriyoprezervasyondan gelen bazı bitki ve alg hücrelerinin geri kazanımını artırabilir [Benson and Withers 1987], [Fleck et al., 2000]. Dat et al., (2000) ise çeşitli stres faktörlerinin etkisiyle CAT proteini miktarındaki azalmanın, translasyonun inhibisyonundan veya parçalanma hızındaki artıştan kaynaklandığını rapor etmiştir.

Kriyoprezervasyon sürecinde bazı stres ile ilgili genlerin ve proteinlerin uyarıldığı bilinmektedir. *Arabidopsis* gövde ucunun kriyoprezervasyonu sırasında kriyokoruyucularla uygulamaya cevaben özellikle dehidratasyon yanıtı olarak bazı genler daha fazla ifade edilmektedir [Volk et al., 2011]. Basu, (2008), ozmotik olarak duyarlı genlerin düşük ifadesi *los4*'ün bu süreçte uyarıldığını belirlemiştir. Xu (2006), *Arabidopsis*'in kriyoprezervasyonu sırasında bazı kararlı ısı proteinlerinin önemli bir şekilde arttığı ve bu proteinlerdeki artışın PVS2 tarafından uyarıldığını bulmuştur. Ek olarak, buz kristali oluşumu ve büyüme hızını yavaşlatarak pozitif bir etkiye sahip bazı proteinler de bitkilerin kriyoprezervasyonunda keşfedilmiştir. Örneğin, COR15 donmaya karşı değişken soğuk enzimini ve laktat dehidrogenaz enzimini etkili bir şekilde korur ve güçlü bir kriyokoruyucu aktiviteye sahiptir [Lin and Thomashow 1992]. Antifiriz proteinler (AFP) buz çekirdeğine bağlanarak, buz kristali oluşumunu engeller bu da sitoplazmanın donma noktasını düşürür ve böylece sıfırın altındaki sıcaklıklarda hayatta kalmaya izin verir [Griffith et al., 1992], [Moffatt et al., 2006]. Guo (2007), AFP'lerin longanın (*Dimocarpus longan*) kriyoprezervasyonundan önce düşük sıcaklıklarda önkültürü sırasında uyarıldığını bulmuştur. Kriyokoruyucuların kriyoprezervasyon sırasında bitki hücreleri için hem avantajlı hem de dezavantajlı yönleri vardır. Avantajlı özelliklerinin artırılması ve dezavantajlı özelliklerinin azaltılması bitki kriyoprezervasyonunu geliştirmek için öneme sahiptir. Kriyokoruyuculardan kaynaklanan abiyotik stres mekanizmalarının ortaya çıkarılması kriyogenik uygulamalar sonrasında bitkilerin hayatta kalmasını geliştirmeye yardımcı olacaktır ve bu da kriyoprezervasyonun başarısını artırabilir.

Agapanthus praecox'un embriyonik kallusunun kriyoprezervasyonu sürecinde tüm aşamalarında (önkültür, ozmokoruma, PVS2 ile dehidratasyon, geri kazanım) oksidatif strese karşı antioksidan sistemi ile ilişkili genlerin anlatım düzeylerinin irdelendiği çalışmalarda, kriyoprezervasyonun tüm aşamalarında SOD genlerinin anlatımı artarken, CAT genleri ise anlatımlarının azaldığı görülmüştür. APX, GR, MDHAR ve peroksiredoksin genlerinin anlatımına bakıldığında, sadece geri kazanım aşamasında önemli bir anlatım artışı belirlenmiştir. Ancak, GPX geninin anlatım

düzeyi bu aşamada azalmıştır [Zhang et al., 2015]. Bu sonuç geri kazanım boyunca aşırı H_2O_2 'nin gideriminde AsA-GSH döngüsünün önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Arabidopsis'in 48 ve 72 saat çimlendirilen fidelerinin kriyoprezervasyonu sürecinde yapılan benzer bir çalışmada antioksidan sistem ile ilişki 10 genin (Mn-SOD'u kodlayan *MSD*, Cu/Zn SOD'u kodlayan *CSD1* ve *CSD2*, CAT'ı kodlayan *CAT2* ve *CAT3*, DHAR'yi kodlayan *DHAR2*, APX'i kodlayan *APX1*, GR'yi kodlayan *GR1*, POD'u kodlayan *POD3*, GPX'i kodlayan *GPX4*, Ferritin proteinini kodlayan *FER1*'in gen anlatım düzeyleri karşılaştırılmıştır [Chen et al., 2015]. Kriyoprezervasyon sonrası daha fazla canlılık elde edilen 48 saatlik fidelerde *CSD1*, *APX1*, *DHAR1*, *CAT3* ve *MSD* genlerinin anlatımı 72 saatlik fideler ile karşılaştırıldığında artmıştır.

Stres yanıtının oluşturulması sırasında bazı genler daha fazla anlatılırken, diğer bazıları baskılanır. Bunun sonucu olarak, stres durumunda, stresle uyarılan genlerin ürünü olan proteinler birikir. Çoğu araştırma gen anlatımının transkripsiyonel aktivitesi üzerine yoğunlaşsa da, gelişmekte olan kanıtlar gen ürünlerinin biriktirilmesinde belirli mRNA'ların artışı, translasyonun artmasını, proteinlerin stabilize edilmesini sağlayan, protein aktivitesini değiştiren transkripsiyon sonrası düzenleme mekanizmalarının da görev aldığını ortaya koymaktadır.

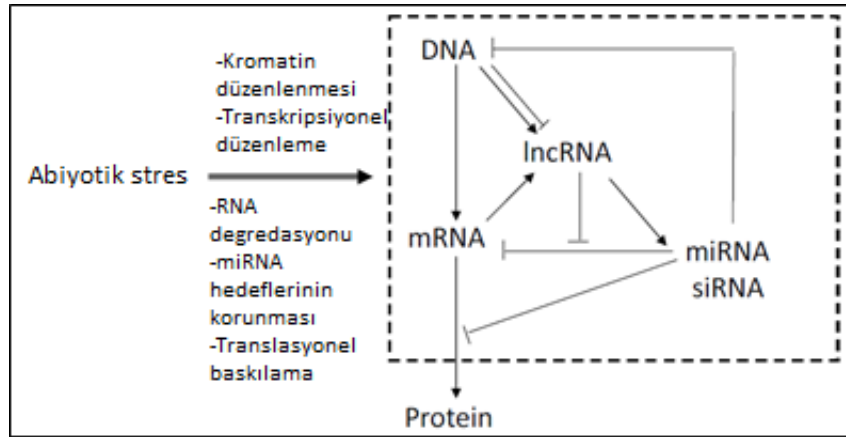
2.3. Transkripsiyon Sonrası Düzenlenme

Bitkilerde transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) ve hayvanlarda RNA susturma, daha bilinen adıyla RNA interferans (RNAi), RNA aracılı dizi spesifik etkileşimler aracılığıyla gen anlatımının kontrolünde kritik bir rol oynar [Voinnet, 2002]. Son 10 yılda, çok sayıda çalışma çevresel stres yanıtlarının modülasyonu ile transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesi ilişkilendirilmiştir.

Gen anlatımının transkripsiyon sonrası düzenlenmesi biyotik ve abiyotik streslere cevap olarak bitki tarafından kullanılan karmaşık gen düzenleyici mekanizmalardan biridir. Küçük-RNA aracılı gen anlatımının düzenlenmesi hücre fonksiyonunun temel ilkelerinden biri olarak ortaya çıkmıştır [Meister, 2013]. Küçük RNA'lar ökaryotik organizmalarda düzenleme süreçlerine rehberlik eden 20-30 nükleotid kodlama yapmayan RNA'lardır [Chen, 2009]. Kendi biyogenezlerine göre 2 tip küçük RNA (short interfering RNA; siRNA ve microRNA; miRNA) iyi bir

şekilde karakterize edilmiştir. Hem miRNA'lar hem de siRNA'lar, RNase III endonukleaz Dicer-benzeri protein tarafından RNA öncü transkriptinin ürünü olmalarına karşın, 21-24 nt siRNA'lar birden fazla siRNA'nın ortaya çıkmasına neden olan uzun çift zincirli RNA'lardan oluşur. 21-22 nt miRNA'lar ise saç-tokası yapısından oluşan tek zincirli RNA öncülerinden türetilir [Axtell and Bowman, 2008]. Bitkilerde siRNA ve miRNA'ların fonksiyonu ve biyogenezi 3 grup protein ailesi tarafından kontrol edilir; RNA-bağımlı RNA polimerazlar (RDRs), Dicer-benzeri (DCLs) ve ARGONAUTES (AGOs) proteinler.

Bu küçük RNA'lar RNA-bağımlı susturma kompleksine (RISC) yüklenir, hedef genlerin anlatımını negatif olarak kontrol eder. Kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNA) kromatin regülasyonu, transkripsiyonel regülasyon, RNA degradasyonu, miRNA hedeflerinin korunması, translasyonel represyon gibi çeşitli düzenleme mekanizmalarında görev alır [Matsui et al., 2013] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Abiyotik strese yanıt olarak ncRNA'ların düzenlenmesi.

2.3.1. miRNA'lar

miRNA'lar bitkiler [Llave et al., 2002], [Park et al., 2002], [Reinhart et al., 2002] ve hayvanlar [Lagos-Quintana et al., 2001], [Lau et al., 2001], [Lee and Ambros, 2001] gibi birçok ökaryotik organizmada bulunan küçük endojen 21-22 nt uzunluğunda kodlama yapmayan RNA'lardır. Bilimsel araştırmacılar protein kodlayan genlerin keşfi ve manipülasyonu üzerine yoğunlaştığından, miRNA'ların varlığı ve önemi 20 yıl öncesine kadar tam olarak bilinmiyordu [Almeida et al., 2011]. İlk miRNA'lar lin-

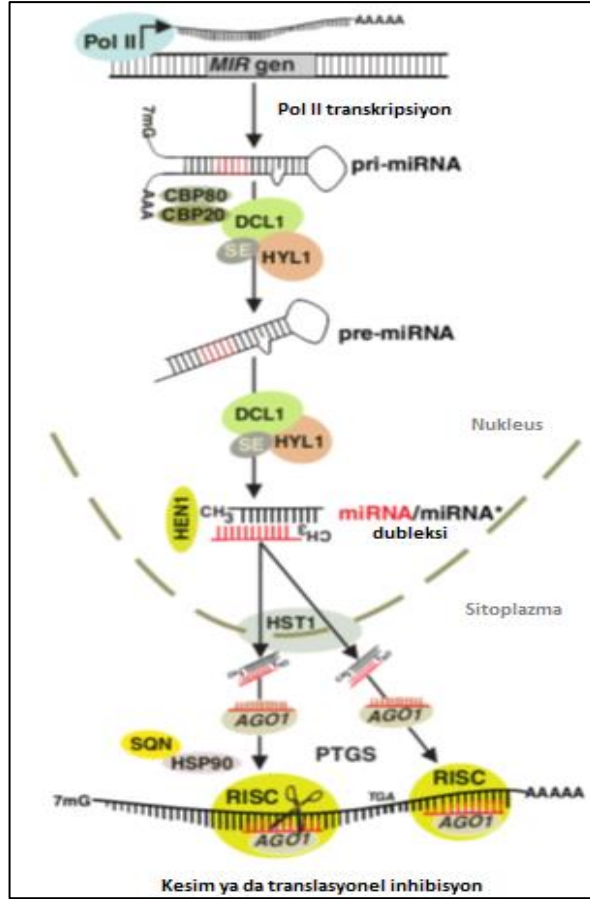
4 ve let-7, *Caenorhabditis elegans*'ta embriyonik gelişim zamanının anahtar düzenleyicisi olarak keşfedildi [Lee et al., 1993].

Bitkilerde, miRNA'lar bitki gelişiminde, sinyal iletiminde, protein degradasyonunda ve kendi biyogenezlerinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynarlar [Shukla et al., 2008], [Zhang et al., 2006b]. miRNA'lar dizi komplementerliğine dayalı olarak mRNA'yı tanıır ve birden çok gen düzenleyici ağlarda negatif düzenleyici olarak fonksiyon gösterir [Bartel, 2009], [Chen, 2009]. Bitkilerde miRNA'ların çoğunluğu; organ farklılaşması, polarizasyon, hücre bölünme yapıları gibi pek çok gelişim sürecinde merkez rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin negatif düzenlenmesi ile bağlantılıdır [Guo et al., 2005], [Mallory et al., 2004], [Sunkar et al., 2012]. Ayrıca kodlama yapmayan bu miRNA'lar hem biyotik hem de abiyotik streslere bitkilerin yanıtında önemli birer elemandırlar [Aung et al., 2006], [Bari et al., 2006], [Chiou et al., 2006].

İlk bitki miRNA'sı *Arabidopsis*'te tanımlanmış [Park et al., 2002] ve daha sonra diğer türler için de miRNA'lar tanımlanmıştır. Günümüzde, 71 bitki türünde toplam 8496 olgun bitki miRNA'sı miRNA kayıt veritabanı miRBase'de depolanmıştır [Griffiths-Jones, 2004], [Kozomara and Griffiths-Jones, 2014].

2.3.1.1. miRNA'ların Biyogenezi

Çoğu metazoa miRNA genleri bağımsız transkripsiyon birimi olarak intergenik bölgede yerleşirler ve birkaçı da kodlama dizilerinin intron bölgelerinde bulunurlar [Monteys et al., 2010], [Tong et al., 2013]. Bitki miRNA genleri ise ağırlıklık olarak intergenik bölgelerde bulunurlar [Voinnet, 2009]. miRNA biyogenezi çok adımlı bir süreçtir (Şekil 2.4., [Khraiwesh et al., 2012]).



Şekil 2.4: miRNA'ların biyogenezi ve fonksiyonu.

miRNA genleri RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir, poly A kuyruğu ve 5' şapka içeren bu transkriptte birincil miRNA transkripti (pri-miRNA) denir [Tang et al., 2008]. Pri-miRNA daha sonra mükemmel olmayan bir şekilde kısmen tamamlayıcı çift zincirli RNA (dsRNA) yapısını geriye doğru katlanarak oluşturur. Transkripsiyonu takiben, pri-miRNA (Hyponasty leaves1 (HYL1), Serrate (SE), ve nükleer cap-bağlanma kompleksi (CBC) yardımıyla) Dicer benzeri (DCL1) tarafından öncü miRNA'ya (pre-miRNA) dönüştürülür. DCL1 bitkilerde Drosha protein olmadığı için nükleusta hem pri-miRNA hem de pre-miRNA'nın işlenmesinden sorumludur [Eldem vd., 2013]. *Arabidopsis* genomu dört farklı DICER-BENZERİ (DCL) proteini kodlar. DCL1 18–21nt, DCL2, DCL3 ve DCL4 ise sırasıyla 22, 24 ve 21 nt uzunluğundaki sRNA'ların biyogenezi ile ilişkilidir [Kurihara and Watanabe, 2004], [Voinnet, 2009].

Pre-miRNA devamında yine çift zincir RNA bağlanma proteini olan Hyponasty leaves1 (HYL1) [Han et al., 2004] ile birlikte DCL1 tarafından işlenir ve olgun bir miRNA::miRNA* dupleksini 3' ucunda iki nükleotidlik çıkıntılar yaparak oluşturur.

Bu çıkıntılar ile 3' uç bir RNA-spesifik metiltransferaz olan HUA ENHANCER1 (HEN1) [Boutet et al., 2003] tarafından metillenerek sRNA degradesi edici nukleazlardan (SDN) korunur [Bartel, 2004], [Yu et al., 2005]. miRNA::miRNA* dubleksi hedef mRNA'ları kodlayan genomik lokusların kromatin modifikasyonda görev almak için nukleusta kalabilir [Axtell and Bowman, 2008], [Qi et al., 2006] ya da nuklear transfer proteini HASTY (HST1) tarafından transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) için sitoplazmaya gönderilir. Sitoplazmada miRNA::miRNA* dubleksi ayrılır ve olgun kılavuz iplik RNA ile uyarılan susturma kompleksi (RISC) olarak adlandırılan efektör kompleksi oluşturmak üzere Argonaute (AGO) proteinleri ile ilişkilendirilir. RISC dizi komplementer olan hedeflerine sRNA'lar tarafından yönlendirilir ve sonucunda hedef mRNA kesilir, translasyon baskılanır [Hannon, 2002]. AGO protein katalitik rezidüleri olan sRNA bağlanma domainleri (PAZ ve PIWI) içerir. Bunlar mRNA transkriptini kesmeye programlanan RISC'e endonukleotik aktivite sağlar [Vaucheret, 2008], [Vaucheret et al., 2004]. *Arabidopsis*'te PTGS için önemli olan AGO1 dahil 10 farklı AGO kodlanır [Baumberger and Baulcombe, 2005].

2.3.1.2. miRNA'ların Bitki Gelişimindeki Rolü

miRNA'lar gelişim sürecinde, fitohormon sinyalizasyonunda, çiçeklenme, cinsiyet belirleme gibi önemli fonksiyonlar ile çok çeşitli metabolik ve biyokimyasal süreçlerde karakterize edilmiştir [Liu and Chen, 2009], [Yang et al., 2007]. *Arabidopsis* kullanarak miRNA'lar ve biyosentezlerindeki bileşenlerin mutasyonlar ile miRNA'ların gelişimi belirlenmiştir. miRNA biyosentezinin temel bir bileşeni olan DCL'de gerçekleşen bir mutasyon embriyogenez sürecindeki kritik önemi dolayısıyla embriyonik ölüme sebep olduğu gözlenmiştir. Benzer bir şekilde *Hen1*, *hyl1* ve *hst* mutantları miRNA birikiminin azaldığı belirlenmiştir [Mallory and Vaucheret, 2006]. Aukerman ve Sakai (2003) miR172b ve onun hedefi TOE1'in aşırı anlatımı *eatD* ve *toeD* mutantlarında sırasıyla erken ve geç çiçeklenmeden sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir. miR164'ün hedef mRNA'ları olan CUC1 ve CUC2'nin fazla birikimine yol açıp erken ekstra petal oluşumuna sebep olan *eep1* mutantı miR164'nin üretiminin bozulmasına yol açmıştır [Baker et al., 2005]. Bitki gelişim süreçlerinde rol alan birçok miRNA Tablo 2.1'de gösterilmiştir [Eldem vd., 2013].

Tablo 2.1: Bitki gelişiminde miRNA'ların rolü.

Bitki	Bitki Organı	miRNA	Hedef Gen	Fonksiyon	Kaynak
<i>Arabidopsis</i>	Kök	miR390	<i>tas3,arf</i>	Kök gelişimi	[Montgomery et al. 2008], [Marin et al. 2010], [Yoon et al. 2010]
<i>Arabidopsis</i>	Kök, yaprak, çiçek, tohum	miR164	<i>nac1, cuc2</i>	Lateral kök oluşumu, yaprak morfolojisi, floral meristem aktivitesi, tohum gelişimi	[Mallory et al. 2004], [Laufs et al. 2004], [Guo et al. 2005], [Nikovics et al. 2006], [Jung et al. 2009]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç, arpa	Kök, tohum	miR160	<i>arf20, arf16</i>	Lateral kök başlangıcı, kök gelişimi	[Mallory et al. 2005], [Sorin et al. 2005], [Xue et al. 2009], [Kantar et al. 2010], [Nodine and Bartel 2010]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç, arpa, <i>Opium poppy</i>	Kök, çiçek	miR171	<i>scl16</i>	Kök ve çiçek gelişimi	[Xue et al. 2009], [Kantar et al. 2010], [Unver et al. 2010b]
<i>Arabidopsis</i>	Yaprak, vasküler sistem, çiçek, tohum	miR156 ve miR166	<i>hd-zip III gen ailesi, phb, phv</i>	Yaprak gelişimi ve morfolojisi, meristem, tohum gelişimi	[Mallory et al. 2004], [Kim et al. 2005], [Williams et al. 2005], [Zhang et al. 2006b]
<i>Antirrhinum majus</i> , <i>Arabidopsis</i>	Yaprak, tohum, çiçek	miR159	<i>cin, tcp, gamyb</i>	Yaprak morfogenezi, tohum gelişimi ve çimlenmesi, çiçeklenme zamanının düzenlenmesi	[Palatnik et al. 2003], [Chen 2005], [Jung et al. 2009]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç, kavak	Yaprak, çiçek, tohum	miR156 ve miR157	<i>sbp box</i>	Yaprak morfogenezi, çiçeklenme zamanının düzenlenmesi, tohum gelişimi	[Rhoades et al. 2002], [Wu and Poethig 2006], [Gandikota et al. 2007], [Wang et al. 2008], [Nodine and Bartel 2010], [Zhao et al. 2010], [Wang et al. 2011a]
<i>Arabidopsis</i>	Yaprak	miR396	<i>grf</i>	Yaprak gelişimi	[Liu et al. 2009], [Rodriguez et al. 2010]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç, mısır	Çiçek	miR172	<i>toe1, toe2, toe3, ids1, gloy15</i>	Çiçeklenme zamanı, vejetatif faz değişimi	[Aukerman and Sakai 2003], [Lauter et al. 2005], [Chuck et al. 2007], [Yang et al. 2007]
<i>Opium poppy</i>	Çiçek	miR169	<i>cbf-b/nf-ya</i>	Çiçeklenme zamanı	[Unver et al. 2010b]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç	Çiçek, kök, tohum	miR167	<i>arf6, arf8</i>	Kök uzaması, stamen gelişimi, tohum gelişimi	[Gutierrez et al. 2009], [Jung et al. 2009], [Xue et al. 2009], [Vidal et al. 2010]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç	Çiçek	miR444	<i>mads-box</i>	Çiçek gelişimi	[Li et al. 2010]
Pirinç	Tohum	miR397 ve miR528	<i>ao</i>	Tohum gelişimi	[Xue et al. 2009]
<i>Arabidopsis</i> , domates	Tohum, yaprak	miR319	<i>tcp4, lanceolata</i>	Tohum gelişimi, yaprak gelişimi ve morfolojisi	[Palatnik et al. 2003], [Jones-Rhoades et al. 2006], [Efroni et al. 2008], [Nodine and Bartel 2010], [Shleizer-Burko et al. 2011]
Soya fasulyesi	Kök	miR1530	<i>tkl</i>	Tohum gelişimi	[Song et al. 2011]

2.3.1.3. miRNA'ların Abiyotik Stres Cevabındaki Rolü

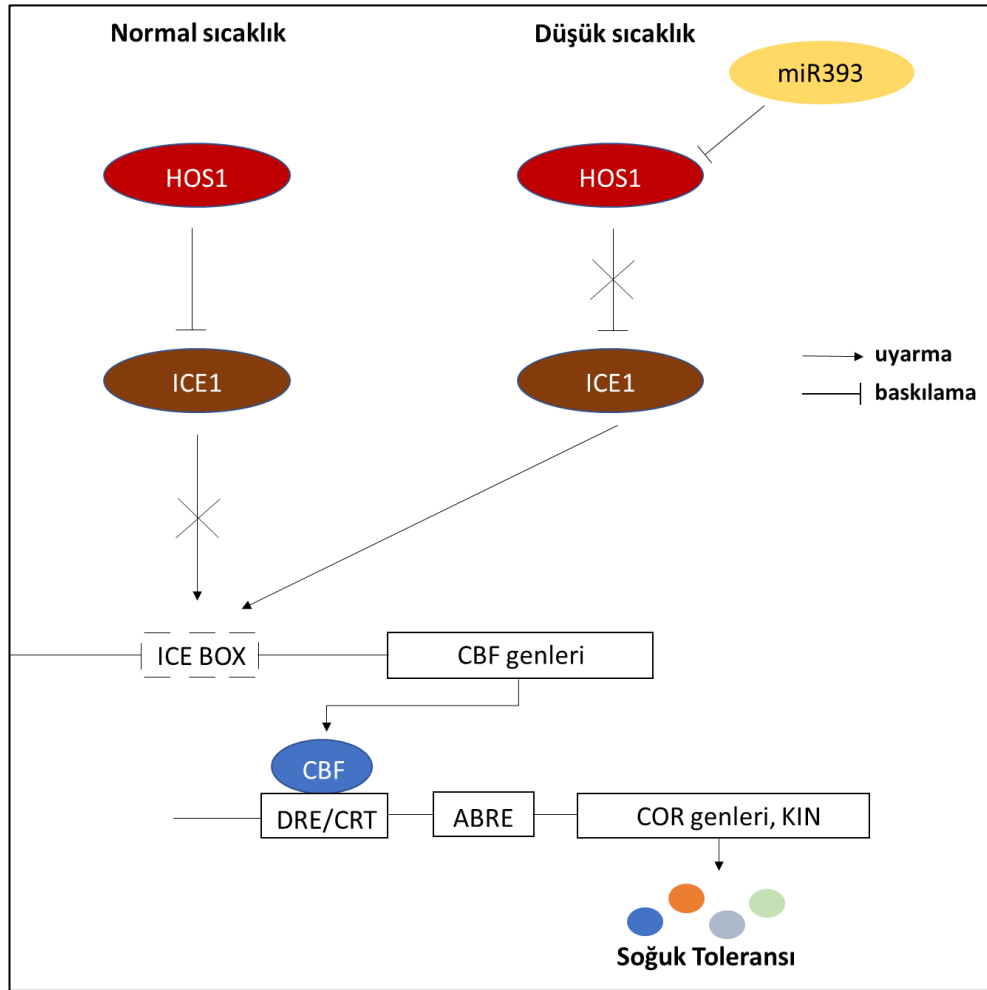
Birçok çalışma abiyotik strese adaptif yanıtta önemli miRNA'ların görev aldığını rapor etmiştir [Shukla et al., 2008], [Sunkar et al., 2006], [Sunkar and Zhu, 2004]. Abiyotik stresler bitkinin stres etmenleri ile başa çıkmak için yeni miRNA'ların sentezinin düzenlenmesine sebep olur. miR395 ve miR399 besin eksikliğinde düzenleyici bir fonksiyon olarak rol oynar. Normal büyüme koşulları altında, miR395 ortaya çıkmaz ama düşük sülfat stresi durumunda uyarılır [Jones-Rhoades and Bartel, 2004]. Benzer bir şekilde, ubiquitin-konjugasyon enzimini (UBC) hedefleyen miR399 düşük fosfat stresi durumunda uyarılır [Chiou et al., 2006], [Fujii et al., 2005]. Sunkar ve Zhu (2004) *Arabidopsis* fidelerini soğuk, kuraklık, tuzluluk, ABA streslerine maruz bıraktığında, miRNA'ların farklı şekilde anlatıldığını belirlemiştir. miR393, miR397b ve miR402 tüm muamelelerde gen anlatımı artırırken, miR389a ise tüm streslerde gen anlatımı azaltmıştır. Pirinçte, miR169 ailesinin bazı miRNA'ları kuraklık ve tuzluluk stresinde uyarılmıştır [Zhao et al., 2009], [Zhao et al., 2007]. miR396 ise yüksek tuzluluk, kuraklık ve soğuk streslerine duyarlıdır [Liu et al., 2008].

miR408'in anlatımını tuzluluk, oksidatif ve soğuk streslerinde indüklendiği, ozmotik ve kuraklık stres koşullarında ise azaldığını göstermiştir [Ma et al., 2015]. *A. thaliana*'da anlatımı değişen bir başka miRNA, kuraklık stresinde anlatımları azalan ve transkripsiyon sonrası düzeyde hedef genleri NFYA5'in düzenlenmesinde çok önemli rol alan miR169a ve miR169c'dir [Li et al., 2008].

miR393, kriyoprezervasyon sırasında potansiyel kriyokoruyucu aktiviteye sahip olan COR15'in [Lin and Thomashow, 1992] ekspresyonunu direkt hedef geni olmamasına rağmen dolaylı bir şekilde etkilediği için ayrıca önem arz etmektedir. miR393 E3 ubiquitin ligaz ve F-box ailesi proteinleri kodlayan transkriptleri hedef alır. Bir E3 ubiquitin ligaz proteini olan HOS1, ICE1'in (Inducer of CBF Expression, CBF anlatımının indükleyicisi) ubiquitinasyonu yoluyla soğuk yanıtı negatif olarak düzenler. ICE1, CBF [CRT (C- terarı) bağlanma faktörü] diğer adıyla da bilinen DREB1 [DRE (Dehidratasyon duyarlı element) bağlanma proteinleri] genlerinin anlatımı, CBF genleri ise COR genlerinin anlatımını düzenleyerek soğuk stresine yanıt oluşması sağlanır. Normal sıcaklıklarda HOS1 tarafından baskılanan ICE1, soğuk stresi durumunda HOS1'in baskılanmasıyla CBF genlerinin promotörü olarak çalışır. CBF

genlerinin ürünü olan CBF proteinleri COR genlerinin anlatımını gerçekleştirir (Şekil 2.5), [Ekinci et al., 2020].

Trasngenik *Arabidopsis* bitkisinde CBF/DREB1 transkripsiyon faktörlerinin aşırı anlatımı kriyokoruyucu aktivitelere sahip çözünenlerin birikmesiyle ve soğuk toleransı ile sonuçlanır [Fowler and Thomashow, 2002].



Şekil 2.5: Soğuk stresi sırasında HOS1 bağımlı CBF ve COR genlerinin anlatımı.

2.3.1.4. miRNA'ların Oksidatif Stres Cevabındaki Rolü

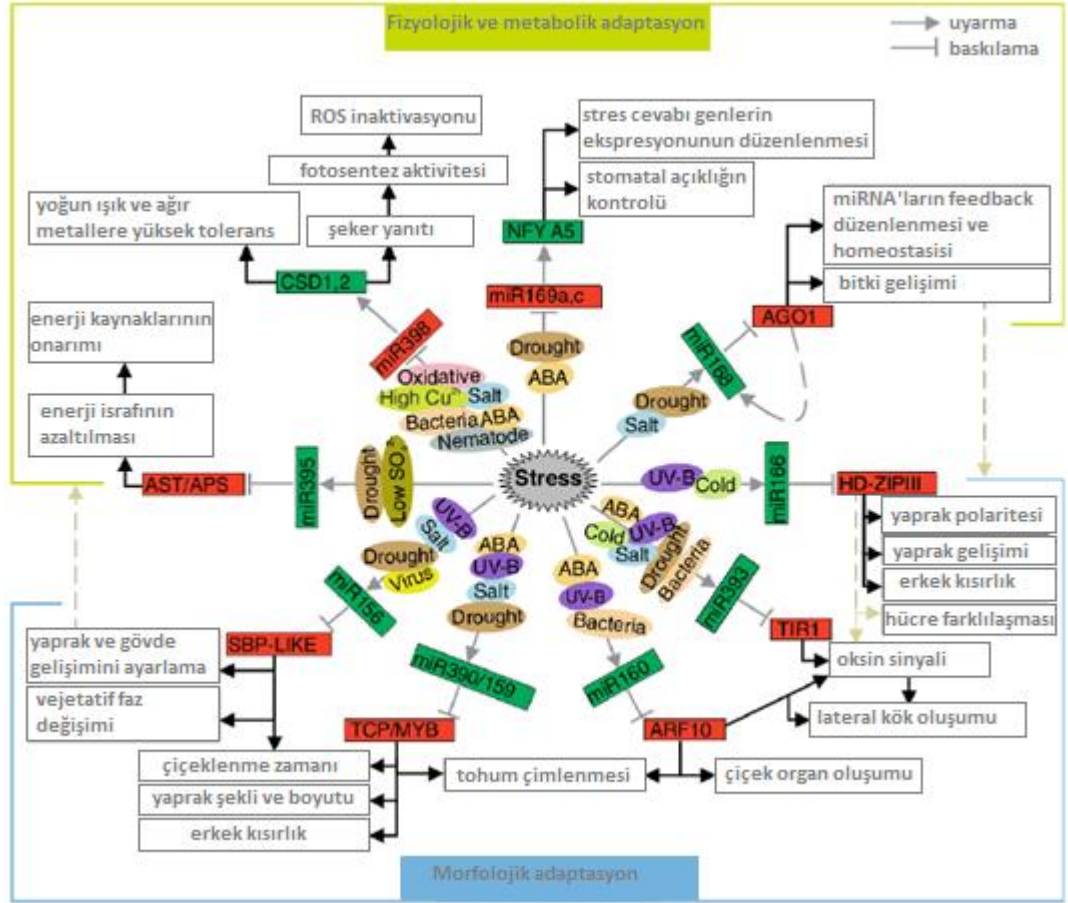
Kloroplast, peroksizom ve mitokondri dahil olmak üzere farklı hücresel organellerde ROS'un artırılmış üretimi kuraklık stresinin kaçınılmaz sonuçlarından biridir [Cruz de Carvalho, 2008]. Yüksek ROS miktarı proteinleri, nükleik asitleri denatüre eder ve membran lipidlerinin preoksidasyonuna yol açar [Schützendübel and Polle, 2002]. Oksidatif stresin etkilerinin üstesinden gelebilmek için, bitkiler öneride

daha önce belirtildiği gibi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları içeren savunma mekanizmaları geliştirmiştir [Mittler, 2002]. Antioksidan enzim yolağında miRNA'lar da düzenleyici olarak rol oynamaktadır [Wei et al., 2009]. Örneğin; fotosentez, ROS giderimi ve etilen algılanması gibi çeşitli bitki işlevleri için bir kofaktör olarak hizmet veren temel mikroelementlerden olan bakıra yüksek maruziyet *Arabidopsis*'te miR398'in anlatımını azaltmıştır.

Optimal büyüme koşulları altında, miR398 orta düzeyde anlatılır ve CSD1, CSD2 ve CCS1 transkriptleri ve/veya proteinleri hassas bir şekilde ayarlanır. Ancak, bakırın fazla olduğu stres koşulları altında, ROS birikimi ve onun detoksifikasyonu miR398 düzeyinin baskılanması yoluyla CSD1 ve CSD2 anlatımının artmasını sağlar ve böylece hücre oksidatif stresten korunur. Bitkilerde farklı stresler ile ilişkili belirli miRNA'lar Tablo 2.2'de ve Şekil 2.6'te sunulmuştur [Eldem vd., 2013], [Khraiwesh et al., 2012].

Tablo 2.2: Stres yanıtı ile ilişkili belirli miRNA'lar.

Bitki	Stres	miRNA	Hedef genler ve proteinler	Kaynak
<i>Arabidopsis</i> , arpa, pirinç, <i>Populus</i>	Kuraklık, tuz, soğuk, fungal patojen	miR156	SBP ailesi transkripsiyon faktörleri	[Liu et al. 2008], [Lu et al. 2008], [Kantar et al. 2010], [Zhou et al. 2010], [Li et al. 2011]
<i>Arabidopsis</i> , soya	Kuraklık, ABA, tuz, bakteriyal patojen	miR159	MYB33 ve MYB101, MYB33 ve MYB65 transk. faktörleri	[Reyes and Chua 2007], [Frazier et al. 2011], [Alonso-Peral et al. 2012]
<i>Populus</i> , mısır, pirinç	Kuraklık, tuz	miR162	<i>dcl</i>	[Zhou et al. 2010], [Li et al. 2011a]
<i>Populus</i>	Mekanik stres	miR164	NAC transkripsiyon faktörleri	[Lu et al. 2008]
<i>Arabidopsis</i> , arpa, soya, buğday, mısır	Tuz, soğuk, kuraklık, sıcak, fungal ve bakteriyal patojen	miR165, miR166	HD-ZIP III TFs, PHABULOSA, <i>homeobox</i> genleri	[Liu et al. 2008], [Zhou et al. 2008], [Lv et al. 2010], [Ding et al. 2009], [Kantar et al. 2010], [Li et al. 2011b], [Zhang et al. 2011a]
<i>Arabidopsis</i> , mısır, pirinç	Kuraklık, tuz, soğuk, besin kıtlığı	miR167	ARF6 ve ARF8 transkripsiyon faktörleri	[Liu et al. 2008], [Li et al. 2010], [Lv et al. 2010], [Zhou et al. 2010], [Frazier et al. 2011], [Zhang et al. 2011a], [Sunkaret al. 2012]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç, <i>Populus</i> , buğday	Kuraklık, soğuk, sıcak, tuz	miR168	<i>ago1</i>	[Liu et al. 2008], [Lu et al. 2008], [Zhou et al. 2010]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç	Kuraklık, tuz, soğuk	miR169	NF altpirim Y, CCAAT-BOX bağlanma Faktörü	[Zhao et al. 2007], [Zhang et al. 2009], [Li et al. 2010], [Frazier et al. 2011]
<i>Arabidopsis</i> , arpa, <i>Populus</i> , pirinç	Kuraklık, mekanik, tuz, soğuk	miR171	SCL transkripsiyon faktörleri	[Reyes et al. 2007], [Liu et al. 2008], [Kantar et al. 2010], [Lv et al. 2010], [Frazier et al. 2011]
<i>Arabidopsis</i> , arpa, <i>Populus</i> , pirinç	Soğuk, kuraklık	miR172	AP2 transkripsiyon faktörü	[Liu et al. 2008], [Zhang et al. 2009], [Frazier et al. 2011]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç	Soğuk, kuraklık, tuz	miR319	TCP ailesi transk. faktörleri	[Liu et al. 2008], [Lv et al. 2010], [Zhang et al. 2011a]
<i>Arabidopsis</i> , <i>Populus</i>	Soğuk, bakteriyal patojen, kuraklık	miR390, miR476	GLUTMATE RESEPTÖR proteinleri	[Liu et al. 2008], [Lu et al. 2008], [Lv et al. 2010], [Zhang et al. 2011a]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç, buğday	Tuz, sıcak, soğuk, ABA, kuraklık, besin kıtlığı ve patojenler	miR393	F-BOX protein, TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 protein, <i>tir1</i> , <i>afb2</i> , <i>afb3</i> genleri, HOS1	[Navarro et al. 2006], [Reyes et al. 2007], [Zhao et al. 2007], [Liu et al. 2008], [Li et al. 2010], [Frazier et al. 2011], [Sunkar et al. 2012]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç	Besin kıtlığı, kuraklık	miR395	<i>aps</i>	[Bartel 2004], [Rhoades and Bartel 2004], [Zhou et al. 2010]
<i>Arabidopsis</i> , arpa	Kuraklık, tuz, soğuk	miR396	GRF ailesi transk faktörleri	[Liu et al. 2008], [Kantar et al. 2010], [Frazier et al. 2011]
<i>Arabidopsis</i> , pirinç, soya, <i>Brachypodium</i>	Soğuk, ABA, tuz	miR397b	LACCASE	[Sunkar and Zhu 2004], [Zhao et al. 2007], [Liu et al. 2008], [Zhang et al. 2009], [Zhang et al. 2009]
<i>Arabidopsis</i>	Besin kıtlığı, oksidatif stres, bakteriyal patojen	miR398	<i>csd1</i> , <i>csd2</i> , <i>ccs1</i> , <i>cox5b.1</i>	[Sunkar et al. 2006, 2012], [Gifford et al. 2008], [Trindade et al. 2010], [Li et al. 2010a], [Li et al. 2011c], [Zhang et al. 2011a], [Zhu et al. 2011]
<i>Arabidopsis</i>	Soğuk, ABA, tuz	miR402	DML3, ARGONAUTE2	[Sunkar and Zhu 2004], [Zhou et al. 2008]
<i>Populus</i> , arpa	Mekanik, kuraklık	miR408	PLANTACYANIN	[Lu et al. 2008], [Kantar et al. 2010], [Trindade et al. 2010]
<i>Populus</i>	Soğuk	miR474	PPRs	[Lu et al. 2008]
Pirinç	Kadmium stresi	miR166	Homeodomein-leucine Zipper (HD-Zip) transk. faktörleri	[Ding et al. 2011]
Pirinç	Alüminyum stresi	miR528	F-BOX/LRR-MAX2	[Lima et al. 2011]
<i>Arabidopsis</i>	Bakteriyal	miR825	REMORINA, ZF, homeobox	[Li et al. 2010a]



Şekil 2.6: *Arabidopsis*'te stres yanıtı miRNA'ların düzenlenme ağı.

Bu tez çalışması kapsamında; kriyoprezervasyon sürecinde maruz kalınan kuraklık, soğuk ve oksidatif stres gibi stresler tarafından indüklendiği bilinen miRNA'lar (miR156, miR159, miR169, miR172, miR319, miR393, miR394, miR397, miR398 and miR408) ve onların hedef genleri SPL10, TCP4, TIR1, HOS1, LAC4, CSD1, LCR, LAC3 ve PLANTACYANIN ve soğuk-ilişkili yollarındaki genler CBF1, CBF3 ve bunların alt genleri COR15 ve COR47 *Arabidopsis thaliana*'nın kriyoprezervasyonu sonrası ve sonrasındaki gen anlatım profillerini saptamak için kullanılmıştır (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Tez kapsamında kullanılan miRNA ve hedef genleri.

miRNA	Hedef genler ve proteinler	Stres	Kaynak
miR156	Squamosa promoter binding protein-like 10 (SPL10)	Kuraklık, soğuk	[Liu et al. 2008], [Lu et al. 2008], [Kantar et al. 2010], [Zhou et al. 2010], [Li et al. 2011]
miR159	-	Kuraklık, ABA	[Reyes and Chua 2007], [Alonso-Peral et al. 2012]
miR169	-	Kuraklık, soğuk	[Zhao et al. 2007], [Zhang et al. (2009), Li et al. 2008], [Liu et al. 2008]
miR172	-	Soğuk, Kuraklık	[Liu et al. 2008], [Zhang et al. 2009]
miR319	TCP family transcription factor 4 (TCP4)	Soğuk, Kuraklık	[Liu et al. 2008], [Lv et al. 2010], [Sunkar and Zhu 2004]
miR393	Transport inhibitor response 1 (TIR1), High expression of osmotically responsive gene 1 (HOS1)	Soğuk, ABA, Kuraklık	[Zhao et al. 2007], [Liu et al. 2008], [Sunkar and Zhu 2004], [Li et al. 2010], [Sunkar et al. 2012], [Sunkar et al. 2007], [Lv et al. 2010]
miR394	Leaf curling responsiveness (LCR)	Kuraklık, soğuk	[Ni et al. 2012], [Song et al. 2013], [Song et al. 2016]
miR397	Laccase 4	Soğuk, ABA	[Sunkar and Zhu 2004], [Zhao et al. 2007], [Liu et al. 2008], [Zhang et al. 2009]
miR398	Copper/zinc superoxide dismutase 1 (CSD1)	Oksitatif	[Sunkar et al. 2006, 2012], [Abdel-Ghany and Pilon 2008], [Trindade et al. 2010], [Li et al. 2010b], [Zhu et al. 2011], [Khraiweh et al. 2012]
miR408	Laccase 3, PLANTACYANIN	Soğuk, Kuraklık, oksidatif	[Sunkar and Zhu 2004], [Liu et al. 2008], [Mutum et al. 2013], [Jovanovic et al. 2014], [Zhang et al. 2014], [Trindade et al. 2010]

2.4. Model Organizma *Arabidopsis*

Tez çalışması kapsamında kullanılan *Arabidopsis thaliana*, bitki biyolojisinde model organizma olarak kullanılan küçük çiçekli bir bitkidir (Şekil 2.7.). *Arabidopsis* lahana ve turp gibi ekilen *Brassicaceae* üyesidir.



Şekil 2.7: *Arabidopsis thaliana*'nın gövde (a) ve çiçek (b) görünümü.

Temel tarımsal önemi olmamasına rağmen, *Arabidopsis* temel moleküler biyoloji ve genetik çalışmalarda önemli bir avantaj sunar:

- 125 Mb genomunun yaklaşık 115 Mb'si dizilenmiş ve açıklanmıştır (Nature, 408:796-815; 2000).
- 5 kromozomunun hepsinin fiziksel ve genetik haritaları mevcuttur.
- Yaşam döngüsü kısadır (—tohumdan çimlenmesi ile yaklaşık 6 hafta).
- Tohum üretimi üretkendir ve bitki kısıtlı alanlarda kolayca yetiştirilir.
- *Agrobacterium tumefaciens* kullanılarak transformasyon kolaydır.
- Çok sayıda genomik kaynağı ve mutant hatları mevcuttur.
- Birçok miRNA *Arabidopsis*'te görevleriyle belirlenmiştir.

Bu avantajlar *Arabidopsis*'i moleküler biyolojinin bitki çalışmaları için model bir organizma yapmaktadır. *Arabidopsis* bilgi kaynağı (TAIR) yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiyi toplar ve kullanılabilir hale getirir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Tez çalışması kapsamında kullanılan *Arabidopsis thaliana* (Col-0) tohumları Doğa Selin KAYIHAN'ın Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yürüttüğü doktora tezi kapsamında yetiştirilen bitkilerden tohum olarak elde edilmiştir. Bu tohumlar tez çalışmasında kapsamındaki tüm deneyler için yetersiz olduğundan daha fazla tohum elde edebilmek için mevcut tohumlar önce *in vitro* ortamda çimlendirilip akabinde GTÜ, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü serasına aktarılmış ve bitkilerden yaklaşık 20.000 tohum elde edilmiştir. Elde edilen tohumlar tez çalışması kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Arabidopsis thaliana'nın doku kültürü aşamasında kullanılan kimyasal ve/veya organik bileşenlere ait katalog numaraları Tablo 3.1'de, kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan bileşenlere ait olanlar Tablo 3.2'de, total RNA izolasyonunda kullanılan bileşenlere ait olanlar Tablo 3.3'te, cDNA, PCR, qRT-PCR reaksiyonlarında ve agaroz jelin hazırlanıp, görüntülenmesinde kullanılan bileşenlere ait olanlar ise Tablo 3.4'te sunulmuştur.

Tablo 3.1: Doku kültüründe kullanılan bileşenler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Etil alkol (%96)	Alkomed	AM-EA96
NaOCl	Sigma	425044
MS besi ortamı	Duchefa	M0222
• Glisin • Nikotinik asit • Tiamin HCl • Piridoksin HCl • Myo-inositol • NH_4NO_3 (Amonyum nitrat) • KNO_3 (Potasyum nitrat) • KH_2PO_4 (Potasyum fosfat) • $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Kalsiyum klorür) • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Magnezyum sülfat) • H_3BO_3 (Borik asit) • KI (Potasyum iyodür) • $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Mangan sülfat) • $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Çinko sülfat) • $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Molibdik asit) • $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Bakır sülfat) • $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Kobalt klorür) • $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Demir sülfat) • Na_2EDTA (Sodyum etilendiamintetraasetik asit)		
Gelrite	Duchefa	G1101
Sukroz	Merck	1.07651.1000
dH ₂ O	-	-

Tablo 3.2: Kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan bileşenler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Sukroz	Merck	1.07651.1000
Gelrite	Duchefa	G1101
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Merck	K33960252
Gliserol	Merck	1.04093.2500
Sukroz	Merk	1.07651.1000
Etilen Glikol	Merck	K34762849
SA	Messer	-

Tablo 3.3: Total RNA izolasyonunda kullanılan bileşenler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
TRizol	Invitrogen	15596026
DEPC	Sigma	D5758
ZAP	Sigma	R2020
Etanol	Alkomed	AM-EA96
Kloroform	Sigma	372978
İsopropanol	AppliChem	A3461.1000

Tablo 3.4: cDNA, PCR, qRT-PCR reaksiyonlarında ve agaroz jelin hazırlanıp görüntülenmesinde kullanılan bileşenler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher	K1622
5x HOT FIREPol® Blend Master Mix	Solis BioDyne	04-25-00S25
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Thermo Fisher	K0221
Agaroz	Sigma	T6066
RedSafe	Intron	21141
λ DNA-Hind III	AppliChem	A3461.1000
1 kb DNA belirteç (TrackIt™)	Intron Biotechnology	27062
100 bp DNA belirteç (TrackIt™)	Intron Biotechnology	32181
Trizma base	Sigma	S3014
Asetik asit	Calbiochem	324503
EDTA	Applchem	A11080.0100
dH ₂ O	-	-

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazların listesi Tablo 3.5’te sunulmuştur.

Tablo 3.5: Tez kapsamında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Cihazın Modeli	Firma
Hassas terazi	TP3030	Denver Instrument
Otoklav	HV-110L	Hirayama
Etüv	DIN 12880	Binder
Bitki büyütme odası	RivaCold	Genpa Mühendislik
pH metre	pH209	Hanna Instrument
Manyetik karıştırıcı	MR3001	Heidolph
Sterilizatör	Steri 350	Swiss Made
Laminar akımlı kabin	Cleanair	PMU Company
İklimlendirme dolabı	WTC	Binder
Derin dondurucu (-20 °C)	GS26DN13NE	Simens
Buzdolabı (4 °C)	RG 1380	İndesit
SA tankı	ARPEGE 40	Dmc-airliquide
Sıcak su banyosu	D-77960	Julabo
Homojenizatör	MM400	Retsch
Vorteks	AC230	VNR International
Mikrodalga fırın	MW71E	Samsung
Nanodrop	BioSpec-nano	Shimadzu Biotech
Otomatik pipet	3862243	Eppendorf Research
Santrifüj	Universal 32	Hettich
Termal döngü cihazı	PTC-200	MJ Research INC
qPCR cihazı	StepOne Plus	Applied Biosystems
Jel elektroforezi ve güç kaynağı	MP300	Claver Scientific
Jel görüntüleme cihazı	Universal Hood II	BIO-RAD

3.2. Yöntem

3.2.1. Besi Ortamı ve Tohumların Eldesi

Tez kapsamında kullanılan *Arabidopsis thaliana*'nın doku kültüründe çimlendirilmesi ve kriyoprezervasyon sonrası fidelerinin geri kazanımı sırasında

kullanılan MS0 [Murashige and Skoog, 1962] besi ortamına ait bileşenler Tablo 3.6’da sunulmuştur.

Tablo 3.6: MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).

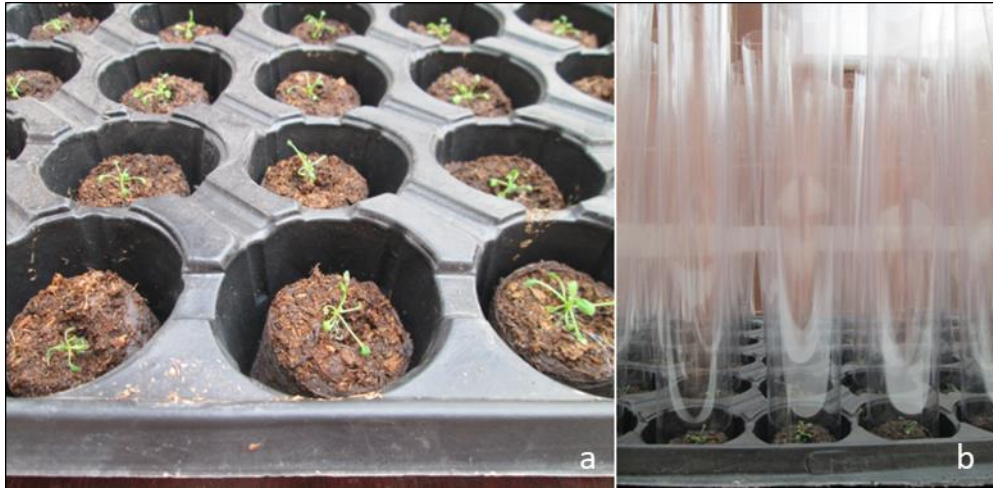
Bileşen adı	Miktar
Sukroz	30 g
MS	4400 g
Gelrite	3 g
dH ₂ O	1 L’ye tamamlanacak
pH	5.8

Mevcut *Arabidopsis* tohumları tez kapsamındaki tüm deneylerin yürütülmesi için yeterli olmadığından, 40 adet *Arabidopsis thaliana* (Col-0) tohumu steril bir eppendorf tüp içerisinde önce %70 EtOH solüsyonu ile 2 dakika ve ardından %15 NaOCl ile 10 dakika çalkalanarak yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş sonrasında tohumlar 3 kere dH₂O ile yıkandıktan sonra 2 ayrı petriye her bir petride 20 tohum olacak şekilde bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS0 [Murashige and Skoog, 1962] besi ortamına aktarılmıştır. Tüm tohumların çimlenmesinin senkronize olması için 48 saat 4°C’de karanlıkta tutulmuştur. Senkronizasyonun ardından tohumlar bitki büyütme odası koşullarında 8/16 saat fotoperiyot olacak şekilde 22±2°C sıcaklıkta çimlendirilmeye bırakılmıştır. Yaklaşık 15 gün çimlenen Col-0 Şekil 3.1.’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: 15 gün çimlenen *Arabidopsis thaliana* Col-0 tohumları.
Bar 1 cm'yi ifade eder.

5 hafta bitki büyütme odası koşullarında büyüyen bitkiler akabinde her biri 6 cm çapındaki yan yana kuyulardan oluşan ve içi, otoklavlanmış steril toprak ile doldurulmuş kabın içerisine birer birer konulmuş ve $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta sera koşullarına aktarılmıştır. Her bir bitki düzgün ve birbirine karışmadan büyümeleri için ışığı geçirebilen şeffaf malzeme ile etrafları kapatılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2: Sera koşullarına aktarılan *Arabidopsis thaliana* bitkileri a) Toprağa aktarılan *Arabidopsis* fideleri, b) Fideleri koruyan şeffaf malzeme.

Bitkilere sera koşullarında ilk hafta her gün, 1 haftadan sonra 2 günde bir su verilmiştir ve bitkiler maksimum boyutlarına ulaşp kuruyana kadar su verilmeye

devam edilmiştir. 10 hafta sonunda kuruyan bitkilerden tohumlar, bir beyaz kâğıdın üzerine sallama ve ufalama yoluyla dökülerek sağlanmıştır. Toplanan tohumlar 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine konulmuş, kapakları parafilmlelenmiş ve +4°C sıcaklığa kaldırılmıştır. Bu çalışmada 3 eppendorf yaklaşık 20000 tohum elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılacak olan kriyoprezervasyon deneyleri elde edilen bu tohumlardan gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. *Arabidopsis thaliana*'nın Kriyoprezervasyonu

Arabidopsis thaliana (Col-0) fidelerinin kriyoprezervasyonu Ren ve arkadaşları (2013) tarafından tanımlanan vitrifikasyon temeli yöntem kullanılarak gerçekleştirilecektir. Kriyoprezervasyonun aşamaları şu şekilde sıralanmıştır:

- Ozmokoruma (OK): 30–40 fide içerisinde yükleme solüsyonu (MS + 2 M gliserol + 0.4 M sukroz) [Wang and He 2009] içeren 2 mL kriyoviyallere transfer edilir, 20°C, 20 dk.
- Dehidratasyon (DH): Yükleme solüsyonundan ayrılmasını takiben, fideler PVS2 (MS + %30 gliserol + %15 etilen glikol + %15 DMSO + 0.4 M sukroz) [Sakai et al., 2008] ile dehidrate edilir, 0°C, 50 dk.
- Hızlı soğutma ve ısıtma (HSI): PVS2 içeren kriyovialle hızlı bir şekilde sıvı azota daldırılır ve 1 saat orada tutulur, sonrasında hızlı bir şekilde steril su içeren su banyosunda 40°C'ta sabit çalkalama ile çözündürülür, 90 sn.
- Dilüsyon (DL): Kriyoviallerdeki fideler her 10 dakikada bir yenisi ile değiştirilen boşaltma solüsyonu (MS + 1.2 M sukroz) ile 40 dakika durulanır.
- Geri kazanım (GK): Fideler çimlenme için kullanılan aynı koşullarda MS besi ortamında kültürlenir.

MS + 2 M gliserol + 0.4 M sukroz çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler Tablo 3.7'de, PVS2 çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler Tablo 3.8'de, MS + 1.2 M sukroz çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler ise Tablo 3.9'da gösterilmiştir.

Tablo 3.7: MS + 2 M gliserol + 0.4 M sukroz çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler (100 mL).

Bileşen adı			Miktar
Gliserol			18,4 mL
Sukroz			13,691 g
dH ₂ O			80 mL
MS	Sukroz	x	100 mL'ye tamamlanacak
	Bitki büyüme düzenleyicisi	x	
	Vitamin	x	
pH			5.8

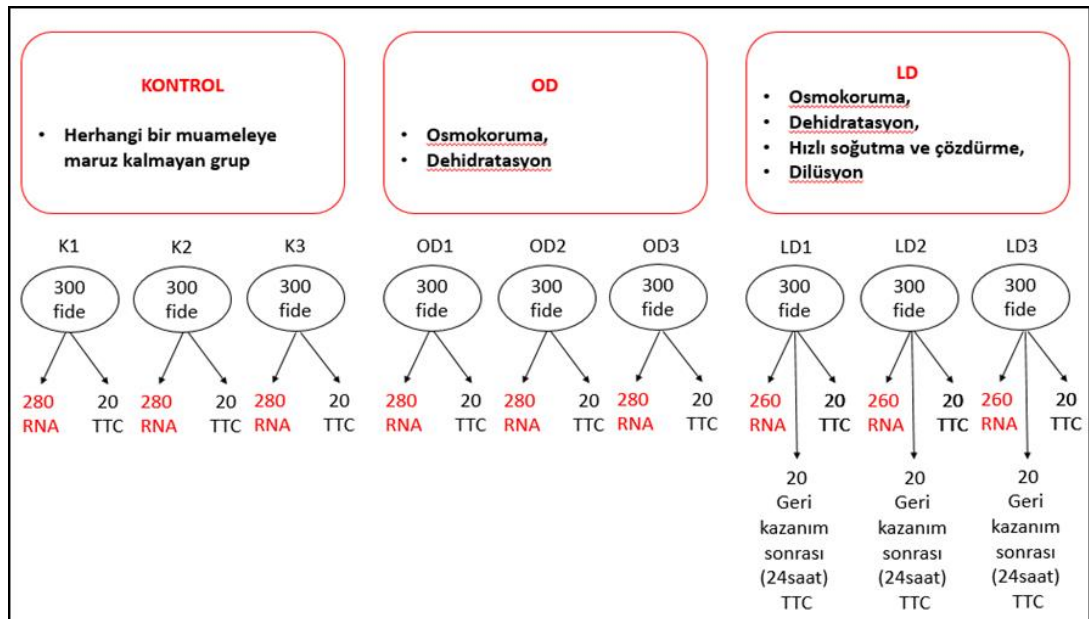
Tablo 3.8: PVS2 çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler (200 mL).

Bileşen adı		Miktar
Gliserol		54 mL
Etilen glikol		32 mL
DMSO		32 mL
MS (0.4 M sukroz içeren)		200 mL'ye tamamlanacak
pH		5.8

Tablo 3.9: MS + 1.2 M sukroz çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler (100 mL).

Bileşen adı			Miktar
Sukroz			41,074 g
dH ₂ O			80 mL
MS	Sukroz	x	100 mL'ye tamamlanacak
	Bitki büyüme düzenleyicisi	x	
	Vitamin	x	
pH			5.8

48 saat ve 72 saat çimlenen fidelerin kriyoprezervasyonu iki set olarak ayrı ayrı yapılmıştır. Her iki set de kendi içerisinde kontrol grubu (K), sıvı azot öncesi grubu (ozmokoruma ve dehidratasyon; OD) ve sıvı azot sonrası grubu (sıvı azot ve dilüsyon; LD) olmak üzere 3 farklı gruptan oluşturulmuştur. K, OD ve LD grupları için yaklaşık 300'er, 3 tekrarlı gerçekleştirildiği için de her bir sette yaklaşık 2700 tohum kullanılmıştır. Her gruptaki 300 fideden yaklaşık 20 tanesi canlılık testi için ayrılmış, geri kalan yaklaşık 270 fide alüminyum folyoda toplanıp sıvı azota ve takiben -80°C'a miRNA çalışmalarında kullanılacak olan total RNA'ların izolasyonu için kaldırılmıştır. Tüm protokol Şekil 2.3'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.3: 48 ve 72 saat çimlenen Arabidopsis thaliana tohumlarından elde edilen fidelerin kriyoprezervasyon protokol şeması.

3.2.3. Arabidopsis thaliana'nın Canlılık Testi

Kriyoprezervasyon sonrasında fidelerin canlılık testi TZ (Tetrazolium) testi [Porter et al., 1947] ile yapılmıştır. TZ testi, tohum canlılığını doğru ve hızlı bir şekilde belirlemek amacıyla kullanılan ve dünya çapında geniş ölçüde kabul gören bir testtir. TZ testi, solunum aktivitesinin ölçüsüdür ve tohumlardaki yaşam belirtilerini ya da metabolik aktiviteyi ortaya çıkarır. Bu testte solunum oranı ve tohum canlılığının belirteci olarak dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesinden yararlanılır. Testte kullanılan 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) tuzu ile hazırlanan çözelti

renksizdir ve solunum esnasında canlı dokular ile temas halindedir. Bu aşamada dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesi ile indirgenir ve çözünemez halde kalan, formazan adı verilen kırmızı renkli bir bileşiğe dönüşür. Böylece formazan kırmızısı rengine dönen tohumlar canlı, renksiz kalan (ya da renk değiştiremeyen) tohumlar ölü olarak ayrılabilir [ISTA, 2003], [ISTA, 2007].

Tez çalışmasında K, OD ve LD grubu fidelere ek olarak kriyoprezervasyon sonrası fidelerin geçişimi için besiyerine alınan geri kazanım (GK) grubu fidelere de 24 saatin sonunda TZ testi uygulanmıştır. TZ testi için kullanılacak olan %1'lik TTC çözeltisi; otoklavlanmış dH₂O ile hazırlanmış, pH'sı 7 olarak ayarlanmış ve amber şişede 4°C'ta muhafaza edilmiştir. Test, Verma et al., (2013) protokolü referans alınarak aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

- Testi yapılacak tüm grup fideler 0.5'lik ependorf tüplerine alındı ve 300 ml %1 TTC çözeltisi ile 30°C'ta 48 saat inkübe edildi.
- Negatif kontrol (ölü) için kontrol grubu fidelerden yaklaşık 20 fide 100°C'ta 1 saat bekletildi ve takiben onlar da teste tabi tutuldu.
- TTC muamelesinden sonra fideler 2-3 kere dH₂O ile yıkandı ve daha berrak bir görünüm için laktofenol (1:1:2:1 oranında laktik asit: fenol: gliserin: su) çözeltisinde 1-2 saat inkübe edildi.
- Stereo mikroskop altında gözlemlendi ve canlı, cansız sayımı yapıldı.

3.2.4. Moleküler Analizler

3.2.4.1. miRNA'ların, Hedef Genlerinin ve Soğuk İlişkili Genlerin Belirlenmesi ve Gen Anlatım Analizleri

Tez kapsamında kullanılan, kriyoprezervasyon sırasında karşılaşılabilecek dehidratasyon, soğuk ve oksidatif stres gibi abiyotik streslerde etkin olan 10 adet miRNA, bunların hedef genleri ve soğuk ilişkili genler miRbase ve NCBI veri tabanları kullanılarak seçilmiştir.

3.2.4.2. Total RNA izolasyonu

Arabidopsis thaliana fidelerinin kriyoprezervasyonun tüm aşamalarını takiben TRIzol çözeltisi kullanılarak total RNA'lar izole edilmiştir [Chomczynski and Sacchi 1987]. Bu yöntem aşağıdaki adımlar takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

- İzolasyon süreci sırasında tüm materyaller ve solüsyonlar DEPC (Dietilpirookarbonat) ile muamele edilerek kullanıldı.
- Fideler sıvı azot ile soğutulmuş ependorf tüplerinin içerisine aktarıldı ve ependorflar tekrar sıvı azota atıldı.
- Sıvı azottan çıkarılan tüpler hızlı bir şekilde -80°C'ta soğutulmuş homojenizatör cihazının bataryalarına yerleştirildi ve 20 m/s hızda 1 dk (X2) çalkalanarak toz haline gelinceye kadar ezildi.
- 1 ml TRIzol çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika vortekslendi ve daha sonra ependorflar maksimum hızda oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi.
- 900 µl supernatant yeni bir tüpe transfer edildi ve 180 µl kloroform eklendi.
- Tüp vortekslendi ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildikten sonra 4°C'ta maksimum hızda 15 dakika santrifüj edildi.
- 450 µl üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve 200 µl kloroform eklendi. Tüp vortekslendi ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında maksimum hızda 5 dakika santrifüj edildi.
- 400 µl üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine bir hacim isopropanol eklendi ve tüp/ler birkaç defa ters-düz edildikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Tüp oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
- Pellet 1 ml %75 etanol ile yıkandı ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Oda sıcaklığında 5 dakika maksimum hızda santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
- Etanolü uzaklaştırmak için ek olarak 15 saniye santrifüj edildi ve 10 dakika boyunca kurutmaya bırakıldı. Son olarak 50 µl DEPC'li su eklendi ve 65°C'ta pelletin çözünmesi için inkübe edildi.
- Agaroz jel elektroforezi ve NanoDrop kullanılarak RNA niteliği, bütünlüğü ve konsantrasyonu kontrol edildi.
- İzole edilen total RNA'lar kullanılabilecek kadar -80°C'ta tutuldu.

3.2.4.3. Total RNA'ların Ters Transkripsiyonu ve Sap-İlmik (stem-loop) qRT-PCR

miRNA'ların hedef genleri ve iç-kontrol geni Ubiquitin (UBQ5), [Ren et al., 2015] için cDNA sentezi, 500 ng total RNA ile ticari kit (RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti, K1622; Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ters transkripsiyon (RT) reaksiyonu için primer olarak rastgele heksamerler kullanılmıştır. miRNA'lar için ise cDNA sentezi Varkonyi-Gasic ve arkadaşlarının (2007) sap-ilmik (SL) RT reaksiyon yönteminin Kayıhan ve arkadaşları (2016) tarafından modifiye edilen yöntemi kullanılarak aynı kit ile gerçekleştirilmiştir. Ters transkripsiyon (RT) reaksiyonu için primer olarak miRNA'ların SL primerleri karışım halinde kullanılmıştır. Tüm cDNA sentez protokolü Tablo 3.10'da detaylandırılmıştır.

Tablo 3.10: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit protokolü.

RNA	0,5 µg
Primer*	SL Miks1 veya 2**
	Rastgele heksamer
Nukleaz içermeyen dH ₂ O	12 µl'ye tamamlanır.
Total hacim	12 µl
5 dakika 65°C'ta ve ardından 2 dakika buzda inkübasyon	
5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT	1 µl
- Rastgele heksamerler ile cDNA sentezi için 5 dakika 25°C, 60 dakika 42°C ve 5 dakika 70°C'ta inkübasyonun ardından sentezlenen cDNA'lar -20°C kaldırıldı. - SL Miks'ler ile cDNA sentezi için 16°C 30 dakikayı takiben 60 döngü olacak şekilde 30°C'ta 30 saniye, 42°C'ta 30 saniye, 50°C'ta 1 saniye ve döngü sonrası 70°C 5 dakikanın ardından sentezlenen cDNA'lar -20°C kaldırıldı. *İç kontrol, hedef genleri ve soğuk-ilişkili genlerin cDNA sentezi için rastgele Hexamer primerler kullanılırken, miRNA'lar için ise 5 miRNA'nın Stem-Loop (SL) primeri karışım (1'er µl 100µM ilgili 5 miRNA SL primeri ve 45µl NF su; son hacim 2µM) halinde kullanılmıştır. 10 miRNA için SL Mix primerleri 2 seferde yapılmıştır. **SL Miks1 (miR159, miR169, miR172, miR319 ve miR394), SL Miks2 (miR156, miR393, miR397, miR398 ve miR408) RT- : Her bir örnek için RT- negatif kontrol olarak kullanıldı. RT- reaksiyonunda RevertAid enzimi hariç tüm reaktifler kullanıldı. NTC : Reaktiflerin kontaminasyonunu belirlemek için de NTC kullanıldı. NTC reaksiyonunda RNA kalıbı hariç tüm reaktifler kullanıldı.	

“RevertAid First Strand cDNA Synthesis” kiti kullanılarak 48 ve 72 saat tüm örneklerden (K1, K2, K3, OD1, OD2, OD3, LD1, LD2 ve LD3) rastgele heksamer primerler ile elde edilen cDNA’lar kullanılarak, iç kontrol geni UBG5 primerleri ile kontrol PCR gerçekleştirilmiştir. Kontrol PCR reaksiyonu PCR 12,5mM MgCl₂ içeren “5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (Solis Biodyne)” kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen tüm cDNA’lar uzun süreli kullanım için -80°C’a kaldırılmış ve qRT-PCR reaksiyonu için doğrudan kalıp olarak kullanılmıştır.

Real-time PCR Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) kullanılarak StepOnePlus™ Real-Time PCR sisteminde (Applied Biosystems) gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR reaksiyonu, 1 µl cDNA, 7 µl 2X Master Mix, son konsantrasyonu 0,3 µM primerler 15 µl hacime nukleaz içermeyen suyla tamamlayarak elde edilen karışımda gerçekleştirilmiştir.

İç kontrol genleri ve hedef genler için cDNA olarak rastgele heksamer primerleri ile sentezlenen cDNA örnekleri, miRNA’lar için ise mir159, mir169, mir172, mir319, mir394 için SL Miks1 primer karışımı ile sentezlenen cDNA örnekleri ve mir156, mir393, mir397, mir398, mir408 için SL Miks2 primer karışımı ile sentezlenen cDNA örnekleri kullanılmıştır. İç kontrol genleri ve hedef genler için primer olarak kendi F ve R primerleri kullanılırken, miRNA’lar için kendi F primerlerinin yanında geri primer olarak universal R primer kullanılmıştır. Kullanılan tüm primerler 100µM ana stoktan dilüsyon ile 5µM’a düşürülmüştür. qPCR için reaksiyon hacmi ve konsantrasyonu, PCR koşulu Tablo 3.11.’te gösterilmiştir.

Tablo 3.11: qRT-PCR için reaksiyon hacmi ve konsantrasyonu, PCR koşulu.

Reaksiyon Hacmi ve Konsantrasyonu		PCR Koşulu	
cDNA	1µl	95°C 10 dakika 95°C 15 saniye 55°C 30 saniye 72°C 30 saniye	X40
SYBR Green	7µl		
5µM F Primer	0,9µl		
5µM R Primer	0,9µl		
5µM Universal R Primer	0,9µl	95°C 15 saniye 60°C 1 dakika 95°C 15 saniye	Erime Eğrisi
dH ₂ O	5,2µl		

qRT-PCR sonrası elde edilen her bir gene ait Ct (döngü eşiği) değerine göre hesaplanan katlı değişim $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hem 48 ve 72 saat örnekleri ile hem de iki iç kontrol geni UBQ5 ile karşılaştırılmış ve normalize edilmiştir.

Gen anlatım analizleri için seçilen miRNA'lara ait primerler Kayıhan ve arkadaşları (2016, 2019)'a göre tasarlanmıştır. Hedef genlerinin, soğuk-ilişkili genlere ve iç kontrol geni UBQ5'e ait primerler ise "Primer 3" programı ve NCBI primer tasarlama programı kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo 3.12).

Tablo 3.12: Tez kapsamında kullanılan miRNA'lar, hedef genleri ve soğuk-iliskili genlerin primer listesi.

	Primerler	Diziler 5' - 3'
miRNAlar	miR156_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CGTGCTC
	miR156_F	AGGCGGTGACAGAAGAGAGT
	miR159_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CTAGAGC
	miR159_F	CGGCGGTTTGGATTGAAGGGA
	miR169_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CTCGGCT
	miR169_F	GATATGCAGCCAAGGATGACT
	miR172_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CATGCAG
	miR172_F	CGGCGGAGAATCTTGATGATG
	miR319_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CAGGGAG
	miR319_F	CGGATATTGGACTGAAGGGAG
	miR393_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CGGATCA
	miR393_F	CGTAATTCCAAAGGGATCGCAT
	miR394_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CCATCAA
	miR394_F	CGATATTCATTGAGTGCAGCG
	miR397_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CAAGGGG
	miR397_F	CGGCGGTGTGTTCTCAGGTCA
	miR398_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CGCCAGG
	miR398_F	TGGCGGATGCACTGCCTCTTC
	miR408_SL RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CGGAGGT
	miR408_F	GGTAGTTTGGCATTCTGTCC
	Universal_R	GTGCAGGGTCCGAGGT
miRNAların hedef genleri	SPL10_F	TGTGGTCAGAGCATGCAAGT
	SPL10_R	ACAGCATGGAACCTGCTACA
	TCP4_F	AAGAAGAGGAGCAGCAGCAGC
	TCP4_R	GGAAAGCTAGACAAGCCCTGAA
	TIR1_F	CCTCTGGGTGCTTGACTACA
	TIR1_R	AAAAGGCTCGGACGGAACA
	HOS1_F	CTCCGCCGAATCACAGCTAA
	HOS1_R	GTTGTTGTTGTCCTTTAAGCTCG
	LAC4_F	CCATCTCAAGGTTACAACTGTCAG
	LAC4_R	CTTCTACCACCGTGAAAATATGGC
	CSD1_F	ATGGCGAAAGGAGTTGCAGT
	CSD1_R	TCACAGTGGTCACACCATCG
	LCR_F	TGCCATGCTTAGACAGCTCA
	LCR_R	GGCAAACACCATCCGTTCTG
	PLANTACYANIN_F	TATAATCCGAGGATGCACAAC
	PLANTACYANIN_R	ATATCGCTTTCGCAATGGTT
	LAC3_F	CCTGGCCAAACCACTAACGT
	LAC3_R	ATGTAGTAGCGCCTGGTCTCT
Soğuk-iliskili genler	COR15_F	GCGATGTCTTTCTCAGGAGC
	COR15_R	GCTTTCTTTGTGGCCTCGTT
	COR47_F	GACGTGTCTAATGGCCACACA
	COR47_R	TAAAAGAGGTGGGAACGGGC
	CBF1_F	AGGGTCAAAGGACACACGTC
	CBF1_R	GGGAGCACACGGAGTTTGTG
	CBF3_F	ACTTGCGCTAAGGACATCCA
	CBF3_R	TGTCGAAGCCATGATCCGTC
İç kontrol geni	UBQ5_F	GACGCTTCATCTCGTCC
	UBQ5_R	CCACAGGTTGCGTTAG

3.3. Verilerin Toplanması ve İstatistiksel Analizler

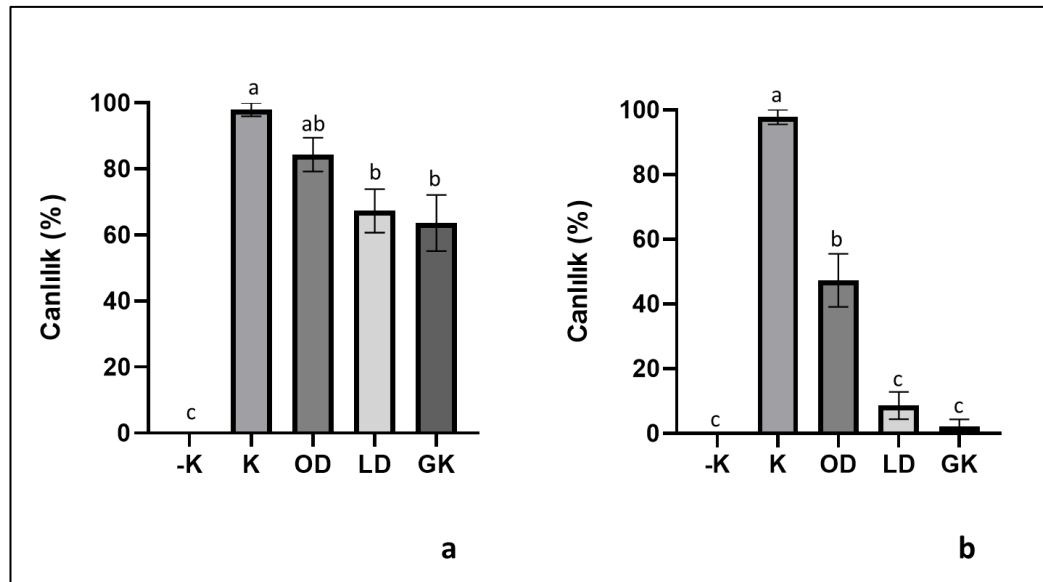
Canlılık testi verileri SPSS istatistik programı kullanılarak “tek yönlü varyans analizi” (ANOVA) ve ardından “en az anlamlı farklılık” (LSD) testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Üç tekrarın ortalama değerleri $\pm$ standart hata (SE) olarak ifade edilmiş ve $p \leq 0.05$ değerleri anlamlı farklılık olarak kabul edilmiştir. qRT-PCR verileri ise t-testi ile analiz edilmiş ve ortalama $\pm$ SE ($p \leq 0.05$) olarak ifade edilmiştir. Isı haritası grafikleri, üç kopyanın ortalama değerlerine göre Microsoft Excel ve GraphPad Prism 8 istatistik programı kullanılarak çizilmiştir.

4. BULGULAR

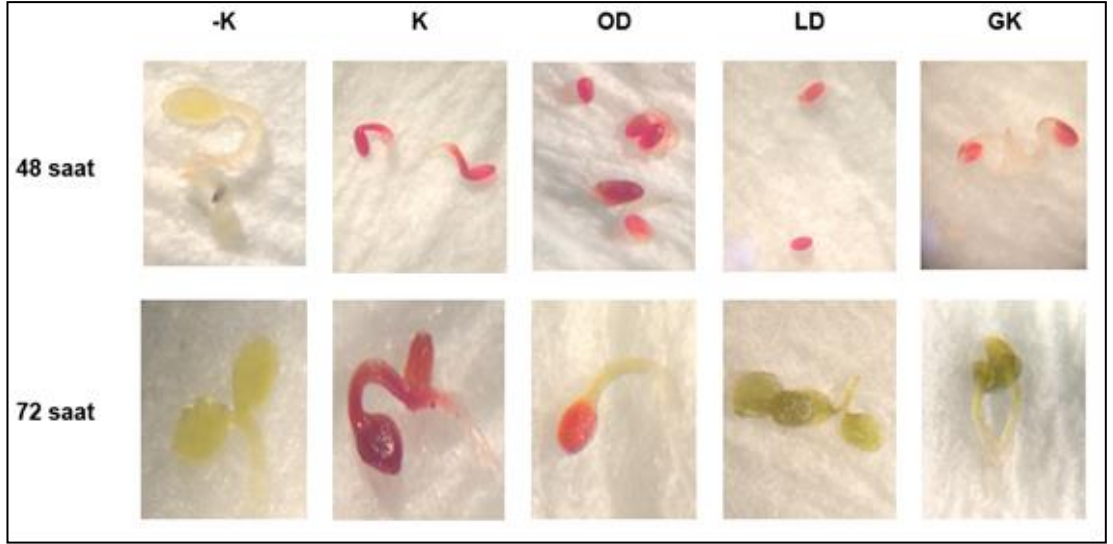
4.1. *Arabidopsis* Fidelerinin Kriyoprezervasyon Sürecindeki Canlılığı

48 ve 72 saat çimlenen *Arabidopsis thaliana* fidelerinden iki set olarak gerçekleştirilen kriyoprezervasyon aşamalarının sonunda ve sonrasında alınan fidelerin TZ testi ile değerlendirilen canlılık oranlarının istatistiksel analizleri sonucu oluşturulan grafikleri Şekil 4.1’de, ilgili gruplara ait fidelerin canlılık görüntüleri ise Şekil 4.2’de sunulmuştur.

Tablo ve şekillerden anlaşılabileceği gibi 48 saatlik çimlenmiş K fidelerinin TZ testine dayalı canlılığı %97.8 olarak saptanmış ve bunun LD ve GK fidelerinin canlılık yüzdesinden önemli ölçüde farklı olduğu görülmüştür (sırasıyla %67.3 ve %63.6, Şekil 4.1a). Öte yandan, 72 saatlik çimlendirilmiş fidelerin canlılığı OD (%47.4) ve LD (%8.7) basamaklarında (Şekil 4.1b) K ile karşılaştırıldığında keskin bir düşüş göstermiştir.

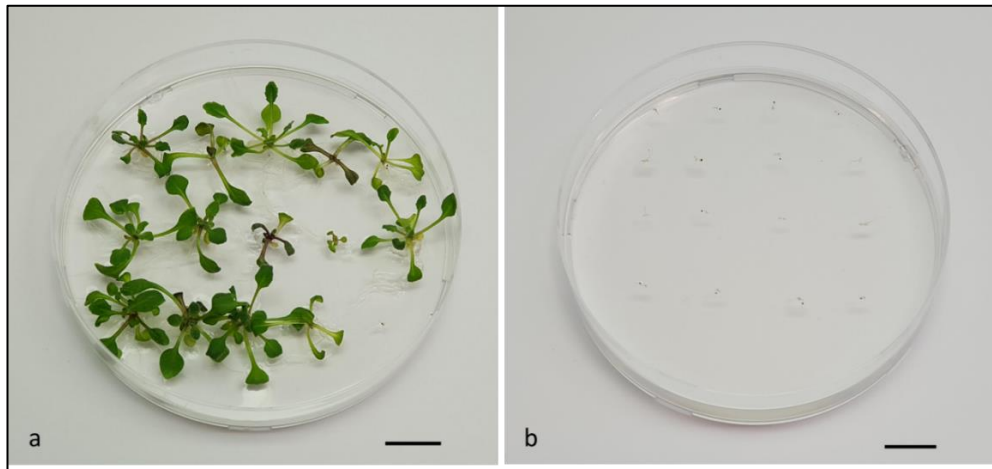


Şekil 4.1: 48 (a) ve 72 saat (b) *in vitro* çimlendirilmiş *A. thaliana* fidelerinin kriyoprezervasyon sırasındaki canlılık yüzdeleri. K: Herhangi bir muamele olmayan kontrol fideler, OD: sıvı azota daldırılmadan önceki fideler (ozmokoruma ve dehidratasyon), LD: sıvı azota daldırıldıktan sonraki fideler (SA’da hızlı soğutma ve dilüsyon), GK: geri kazanım sonrası MS0 besiyerindeki 24 saat sonraki fideler ve -K: 1 saat 100°C’te bekletilerek öldürülen fideler (negatif kontrol). Farklı harfler ise her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder (P<0.05).



Şekil 4.2: 48 ve 72 saat *in vitro* çimlendirilmiş *A. thaliana* fidelerinin kriyoprezervasyon sırasında ve sonrasındaki canlılık testi görüntüleri. Kırmızı renk canlılığı, soluk renkler ise cansızlığı temsil eder.

Hem 48 saat hem de 72 saat grubu için sıvı azottan geri kazanım sonrası 20'şer fide 3 tekrarlı olarak MS0 rejenerasyon besisi ortamında 15 gün süre ile kültüre edilmiş ve canlılık yüzdeleri petri ortamında da ölçüldüğünde sonuç 72 saat grubu için değişmezken (%0), 48 saat grubu için TZ testinden daha yüksek (%91,67) olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Elde edilen bu sonuçlar 72 saat çimlenen fidelerin kriyoprezervasyon sonrası canlılık yüzdesinin 48 saat çimlenen fidelerinkinden anlamlı ölçüde daha düşük olduğu ve 72 saat çimlenen fidelerin kriyoprezervasyon sonrası geri kazanımın %0'a yakın olduğunu ortaya çıkarmıştır.



Şekil 4.3: MS0 besisi ortamında 15 günlük inkübasyonun ardından 48 saat (a) ve 72 saat (b) *in vitro* çimlenmiş ve kriyoprezerve edilmiş *A. thaliana* fidelerinin geri kazanımı. Barlar 1 cm'yi temsil eder.

4.2. Moleküler Analizler

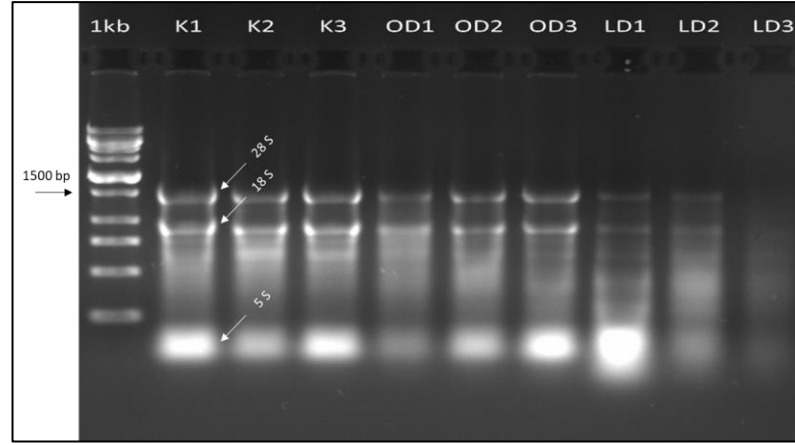
Hem 48 saat, hem de 72 saat çimlenip kriyoprezerve edilen *Arabidopsis thaliana* fidelerin canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında iki grup arasındaki büyük farkı moleküler anlamda anlayabilmek için bu süreçte maruz kaldığı stresler göz önünde bulundurularak seçilen 10 miRNA ve bunlardan bazılarının hedef genlerinin anlatım analizlerini gerçekleştirmek için kriyoprezervasyon öncesi, sırası ve sonrasında ilgili grup bitkilerden total RNA izolasyonu, takiben cDNA sentezi ve qRT-PCR çalışmaları yapılmıştır.

4.2.1. Total RNA İzolasyonu

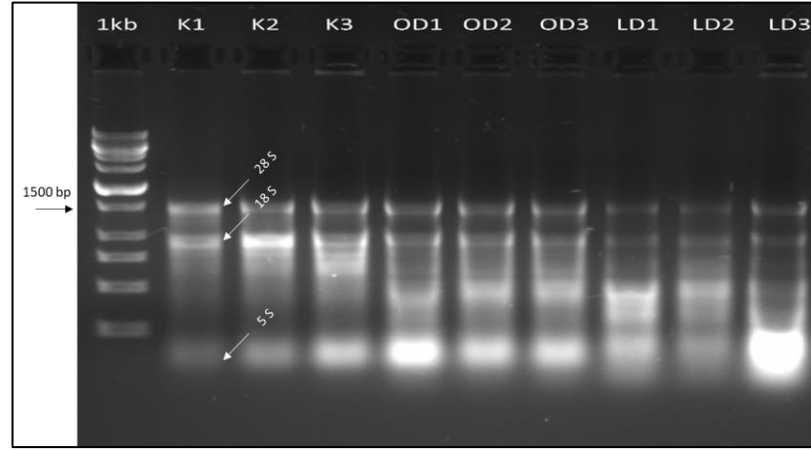
48 saat ve 72 saat çimlendirilen *Arabidopsis thaliana* fidelerinden ve kriyoprezervasyonun farklı aşamalarında alınan fidelerden TRIzol kullanılarak izole edilen total RNA'ların NanoDrop değerleri Tablo 4.1'de, %1'lik agaroz jel görüntüleri ise Şekil 4.4, Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.1: 48 saat ve 72 saat grubuna ait RNA izolatlarının NanoDrop sonuçları.

48 saat	Konsantrasyon (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
K1	335,93	1,97	0,95
K2	410,17	1,86	0,66
K3	711,01	1,93	0,92
OD1	251,45	1,92	0,72
OD2	326,14	1,89	0,56
OD3	382,79	1,95	0,81
LD1	436,54	1,98	0,90
LD2	253,44	1,91	0,55
LD3	154,90	1,82	0,28
72 saat	Konsantrasyon (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
K1	2076,84	1,89	0,86
K2	2103,25	1,91	0,81
K3	256,67	1,97	1,01
OD1	212,72	1,99	1,40
OD2	274,42	2,02	1,46
OD3	362,58	2,05	1,58
LD1	213,48	2,04	0,96
LD2	162,67	2,01	0,84
LD3	427,37	2,04	1,60



Şekil 4.4: 48 saat çimlenen *Arabidopsis thaliana* fidelerinin tüm kriyoprezervasyon aşamalarından izole edilen total RNA'ların %1'lik agaroz jelde görünümü, kontrol grubu (K), sıvı azot öncesi grubu (ozmokoruma ve dehidratasyon; OD) ve sıvı azot sonrası grubu (sıvı azot ve dilüsyon; LD).

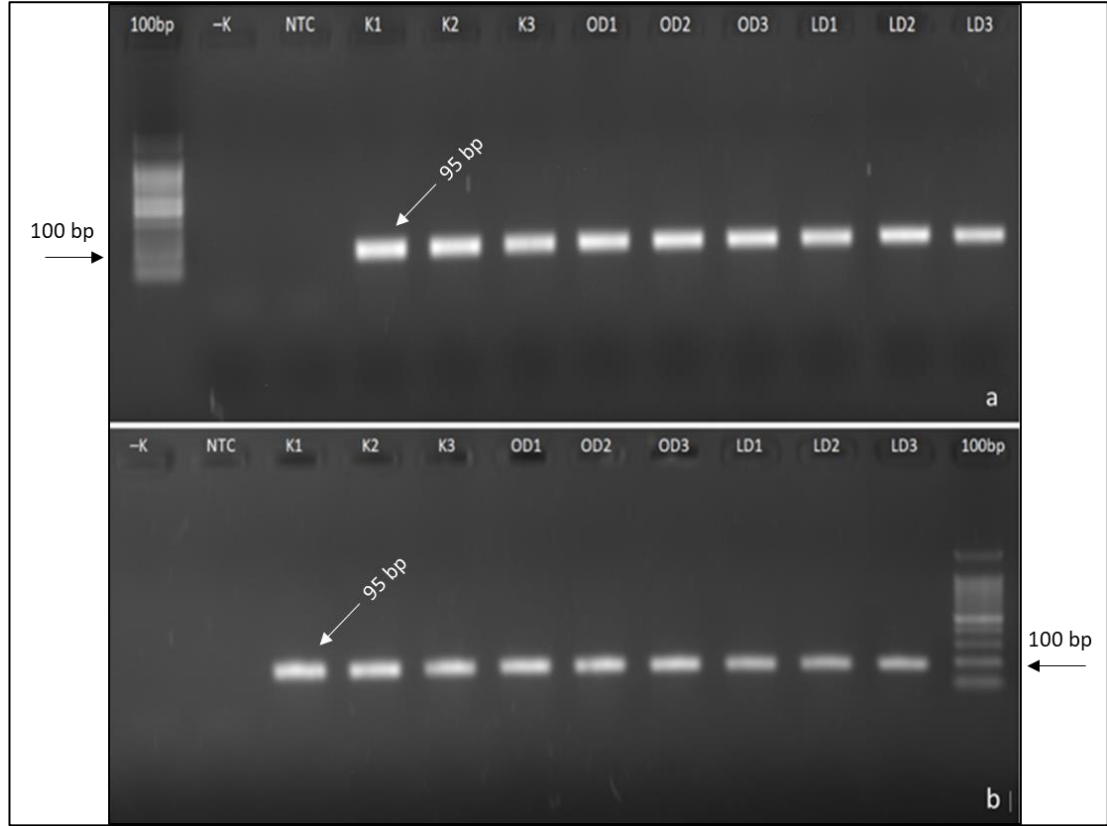


Şekil 4.5: 72 saat çimlenen *Arabidopsis thaliana* fidelerinin tüm kriyoprezervasyon aşamalarından izole edilen total RNA'ların %1'lik agaroz jelde görünümü, kontrol grubu (K), sıvı azot öncesi grubu (ozmokoruma ve dehidratasyon; OD) ve sıvı azot sonrası grubu (sıvı azot ve dilüsyon; LD).

4.2.2. Total RNA'lardan cDNA Sentezi

miRNA'ların cDNA sentezi "RevertAid First Strand cDNA Synthesis" kiti kullanılarak 48 ve 72 saat tüm örneklerden (K1, K2, K3, OD1, OD2, OD3, LD1, LD2 ve LD3) SL primer karışımları ile 2'şer set olarak [SL Miks1 (miR159, miR169, miR172, miR319 ve miR394), SL Miks2 (miR156, miR393, miR397, miR398 ve miR408)], hedef genlerin, soğuk-ilişkili genlerin ve iç kontrol geninin cDNA sentezi ise yine aynı örneklerden rastgele heksamer primerler ile tek set olarak gerçekleştirilmiştir. Rastgele heksamer primerler ile elde edilen cDNA'lar

kullanılarak, iç kontrol geni UBQ5 primerleri ve hem 48 saat hem de 72 saat örnekleri kontrol PCR gerçekleştirilmiş ve PCR ürünü %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.6). PCR 12,5 mM MgCl₂ içeren “5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (Solis Biodyne)” kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6: UBQ5 primeri ile gerçekleştirilen kontrol PCR ürünlerinin %1 agaroz jel elektrofez görüntüsü. a) 48 saat UBQ5 ve b) 72 saat UBQ5 (beklenen band büyüklüğü: 195bp), Negatif kontrol (-K), NTC, kontrol grubu (K1, K2, K3), sıvı azot öncesi grubu (ozmokoruma ve dehidratasyon; OD1, OD2, OD3), sıvı azot sonrası grubu (sıvı azot ve dilüsyon; LD1, LD2, LD3).

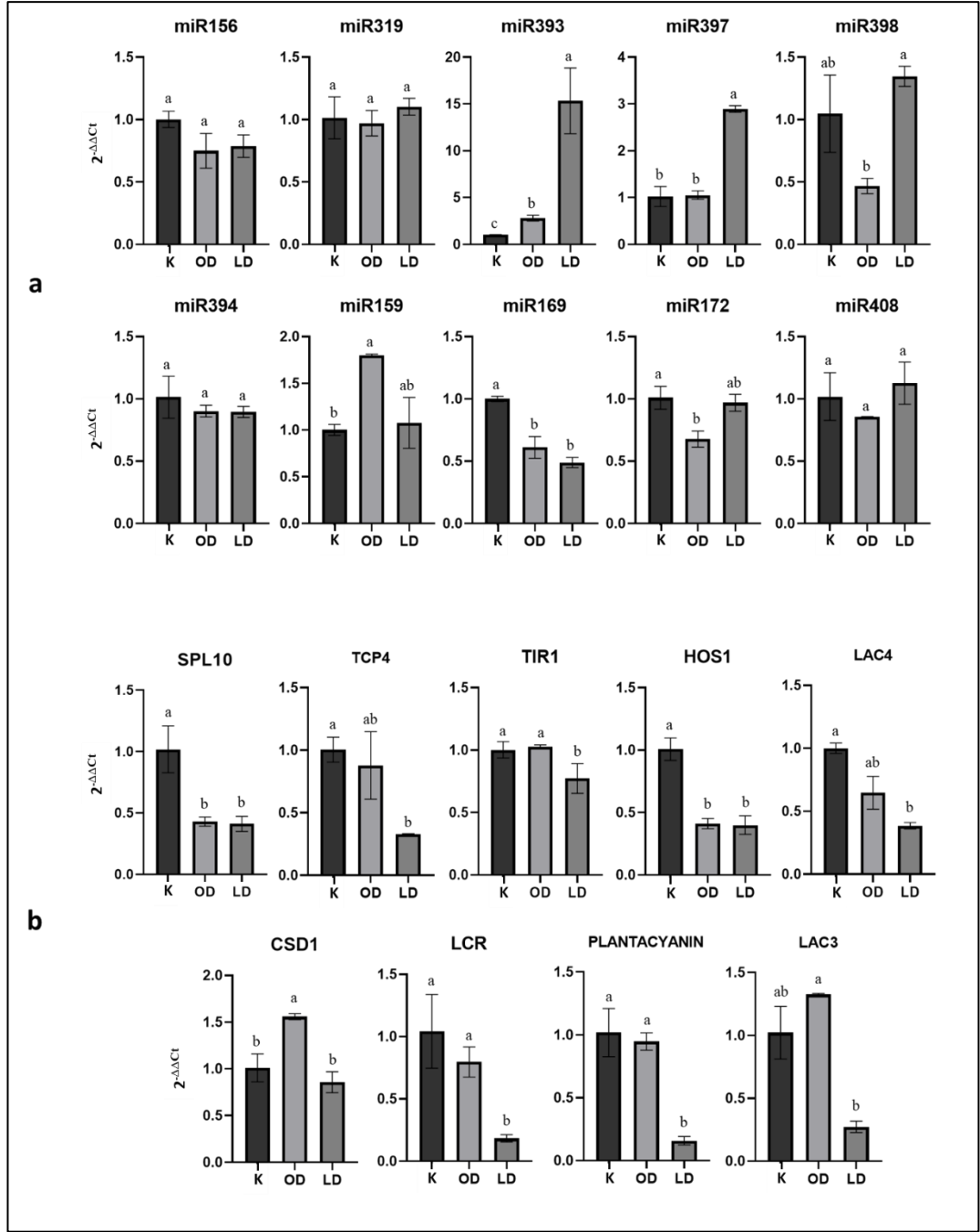
4.2.3. cDNA'lar Kullanılarak qRT-PCR Analizleri

Farklı çimlenme süreleri (48 saat ve 72 saat) sonrasında kriyoprezerve edilen *Arabidopsis* fidelerinin kriyoprezervasyonu sırasında ve sonrasında alınan fidelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak sentezlenen cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı 10 miRNA, 9 hedef gen ve 4 soğuk ilişkili genin primerleri ile gerçekleştirilen qRT-PCR reaksiyonu ile ilgili süreçteki olası gen anlatım değişimleri analiz edilmiştir.

4.2.3.1. 48 Saatlik Fidelerde miRNA'ların ve Seçilen Hedef Genlerin Anlatımı

4 miRNA'nın (miR156, miR319, miR394 ve miR408) anlatım düzeyi 48 saatlik fidelerde sabit kalırken, 6 miRNA (miR393, miR397, miR398, miR159, miR169 ve miR172) ozmokoruma ve SA'da saklama karmaşık bir model göstermiştir. Örneğin, miR393 anlatımı OD örneklerde 2 kat artmış, sıvı azot ile muamele edilmiş olanlarda ise 15 kat artmıştır. Ayrıca, 48 saatlik fidelerde oksidatif stresle ilişkili olan iki miRNA, miR397 ve miR398'de anlatım düzeylerinde değişim tespit edildi. OD'de, bu miRNA'ların anlatım düzeyleri indüklenmemiştir ancak LD'de, kontrole kıyasla miR397'de üç kat bir artışa yol açmıştır. Yaklaşık olarak, LD örneklerinde OD'ye kıyasla miR397 ve miR398 anlatım düzeylerinde üç kat artış gözlenmiştir. Öte yandan, miR172 anlatımı sadece OD ile muamele edilmiş fidelerde azalırken, LD numunelerinde kontrol fidelerine kıyasla daha kararlıdır. Aksine, miR159'un anlatım düzeyi OD fidelerinde artmış ve sıvı azot muamelesinden sonra düşmüştür, ancak bu değişiklik anlamlı değildir (Şekil 4.7a, Şekil 4.10a).

Her ne kadar yukarıda belirtilen miR156, miR319, miR394 ve miR408 anlatım düzeylerinde istatistiksel olarak bir değişiklik olmasa da, hedef genleri hem OD hem de LN grubu örneklerde (SPL10) veya sadece LD grubu fidelerde (LCR, TCP4 ve PLANTACYANIN ve LAC3) azalmıştır (Şekil 4.7b). LD örneklerinde miR393 ve miR397'nin artan anlatımına göre hedef genleri TIR1, HOS1 ve LAC4'ün anlatım düzeyleri düşmüştür. CSD1'in anlatım düzeyi OD numunelerinde artmış daha sonra LD fidelerinde kontrol düzeylerine düşmüştür (Şekil 4.7b, Şekil 4.10c).

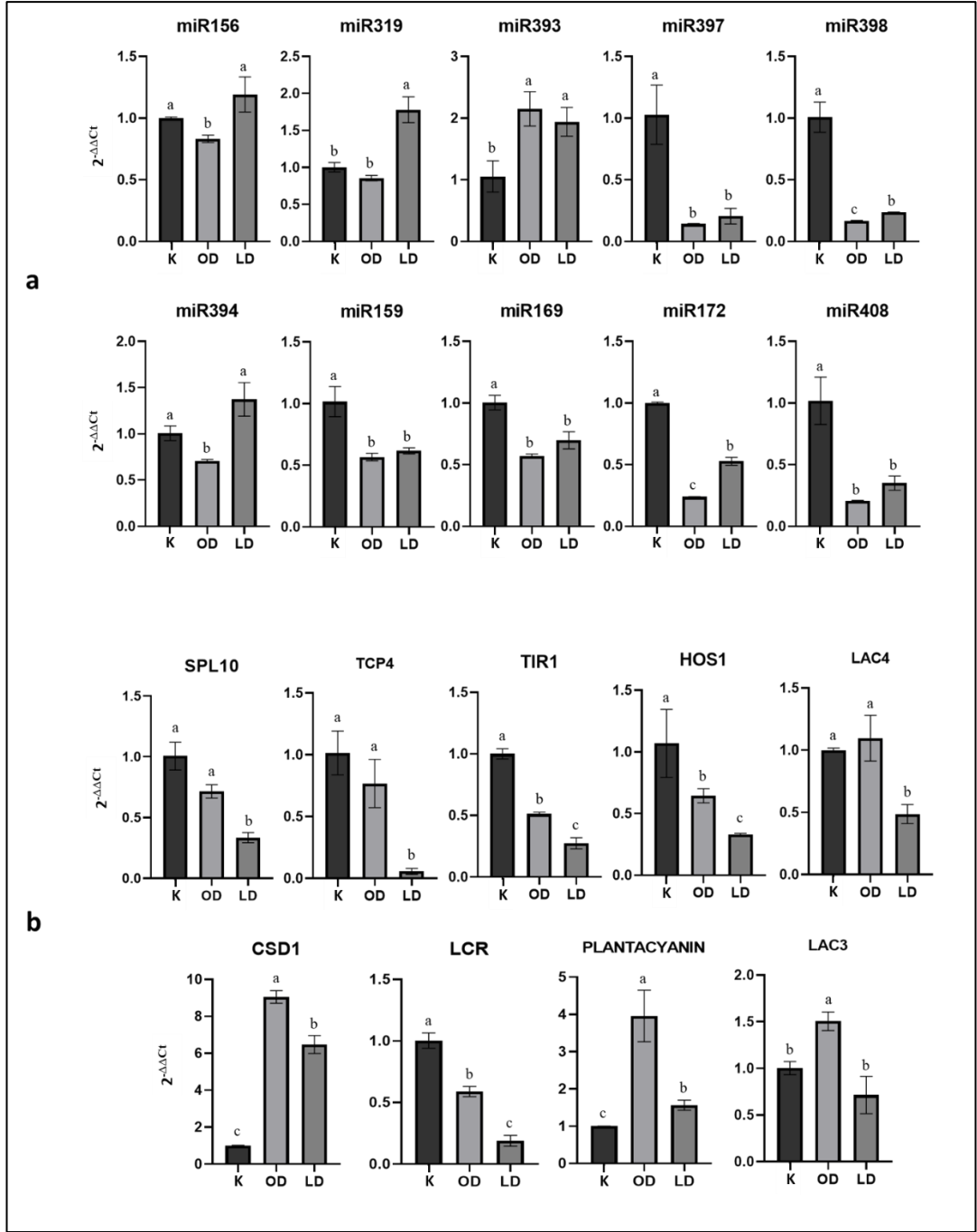


Şekil 4.7: 48-saat *in vitro* çimlendirilmiş *A. thaliana* fidelerinin kriyoprezervasyon aşamalarında farklılaşmış olarak anlatılan miRNA'ların (a) ve bunların hedef genlerinin (b) kantitatif analizi. K: Herhangi bir muamele olmayan kontrol fideler, OD: sıvı azota daldırılmadan önceki fideler (ozmokoruma ve dehidratasyon), LD: sıvı azota daldırıldıktan sonraki fideler (SA'da hızlı soğutma ve dilüsyon). Barlar standart hatayı, farklı harfler ise her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder ($P < 0.05$).

4.2.3.2. 72 Saatlik Fidelerde miRNA'ların ve Seçilen Hedef Genlerin Anlatımı

Test edilen 6 miRNA'nın (miR397, miR398, miR159, miR169, miR172 ve miR408) anlatım düzeyi, kontrol ile karşılaştırıldığında OD ve LD işlemlerine maruz bırakılan 72 saatlik fidelerde önemli ölçüde azalmıştır. miR156 ve miR394'ün OD örneklerinde anlatımında bir düşüş saptanırken, LD fidelerinde kontrol düzeyine göre artış gözlenmiştir. Diğer yandan, miR393 anlatımı OD ve LD örneklerinde 2 kat artmıştır. Benzer şekilde, miR319 LD örneklerinde neredeyse 1.7 kat indüklenmiştir, ancak kontrol ile karşılaştırıldığında 72 saatlik fidelerin OD örneklerinde kararlı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8a, Şekil 4.10b).

Hedef gen anlatımı ile ilgili olarak, miR319 anlatımındaki artıştan ötürü LN örneklerinin TCP4 anlatımında 20 kat azalma tespit edilmiştir. miR393 anlatımındaki artışla uyumlu bir şekilde hem OD hem de LN örneklerinde TIR1 ve HOS1 anlatımında önemli bir düşüş belirlenmiştir. Aksine, CSD1 anlatımı OD ve LD'ye maruz bırakılan 72 saatlik fidelerde (sırasıyla 9 kat ve 6.5 kat) artmıştır. Koordineli olarak, miR398'in anlatımı bu koşullarda dikkate değer ölçüde azalmıştır. Benzer şekilde, PLANTACYANIN'in gen anlatımı, 72 saatlik fidelerin OD ve LD örneklerinde miR408 anlatımının düşmesi nedeniyle sırasıyla 3.9 kat ve 1.5 kat artmıştır. Ek olarak, miR408'in diğer hedef geni olan LAC3, OD örneklerinde artarken, LD fidelerinde kontrol düzeylerinde bir düşüş gözlenmiştir. Bununla birlikte, LD örneklerinde miR394'in anlatımında kontrole kıyasla istatistiksel bir fark görülmesi de, hedefi olan LCR'de 5 kat düşüş gözlenmiştir. miR156'nın hedefi olan SPL10 aynı anlatım modelini sergiledi. Ayrıca, OD ve LD fidelerinde miR397'nin anlatımındaki azalmadan bağımsız olarak LAC4 anlatımı, sadece LD ile muamele edilmiş 72 saatlik fidelerde önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.8b, Şekil 4.10d).

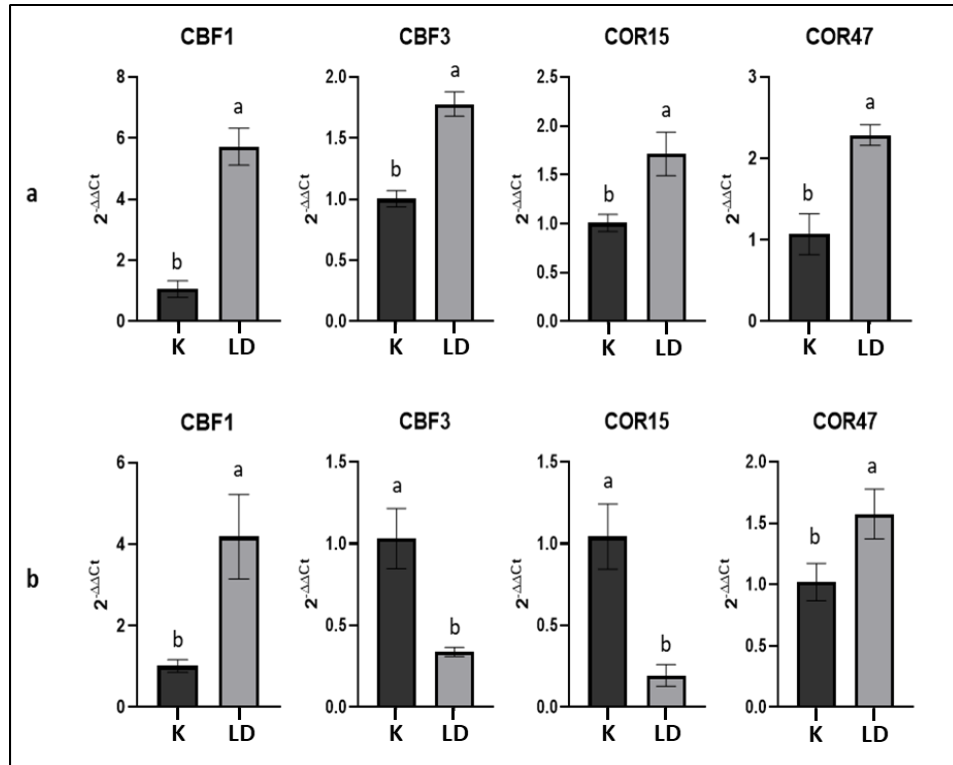


Şekil 4.8: 72-saat *in vitro* çimlendirilmiş *A. thaliana* fidelerinin kriyoprezervasyon aşamalarında farklılaşmış olarak anlatılan miRNA'ların (a) ve bunların hedef genlerinin (b) kantitatif analizi. K: Herhangi bir muamele olmayan kontrol fideler, OD: sıvı azota daldırılmadan önceki fideler (ozmokoruma ve dehidratasyon), LD: sıvı azota daldırıldıktan sonraki fideler (SA'da hızlı soğutma ve dilüsyon). Barlar standart hatayı, farklı harfler ise her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder ($P < 0.05$).

Daha önce dehidratasyon (OD) aşamasının kriyoprezervasyondan sonra hayatta kalmak için kritik öneme sahip olduğu bildirilmiş (Engelmann 2004; Ren et al., 2015) olmasına rağmen, soğukta maruz kalma da *A. thaliana* fidelerinin geri kazanılması için önemli görünmektedir. Bu nedenle, tez çalışmasında, yüksek antioksidan durumu ve oksidatif stres tepkisi ile birlikte, miRNA'larla ilişkili soğuk ilişkili genlerin ve hedef genlerin anlatım düzeylerinin değişmesinin, başarılı kriyoprezervasyon protokollerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, abiyotik stres ve gelişim aşamaları ile ilişkili miRNA'larla elde edilen sonuçlar, *A. thaliana* fidelerinde çimlenme süresinin uzamasının, uzun süreli depolama sırasında meydana gelen streslere karşı toleransın azalmasına neden olduğunu göstermiştir.

4.2.3.3. Soğuk İlişkili Genlerin (CBF'ler ve COR'lar) Anlatımı

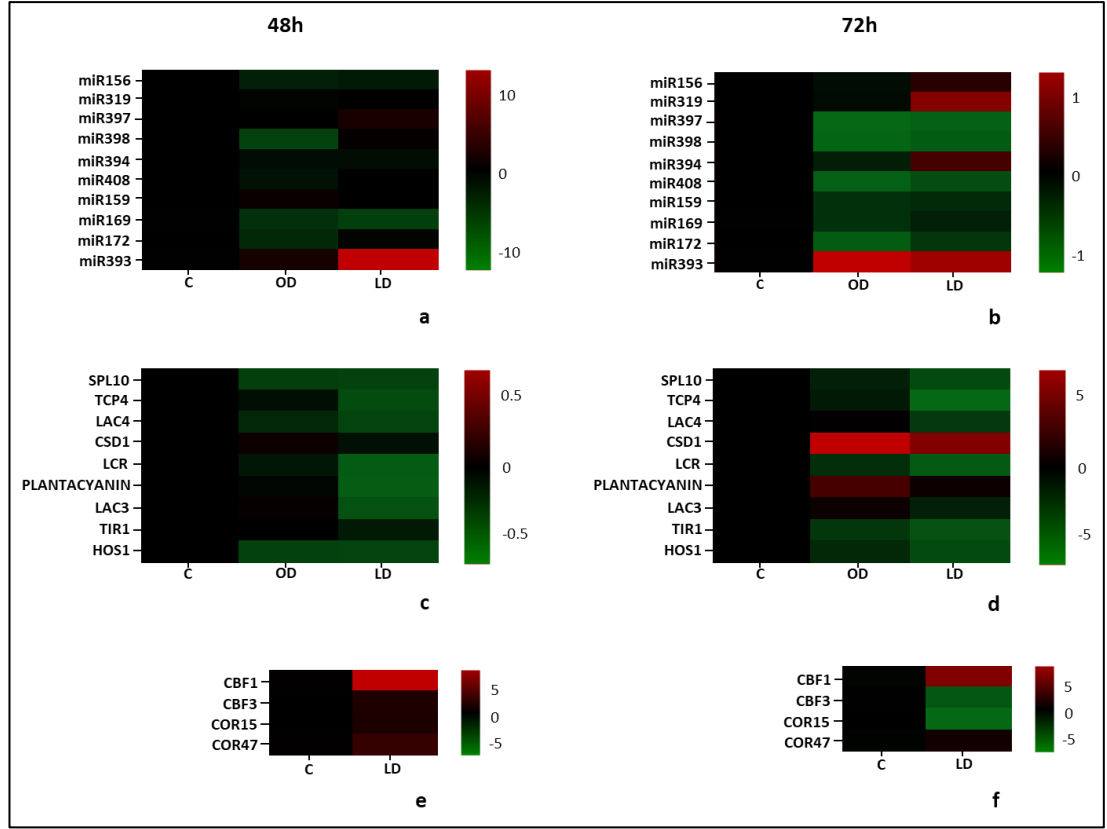
Kriyoprezerve edilmiş *Arabidopsis thaliana*'da miR393 ve miR397'nin düzenlediği soğuk toleransının yolunu anlamak için CBF1 ve CBF3 transkripsiyon faktörlerinin ve bunların alt genlerinin (COR15 ve COR47) anlatım düzeyleri qRT-PCR ile değerlendirilmiştir. 48 saat ve 72 saat çimlenen *Arabidopsis thaliana* tohumlarından gerçekleştirilen kriyoprezervasyon aşamalarından örnek olarak RNA izolasyonu ve akabinde bunlardan sentezlenen cDNA'ların kullanıldığı gen anlatım çalışmalarına ait tüm qRT-PCR analizi sonuçlarından elde edilen verilerin istatistiksel olarak işlenmesi sonucu oluşturulan grafikler Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9: 48-saat (a) ve 72- saat (b) *in vitro* çimlendirilmiş *A. thaliana* fidelerinin kriyoprezervasyon aşamalarında farklılaşmış olarak anlatılan soğuk ilişkili genlerin (CBF'ler ve COR'lar) kantitatif analizi. K: Herhangi bir muamele olmayan kontrol fideler, LD: sıvı azota daldırıldıktan sonraki fideler (SA'da hızlı soğutma ve dilüsyon). Barlar standart hatayı, farklı harfler ise her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder ($P < 0.05$).

Soğuk-ilişkili transkripsiyon faktörleri ve genlerinin (CBF1, CBF3, COR15 ve COR47) anlatım düzeyleri, kontrole kıyasla 48 saat - LD örneklerinde önemli ölçüde artmıştır (Şekil 4.9a, Şekil 4.10e). CBF1 ve CBF3 anlatımı, 48 saat - LD örneklerinde sırasıyla 5.7 ve 1.8, COR15 ve COR47 anlatımı ise sırasıyla 1.7 ve 2.3 kat artmıştır. Aksine, 72 saat - LD örneklerinde CBF3 anlatımında önemli bir azalma (5.2 kat) gözlenirken COR15'in anlatımı, kontrole kıyasla 2.9 kat azalmıştır (Şekil 4.9b, Şekil 4.10f). CBF1 ve COR47'in anlatımı ise sırasıyla 4.1 ve 1.5 kat yükselmiştir.

48 ve 72 saat çimlenen *Arabidopsis* fidelerinin kriyoprezervasyonu sonrası ve sonrasında alınan fidelerden izole edilen RNA örneklerinden sentezlenen cDNA'lar ile 10 miRNA, 9 hedef geni ve 4 soğuk-ilişkili gene ait primerler kullanılarak çalışılan qRT-PCR çalışmalarına ait tüm sayısal veriler Tablo B1.2'de ve bu veriler ile oluşturulan ısı-haritası grafikleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



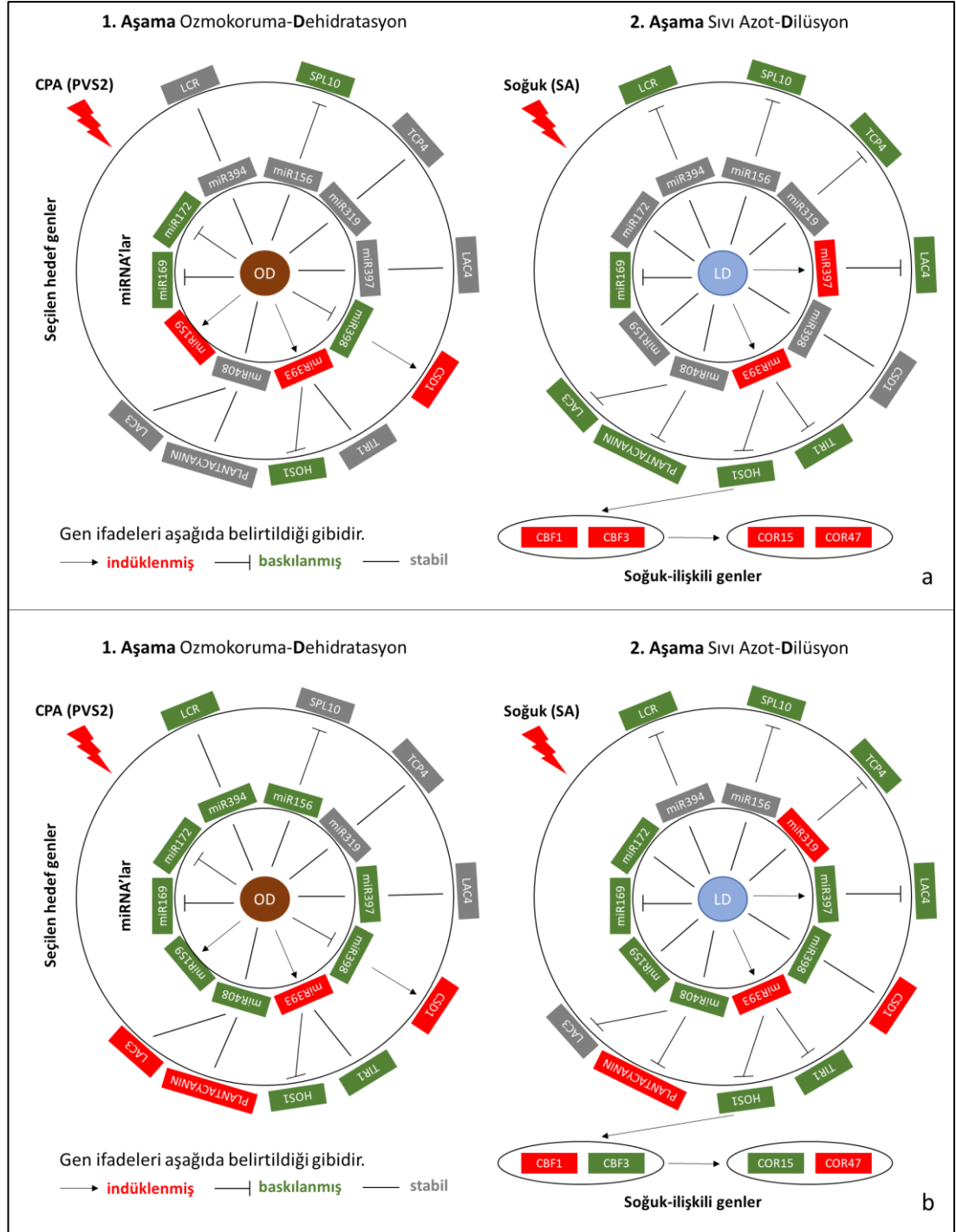
Şekil 4.10: 48- ve 72-saat *in vitro* çimlendirilmiş *A. thaliana* fidelerinin kriyoprezervasyon aşamalarında farklılaşmış olarak anlatılan miRNA'ların (a, b), bunların hedef genlerinin (c, d) ve soğuk-ilişkili genlerin (e, f) qRT-PCR analizlerinin ısı haritası. Genlerin anlatım düzeyleri kontrole kıyasla $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formatına dönüştürülmüş kat değıştirme değeri olarak sunulmuştur. Anlatım düzeyi artan genler kırmızı ve anlatım düzeyi azalan genler ise yeşil renkle gösterilir. Sağdaki çubukta gösterildiğı gibi, anlatım farklılıkları arttıkça rengin yoğunluğu artar.

5. TARTIŞMA

Birçok farklı bitkide kriyoprezervasyonu için çeşitli teknikler geliştirilmiş olmasına rağmen, bazı türlerde [örn; fıstık (Ozden-Tokatli ve ark. 2009), cennet ağacında (Scocchi ve ark. 2007)] halen sıvı azotta dondurulma ve çözündürülme sonrasında nispeten düşük sağkalım oranları gözlenmektedir. Bu süreçte bitkiler birçok strese maruz kalmaktadır. Dahası, şimdiye kadar, bitkilerin kriyoprezervasyon sırasında abiyotik streslere karşı toleransını artırmak için benzersiz bir bileşik veya hatta metabolik yol yoktur. Bununla birlikte, bitkilerin başarılı bir şekilde uzun süreli saklanabilmesi için anahtar adımın, dehidratasyon, donma ve bu koşulların oluşturduğu oksidatif strese karşı tolerans olduğu iyi bilinmektedir (Folgado ve ark. 2015). Ayrıca, bu streslere tolerans, kriyoprezerve edilen *A. thaliana*'nın fide yaşları ile de doğrudan ilişkilidir. Ren ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada, *A. thaliana*'nın 48 saatlik fidelerinde kriyoprezervasyon sonrası geri kazanım sağlanabilirken, 72 saatlik fideler kriyojenik işlem后会 sonra ölmüştür (Ren ve ark. 2013). Destekleyici olarak, bu tez çalışmasında da, 48 saat çimlendirilmiş *A. thaliana* fidelerinde kriyoprezervasyon sonrası MS0 besi ortamındaki 15 günlük kültürlerinde %91,7 oranında geri kazanım gözlenirken, 72 saatlik çimlendirilmiş fideelerde kriyoprezervasyondan sonra hayatta kalma kaydedilmemiştir (Şekil 4.3).

Soğuk, ABA, dehidrasyon ve tuz stresleri gibi abiyotik streslerin miR393, miR397b, miR402 anlatımlarını indüklediği iyi bilinmektedir [Sunkar and Zhu 2004]. Birçok bitki türünde mevcut korunmuş bir miRNA ailesi olan miR393'in [Bian et al., 2012] anlatımı tez çalışmamızda da özellikle 48 saatlik örneklerde dikkate değer bir şekilde artmıştır (Şekil 4.7a ve Şekil 4.10a). Daha önce dört F-box geni, TIR1, AFB1, AFB2 ve AFB3, miR393 için hedef olarak belirlenmiştir [Jones-Rhoades and Bartel 2004], [Parry et al., 2009]. Tez çalışmasında, kriyoprezervasyon uygulaması sırasında miR393 anlatımındaki değişiklikleri değerlendirmek için F-box / RNI benzeri süper aile proteini TIR1 seçilmiştir. miR393'ün (15 kat) artışına uygun olarak, TIR1 anlatımı SA ile muamele edilmiş 48 saatlik fideelerde azalmıştır. Benzer şekilde, 72 saatlik fideelerde miR393 anlatım düzeyinde bir artış (Şekil 4.8a ve Şekil 4.10b) ve TIR1'de ise azalış (Şekil 4.8b ve Şekil 4.10d) gözlenmiştir. miR393 anlatımındaki elde edilen bu tür farklılaşan anlatım düzeyi, bu miRNA'nın bir başka hedef geni HOS1'in baskılanmasıyla anlatımı artan RD29A (COR78), COR47, COR15 ve KIN1 gibi

soğuk ilişkili proteinler nedeniyle SA muamelesinden sonra 48 saat çimlenmiş fidelerde nispeten daha yüksek sağkalımın meydana gelmesinde rol oynadığını göstermiştir (Şekil 5.1a) [Liu et al., 2008]. Bu proteinler arasında, COR15'in, kararsız soğuk laktat dehidrojenaz enzimini [Lin ve Thomashow 1992] etkili bir şekilde koruduğu ve aynı zamanda donma sırasında hassas membranları stabilize ettiği için güçlü kriyoprotektif aktiviteye sahip olduğu iyi bilinmektedir [Thalhammer and Hinch 2014]. Bu nedenle, 48 saatlik fidelerde elde edilen nispeten yüksek hayatta kalma oranları, miR393 anlatımının yükselmesinin bir sonucu olarak HOS1'i baskılayarak muhtemelen COR15 ve diğer soğuk ilişkili proteinlerin indüklenmesiyle hassas membranların daha stabil hale gelmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca, TIR1 transkript düzeyi soğuk stresi altında düştüğünden, miR393 soğuk yanıtı verme sırasında membran stabilizasyonu için de önemli olan şeker sinyallerini stres yanıtlarıyla birleştirebilir [Sunkar et al., 2007]. Bu varsayım, ciddi membran lipid peroksidasyonunun 72 saatlik fidelerin düşük hayatta kalma nedenlerinden biri olduğu tespit edilen Chen ve arkadaşlarının (2015) çalışması ile de tutarlıdır.



Şekil 5.1: 48 saat (a) ve 72 saat (b) çimlenme sonrası kriyoprezerve edilmiş *A. thaliana* fidelerinde kuraklık, soğuk ve oksidatif stres ile ilişki miRNA'ların (iç çember), onların seçilmiş hedef genlerinin (dış çember) ve soğuk-ilişkili genlerin stres durumunda düzenlenme mekanizmalarının diagramı.

48 saat örneklerindeki soğuk ilişkili proteinlerin artması, 48 saatlik çimlenmiş LD fidelerinde (Şekil 4.7a ve Şekil 4.10a) miR397'nin anlamlı artışıyla (yaklaşık 3 kat) da kanıtlanabilir. Dong ve Pei (2014) bitkinin soğuk stresine toleransında görev alan CBF ve COR genlerinin transkript düzeylerinin indüklenmesi ile sonuçlanan

miR397'nin aşırı anlatımını göstererek bu miRNA'nın *A. thaliana*'da soğuk stresine yanıtta düzenleyici bir fonksiyonu olduğunu rapor etmiştir. Benzer şekilde, CBF1 anlatımı *Arabidopsis*'te 4°C'ye maruz kaldıktan sonraki bir saat içinde yaklaşık 3 kat uyarılmıştır [Fowler ve Thomashow 2002]. Tez çalışmasında, miR397'nin anlatımı 72 saatlik çimlenmiş OD ve LD örneklerinde belirgin şekilde (5 kat) düşmüştür (Şekil 4.8a ve Şekil 4.10b). Bu miRNA'nın bir kazein kinaz beta alt birimi 3 ve iki farklı lakkazı (LAC17 ve LAC4) hedeflediği bilinmektedir [Sunkar and Zhu 2004], [Li et al., 2010]. Bu çalışmada LAC4 anlatımı miR397'nin artışı ile uyumlu olarak 48 saatlik LD örneklerinde (Şekil 4.7b ve Şekil 4.10c) 2.6 kat azalmıştır. Her ne kadar 72 saatlik OD ve LD örneklerinde miR397'nin anlatımı 5 kat azalmış olsa da, hedef genin LAC4 anlatımı OD'deki kontrole göre değişmemiş ve ayrıca LD'de azalmıştır (Şekil 4.8b ve Şekil 4.10d). Yukarıda belirtilen miR393 anlatımı ile birlikte bu ilginç sonuç, 72 saat örneklerinin hayatta kalamamalarının nedenlerinden biri, miR397 anlatımının azalması ve miR393 anlatımının yeterli bir şekilde artmaması nedeniyle soğuk ilişkili genlerin anlatımının indüklenememesi olabilir.

Soğuk ilişkili genlerin anlatımının yanı sıra, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi ve serbest radikallerin antioksidan sistemlerle atılması, kriyoprezervasyon sürecinde bir diğer önemli faktördür [Chen et al., 2015]. *A. thaliana*'da, oksidatif stres düzeylerinin yükselmesi miR398 anlatımının azalması ile sonuçlanırken, miR398'in hedef geni CSD1 ve CSD2 transkriptleri uyarılmıştır [Khraiweh et al., 2012]. Çalışmamızda OD örneklerinde miR398 anlatımı baskılanmış, CSD1 anlatımı hem 48 saat (Şekil 4.7 ve Şekil 4.10a,c) hem de 72 saat (Şekil 4.8a ve Şekil 4.10b) örneklerinde artmış ve ardından beklenildiği gibi antioksidan tepkiler gerçekleşmiştir. Bununla birlikte, miR398 anlatımındaki düşüş ve CSD1 transkriptinin indüklenmesi, 72 saatlik fidelerde daha belirgindir (8 kat). Bu da muhtemelen söz konusu fidelerde kriyoprezervasyon sonrası önemli ölçüde düşük hayatta kalmalarında rol oynayabilecek daha ciddi oksidatif hasarın oluştuğunu gösterir. Bu varsayım, oksidatif strese maruz kaldıktan sonra membran lipid peroksidasyonundan dolayı ozmokoruma ve dehidratasyon sırasında 48 saatlik numunelere kıyasla 72 saatlik fidelerde nispeten düşük oksidatif fosforilasyonun kaydedildiği Ren ve çalışma arkadaşlarının (2013) sonuçları ile aynı görüştedir. LD ile ilgili olarak, SA işlemi, miR398 ve CSD1'in 48 saatlik fidelerde anlatım değişikliklerine neden olmazken, 72 saatlik fidelerde miR398 anlatımını azaltmış ve bununla uyumlu olarak, işaret ettiğimiz gibi daha fazla oksidatif

stresin varlığının olduğu 72 saatlik fidelerde dikkate değer bir CSD1 indüksiyonuna yol açmıştır.

Dört bakır atomu içeren glikoproteinler olan ve hücre duvarı işlevinde rol oynayan lakkaz (LAC3) ve proteinler arasında elektrontransfer servisleri olarak işlev gördüğü düşünülen bakır bağlayıcı proteinleri kodlayan PLANTACYANIN [Nersissian et al., 1998], farklı abiyotik stres tepkilerinde rol oynayan önemli biyolojik yolları düzenleyen miR408 tarafından hedeflenmektedir [Sunkar and Zhu 2004], [Liu et al., 2008], [Mutum et al., 2013], [Jovanovic et al., 2014], [Zhang et al., 2014]. Ma ve arkadaşları (2015), miR408'in tuzluluk, oksidatif ve soğuk stresleri tarafından indüklendiğini, anlatımının ozmotik ve kuraklık stres koşullarında azaldığını göstermiştir. Bu çalışma ile uyumlu olarak, miR408'in anlatımı kuraklık stresi altındaki 72 saatlik OD örneklerinde azalmış ve hedef genlerinin (PLANTACYANIN ve LAC3) anlatımı aynı stres koşulundaki 72 saatlik OD örneklerinde artmıştır (Şekil 4.8 ve Şekil 4.10 b,d). miR408 anlatımının azalması ve hedef genlerinin anlatımlarının 72-saatte eşzamanlı artması muhtemelen bu fidelerin dehidratasyon stresinden daha fazla etkilendiğini göstermektedir. LD örneklerinde soğuk stresine maruz kalındığında, hedef genlerinin anlatımı 48 saatte miR408 ile ters olarak azalmıştır (Şekil 4.7a ve Şekil 4.10a). Sonuçlarımızla ilgili olarak, 72 saatlik LD örneklerinde miR408'in azalması, oksidatif stresin neden olduğu artan lipid peroksidasyonu ile açıklanabilir [Ren et al., 2013]. Bu nedenle, ilgili anlatımın azalması muhtemelen bitkileri oksidatif strese karşı daha hassas hale getirmiş ve 72 saatlik çimlenmiş *A. thaliana* fidelerinin kriyoprezervasyonu sonrasında düşük bir geri kazanım oranı ile sonuçlanmıştır.

A. thaliana'da gen anlatımını değiştiren bir başka miRNA, kuraklık stresinde anlatımları azalan ve transkripsiyon sonrası düzeyde hedef genleri NFYA5'in düzenlenmesinde çok önemli rol alan miR169a ve miR169c Li ve arkadaşları (2008) tarafından rapor edilmiştir. Sonuçlarımız, miR169'un anlatımının hem 48 saat (Şekil 4.7a ve Şekil 4.10a) hem de 72 saat (Şekil 4.8a ve Şekil 4.10b) OD ve LD örneklerinde düştüğünü göstermiştir. Ek olarak, miR159 anlatımı 72 saatlik örneklerde hem OD hem de LD'de azalmıştır (Şekil 4.8a ve Şekil 4.10b), ancak 48 saatlik örneklerde LD'de kontrol düzeyine düşerken, OD'de 1.8 kat artmıştır (Şekil 4.7a ve Şekil 4.10a). Bu sonuç, Reyes ve Chua'nın (2007) çalışmasında, miR159'un *A. thaliana* tohumlarının erken çimlenme evrelerinde kuraklık stresine neden olduğunu belirttiği çalışmasına uygundur.

Abiyotik stres ile ilişkili miRNA'ların yanı sıra, gelişim ile ilişkili miRNA'ların da kriyoprezervasyon sonrası geri kazanımda rol oynadığı varsayılmaktadır. Bu nedenle, farklı kriyoprezervasyon basamaklarında miR156, miR319 ve miR394'ün anlatım düzeyleri bu çalışmada değerlendirilmiştir. Genç fidelerde yüksek oranda ifade edilen miR156 [Xu et al., 2016] kuraklık stresinde önemli ölçüde (2.1 kat) azalmış [Zhou et al., 2010], tuz stresi altında ise (1.56 kat) artmıştır [Liu et al., 2008]. miR156 bu çalışmada kriyoprezervasyonun ozmokokoruma ve dehidratasyon basamağı nedeniyle 72 saatlik OD örneklerinde önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.8a ve Şekil 4.10b). Ancak, 72 saatlik LD örneklerinde (Şekil 4a) ve hem genç-yetişkin vejetatif hem de vejetatif-üreme fazının geçişini kontrol eden hedef geni SPL10'nun anlatımı aynı örneklerde (miR156-SPL yolunun, *A. thaliana*'da soğuk stres altında etkili olmadığı bildirildiği halde [Khraiwesh et al., 2012]) ilginç bir şekilde azalmıştır (Şekil 4b). Bununla birlikte, 72 saat örneklerinde miR156'nın indüksiyonu, abiyotik stres koşullarında juvenil durumun uzun süre korunmasından kaynaklanabilir. Ayrıca, juvenil durumdan erişkinliğe geçişe izin vermek için anlatımı baskılanmıştır [Cui et al., 2014]. Ancak, *A. thaliana*'da çimlenmenin ilk aşamalarındaki gen anlatım düzeylerini değerlendirdiğimiz çalışmamızda bu baskının görülmesi için erken olduğu düşünülmektedir.

miR319, hedef geni TCP ailesi transkripsiyon faktörlerini düzenler. TCP transkripsiyon faktörleri ise hormon biyosentezi, sinyalizasyon, hücre çoğalması ve farklılaşma bitki gelişim süreçleri, özellikle yaprak morfogenezi dahil olmak üzere çoklu biyolojik yolların düzenlenmesinden sorumludur [Schommer et al. 2012]. miR319'un anlatımı *A. thaliana*'da soğuk stresi altında artmıştır [Liu et al, 2008], [Sunkar and Zhu 2004]. Tez çalışmasında, miR319'daki anlatım değişikliğinin hedef geni TCP4 ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. miR319 anlatımı 72 saat LD örneklerinde artmış, TCP4 anlatımı ise azalmıştır (Şekil 4.8 ve Şekil 4.10b,d). Her ne kadar miR319 anlatım düzeyi, 48 saatlik LD örneklerinde (Şekil 4.7a ve Şekil 4.10a) kontrole kıyasla değişmese de, 72 saatlik LD örneklerinde artışı 72 saatlik çimlenen fidelerin kriyoprezervasyon sırasında soğuk stresinden daha fazla etkilendiğini gösterebilir.

Yaprak morfolojik gelişiminde ve kuraklık [Ni et al., 2012], [Song et al., 2013], tuzluluk [Song et al., 2013] ve soğuk [Song et al., 2016] gibi abiyotik streslerin düzenlenmesinde görev alan bir başka miRNA, miR394 [Song et al., 2012] olarak rapor edilmiştir. Sonuçlarımız, 48 saat örneklerinde miR394'ün anlatım düzeyinde (Şekil 4.7a ve Şekil 4.10a) anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermiş, ancak 72

saatlik LD örneklerinde miR394 anlatımında artış ve hedef geninde (LCR) azalış görülmüştür (Şekil 4.8 ve Şekil 4.10 bd). 72 saat örneklerinde LD'de miR394 ve LCR'nin anlatımlarındaki değişiklik muhtemelen 72 saat çimlenen fidelerin, abiyotik strese 48 saatlik fidelerden daha duyarlı olduğu bir kez daha göstermiştir.

Daha önce dehidratasyon (OD) aşamasının kriyoprezervasyondan sonra hayatta kalmak için kritik öneme sahip olduğu bildirilmiş [Engelmann 2004], [Ren et al., 2015] olmasına rağmen, soğukta maruz kalma da *A. thaliana* fidelerinin geri kazanılması için önemli görünmektedir. Bu nedenle, tez çalışmasında, yüksek antioksidan durumu ve oksidatif stres tepkisi ile birlikte, miRNA'larla (özellikle miR393) ve onların hedef genleri ile ilişkili, soğuk ile uyarılan genlerin anlatım düzeylerindeki değişimlerin, başarılı kriyoprezervasyon protokollerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, abiyotik stres ve gelişim aşamaları ile ilişkili miRNA'larla elde edilen sonuçlar, *A. thaliana* fidelerinde çimlenme süresinin uzamasının, uzun süreli depolama sırasında meydana gelen streslere karşı toleransın azalmasına neden olduğunu göstermiştir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında farklı çimlenme süreleri (48 ve 72 saat) sonrasında *Arabidopsis* fideleri kriyoprezerve edilmiş, kriyoprezervasyon sırası ve sonrasında fidelerin canlılıkları TZ testi ile değerlendirilmiş, bu süreçte alınan örneklerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmış, cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak da ilgili miRNA'lar ve hedef genleri için qRT-PCR ile gen anlatım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen önemli sonuçlar aşağıda listelenmiştir.

- 48 saat çimlenen fideler kriyoprezervasyon sonrası canlılıklarını sürdürürken, 72 saatlik çimlenenlerin canlılığı OD (%47.4) ve LD (%8.7) basamaklarında K ile karşılaştırıldığında keskin bir düşüş göstermiştir.
- 48 saat örneklerinde miR393 anlatımı OD örneklerde 2 kat artmış, sıvı azot ile muamele edilmiş olanlarda ise 15 kat artmıştır. Ayrıca, 48 saatlik fidelerde oksidatif stresle ilişkili olan iki miRNA'dan, miR397 ve miR398'de anlatım düzeylerinde değişim tespit edilmiştir. miR393 ve miR397'nin artan anlatımına göre hedef genleri TIR1, HOS1 ve LAC4'ün anlatım düzeyleri düşmüştür. CSD1'in anlatım düzeyi OD numunelerinde artmış daha sonra LD fidelerinde kontrol düzeylerine düşmüştür.
- 72 saat örneklerinde miR397, miR398, miR159, miR169, miR172 ve miR408 anlatım düzeyi, kontrol ile karşılaştırıldığında OD ve LD işlemlerine maruz bırakılan fidelerde önemli ölçüde azalmıştır. miR319 anlatımındaki artıştan ötürü LD örneklerinin TCP4 anlatımında 20 kat azalma tespit edilmiştir. miR393 anlatımındaki artışla uyumlu bir şekilde hem OD hem de LD örneklerinde TIR1 ve HOS1 anlatımında önemli bir düşüş belirlenmiştir. Aksine, CSD1 anlatımı OD ve LD'ye maruz bırakılan 72 saatlik fidelerde (sırasıyla 9 kat ve 6.5 kat) artmıştır. Koordineli olarak, miR398 anlatımı bu koşullarda dikkate değer ölçüde azalmıştır.
- 48 saat LD örneklerinde CBF1 ve CBF3 anlatımı sırasıyla 5.7 ve 1.8 kat, COR15 ve COR47 anlatımı ise sırasıyla 1.7 ve 2.3 kat artmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Ghany S. E., Pilon M., (2008), "MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis", *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15932-15945.
- Ahmad P., Sharma S., (2008), "Salt stress and phyto-biochemical responses of plants", *Plant Soil Environment*, 54(3), 89-99.
- Akdemir H., Suzerer V., Tilkat E., Yildirim H., Onay A., Ozden-Çiftçi Y., (2013), "In vitro conservation and cryopreservation of mature pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm", *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(1), 43-51.
- Al-Ababneh S. S., Shibli R. A., Karam N. S., Shatnawi M. A., (2003) "Cryopreservation of bitter almond (*Amgdalus communis* L.) shoot tips by encapsulation-dehydration and vitrification", *Advanced HortScience*, 17, 15-20.
- Almeida, M. I., Reis, R. M., Calin, G. A., (2011). "MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1–2), 1-8.
- Alonso-Peral M. M., Sun C., Millar A. A., (2012), "MicroRNA159 can act as a switch or tuning microRNA independently of its abundance in Arabidopsis", *PLoS One* 7(4), e34751
- Alscher R. G., Donahue J. L., Cramer C. L., (1997), "Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells", *Plant Physiology*, 100(1), 224–233.
- Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S. (2002), "Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants", *Journal of Experimental Biology*, 153(1), 1331–1341.
- Aronen T., Krajinakova J., Haggman H., Ryynanen L. A., (1999), "Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*", *Plant Science*, 142, 163-172.
- Ashmore S.E., (1997), "Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation of plant genetic resources", *International Plant Genetic Resources Institute*, Rome, Italy, 11 August.
- Aukerman M. J., Sakai H., (2003), "Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes", *The Plant Cell Online*, 15(11), 2730-2741.
- Aung K., Lin S. I., Wu C. C., Huang Y. T., Su C., Chiou T. J., (2006). "pho2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene", *Plant Physiology*, 141(3), 1000-1011.

Axtell M. J., Bowman J. L., (2008). "Evolution of plant microRNAs and their targets", *Trends in Plant Science*, 13(7), 343-349.

Baker C. C., Sieber P., Wellmer F., Meyerowitz E. M., (2005), "The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*", *Current Biology*, 15(4), 303-315.

Bari R., Pant B. D., Stitt M., Scheible W. R., (2006), "PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants", *Plant Physiology*, 141(3), 988-999.

Bartel D. P., (2004), "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function", *Cell*, 116(2), 281-297.

Bartel D. P., (2009), "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions". *Cell*, 136(2), 215-233.

Basu C., (2008), "Gene amplification from cryopreserved *Arabidopsis thaliana* shoot tips", *Current Issues in Molecular Biology*, 10(1/2), 55-60.

Baumberger N., Baulcombe D. (2005), "Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(33), 11928.

Benson E. E., Bremner D. H., (2004), "Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view", *Boca Raton*, 14, 206–241.

Benson E. E., Withers L. A. W., (1987), "Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures: a non-destructive method for assessing stability", *CryoLetters*, 8, 35–46

Benson E. E., Harding K., Debouck D., Dumet D., Escobar R., Mafla G., (2011a), "Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops. Part II. Status of in vitro conservation technologies for: Andean root and tuber crops, cassava, Musa, potato, sweetpotato and yam", *Bioversity International*, Rome, IT.

Benson E. E., Reed B. M., Brennan R., Clacher K. A., Ross D. A., (1996b), "Use of thermal analysis in the evaluation of cryopreservation protocols for *Ribes nigrum* L. germplasm", *CryoLetters*, 17, 347-362.

Bian H., Xie Y., Guo F., Han N., Ma S., Zeng Z., Wang J., Yang Y., Zhu M., (2012), "Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/TIR1 homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*)", *New Phytologist*, 196(1), 149–161.

Boutet S., Vazquez F., Liu J., Béclin C., Fagard M., Gratias A., Vaucheret H., (2003), "Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance", *Current Biology*, 13(10), 843-848.

Bowler C., Slooten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., Van Montagu M., Inze D., (1991), "Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants", *EMBO Journal*, 10(1), 1723–32.

Boyko A, Kovalchuk I., (2008), "Epigenetic control of plant stress response", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 39(1), 61-72.

Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E., (2000), "Responses to abiotic stresses". In: Gruissem W., Buchanan B., Jones R., Editors, "Biochemistry and Molecular Biology of Plants", American Society of Plant Physiologists, 1158–1249.

Brettell R. I. S., Dennis E. S., (1991), "Reactivation of a silent Ac following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern", *Molecular Gene Genetics*, 229, 365–372.

Channuntapipat C., Sedgley M., Collins G., (2003), "Changes in methylation and structure of DNA from almond tissues during in vitro culture and cryopreservation", *Journal of American Society of Horticultural Science*, 128, 890–897.

Chen G. Q., Ren L., Zhang J., Reed B. M., Zhang D., Shen X. H., (2015), "Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings", *Cryobiology*, 70(1), 38-47.

Chen X., (2009), "Small RNAs and Their Roles in Plant Development", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), 21-44.

Chiou T. J., Aung K., Lin S. I., Wu C. C., Chiang S. F., Su, C., (2006). "Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*", *The Plant Cell Online*, 18(2), 412-421.

Chomczynski P., Sacchi N., (1987), "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction", *Analytical Biochemistry* 162(1), 156-159.

Chuck G., Meeley R., Irish E., Sakai H., Hake S., (2007), "The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/ in determinate spikelet1", *Nature Genetics*, 39, 1517–1521.

Corredoira E., San-José M.C., Vieitez A. M., Ballester A., (2007), "Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91, 281-288.

Cruz de Carvalho M. H., (2008), "Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling", *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156-165.

Cui L. G., Shan J. X., Shi M., Gao J. P., Lin H. X., (2014), "The miR156-SPL 9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants", *The Plant Journal* 80(6), 1108-1117.

Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F., (2000), “Dual action of the active oxygen species during plant stress responses” *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 779–795.

Deverno L. L., Park Y. S., Bonga J. M., Barrett J. D., (1999), “Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.]”, *Plant Cell Reports*, 18, 948-953.

Ding D., Zhang L., Wang H., Liu Z., Zhang Z., Zheng Y., (2009), “Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots”, *Annals of Botany*, 103, 29–38.

Ding Y., Chen Z., Zhu C., (2011). “Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*)”, *Journal of Experimental Botany*, 62, 3563–73.

Dixit S., Mandal B. B., Ahuja, S., Srivastava P. S.. (2003), “Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis”, *CryoLetters*, 24, 77-84.

Dixit-Sharma S., Ahuja-Ghosh S., Mandal B. B., Srivastava P. S., (2005), “Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidea* – An endangered medicinal plant”, *Scientia Horticulturae*, 105, 513-517.

Dong C. H., Pei H., (2014), “Over-expression of miR397 improves plant tolerance to cold stress in *Arabidopsis thaliana*”, *Journal of Plant Biology*, 57(4), 209-217.

Dowling D. K., Simmons L. W., (2009), “Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution”, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276 (1663), 1737-1745.

Dumet D., Engelmann F., Chabrillange N., Duval Y., (1993), “Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a dessiccation step”, *Plant Cell Reports*, 12, 352-355.

Edrewa A., (2005), “Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years”, *General and Applied Plant Physiology*, 31, 105-124.

Efroni I., Blum E., Goldshmidt A., Eshed Y., (2008), “A protracted and dynamic maturation schedule underlies *Arabidopsis* leaf development”, *Plant Cell*, 20, 2293–2306.

Ekinci H., (2013), “Alev ağacı (*Photinia x fraseri* Dress.) bitkisinin kriyoprezervasyonu ve kriyoprezerve edilen bitkilerin genetik kararlılıklarının moleküler belirteçler ile incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Ekinci M. H., Özden Çiftçi Y., (2019), “In vitro koruma ve kriyoprezervasyon”, In: Özden Çiftçi Y., Altınkut Uncuoğlu A., Editor, “Bitki biyoteknolojisinde güncel yaklaşımlar”, *Palme*, 131-150.

- Ekinci M. H., Kayıhan D. S., Kayıhan C., Özden Çiftçi Y., (2020), “The role of microRNAs in recovery rates of *Arabidopsis thaliana* after short term cryo-storage”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-13.
- Eldem V., Okay S., Ünver T., (2013), “Plant microRNAs: new players in functional genomics”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(1),1-21.
- Engelmann F., (2004), “Cryopreservation: progress and prospects”, *In Vitro Cell Developmental Biology-Plant*, 40,427-433.
- Engelmann F., (1997), “In vitro conservation methods, in biotechnology and plant genetic resources: Conservation and use”, CABI, Wellingford, 119-162.
- Ericsson C., Franzen B., Nister M., (2006), “Frozen tissue biobanks. Tissue handling, cryopreservation, extraction, and use for proteomic analysis”, *Acta Oncologica*, 45, 643-661.
- Fabre J., Dereuddre J., (1990), “Encapsulationdehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips”, *CryoLetters*, 11, 413–426.
- Fahy G. M., MacFarlane D. R., Angell C. A., Meryman H. T., (1984), “Vitrification as an approach to cryopreservation”, *Cryobiology*, 21, 407-426.
- Fang Y., You J., Xie K., Xie W., Xiong L., (2008), “Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice” *Molecular Genetics and Genomics*, 280, 547–563.
- Fernandes P., Rodregus E., Pinto G., Roldan-Ruiz I., Deloose M., Santos, C., (2008), “Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability” *Tree Physiology*, 28, 1841–1850.
- Fleck R. A., Benson E. E., Bremner D. H., Day J. G., (2000), “Studies of free radical-mediated cryoinjury in the unicellular green alga *Euglena gracilis* using a non-destructive hydroxyl radical assay: a novel approach for developing protistan cryopreservation strategies”, *Free Radical Research* 32, 157-170.
- Fowler S., Thomashow M. F., (2002), “*Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway”, *The Plant Cell*, 14(8), 1675-1690.
- Foyer C. H., Halliwell B., (1976), “The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism”, *Planta*, 133(1), 21–25.
- Foyer C. H., Sourian N., Perret S., Lelandais M., Kunert K-J., Pruvost C., Jouanin L. (1995), “Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees”, *Plant Physiology*, 109(1), 1047–1057.

Frazier T. P., Sun G., Burklew C. E., Zhang B., (2011), “Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco”, *Molecular Biotechnology*, 49, 159–165.

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(22), 2038-2043.

Fukai S., Oe M., (1990), “Morphological observations of chrysanthemum shoot tips cultured after cryopreservation and freezing”, *Journal of Japanese Society Horticultural Science*, 59, 383-387.

Gagliardi R. F., Pacheco G. P., Carneiro L. A., Valls J. F. M., Vieira M. L. C., Mansur E., (2003), “Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of in vitro - grown shoot apices and genetic stability of recovered plants”, *CryoLetters*, 24, 103-110.

Gandikota M., Birkenbihl R. P., Hohmann S., Cardon G. H., Saedler H., Huijser P., (2007), “The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings”, *Plant Journal*, 49, 683–693.

Gifford M. L., Dean A., Gutierrez R. A., Coruzzi G. M., Birnbaum K. D., (2008), “Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 803–808.

Gill S.S., Tuteja N., (2010), “Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.

Gnanapragasam S., Vasil I. K., (1992), “Cryopreservation of immature embryos, embryonic callus and cell suspension culture of gramineous species”, *Plant Science*, 83, 205-215.

Gonzalez-Arnan M. T., Urrea C., Engelmann F., Ortiz R., Delafe C., (1993), “Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: effect of storage temperature and duration”, *CryoLetters*, 20, 347-352.

Gonzalez-Arnan M. T., Engelmann F., (2006), “Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane”, *CryoLetters*, 27, 155-168.

Griffith M., Ala P., Yang D. S. C., Hon W. C., Moffatt B. A., (1992), “Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves”, *Plant Physiology*, 100, 593–596.

Griffiths-Jones S., (2004), “The microRNA Registry”, *Nucleic Acids Research*, 32, 109-111.

Guo Y. Q., (2007), “Studies on the cryopreservation of embryogenic cultures from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) and litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)”, *Doctoral Thesis*, Fujian Agriculture and Forestry University.

Guo H. S., Xie Q., Fei J. F., Chua N. H., (2005), "MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development", *The Plant Cell Online*, 17(5), 1376-1386.

Gutierrez L., Bussell J. D., Pacurar D. I., Schwambach J., Pacurar M., Bellini C., (2009), "Phenotypic plasticity of adventitious rooting in Arabidopsis is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance", *Plant Cell*, 21, 3119-3132.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C., (2007), "Free radicals in biology and medicine", Oxford: 4. Clarendon.

Han M. H., Goud S., Song L., Fedoroff N., (2004), "The Arabidopsis doublestranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(4), 1093-1098.

Hannon G. J., (2002), "RNA interference", *Nature*, 418(6894), 244-251.

Hao Y. J., Liu Q. L., Deng X. X., (2001), "Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal and molecular levels", *Cryobiology*, 43, 46-53.

Hao Y. J., You C., Deng X. X., (2002a), "Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation", *CryoLetters*, 23, 37-46.

Hao Y. J., You C. X., Deng X. X., (2002b), "Effects of cryopreservation on developmental competency, cytological and molecular stability of citrus callus", *CryoLetters*, 23(1), 27-35.

Harding K., (1997), "Stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* L. plants recovered from cryopreservation", *CryoLetters*, 18, 217-230.

Harding K., (2004), "Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review", *CryoLetters*, 25(1), 3-22.

Harding K., Marzalina M., Krishnapillay B., Nashatul Z., Normah M. N., Benson E. E., (2000), "Molecular stability assessments of trees regenerated from cryopreserved Mahogany (*Swietenia macrophyllum*) seed germplasm using non-radioactive techniques to examine chromatin structure and DNA methylation status of the ribosomal RNA genes", *Journal of Tropical Forest Sciences*, 12, 149-163.

Harding K., Benson E. E., (2000), "Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from cryopreserved shoot-tips of potato", *CryoLetters*, 21, 279-288.

Harding K., Benson E. E., (2001), "The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* L. in vitro plantlets derived from cryopreserved germplasm", *CryoLetters*, 22, 199-208.

Helliot C., de Boucaud M. T., (1997), “Effect of various parameters on the survival of cryopreserved *Prunus ferlenain* in vitro plantlets shoot tips”, *CryoLetters*, 18, 133-142.

Helliot B., Panis B., Poumay Y., Swennen R., Lepoivre P., Frison E., (2002), “Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.)”, *Plant Cell Reports*, 20(12), 1117-1122.

Hirai D., Sakai A., (2001), “Recovery growth of plants cryopreserved by encapsulation vitrification”, *Bulletin of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Station*, 80, 55-64.

ISTA, (2003), “ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing”, Volumes 1 and 2. International Seed Testing Association. Bassersdorf, Switzerland.

ISTA, (2007), “International Rules for Seed Testing”, International Seed Testing Association. Bassersdorf, Switzerland.

Johnston J. W., Benson E., Harding K., (2009), “Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in *Ribes* germplasm”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 123–131.

Jokipii S., Ryynäne, L., Kallio P. T., Aronen T., Häggman H., (2004), “A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree, *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx” *Plant Science*, 166, 799-806.

Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P., (2004), “Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA”, *Molecular Cell*, 14(6), 787-799.

Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P., Bartel B., (2006), “MicroRNAs and their regulatory roles in plants”, *Annual. Review Plant Biology.*, 57, 19-53.

Jovanović Ž., Stanisavljević N., Mikić A., Radović S., Maksimović V., (2014), “Water deficit down-regulates miR398 and miR408 in pea (*Pisum sativum* L.)”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 83;26-31.

Jung J. H., Seo P.J., Park C. M., (2009), “MicroRNA biogenesis and function in higher plants”, *Plant Biotechnology Reports*, 3, 111–126.

Kaczmarczyk A., Funnekotter B., Menon A., Phang P. Y., Al-Hanbali A., Bunn E., Mancera R. L., (2012), “Current issues in plant cryopreservation”, In: Katkov I., Editor, “Current Frontiers in Cryobiology”, IntechOpen, 417-438.

Kaity A., Ashmore S. E., Drew R. A., Dulloo M. E., (2008), “Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya”, *Plant Cell Reports*, 27, 1529–1539.

Kaity A., Ashmore S. E., Drew R. A., (2009), "Field performance evaluation and genetic integrity assessment of cryopreserved papaya clones", *Plant Cell Reports*, 28, 1421–1430.

Kantar M., Unver T., Budak H., (2010), "Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression", *Functional & Integrative Genomics*, 10(4), 493-507.

Kayıhan D. S., Kayıhan C., Özden-Çiftçi Y., (2016), "Excess boron responsive regulations of antioxidative mechanism at physio-biochemical and molecular levels in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 337-345.

Kayıhan D. S., Kayıhan C., Özden-Çiftçi Y., (2019), "Moderate level of toxic boron causes differential regulation of microRNAs related to jasmonate and ethylene metabolisms in *Arabidopsis thaliana*", *Turkish Journal of Botany*, 43(2), 167-172.

Khraiweh B., Zhu J. K., Zhu J., (2012), "Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137-148.

Kim J. H., Woo H. R., Kim J., Lim P. O., Lee I. C., Choi S. H., Nam H. G., (2009), "Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*", *Science*, 323(5917), 1053-1057.

Koc I., Akdemir H., Onay H., Ozden-Çiftçi Y., (2014), "Cold-Induced genetic instability in micropropagated *Pistacia lentiscus* L. Plantlets", *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 2373–2384.

Kozomara A., Griffiths-Jones S., (2014), "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data", *Nucleic Acids Research*, 42(1), 68-73.

Kumu Y., Harada T., Yakuwa T., (1983), "Development of a whole plant from a shoot tip of *Asparagus officinalis* L. frozen down to -196 °C", *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University*, 61, 285-394.

Kurihara Y., Watanabe Y., (2004), "Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12753-12758.

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T., (2001), "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs", *Science*, 294(5543), 853-858.

Lambardi M., De Carlo A., Capuana M., (2005), "Cryopreservation of embryogenic callus of *Aesculus hippocastanum* L. by vitrification/one-step freezing", *CryoLetters*, 26, 185-192.

Lau N. C., Lim L. P., Weinstein E. G., Bartel D. P., (2001), "An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*", *Science*, 294(5543), 858-862.

Laufs P., Peaucelle A., Morin H., Traas J., (2004), “MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems”, *Development*, 131, 4311–4322.

Lauter N., Kampani A., Carlson S., Goebel M., Moose S. P., (2005), “microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 9412– 9417.

Lee R. C., Ambros V. ,(2001), “An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*”, *Science*, 294(5543), 862-864.

Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V., (1993), “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*”, *Cell*, 75(5), 843-854.

Li W. X., Oono Y., Zhu J., He X. J., Wu J. M., Iida K., Lu X. Y., Cui X., Jin H., Zhu J. K., (2008), “The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance”, *The Plant Cell*, 20(8), 2238-2251.

Li Y. F., Zheng Y., Addo-Quaye C., Zhang L., Saini A., Jagadeeswaran G., Axtell M. J., Zhang W., Sunkar R., (2010), “Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice”, *The Plant Journal* 62(5), 742-759.

Li Y., Zhang Q., Zhang J., Wu L., Qi Y., Zhou J. M., (2010a), “Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity”, *Plant Physiology*, 152, 2222–223.

Li T., Li H., Zhang Y. X., Liu J. Y., (2010b), “Identification and analysis of seven H₂O₂-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)”, *Nucleic Acids Research*, 39(7), 2821-2833.

Li B., Qin Y., Duan H., Yin W., Xia X., (2011), “Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*”, *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3765-3779.

Li B., Qin Y., Duan H., Yin W., Xia X., (2011a), “Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*”, *Journal of Experimental Botany*, 62, 3765–3779.

Li H., Dong Y., Yin H., Wang N., Yang J., Liu X., Wang Y., Wu J., Li X., (2011b), “Characterization of the stress associated microRNAs in *Glycine max* by deep sequencing”, *BMC Plant Biology*, 11, 170.

Li T., Li H., Zhang Y. X., Liu J. Y., (2011c), “Identification and analysis of seven H₂O₂ -responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)”, *Nucleic Acids Research*, 39, 2821–2833.

Lima J. C., Arenhart R. A., Margis-Pinheiro M., Margis R., (2011), “Aluminum triggers broad changes in microRNA expression in rice roots”, *Genetics and Molecular Research*, 10, 2817–2832.

Lin C., Thomashow M. F., (1992), “A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity”, *Biochemical and biophysical Biophysical Research Communications*, 183(3), 1103-1108

Lipavska H., Vreugdenhil D., (1996), “Uptake of mannitol from media by in vitro grown plants”, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 45, 103-107.

Liu H. H., Tian X., Li Y. J., Wu C. A., Zheng C. C., (2009), “Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*”, *RNA*, 14(5), 836-843.

Liu Q., Chen Y. Q., (2009), “Insights into the mechanism of plant development: interactions of miRNAs pathway with phytohormone response”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384(1), 1-5.

Liu H. H., Tian X., Li Y. J., Wu C. A., Zheng C. C., (2008), “Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*”, *RNA*, 14(5), 836-843.

Liu H., Yu W., Dai J., Gong Q., Yang K., Lu X., (2004), “Cryopreservation of protoplasts of the alga *Porphyra yezoensis* by vitrification”, *Plant Science*, 166(1), 97-102.

Llave C., Kasschau K. D., Rector M. A., Carrington J. C., (2002), “Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants”, *The Plant Cell Online*, 14(7), 1605-1619.

Lu S., Sun Y. H., Chiang V. L., (2008), “Stress-responsive microRNAs in *Populus*”, *The Plant Journal*, 55(1), 131-151.

Lv D. K., Bai X., Li Y., Ding X. D., Ge Y., Cai H., Ji W., Wu N., Zhu Y. M., (2010), “Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays”, *Gene*, 459(1-2), 39-47.

Ma C., Burd S., Lers A., (2015), “miR408 is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*”, *The Plant Journal*, 84(1), 169-187.

Maki S., Hirai Y., Niino T., Matsumoto T., (2015), “Assessment of molecular genetic stability between longterm cryopreserved and tissue cultured wasabi (*Wasabia japonica*) plants”, *CryoLetters*, 36, 318-324.

Mallory A. C., Dugas D. V., Bartel D. P., Bartel B., (2004), “MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs”, *Current Biology*, 14(12), 1035-1046.

Mallory A. C., Vaucheret H., (2006), “Functions of microRNAs and related small RNAs in plants”, *Nature Genetics*, 38, 31-36.

Mallory A. C., Bartel D. P., Bartel B., (2005), “MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes”, *Plant Cell*, 17, 1360–1375.

Marin E., Jouannet V., Herz A., Lokerse A. S., Weijers D., Vaucheret H., Nussaume L., Crespi M. D., Maizel A., (2010), “miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth”, *Plant Cell*, 22, 1104–1117.

Martin C. M., González-Benito E., (2005), “Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration”, *Cryobiology*, 51, 281-289.

Matsui A., Nguyen A., Nakaminami K., Seki M., (2013), “Arabidopsis non-coding RNA regulation in abiotic stress responses”, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 22642-22654.

Matsumoto T., Akihiro T., Maki S., Mochida K., Kitagawa M., Tanaka D., Yamamoto S., Niino T., (2013), “Genetic stability assessment of Wasabi plants regenerated from long-term cryopreserved shoot tips using morphological, biochemical and molecular analysis”, *CryoLetters*, 34, 128-136.

Matsumoto T., (2017), “Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods”, *Reviews in Agricultural Science*, 5, 13-20.

Meister G., (2013), “Argonaute proteins: functional insights and emerging roles.”, *Nature Reviews: Genetics*, 14(7), 447-459.

Meryman H. T., (1974), “Freezing injury and its prevention in living cells”, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 3(1), 341-363.

Meyer A. J., (2008), “The integration of glutathione homeostasis and redox signaling”, *J Plant Physiol* 165:1390–1403.

Mikuła A., Tomiczak K., Rybczynski J. J., (2011), “Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi)genetic uniformity of regenerants”, *Plant Cell Reports*, 30, 565-574.

Mittler R., (2002), “Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance”, *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.

Moffatt B., Ewart V., Eastman A., (2006), “Cold comfort: plant antifreeze proteins”, *Physiologia Plantarum*, 126, 5–16.

Moges A. D., Shibli R. A., Karam N. S., (2003), “Cryopreservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips”, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(4), 389-395.

Monteys A. M., Spengler R. M., Wan J., Tecedor L., Lennox K. A., Xing Y., Davidson B. L., (2010), "Structure and activity of putative intronic miRNA promoters.", *RNA*, 16(3), 495-505.

Montgomery T. A., Howell M. D., Cuperus J. T., Li D., Hansen J. E., Alexander A. L., Chapman E. J., Fahlgren N., Allen E., Carrington J. C., (2008), "Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation", *Cell*, 133, 128–141.

Murashige T., Skoog F., (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497

Mutum R. D., Balyan S. C., Kansal S., Agarwal P., Kumar S., Kumar M., Raghuvanshi S., (2013), "Evolution of variety-specific regulatory schema for expression of osa-miR408 in indica rice varieties under drought stress", *The FEBS Journal*, 280(7), 1717-1730.

Mycock D. J., Wesley-Smith D. M., Berjak P., (1995), "Cryopreservation of somatic embryos four species with and without cryoprotectant pretreatment", *Annals of Botany*, 75, 331-336.

Nadarajan J., Pritchard H. W., (2014), "Biophysical Characteristics of Successful Oilseed Embryo Cryoprotection and Cryopreservation Using Vacuum Infiltration Vitrification: An Innovation in Plant Cell Preservation", *PLOS ONE*, 9(5), 1-11.

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.

Nersissian A. M., Valentine J. S., Immoos C., Hill M. G., Hart P. J., Williams G., Herrmann R. G., (1998), "Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytocyanins: plant-specific mononuclear blue copper proteins", *Protein Science*, 7(9), 1915-1929.

Ni Z., Hu Z., Jiang Q., Zhang H., (2012), "Overexpression of gma-MIR394a confers tolerance to drought in transgenic *Arabidopsis thaliana*", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(2), 330-335.

Niino T., Sakai A., Yakuwa H., Nojiri K., (1992), "Cryopreservation of in vitro-grown shoot of apple and pear by vitrification", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 261-266.

Niino T., Shirata K., Oka S., (1995), "Viability of mulberry buds cryopreserved for 5 years at -135°C", *Journal of Sericulture Science of Japan*, 64, 370-374.

Nikovics K., Blein T., Peaucelle A., Ishida T., Morin H., Aida M., Laufs P., (2006), "The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 18, 2929–2945.

Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T., (1993), "Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification", *Plant Science*, 91(1), 67-73.

Nodine M. D., Bartel D. P., (2010), "MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis", *Genes & Development*, 24, 2678–2692.

Ogawa K., Kanematsu S., Asada K., (1996), "Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl", *Plant and Cell Physiology*, 37(1), 790–9.

Ozden-Tokatli Y., Akdemir H., (2010), "Cryopreservation of fraser Photinia (*Photinia x fraseri* Dress.) via vitrification-based one-step freezing techniques", *CryoLetters*, 31(1), 40-49.

Ozudogru E. A., Previati A., Lambardi M., (2010), "In vitro conservation and cryopreservation of ornamental plants", *Methods in Molecular Biology*, 589, 303-324.

Oncel I., Kele Y., Ustun A. S., (2000), "Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings", *Environmental Pollution*, 107, 315-320

Palatnik J. F., Allen E., Wu X., Schommer C., Schwab R., Carrington J. C., Weigel D., (2003), "Control of leaf morphogenesis by microRNAs", *Nature*, 425(6955), 257-263.

Panis B., Lambardi M., (2005), "Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)", *Turin*, 61–78.

Panis B., Strosse H., Van Den Hende S., Swennen R., (2002), "Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures", *CryoLetters*, 23, 375-384.

Park W., Li J., Song R., Messing J., Chen X., (2002), "CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana*", *Current Biology*, 12(17), 1484-1495.

Parry G., Calderon-Villalobos L. I., Prigge M., Peret B., Dharmasiri S., Itoh H., Lechner E., Gray W. M., Bennet M., Estelle M., (2009), "Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(52), 22540-22545.

Paul H., Daigny G., Sangwan-Norreel B. S., (2000), "Cryopreservation of apple (*Malus X domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-vitrification", *Plant Cell Reports*, 19, 768-774.

Paunescu A., (2009), "Biotechnology for endangered plant conservation: A critical overview", *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4095-4103.

Peredo E. L., Arroyo-Garcia R., Reed B. M., Revilla M. A., (2008), “Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and coldstored hops (*Humulus lupulus* L.)”, *Cryobiology*, 57, 234-24.

Poobathy R., Sinniah U. R., Mahmood M., Subramaniam S., (2013), “Refinement of a vitrification protocol for protocorm-like bodies of *Dendrobium sonia-28*”, *Turkish Journal of Botany*, 37, 940-949.

Porter R. H., Durrell M., Romm H. J., (1947), “The use of 2,3,5-triphenyl-tetrazoliumchloride as a measure of seed germinability”, *Plant Physiology*, 22(2), 149.

Qi Y., He X., Wang X. J., Kohany O., Jurka J., Hannon G. J., (2006), “Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation”, *Nature*, 443(7114), 1008-1012.

Razdan M. K., Cockling E. C., (1997), “Biotechnology in conservation of genetic resources”, Science Publishers, 1-25.

Reed B. M., Engelmann F., Dulloo M. E., Engels J. M. M., (2004), “Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections”, International Plant Genetic Resources Institute, IPGRI. Rome, Italy.

Reed B. M., (2008), “Plant cryopreservation: a practical guide”, Springer, 513.

Reinhart B. J., Weinstein E. G., Rhoades M. W., Bartel B., Bartel D. P., (2002), “MicroRNAs in plant.”, *Genes & Development*, 16(13), 1616-1626.

Ren L., Zhang D., Jiang X. N., Gai Y., Wang W. M., Reed B. M., Shen X. H., (2013), “Peroxidation due to cryoprotectant treatment is a vital factor for cell survival in *Arabidopsis* cryopreservation”, *Plant Science*, 212, 37-47.

Rey N. A., Papacchioli V., Tavazza R., Pagnotta M. A., (2013), “Gauging the genetic changes occurring across globe artichoke micropropagation towards an appropriate variety registration and nursery production”, *Scientia Horticulturae*, 156, 121-126.

Reyes J. L., Chua N. H., (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination”, *The Plant Journal*, 49(4), 592-606.

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

Rhoades M. W., Reinhart B. J., Lim L. P., Burge C. B., Bartel B., Bartel D. P., (2002), “Prediction of plant microRNA targets”, *Cell*, 110, 513– 520.

Rodriguez R. E., Mecchia M. A., Debernardi J. M., Schommer C., Weigel D., Palatnik J.F., (2010), “Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396”, *Development*, 137, 103–112.

Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I., (1990), “Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9(1), 30-33.

Sakai A., Hirai D., Niino T., (2008), “Development of PVS-based vitrification and encapsulation–vitrification protocols”, In: Reed B. M., Editor, “Plant cryopreservation: A practical guide”, Springer, New York, 33-57.

Sakai A., Engelmann F., (2007), “Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: A review”, *CryoLetters*, 28, 151-172.

Salin M. L., (1987), “Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast”, *Physiologia Plantarum*, 72, 681-689.

Schäfer-Menuhr A., Schumacher H..M., Mix-Wagner G., (1997), “Long-term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot tips in liquid nitrogen”, *Plant Genetic Resources Newsletter*, 111: 19– 24.

Schommer C., Bresso E. G., Spinelli S. V., Palatnik J. F., (2012), “Role of microRNA miR319 in plant development”, In: Sunkar R., Editor, “MicroRNAs in plant development and stress responses”, Springer, Berlin, Heidelberg, 29-47.

Schützendübel A., Polle A., (2002), “Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization”, *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1351-1365.

Scocchi A., Vila S., Mroginski L., Engelmann F., (2007), “Cryopreservation of somatic embryos of paradise tree (*Melia azedarach* L.) ”, *CryoLetters*, 28(4), 281-290.

Scottez C. E., Chevreau E., Godard N., Arnaud Y., Duran M., Dereuddrem J., (1996), “Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear in vitro cultures after encapsulated-dehydration”, *Cryobiology*, 29, 691-700.

Shibli R. A., Shatnawi M. A., Ajlouni M. M., Jaradat A., Adham Y., (1999), “Slow growth in vitro conservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.)”, *Advances in Horticultural Science*, 13, 133-134.

Shibli R., Haagensohn D., Cunningham S., Berg W., Volenec J., (2001), “Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration”, *Plant Cell Reports*, 20(5), 445-450.

Shibli R., Shatnawi M., Subaih W., Ajlouni M. ,(2006), “In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review”, *World Journal of Agricultural Sciences*, 2, 372-382.

Shibli R. A., (2000), “Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration”, *CryoLetters*, 21, 39-46.

Shleizer-Burko S., Burko Y., Ben-Herzel O., Ori N., (2011), “Dynamic growth program regulated by LANCEOLATE enables flexible leaf patterning”, *Development*, 138, 695–704.

Shukla L., Chinnusamy V., Sunkar R., (2008), “The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779, 743–748.

Skyba M., Urbanova M., Toteva V. K., Kosuth J., Harding K., Ellarova E., (2010), “Physiological, biochemical and molecular characteristics of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. shoot tips”, *CryoLetters*, 31, 249-260.

Skybaa M., Faltusb M., Zámecník J., Cellárová E., (2011), “Thermal analysis of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. shoot tips: Cooling regime dependent dehydration and ice growth”, *Thermochimica Acta*, 514, 22-27.

Smulders M. J. M., Klerk G. J., (2011), “Epigenetics in plant tissue culture”, *Plant Growth Regulation*, 63, 137– 146.

Song Q. X., Liu Y. F., Hu X. Y., Zhang W. K., Ma B., Chen S. Y., Zhang J. S., (2011), “Identification of miRNAs and their target genes in developing soybean seeds by deep sequencing”, *BMC Plant Biology*, 11, 5.

Song J. B., Huang S. Q., Dalmay T., Yang Z. M., (2012), “Regulation of leaf morphology by microRNA394 and its target leaf curling responsiveness”, *Plant and Cell Physiology* 53(7), 1283-1294.

Song J. B., Gao S., Sun D., Li H., Shu X. X., Yang Z. M., (2013), “miR394 and LCR are involved in Arabidopsis salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner”, *BMC Plant Biology*, 13(1), 210.

Song J. B., Gao S., Wang Y., Li B.,W., Zhang Y. L., Yang Z. M., (2016), “miR394 and its target gene LCR are involved in cold stress response in Arabidopsis”, *Plant Gene*, 5, 56-64.

Sorin C., Bussell J. D., Camus I., Ljung K., Kowalczyk M., Geiss G., McKhann H., Garcion C., Vaucheret H., Sandberg G., Bellini C., (2005), “Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1”, *Plant Cell*, 17, 1343–1359.

Stacey G. N., (2004), “Fundamental issues for cell-line banks in biotechnology and regulatory affairs”, In: Fuller B., Lane N., Benson E. E., Editors, “Life in the Frozen State”, CRC Press, 437-452.

Sunkar R., Zhu J. K., (2004), “Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis”, *The Plant Cell*, 16(8), 2001-2019.

Sunkar R., Kapoor A., Zhu J. K., (2006), “Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance”, *The Plant Cell*, 18(8), 2051-2065.

Sunkar R., Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J. K., (2007), "Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation", *Trends in Plant Science*, 12(7), 301-309.

Sunkar R., Li Y. F., Jagadeeswaran G., (2012), "Functions of microRNAs in plant stress responses", *Trends in Plant Science*, 17(4), 196-203.

Surenciski M. R., Flachslund E. A., Terada G., Mroginski L. A., Rey H. Y., (2012), "Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration", *Biocell*, 36(1), 31-36.

Swan T. W., Deakin E. A., Hunjan G., Souch G. R., Spencer M. E., Stafford A. M., Lynch P. T., (1998), "Cryopreservation of cell suspensions of *Polygonum aviculare* using traditional controlled rate freezing and encapsulation-dehydration protocols, a comparison of post-thaw cell recovery", *CryoLetters*, 19, 237-248.

Swan T. W., O'Hare D., Gill R. A., Lynch P. T., (1999), "Influence of preculture conditions on the post-thaw recovery of suspension culture of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)", *CryoLetters*, 20, 325-336.

Tahtamouni R. W., Shibli R. A., (1999), "Preservation at low temperature and cryopreservation in wild pear (*Pyrus syriaca*)", *Advances in Horticultural Science*, 13, 156-160.

Tanaka D., Niino T., Isuzugawa K., Hikage T., Uemura M., (2004), "Cryopreservation of shoot apices of in vitro grown gentian plants: comparison of vitrification and encapsulation-vitrification protocols", *CryoLetters*, 25, 167-176.

Tang G., Tang X., Mendu V., Jia X., Chen Q. J., He L., (2008), "The art of microRNA: various strategies leading to gene silencing via an ancient pathway", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(11), 655-662.

Tatone C., Carbone M. C., Campanella G., Festuccia C., Artini P.G., Talesa V., Focarelli R., Amicarelli F., (2010), "Female reproductive dysfunction during ageing: role of methylglyoxal in the formation of advanced glycation endproducts in ovaries of reproductively-aged mice", *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 24, 63-72.

Thalhammer A., Hinch D. K., (2014), "A mechanistic model of COR15 protein function in plant freezing tolerance: integration of structural and functional characteristics", *Plant Signaling & Behavior*, 9(12), e977722.

Tong Y. A., Peng H., Zhan C., Fan L., Ai T., Wang S., (2013), "Genome-Wide Analysis Reveals Diversity of Rice Intronic miRNAs in Sequence Structure", *Biogenesis and Function. PLoS ONE*, 8(5), e63938.

Touchell D. H., Dixon K. W., (1994), "Cryopreservation for seedbanking of Australian species", *Annals of Botany*, 74, 541-546.

Trindade I., Capitão C., Dalmay T., Fevereiro M. P., Dos Santos D. M., (2010), “miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*”, *Planta*, 231(3), 705-716.

Uchendu E. E., Leonard S. W., Traber M. G., Reed B. M., (2010), “Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation”, *Plant Cell Reports*, 29(1), 25.

Unver T., Parmaksiz I., Dündar E., (2010b), “Identification of conserved micro-RNAs and their target transcripts in opium poppy (*Papaver somniferum* L.)”, *Plant Cell Reports*, 29, 757–769

Uragami A., Sakai A., Nagai M., Takahashi T., (1989), “Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification”, *Plant Cell Reports*, 8(7), 418-421.

Urbanova M., Kosuth J., Cellarova E., (2006), “Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation”, *Plant Cell Reports*, 25, 140-147.

Varkonyi-Gasic E., Wu R., Wood M., Walton E. F., Hellens R. P., (2007), “Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs”, *Plant Methods*, 3(1), 12.

Vasanth K., Vivier M. A., (2011), “Improved cryopreservation procedure for long term storage of synchronised culture of grapevine”, *Biologia Plantarum*, 55, 365-369.

Vaucheret H., (2008), “Plant argonauts.”, *Trends in Plant Science*, 13(7), 350-358.

Vaucheret H., Vazquez F., Crété P., Bartel D. P., (2004), “The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development”, *Genes & Development*, 18(10), 1187.

Verma P., Kaur H., Petla B. P., Rao V., Saxena S. C., Majee M., (2013), “PROTEIN L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE2 is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins”, *Plant Physiology*, 161(3), 1141-1157.

Vidal E. A., Araus V., Lu C., Parry G., Green P. J., Coruzzi G. M., Gutierrez R. A., (2010), “Nitrate responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 4477–4482.

Villalobos V. M., Engelmann F., (1995), “Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 375-382.

Voinnet O., (2002), “RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression.”, *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), 444-451.

Voinnet O., (2009), “Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs”, *Cell*, 136(4), 669-687.

Volk G. M., Henk A. Basu C., (2011), “Gene expression in response to cryoprotectant and liquid nitrogen exposure in *Arabidopsis* shoot tips”, In: I International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, *Acta Horticulturae*, 908, 55-66.

Volk G. M., Walters C., (2006), “Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behaviour in shoot tips during cryoprotection”, *Cryobiology*, 5248–61.

Vranova E., Atichartpongkul S., Villarroel R., Van Montagu M., Inze D., Van Camp W., (2002), “Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 10870–10875.

Wang Z., He Y., (2009), “Effect of cryopreservation on the development and DNA methylation patterns of *Arabidopsis thaliana*”, *Life Science Journal*, 6(1), 55-60.

Wang Q. C., Cuellar W. J., Rajamäki M. L., Hiraka Y., Valkonen J. P. T., (2008), “Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants”, *Molecular Plant Pathology*, 9, 237–250.

Wang L., Gu X., Xu D., Wang W., Wang H., Zeng M., Cui X., (2011a), “MiR396-targeted *AtGRF* transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in *Arabidopsis*”, *Journal of Experimental Botany*, 62, 761–773.

Ward A. C. W., Benson E. E., Blackhall N. W., Cooper-Bland S., Powell W., Power J. B., Davey, M. R., (1993), “Flow cytometric assessments of ploidy stability in cryopreserved dihaploid *Solanum tuberosum* and wild *Solanum* species”, *CryoLetters*, 14, 145-152.

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.

Whitaker C., Beckett R. P., Minibayeva F. V., Kranner I., (2010), “Production of reactive oxygen species in excised and cryopreserved explants of *Trichilia dregeana* Sond”, *South African Journal of Botany*, 76, 112–118.

Williams L., Grigg S. P., Xie M., Christensen S., Fletcher J. C., (2005), “Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its *AtHD-ZIP* target genes”, *Development*, 132, 3657–3668.

Withers L., (1991), “In vitro conservation”, *Biological Journal of Linnean Society*, 43, 31- 42.

Wu G., Poethig R. S., (2006), “Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3”, *Development*, 133, 3539–3547.

Wu Y., Engelmann F., Zhao Y., Zhou M., Chen S., (1999), “Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation techniques and conditioning of donor plants”, *Cryoletters*, 20, 121-130.

Xu Y., (2006), “Cryopreservation of germplasm of ornamental ferns”, Doctoral Thesis, Beijing Forestry University.

Xu J., Liu Q., Jia M., Liu Y., (2014), “Generation of reactive oxygen species during cryopreservation may improve *Lilium* × *siberia* pollen viability”, *Physiology, In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 50(3), 369-375.

Xu M., Hu T., Zhao J., Park M. Y., Earley K. W., Wu G., Yang L., Poethig R. S., (2016), “Developmental functions of mir156-regulated squamosa promoter binding protein-like (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana*”, *PLoS genetics*, 12(8), e1006263.

Xue L. J., Zhang J. J., Xue H. W., (2009), “Characterization and expression profiles of miRNAs in rice seeds”, *Nucleic Acids Research*, 37: 916– 930.

Yang T. W., Xue L. G., An L. Z., (2007), “Functional diversity of miRNA in plants”, *Plant Science*, 172(3), 423-432.

Yoon E. K., Yang J. H., Lim J., Kim S. H., Kim S. K., Lee W. S., (2010), “Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in *Arabidopsis* lateral root development”, *Nucleic Acids Research*, 38, 1382–1391.

Yoshimatsu K., Yamaguchi H., Shimomura K., (1996), “Traits of *Panax ginseng* hairy roots after cold storage and cryopreservation”, *Plant Cell Reports*, 15, 555-560.

Younis L. S., (2012), “In vitro multiplication and conservation of *Acheillea fragrantissima* Foorssk SCH. BIP”, Master. Thesis. The University of Jordan.

Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S., Yang M., Padgett R. W., Chen X., (2005), “Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis”, *Science*, 307(5711), 932-935.

Zhang B., Pan X., Cobb G. P., Anderson T. A., (2006b), “Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact”, *Developmental Biology*, 289(1), 3-16.

Zhang J., Xu Y., Huan Q., Chong K., (2009), “Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response”, *BMC Genomics*, 10(1), 449.

Zhang X., Zou Z., Gong P., Zhang J., Ziaf K., Li H., Ye Z., (2011a), “Over- expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato”, *Biotechnology Letters*, 33, 403–409.

Zhang X. N., Li X., Liu J. H., (2014), “Identification of conserved and novel cold-responsive microRNAs in trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) using high-throughput sequencing”, *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(2), 328-341.

Zhang D., Ren L., Chen G. Q., Zhang J., Reed B. M., Shen X. H., (2015), “ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*”, *Plant Cell Reports*, 34(9), 1499-1513.

Zhao B., Liang R., Ge L., Li W., Xiao H., Lin H., Ruan K., Jin Y., (2007), “Identification of drought-induced microRNAs in rice”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), 585-590.

Zhao C. Z., Xia H., Frazier T. P., Yao Y. Y., Bi Y. P., Li A. Q., Li M. J., Li C. S., Zhang B. H., Wang X. J., (2010), “Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.)”, *BMC Plant Biology*, 10, 3.

Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M., Chen S., (1999), “Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: Effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration”, *Cryoletters*, 20, 103-108.

Zhao B., Ge L., Liang R., Li W., Ruan K., Lin H., Jin Y., (2009), “Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NFYA transcription factor”, *BMC Molecular Biology*, 10(1), 29.

Zhou X., Wang G., Sutoh K., Zhu J. K., Zhang W., (2008), “Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779, 780–788.

Zhou L., Liu Y., Liu Z., Kong D., Duan M., Luo L., (2010), “Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*”, *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4157-4168.

Zhu C., Ding Y., Liu H., (2011), “MiR398 and plant stress responses”, *Physiologia Plantarum*, 143(1), 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

Muahmmmed Hamit EKİNCİ 26 Ağustos 1987’de Diyarbakır’da doğdu. Lisans eğitimini Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde 2010 yılında tamamladıktan sonra 2011 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2013 yılında tamamladı. 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı. Muahmmmed Hamit EKİNCİ halen doktora eğitimine devam etmektedir.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Ekinci M. H., Kayıhan D. S., Kayıhan C., Özden Çiftçi Y. (2020), “The role of microRNAs in recovery rates of *Arabidopsis thaliana* after short term cryo-storage”, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 1-13.

Ek B: Tez Kapsamında Yapılan Çalışmalara Ait İstatistiksel Veriler

48 ve 72 saat çimlenen *Arabidopsis* fidelerinin kriyoprezervasyonu sırası ve sonrasında alınan fidelerin TTC testi ile yapılan canlılık sonuçlarına ait sayısal veriler Tablo B1.1’de, bunlardan izole edilen RNA örneklerinden sentezlenen cDNA’lar ile 10 miRNA, 9 hedef geni ve 4 soğuk-ilişkili gene ait primerler kullanılarak çalışılan qRT-PCR çalışmalarına ait tüm sayısal veriler Tablo B1.2’de sunulmuştur.

Tablo B1.1: 48 ve 72 saat *in vitro* çimlendirilmiş *A. thaliana* fidelerinin kriyoprezervasyon sırasındaki canlılık oranlarının istatistiksel analiz sonuçları^a. K: Herhangi bir muamele olmayan kontrol fideler, OD: sıvı azota daldırılmadan önceki fideler (ozmokoruma ve dehidratasyon), LD: sıvı azota daldırıldıktan sonraki fideler (SA’da hızlı soğutma ve dilüsyon), GK: geri kazanım sonrası MS0 besiyerindeki 24 saat sonraki fideler ve -K: 1 saat 100°C’te bekletilerek öldürülen fideler (negatif kontrol). Farklı harfler ise her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder (P<0.05).

	-K (%)	K (%)	OD (%)	LD (%)	GK (%)
48 saat	0.00 ± 0.00c ^b	97.95 ± 2.04a	84.31 ± 5.14ab	67.31 ± 6.57b	63.63 ± 8.5b
72 saat	0.00 ± 0.00c	97.78 ± 2.22a	47.37 ± 8.21b	8.69 ± 4.2c	2.18 ± 2.18c

^aHer deneme için farklı harfler, LSD çoklu karşılaştırmalı teste göre anlamlı bir fark (P ≤ 0.05) göstermektedir. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^bOrtalama ± standart hata.

Tablo B1.2: 48 ve 72 saat *in vitro* çimlendirilmiş *A. thaliana* fidelerinin kriyoprezervasyon aşamalarında farklılaşmış olarak anlatılan miRNA'ların, bunların hedef genlerinin ve soğuk-ilişkili genlerin qRT-PCR verileri. Genlerin anlatım düzeyleri kontrole kıyasla $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formatına dönüştürülmüş kat değiştirme değerleri kullanılarak sunulmuştur^a. K: Kontrol fideler, OD: sıvı azota daldırılmadan önceki fideler, LD: sıvı azota daldırıldıktan sonraki fideler. Farklı harfler ise her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder (P<0.05).

		miR156	miR 319	miR393	miR397	miR398	miR394	miR159	miR169	miR172	miR408
48 saat	K	1.00±0.06a	1,01±0.16a	1,00±0.03c	1,02±0.21b	1,04±0.30ab	1,01±0.16a	1,00±0.05b	1,00±0.02a	1,00±0.09a	1,01±0.19a
	OD	0.74±0.13a	0,97±0.11a	2,79±0.30b	1,05±0.09b	0,46±0.06b	0,90±0.04a	1,79±0.01a	0,61±0.08b	0,67±0.06b	0,85±0.01a
	LD	0,78±0.08a	1,10±0.06a	15,34±3.51a	2,89±0.07a	1,34±0.08a	0,89±0.04a	1,07±0.27ab	0,48±0.04b	0,96±0.06ab	1,12±0.16a
72 saat	K	1,00±0.01a	1,00±0.06b	1,05±0.25b	1,03±0.24a	1,01±0.12a	1,01±0.07a	1,02±0.12a	1,00±0.05a	1,00±0.01a	1,02±0.19a
	OD	0,83±0.03b	0,86±0.03b	2,15±0.27a	0,14±0.01b	0,17±0.01c	0,71±0.01b	0,57±0.02b	0,57±0.01b	0,24±0.01c	0,20±0.01b
	LD	1,19±0.14a	1,78±0.17a	1,94±0.23a	0,21±0.06b	0,24±0.01b	1,37±0.18a	0,62±0.02b	0,70±0.06b	0,53±0.03b	0,35±0.05b
		SPL10	TCP4	TIR1	HOS1	LAC4	CSD1	LCR	PLANTACYANIN	LAC3	
48 saat	K	1,02±0.19a	1,01±0.10a	1,00±0.06a	1,01±0.09a	1,00±0.04a	1,01±0.14b	1,04±0.29a	1,02±0.19a	1,02±0.20ab	
	OD	0,43±0.03b	0,88±0.26ab	1,03±0.01a	0,41±0.04b	0,65±0.13ab	1,56±0.03a	0,80±0.12a	0,95±0.06a	1,33±0.01a	
	LD	0,41±0.06b	0,33±0.01b	0,77±0.11b	0,40±0.07b	0,39±0.02b	0,86±0.11b	0,18±0.02b	0,16±0.03b	0,27±0.04b	
72 saat	K	1,01±0.11a	1,02±0.17a	1,00±0.04a	1,07±0.27a	1,00±0.01a	1,00±0.02c	1,00±0.06a	1,00±0.01c	1,00±0.06b	
	OD	0,72±0.05a	0,77±0.19a	0,51±0.01b	0,64±0.05b	1,10±0.18a	9,05±0.34a	0,59±0.04b	3,96±0.69a	1,51±0.09a	
	LD	0,34±0.04b	0,06±0.02b	0,27±0.04c	0,33±0.01c	0,49±0.07b	6,48±0.48b	0,19±0.04c	1,56±0.13b	0,71±0.19b	
		CBF1	CBF3	COR15	COR47						
48 saat	K	1,01±0.08b	1,07±0.25b	1,06±0.27b	1,00±0.06b						
	LD	1,71±0.22a	2,29±0.12a	5,72±0.60a	1,78±0.09a						
72 saat	K	1,04±0.19b	1,02±0.15a	1,01±0.15a	1,03±0.18b						
	LD	0,19±0.06a	1,58±0.20b	4,19±1.03b	0,34±0.02a						

^aHer deneme için farklı harfler, LSD çoklu karşılaştırılmalı teste göre anlamlı bir fark ($P \leq 0.05$) göstermektedir. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^bOrtalama ± standart hata.