

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

**NİCOTIANA TABACUM BİTKİSİNDE IncRNA- miRNA-mRNA
MOLEKÜLLERİNİN KATILDIĞI REKABETÇİ ENDOJEN RNA
(ceRNA) AĞLARININ KURAKLIK ALIŞTIRMASI SIRASINDA
ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ELİF MUMCU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2023**

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***NİCOTIANA TABACUM* BİTKİSİNDE**
IncRNA- miRNA-mRNA MOLEKÜLLERİNİN
KATILDIĞI REKABETÇİ ENDOJEN RNA
(ceRNA) AĞLARININ KURAKLIK
ALIŞTIRMASI SIRASINDA ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

ELİF MUMCU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. FATMA AYDINOĞLU

GEBZE
2023

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

**INVESTIGATION OF THE ROLES OF
COMPETITIVE ENDOGENOUS RNA
(ceRNA) NETWORKS INVOLVING lncRNA-
miRNA-mRNA MOLECULES DURING
DROUGHT PRIMING IN *NICOTIANA
TABACUM* PLANT**

ELİF MUMCU
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. FATMA AYDINOĞLU

GEBZE
2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 26/01/2023 tarih ve 2023/06 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/02/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Elif MUMCU'nun tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Fatma AYDINOĞLU

ÜYE

: Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Stuart James LUCAS

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Kuraklık stresi tütün bitkisi de dahil ticari olarak üretilen ve üretilmeyen tüm bitkilerde ürün verimliliğini, büyüme ve gelişmeyi etkileyen önemli çevresel bir strestir. Kuraklığa alıştırma, bir bitkiyi hafif ve kontrollü bir şekilde belirli bir süre su eksikliğine maruz bırakarak bitkinin kuraklık stresini tolere edebilme becerisini artırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında *Nicotiana tabacum* bitkisi üzerinde kuraklığa alıştırma uygulaması yapılarak, bir sonraki kuraklık stresinde fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal değişimleri incelenerek bitkiye kazandırdığı kuraklık stresi toleransı incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda 40 günlük olan *Nicotiana tabacum* fideleri kontrol (C), kuraklığa alıştırma (D), kuraklığa alıştırma uygulanmayan (CD) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Kuraklığa alıştırılan (D) grup, aynı zamanda yetiştirilen ve daha önce kuraklık stresine maruz kalmayan grup (CD) ile aynı zamanda tekrar kuraklık stresi uygulanarak, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve transkripsiyonel analizler gerçekleştirildi.

Morfolojik analizlerde; rozet alanda, çiçeklenme sürelerinde, fizyolojik analizlerde; bağıl su içeriğinde, biyokimyasal analizlerde; D grubunda askorbat peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde CD ve C grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Transkripsiyonel analizler sonucunda kuraklık stresine karşı ifadesi artan 4 gen tespit edildi ve bunların yarışma içinde olduğu 4 ceRNA ağı RNAhbrid ile belirlendi. ceRNA160 (PEPC-miR160-lnc160), ceRNA168 (RD22-miR168-lnc168), ceRNA172 (AP2-miR172-lnc172) ve ceRNA390 (F3H-miR390-lnc390) ağlarının kuraklık stresinde mRNA, miRNA ve lncRNA seviyeleri qRT-PCR ile belirlenerek aralarındaki ilişki incelenmiştir. PEPC, miR160, RD22 miR168, AP2, lnc172, miR390 ve lnc390 kontrol grubuna göre istatistiksel önemli bulgular elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Nicotiana tabacum*, Kuraklığa alıştırma, ceRNA, miRNA, lncRNA, ROS.

SUMMARY

Drought stress can harm crop growth and productivity, including tobacco plants. Drought priming is a technique that exposes plants to mild, controlled water deficiency to enhance their ability to withstand drought stress. In this thesis, the drought stress tolerance of *Nicotiana tabacum* plant was examined by applying drought practice on the plant, examining the physiological, morphological and biochemical changes in the next drought stress. For this purpose, *Nicotiana tabacum* seedlings that are 40 days old are divided into three groups as control (C), drought priming (D), drought non-priming (CD). Morphological, physiological, biochemical and transcriptional analyses were performed by applying drought stress again at the same time as the group (D) that was drought primed, the group that was also raised and had not been exposed to drought stress before (CD).

Statistically significant results were obtained in morphological analyses; rosette area, flowering times, physiological analyses; relative water content, biochemical analyses; ascorbate peroxidase and superoxide dismutase activities in group D compared to CD and group C. As a result of transcriptional analyses, 4 genes with increased expression against drought stress were identified and 4 ceRNA networks in which they were in competition were determined by RNAhbrid. mRNA, miRNA and lncRNA levels of ceRNA160 (PEPC-miR160-lnc160), ceRNA168 (RD22-miR168-lnc168), ceRNA172 (AP2-miR172-lnc172) and ceRNA390 (F3H-miR390-lnc390) networks in drought stress were determined by qRT-PCR and the relationship between them was investigated. Statistically significant findings were obtained according to PEPC, miR160, RD22 miR168, AP2, lnc172, miR390 and lnc390 control group.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, Drought Priming, ceRNA, miRNA, lncRNA, ROS.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca değerli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve her zaman destekte bulunan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Fatma AYDINOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez komitemin tüm üyelerine, Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT'a, Dr. Öğr. Üyesi Stuart James LUCAS'a, değerli zamanları, tavsiyeleri ve destekleri için çok teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü dönemlerinde arkadaşlığını ve değerli desteklerini benimle paylaşan, her konuda bana yardımcı olan öncelikle Mehmet Serdar KOCA'ya, Mustafa Mert SEVİM'e çok teşekkür ederim. Değerli laboratuvar arkadaşlarım Aslıhan KULOĞLU'na, Ebrar YILMAZ'a, Hilal Sena TAŞÇI'ya ve diğer tüm laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu süreçte yanımda olamasa da her zaman desteğini hissettiğim dostum Ebru KOCAMAN'a, üniversite hayatım boyunca hep yanımda olan sevgili arkadaşlarım Simay AYDINÇ'e, Fatma ÖZGÜÇ'e, Boran MURT'a ve İshak BOYACI 'ya çok teşekkür ederim.

Tüm lisans ve lisansüstü hayatım boyunca hep yanımda olan, beni her koşulda destekleyen ve cesaretlendiren, her zorluğun üstesinden gelmemi sağlayan ve sonsuz sevgisini her zaman hissettiğim yol arkadaşım İsmail Ege YALVAÇ'a çok teşekkür ederim.

Eğitimi her zaman her şeyden önde tutan, tüm eğitim yaşamım boyunca her zaman beni destekleyen, sevgi ve fedakarlıkları ile bugünlere gelmemi sağlayan canım annem Gülay MUMCU'ya ve canım babam Birol MUMCA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Aramızda okyanuslar olsa bile her zaman yanımda hissettiğim, hiçbir zaman benden desteğini ve sevgisini esirgemeyen ablam Merve DEMİR'e ve benim neşe kaynağım minik Hale DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na tez çalışmalarına maddi destekte bulunduğu için teşekkür ederim. Bu proje 2210321 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Nicotiana tabacum</i>	2
1.2. Bitkide Stres Oluşumu	3
1.2.1. Kuraklık Stresi	4
1.2.2. Kuraklığa Alıştırma	6
1.2.3. Bitki ceRNA'larının Kuraklık ile İlişkisi	8
1.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	11
1.3.1 Reaktif Oksijen Türleri Savunma Mekanizmaları	13
1.3.2. Süperoksit dismutaz (SOD)	13
1.3.3. Katalaz (CAT)	14
1.3.4. Peroksidaz (POD)	15
1.3.5. Askorbat Peroksidaz (APX)	15
1.3.6. Glutatyon Redüktaz	16
2. METARYEL VE METOD	17
2.1. Bitki Materyali ve Büyütme Şartları	17
2.2. Klorofil Miktarının Belirlenmesi	19
2.3. Bağlı Su İçeriği Ölçümü	20
2.4. Rozet Alanı, Gövde Uzunluğu ve Çiçeklenme Süresi Ölçümü	21
2.5. Protein İzolasyonu	22
2.6. Antioksidan Enzim Aktiviteleri	23
2.6.1. Katalaz Enzim Aktivitesi	23
2.6.2. Peroksit Oksidaz Enzim Aktivitesi	24

2.6.3. Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi	24
2.6.4. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi	25
2.6.5. Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesi	26
2.7. İn Silico ve İn Vitro ceRNA Analizi	26
2.7.1. Veri Toplama	26
2.7.2. GSE214048 Veri Setinin Biyoinformatik Analizi	27
2.7.3. ceRNA Ağı Tanımlanması	27
2.7.4. ceRNA Regülasyon Ağında Yer Alan miRNA-mRNA- lncRNA Eşleştirme Analizi	28
2.7.5. Primer Dizayn	31
2.8. ceRNA Regülasyon Ağlarında Yer Alan lncRNA-miRNA ve mRNA'ların İfadelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi	32
2.8.1. Toplam RNA İzolasyonu	32
2.8.2. miRNA, mRNA ve lncRNA'lardan cDNA Sentezi	33
2.8.3. Transkript Miktarının Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) Belirlenmesi	34
2.9. İstatistiksel Analiz	35
3. SONUÇLAR	36
3.1. SPAD ve Klorofil Miktarı	36
3.2. Rozet Alanı ve Bağlı Su İçeriği	40
3.3. Gövde Uzunluğu ve Çiçeklenme Süreleri	42
3.3.1. Stres Uygulamasından Sonra Gövde Uzunluğu	42
3.3.2. Çiçeklenme Zamanı Gövde Uzunluğu	42
3.4. Antioksidan Enzim Aktivite Analizleri	45
3.4.1. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi	45
3.4.2. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi	46
3.4.3. Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi	48
3.4.4. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi	49
3.4.5. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesi	50
3.5. Biyoinformatik Analiz Sonuçları	52
4. TARTIŞMA	62
5. ÖNERİLER	69

KAYNAKLAR

70

ÖZGEÇMİŞ

78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
%	: Yüzde
Δ	: Delta
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
kb	: Kilobaz
M	: Molar
ml	: Mililitre
sn	: Saniye
-	: Eksi
+	: Artı
\pm	: Artı Eksi
/	: Taksim
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
$\cdot\text{OH}$: Hidroksil radikali
AA	: Askorbik asit
APX	: Askorbat peroksidaz
BP	: Biyolojik süreç
BSA	: Sığır serum albümini
C	: Kontrol
CAT	: Katalaz
CC	: Hücresel bileşen
CD	: Kuraklığa alıştırlılmamış
cDNA	: Komplementer DNA
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
ceRNA	: Rekabetçi endojen RNA
D	: Kuraklığa alıştırlılmış

ddH ₂ O	: Deiyonize su
DEGs	: Diferansiyel gen ifadesi
DHAR	: Dehidroksiaskorbat redüktaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
eTM	: Endojen hedef mimik
ETS	: Elektron taşıma sistemi
F	: İleri
Fe ²⁺	: Ferroz
Fe ³⁺	: Ferrik
GEO	: Gene Expression Omnibus
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Glutasyon disülfid
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KH ₂ PO	: Potasyum fosfat
L	: Litre
lncRNA	: Uzun kodlanmayan RNA
MF	: Moleküler fonksiyon
mfe	: Minimum serbest enerji
miRNA	: Mikro RNA
mRNA	: Mesajcı RNA
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	: Nitro mavi tetrazolyum
ncRNA	: Kodlanmayan RNA
nm	: Nanometre
O ^{•-} ₂	: Süperoksit
O ₂	: Tekli oksijen
PCA	: Temel Bileşen Analizi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirolidon
q-RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
R	: Geri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rRNA	: Ribozomal RNA

RWC	:	Bağıl su içeriği
SE	:	Standart hata
siRNA	:	Susturucu RNA
snoRNA	:	Küçük nükleor RNA
SOD	:	Süperoksit dismutaz
sRNA	:	Küçük RNA
TA	:	Taze Ağırlık
tRNA	:	Taşıyıcı RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Bitkide stres faktörleri.	4
1.2: Bitkideki kuraklık stresi ile oluşan tepkiler.	5
1.3: Bitkileri kuraklık stresine alıştıırma ve stres hafızası oluşumu.	7
1.4: Bitkideki kodlanmayan RNA'ların sınıfsal gösterimi.	9
1.5: Swiss-model homoloji modelleme kullanılarak oluşturulan SOD enziminin 3 boyutlu yapısı ve enzim reaksiyonu.	14
1.6: Katalaz enzim reaksiyonu.	14
1.7: POD enzimi reaksiyonu.	15
1.8: APX enzimi reaksiyonu.	15
1.9: GR enzimi reaksiyonu.	16
2.1: Tohum ekili viyoller.	17
2.2: Deney tasarımı.	18
2.3: SPAD metre ile <i>Nicotiana tabacum</i> yapraklarının klorofil miktarının ölçümü.	19
2.4: Toplam klorofil miktarı ölçümü.	20
2.5: İmage J uygulamasında rozet alan ölçümü.	21
3.1: Üçüncü yaprak SPAD ölçümü.	36
3.2: Dördüncü yaprak SPAD ölçümü.	37
3.3: Beşinci yaprak SPAD ölçümü.	38
3.4: Altıncı yaprak SPAD ölçümü.	38
3.5: İmage J ile rozet alan ölçüm sonuçları (cm ²).	40
3.6: <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinin üstten (a) ve yandan (b) görüntüsü.	41
3.7: % Bağıl su içeriği miktarları.	42
3.8: <i>Nicotiana tabacum</i> bitkilerinin stres uygulaması sonrası gövde uzunlukları.	43
3.9: <i>Nicotiana tabacum</i> bitkilerinin çiçeklenme zamanı gövde uzunlukları.	44
3.10: Çiçeklenme önceliği.	45
3.11: Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında katalaz (CAT) enzim aktivitesi.	45

3.12:	İyileşmenin ardından C, CD ve D gruplarında katalaz (CAT) enzim aktivitesi.	46
3.13:	Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi.	47
3.14:	İyileşmenin ardından C, CD ve D gruplarında peroksidaz (APX) enzim aktivitesi.	47
3.15:	Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında peroksidaz (POX) enzim aktivitesi.	48
3.16:	İyileşmenin ardından C, CD ve D gruplarında peroksidaz (POX) enzim aktivitesi.	49
3.17:	Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi.	49
3.18:	İyileşmenin ardından C, CD ve D gruplarında Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi.	50
3.19:	Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında Glutatyon Redüktaz (GR) enzim aktivitesi.	51
3.20:	Yeniden sulamanın ardından C, CD ve D gruplarında Glutatyon Redüktaz (GR) enzim aktivitesi.	51
3.21:	PCA grafiği.	52
3.22:	Isı grafiği.	53
3.23:	DEGs'in önemli ölçüde zenginleştirilmiş GO terimi analizi.	53
3.24:	Volcana plot.	54
3.25:	ceRNA-160 (a-d) ağı.	55
3.26:	ceRNA-164 ağı.	55
3.27:	ceRNA-167 ağı (a-e).	56
3.28:	ceRNA-168(a-e) ağı.	56
3.29:	ceRNA-156 ve ceRNA-159 ağı.	57
3.30:	ceRNA-1446 ve ceRNA-171b ağı.	57
3.31:	ceRNA-172 ve ceRNA-168ağı.	57
3.32:	ceRNA-160 ve ceRNA-390 ağı.	57
3.33:	ceRNA regülasyon ağları.	58
3.34:	ceRNA-160 ağı.	59
3.35:	ceRNA-168 ağı.	59

3.36: ceRNA-172 ađi.	60
3.37: ceRNA-390 ađi.	61

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Bitkilerin kuraklık stresine karşı oluşturdukları tepkiler.	5
2.1: RT-qPCR analizleri için seçilen 4 adet ceRNA regülasyon ağında yer alan mRNA-miRNA-lncRNA ilişkileri ve transkript bilgileri.	28
2.2: miRNA ve hedef mRNA ve lncRNA'ları.	28
2.3: mRNA primer dizileri.	31
2.4: miRNA primer dizileri.	31
2.5: lncRNA primer dizileri.	32
3.1 Klorofil a, b ve karotenoid miktarları.	39

1. GİRİŞ

Kuraklık, belli bir alan ya da bölgenin uzun bir süre su ile temas haline geçebileceği kaynaklara ulaşamamasıdır. Bu kaynaklar yağış, yer altı ve yüzey suları olarak değerlendirilebilir. Kuraklığa başlıca neden olan yağış, çok az veya hiç olmamasıyla yer altı; göller, nehirler, dereler gibi yüzey sularını olumsuz yönde etkilemektedir. Her yıl katlanarak artan nüfus, sanayi ve enerji ihtiyacı sonucunda, tüm dünya üzerinde küresel ısınma hızla artmakta ve bununla birlikte iklim değişikliğine sebebiyet vermektedir [Spinoni et al., 2014].

Doğal dengenin bozulması düzeltilemez ise, hızla değişen iklimler ve küresel ısınmadan kaynaklı kuraklık, gelecek süreçte hem insanlık hem de bitkiler ve hayvanlar için ciddi bir tehdit oluşturacaktır.

Kuraklığın birden fazla türü olsa da başlıca en çok ön plana çıkan üç adet türü vardır. Bunlardan ilki meteorolojik kuraklık olarak adlandırılan kuraklık türüdür. Meteorolojik kuraklığın belirlenmesi için; klimatoloji biliminin incelediği iklimin, standartlaştırdığı değerler karşılaştırılarak, ortalama değerlerinin altında olması durumuna denir. Bir diğer tür ise hidrolojik kuraklıktır. Bu kuraklık türü ise yer altı ve yüzey sularının yağmur, kar gibi yağışlarının gerçekleşmemesi sebebiyle oluşmaktadır. Üçüncü tür ise tarımsal kuraklıktır. Tarımsal kuraklık, toprakta yetişen bitkinin, topraktan gerek duyduğu yeterli miktarda suyu alamamasıdır. Toprağın alt katmanları suya fazlasıyla sahip olsa da bitki köklerinin yetişebildiği alanda bitki gelişimi için yeterli düzeyde su olmaması tarımsal kuraklığı oluşturmaktadır. Başlıca sebep olarak rüzgârın sıcak ve kuvvetli esmesiyle toprağın üst yüzeyini kurutması, sıcaklıklarının yüksek derecelere ulaşması ile topraktan nemin hızla buharlaşması, az düzeyde yağışların gerçekleşmesi söylenebilir [Wilhite and Glantz, 1985].

Dünya üzerinde en çok tütün üreten ülkeler arasında Türkiye 15. sıradadır. Türkiye’de de en çok tütün üretimi yapılan iller ise Denizli, Manisa ve Adıyaman’dır. Cebeci ve arkadaşlarının (2019) araştırdığı Türkiye’deki illerin kuraklık seviyeleri incelemesinde, Türkiye de kuraklık riski bulunduran bölgelerin başında olan Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan Adıyaman’ının Bagnouls Gausson kuraklık indisine göre 213.4 ile aşırı kurak, Denizli 146.5 ile aşırı kurak, Manisa 140.3 ile aşırı kurak iller arasındadır. Bagnouls Gausson kuraklık indisi 0 indisi nemli, 1-50 yarı-nemli, 51-130 kurak, >130’dan büyük indisi çok kurak olarak geçmektedir. Bagnouls

Gaussen kuraklık indisi belirli = i ayındaki aylık ortalama sıcaklığı, = i ayındaki aylık toplam yağış miktarını değerlendirilerek hesaplanır.

Tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisinin büyümesi için gerekli su miktarını topraktan yeterli miktarda sağlayamaz ise morfolojik olarak gelişimsel gerileme görülür. Tütün bitkisi yaprağı ticari olarak büyük bir önem arz ettiği için gelişim döneminde kuraklığa maruz kalmak üretici için büyük bir zarar oluşturmaktadır.

Nicotiana tabacum bitki genetiği ve biyolojisi çalışmalarında model bir organizma olarak da kullanılmaktadır. Tütün bitkisindeki kuraklık direnç mekanizmalarının aydınlatılması, kuraklığı tolere edebilme yeteneğine ışık tutarak, kuraklık stresi karşısında çözümler geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında *Nicotiana tabacum* bitkisine kuraklığa alıştırmaya metodu uygulanarak kuraklık stresi sırasında fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler gerçekleştirmek ve lncRNA-miRNA-mRNA'ların yer aldığı rekabetçi endojen RNA (ceRNA) regülasyon ağlarının rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1. *Nicotiana tabacum*

Genel olarak tütün olarak adlandırılan *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana* cinsi ve Solanaceae familyasına ait tek yıllık olarak yetişen, çift çenekli otsu bir bitkidir. Dünya üzerinde yaygın olarak yetiştirilir ve tarımsal ve ekonomik olarak değerli bir bitkidir.

Dünya üzerindeki dağılımları ve genetik özellikleri göz önüne alındığında *Nicotiana* bitkisinin anavatanı Orta Amerika ve Güney Amerika sınırları içerisinde. Amazon bölgesinde yaşayan yerli halk *Nicotiana* bitkisini tedavi için şifalı ve bir bitki olarak kullanmaktaydılar [Russell and Rahman, 2015]. *Nicotiana* bitkisinin şifa kaynağı olarak kullanılmaktan çıkıp, keyif verici zararlı bir maddeye dönüşümü ise Amerika'nın keşfinden sonra tüm dünyaya yayılmasıyla başlamıştır. Tarihte ilk kez tütün Türkiye'ye 16. yüzyılın sonunda ticaret için Avrupa'dan Türkiye'ye gelen gemiler ile gelmiştir. Günümüzde dünyanın hemen hemen her yerinde yetişebilen *Nicotiana tabacum*, farklı iklim koşullarında, pH derecesi farklı asidik ve bazik topraklar ile hafif (kumlu), orta (tınlı) ve ağır (kil) toprak çeşitlerine de uyum sağlayarak yetişebilir [Berlowitz et al., 2020].

Tütün bitkisinin büyümesi için verimli optimal sıcaklık aralığı 20-30 °C'dir. Tütünün ürün olarak yetiştirilmesi yapıyor ise tütünün dikildikten sonra yaklaşık olarak 3 ya da 4 ay içerisinde yapraklarının toplanması gerekmektedir. Ülkemizde birçok bölgede yetişebilen *Nicotiana tabacum* bitkisinin çiçeklenme zamanları haziran ve ağustos ayları arasında olmaktadır. Boyları 1 ila 3 metre arasında değişebilen *Nicotiana tabacum* bitkisi dik bir formda gövdeye sahip olup, salgı içeren tüylerle kaplı yapraklara sahiptir.

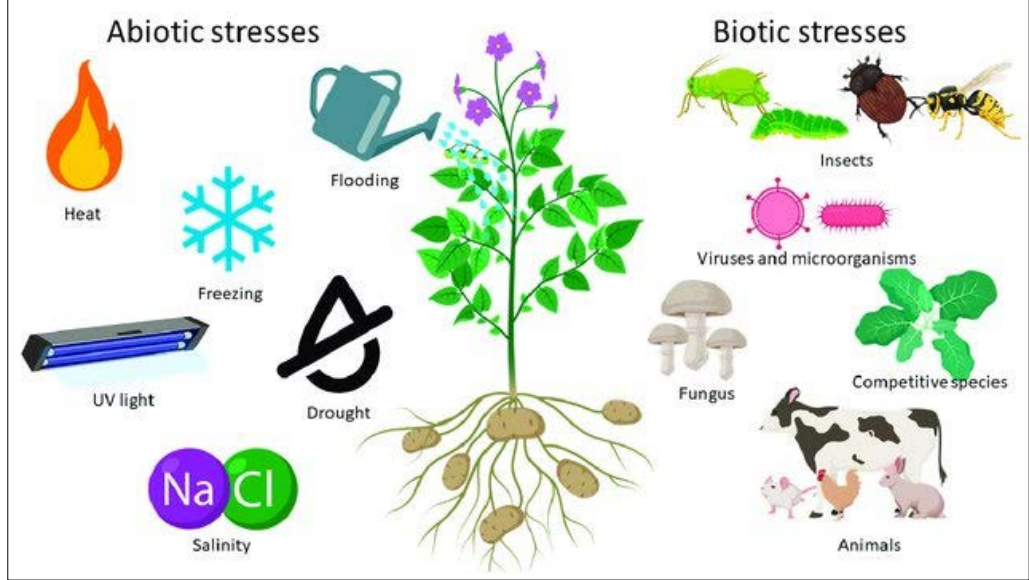
Tütün yapraklarında sıkı bir biçimde bulunan epidermis hücreleri yaprağın alt ve üstündeki tabakada koruyucu olarak görev almaktadır. Epidermisin üst tabakasında ince yapılı kutikula ve üst epidermisten oluşan aromatik salgı tüyleri ve yapraktaki su kaybına sebep olabilecek rüzgâr ve güneş ışıklardan korumak için örtü tüyleri mevcuttur. Epidermisin üst tabakasının alt katmanında ise silindir şeklinde olan, yan yana bitişik bir şekilde bulunan palizat parankiması mevcuttur. Bu katmanın altında ise dağınık bir halde bulunan ve hücrelerin birbirine olan mesafesinin fazla olduğu sünger parankiması vardır. Stomalar bitkide O₂ ve CO₂ alışverişinin gerçekleştiği yerlerdir. Stomalar epidermis hücrelerinin içerisinde, genel şekilden çıkıp şekil değiştiren iki tane epidermis hücresinin oluşturduğu boşluklardır. Genel olarak alt epidermis tabakasında daha az stoma mevcuttur [Anastasov, 2010].

1.2. Bitkide Stres Oluşumu

Bitkiler buldukları konumda sabit olarak durmaktadırlar ve hareket ederek yer değiştirme becerileri bulunmaz. Bu sebepten dolayı oldukları konumlardaki çevre şartlarının bitki büyümesi için uygun koşullarda olmadığına, bitkinin metabolizmasındaki iç dengenin bozulduğu, şartların bitki gelişim ve büyümesi üzerinde olumsuz etkilere sebep olması, bitkilerin metabolik yollarda düzenlemeler yaparak direnç kazanmasını gerektiren durumlara stres denilmektedir [Shulaev et al., 2008].

Bitki stres faktörleri ise stresin oluşmasını sağlayan her bir durumdur. Stres, biyotik ve abiyotik olmak üzere temel iki faktöre ayrılır (Şekil 1.1) [Web 1, 2022]. Biyotik stres faktörlerini canlı unsurlar oluşturmaktadır. Bunlar; böcek, virüs ve mikroorganizma, mantar, bitkiyi strese sokabilen başka bitki türleri ve hayvanlardır.

Abiyotik stres faktörlerindeki unsurlar ise cansızdır. Abiyotik stresi oluşturan unsurlar; kuraklık, sıcak ya da soğuk hava koşulu, ağır metal, tuzluluk, UV ışınları gibi etmenlerdir.

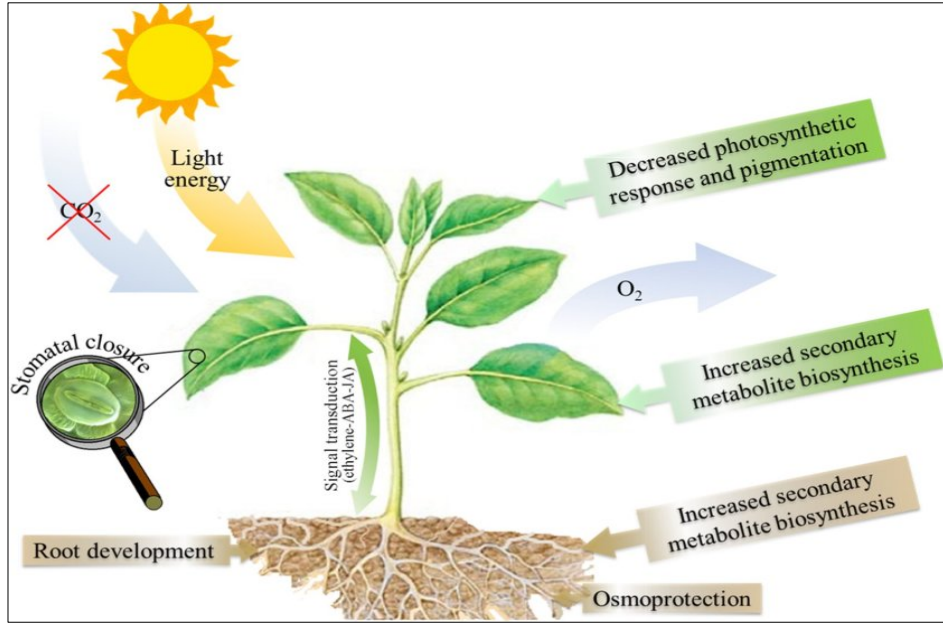


Şekil 1.1: Bitkide stres faktörleri.

1.2.1. Kuraklık Stresi

Kuraklık stresi, topraktaki mineralin fazla ya da az olması, mevcut su miktarının toprakta yetersiz kalması gibi sebeplerden dolayı bitki köklerinin yeterli su miktarını alamamasından oluşmaktadır. Kuraklık stresine daha iyi adaptasyon ve uyum sağlamak için zaman içerisinde evrimsel süreçle bitkiler mekanizmalar geliştirmişlerdir.

Kuraklık stresi bitkideki ozmoz ve iyon dengesini değiştirip bozarak, bitkilerde hasara, büyümesindeki hızın değişmesi gibi gelişimsel ve fizyolojik sürecinde negatif etkiler oluşturur (Şekil 1.2) [Khan et al., 2016], [Paramo et al., 2020].



Şekil 1.2: Bitkideki kuraklık stresi ile oluşan tepkiler.

Tablo 1.1: Bitkilerin kuraklık stresine karşı oluşturdukları tepkiler.

	Cevap		
	Morfolojik	Fizyolojik	Biyokimyasal
Kuraklık Stresi	Kök sistemini güçlendirir (uzatılmış kökler)	Stoma kapanması	ABA sentezi
	Yaprak yüzey alanını azaltma	CO ₂ fiksasyonunu azaltma	Rubisco'nun azaltılmış aktivitesi
	Yaprakları yuvarlamak	Azalan fotosentez	Çözünen bileşiklerin birikmesi (prolin, glisin-betain, şeker)
	Düşen yapraklar	Artan ROS bileşikleri	Artan antioksidan bileşikler
	Erken çiçeklenme		Kuraklığa dayanıklı gen ifadesi

Temel olarak üç tepki mekanizması vardır. Bunlardan ilki kuraklık stresinden kaçınma (escape) mekanizmasıdır. Bu strateji ile bitki kuraklık stresini algıladığında daha hızlı büyüme göstererek ve erken çiçeklenerek kuraklığın bitki üremesine olumsuz etki göstermesinden kaçınır [Kooyers, 2015]. Bir diğer tepki mekanizması kuraklık stresinden sakınmadır (avoidance). Bu strateji ile bitki stomalarını kapatır, yapraklarını buruşturarak yüzey alanını küçültür, kök uzunluğunu artırır ve böylece su kullanma verimliliğini artırır ve bağıl su içeriğini dengede tutarak kuraklık stresinden sakınır [Seleimanve et al., 2021]. Son mekanizma ise kuraklığa tolerans (tolerance) mekanizmasıdır. Osmotik ayarlama, çözünen madde birikimi, stresten kaynaklı oluşan hasarları azaltmak ve onarabilmek için gerekli genlerin ve metabolik yolların düzenlenmelerini içerir [Fang and Xiong, 2015].

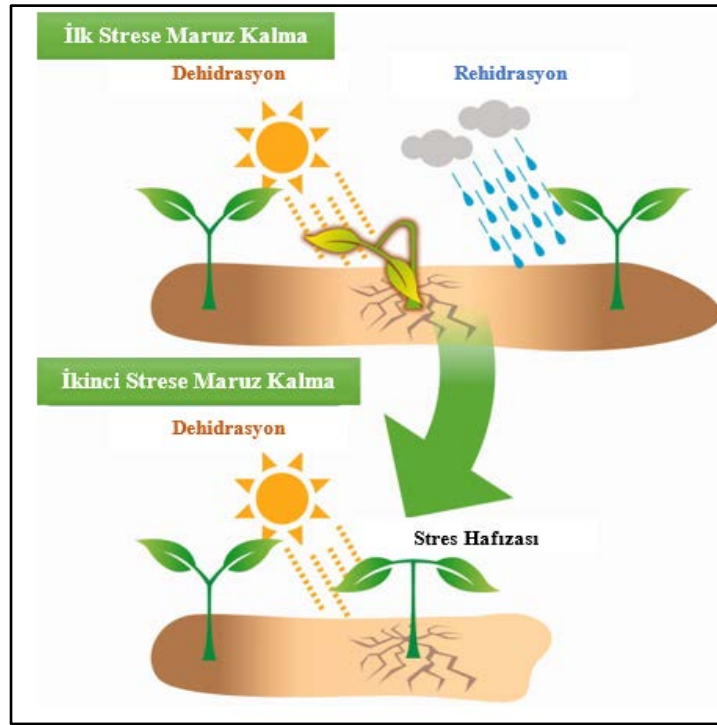
Topraktaki yetersiz su miktarından dolayı toprakta bulunan tuz ve minerallerin yoğunluğu, bitkiye göre daha fazla miktardadır. Topraktaki ozmosun daha yüksek olmasından kaynaklı su alınının yetersiz olmasıyla otsu bitkilerde, bitkinin dik bir şekilde kalmasını sağlayan turgor basıncı azalır ve hücrelerdeki su kaybı sonucunda bitki büzülme ve solmaya başlar. Bitki kökleri su alınımlarını arttırmak için yüzey alanını artırır [Chen et al., 2016]. Bitkiler terleme ile dışarıya atılan su moleküllerini hücre içerisinde tutabilmek için stomalarını kapatır. Stomaların kapanmasıyla fotosentez için gerekli olan karbondioksit (CO_2) alınımlarının durmasıyla hücre arası boşluklarda kısıtlı miktarda bulunan CO_2 ile fotosentez yapmaya devam eder. Kuraklık stresinin uzun sürmesi durumunda bitkideki klorofillerde hasar oluşur ve miktarlarında azalma meydana gelir [Basu et al., 2016]. Bitkideki fotosentez hızı azalır. Bu durumla karşılaşan bitki, fotosentezde kullanılacağı ışık enerjisinden daha çok enerjiyi emmiş olur. Fazla enerjide süperoksit radikali ($O^{\bullet-}_2$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına sebep olabilmektedir [Wang et al., 2018].

1.2.2. Kuraklığa Alıştırma

Kuraklığa alıştırma, bir bitkiyi hafif ve kontrollü bir şekilde belirli bir süre su eksikliğine maruz bırakarak bitkinin kuraklık stresini tolere edebilme becerisini artırmak için kullanılan bir yöntemdir [Ru et al., 2022]. Kuraklığa alıştırma; bitkideki su durumu yönetimini, fotosentezi, yaprak boyutunu, antioksidan enzim aktivitelerinde değişimi, sinyal üretimi gibi bitkinin kuraklık stresinden kurtulmasına ve daha iyi bir şekilde hayatta kalabilmesine yardımcı olabilecek fizyolojik ve

biyokimyasal mekanizmaları aktive eder, bu sayede bitkinin ilerleyen süreçlerde kuraklığa maruz kalması durumunda kuraklık stresi ile mücadele etme yeteneğinin gelişmesine yardımcı olur [Backhaus et al., 2014].

Kuraklığa alıştıırma yöntemi, bitkiyi kontrollü ve hafif şekilde kuraklık stresine maruz bırakılarak oluşturulur. Bitkiye verilen suyun belirli bir süre kesilmesi ya da suyu tutma kapasitesi az olan bir toprakta yetiştirilme sağlanarak bitkinin elde edeceği su miktarı azaltılıp kuraklık stresi oluşturulur. Bu sayede bitki kuraklık stresi ile mücadele edebilmek için fizyolojik ve biyokimyasal savunma mekanizmalarını aktive ederek stres hasarından korunmaya çalışır. Stres uygulamasının ardından bitkiye normal miktarda su verilerek, optimum büyüme şartlarına geri döndürülür (Şekil 1.3.). Alıştıırma süresi boyunca edindiği savunma sistemi ile bitki gelecekteki kuraklık şartlarına karşı daha dirençli olacaktır [Abid et al., 2016].



Şekil 1.3: Bitkileri kuraklık stresine alıştıırma ve stres hafızası oluşumu.

Bitkinin bir strese maruz kalmasının ardından sonraki stres ile daha kolay ve daha az hasar görek atlatması durumuna stres hafızası denir [Sintaha et al., 2022]. Stres hafızası Lämke ve Bäurle (2017) tarafından üç kategoriye ayrılmıştır Bunlardan ilki bir bitkinin yaşam süresi boyunca mitotik olarak aktardığı somatik stres hafızası, ikincisi sadece stres yaşamayan birinci yavru nesilde etki gösteren stres hafızası,

üçüncüsü ise mayoz bölünme ile iki ya da daha fazla strese maruz kalmamış nesillerde etkisini gösteren nesiller arası stres hafızası [Jacques et al., 2021].

Bitkiler birkaç günlük ya da daha uzun süren haftalar boyu kuraklığa maruz kalmalarını hatırlamaları somatik hücrelerdeki transkriptomik ve metabolomik değişimler sayesinde olmaktadır. Kuraklık hafızasına sahip olan bitkide bir sonraki strese maruz kaldığında transkripsiyon faktörleri (TF), absisik asit bağımlı sinyalleşmede rol oynayan genler, lipid transferaz proteinleri, iyon taşıyıcılar gibi daha yüksek ifade edilen genler bulundu.

Kuraklığa alıştıırılan bitkideki kuraklık ile alakalı genlerden olan AREB1, DREB2B ve WRKY6 genlerinin ekspresyon seviyeleri daha önce kuraklık stresi yaşamamış bir bitki ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyelerinde artış bulunmuştur [Khan et al., 2020].

Yapılan çalışmalarda kuraklığa alıştıırmanın bitkinin kuraklık stresine tekrar maruz kaldığında daha iyi adaptasyon gösterdiği belirtilmiştir. İki haftalık mısır fidelerine uygulanan kuraklığa alıştıırma uygulamasının ardından uygulanan ikinci bir kuraklık stresinde alıştıırılan bitkilerin alıştıırılmayan bitkilere göre daha az su kaybettiği gözlenmiştir [Ding et al., 2014].

Yapılan bir başka çalışmada kuraklığa alıştıırmanın fotosentez hızına ve stoma iletimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan deney sonucunda kuraklığa alıştıırılmış soya fasulyesinin alıştıırmamış olana göre kuraklık stresi altında fotosentez etkinliği, stoma iletkenliği ve terleme oranında azalma meydana gelmiştir [Sintaha et al., 2022].

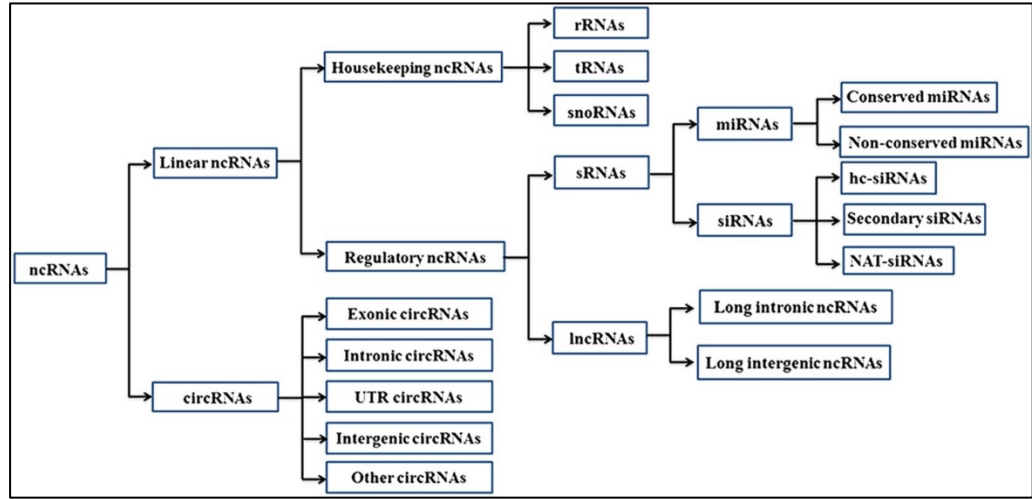
Bir başka çalışmada ise kuraklığa alıştıırmanın antioksidan enzim aktivitesi üzerindeki etkilerine bakıldığında kuraklığa alıştıırılan grubun daha yüksek seviyelerde antioksidan enzim aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir [Khan et al., 2020].

1.2.3. Bitki ceRNA'larının Kuraklık ile İlişkisi

Bir protein kodlama yeteneği olmayan RNA'lar kodlamayan RNA'lar (ncRNAs) olarak adlandırılmaktadır. ceRNA, "rekabet eden endojen RNA" anlamına gelir ve hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek paylaşılan miRNA'lar için rekabet ederek diğer RNA transkriplerini düzenler.

Düzenleme mekanizması, miRNA'lar için bir sünger görevi yaparak miRNA'nın, hedeflediği mRNA'ya bağlanması engellenerek hedef genlerin ekspresyonunu düzenler.

RNA'lar genomdan RNA polimeraz ile transkripsiyona uğrarlar. ncRNA'lar lineer ve dairesel olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Şekil 1.4.) [Liu et al., 2017].



Şekil 1.4: Bitkideki kodlanmayan RNA'ların sınıfsal gösterimi.

Lineer ncRNA'lar fonksiyonlarına göre housekeeping ncRNA'lar ve düzenleyici ncRNA'lar olarak sınıflandırılır. Housekeeping ncRNA'lar rRNA'lar, tRNA'lar, snoRNA'lar olmak üzere başlıca üç gruba daha ayrılmaktadır. Uzunlukları elli ve beş yüz nükleotit (nt) arasındadır ve bütün hücrelerde bulunurlar. Hücre içerisinde başlıca görevlerin yerine getirilmesini sağlarken düzenleyici rollere de sahip olabilirler [Zhang et al., 2019].

Düzenleyici ncRNA'lar ise büyüklüklerine göre iki gruba ayrılmaktadır. 200 nükleotitten daha fazla uzunluğa sahip olan uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) ve 200 nükleotitten kısa olanlara ise küçük kodlamayan RNA (sRNA) olarak isimlendirilmektedir. sRNA'ları oluşturan miRNA'lar ve siRNA'lardır [Filipowicz et al., 2008].

siRNA ve miRNA nükleotit uzunlukları yirmi bir ve yirmi altı nükleotit arasındadır [Ferlita et al., 2018]. İki RNA çok benzer olsa da aralarında farklılıklar bulunmaktadır. miRNA'lar transkripsiyon sonrasında mRNA translasyonunu inhibe ederek gen ekspresyonunu düzenler. miRNA ile mRNA arasında gerçekleşen yüksek oranda baz eşleşmesi sonucunda miRNA hedef mRNA dizisine baz

komplementasyonu ile bağlanarak mRNA'nın parçalanmasına ya da baskılanmasına neden olur [Dong et al., 2013].

miRNA'lar, gen ekspresyonunu hedef mRNA'ların bölünmesi veya translasyonun baskılanması olmak üzere iki ana mekanizma yoluyla düzenleyebilir. Bu mekanizma büyük ölçüde miRNA ile hedef mRNA üzerindeki bağlanma bölgesi arasındaki tamamlayıcılık düzeyi tarafından belirlenir. Hedef mRNA'ya yüksek tamamlayıcılık sergileyen miRNA'lar bölünmeye yol açarken, düşük veya kısmi tamamlayıcılığa sahip miRNA'lar translasyonel baskıya neden olma eğilimindedir [Millar et al., 2005].

LncRNA'lar miRNA tanıma elemanları (MREs) içererek potansiyel ceRNA'lar olarak hareket ederek gen düzenleme mekanizmasında rol alır. lncRNA'lar mRNA ile ortak olarak paylaşılan miRNA için mRNA'lar ile rekabet eder. Böylelikle lncRNA'lar miRNA'ların mRNA'lara bağlanmasını etkileyerek ve hedef genlerin ekspresyon seviyelerini değiştirerek miRNA'lar için sünger görevi yapar.

Endojen hedef mimik (eTM), miRNA'lar için bir tuzak görevi görerek gen ekspresyonunu düzenleyebilen bir RNA molekülü türüdür. eTM'ler, spesifik miRNA'ların hedef bölgelerini taklit eden diziler içererek miRNA'ların rekabetçi inhibitörleri olarak işlev görebilir. eTM'ler tipik olarak gelişim, stres tepkileri ve hastalık dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde gen ekspresyonunu düzenlemek için evrimleşmiş uzun kodlamayan RNA'lardır (lncRNA'lar).

eTM'de odak noktası, miRNA'lar tarafından transkripsiyon sonrası düzenlemeden ziyade transkripsiyonun düzenlenmesidir. eTM'de, ortak transkripsiyon faktörü bağlama bölgelerini paylaşan bir grup RNA molekülü, bu transkripsiyon faktörlerine bağlanmak için birbirleriyle rekabet edebilir ve bu, spesifik genlerin transkripsiyonel çıktısını etkileyebilir.

ceRNA'lar ise, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), haberci RNA'lar (mRNA'lar) ve dairesel RNA'lar (circRNA'lar) gibi bir grup RNA molekülü, ortak miRNA yanıt elemanlarına (MRE'ler) sahip olabilir. miRNA'lara bağlanmak için birbirleriyle rekabet ederler. Bu rekabetin önemli düzenleyici sonuçları olabilir, çünkü bu RNA'ların seviyeleri miRNA'ların seviyelerindeki değişikliklerden etkilenebilir.

LncRNA'ların miRNA'ların endojen hedef mimikleri (eTM'ler) olarak tanımlanan ilk lncRNA miR399 ile eşleşen IPS1'dir. IPS1 ve PHO₂ (fosfat 2) mRNA miR399'a bağlanmak için rekabet içerisinde oldukları benzer 23 nükleotid (nt) bağlanma bölgesine sahiptirler. miR399'nın hedeflediği mRNA'nın parçalanması,

IPS1'in mirR399'a hedef taklit yapması sonunda engellenmiş olur [Franco-Zorrilla et al., 2007].

Endojen miRNA hedef mimikleri (eTM'ler) olarak hareket eden birden fazla lncRNA'lar bitkide tanımlanmıştır. Jiang ve arkadaşlarının (2019) domates bitkisi üzerinde yaptığı bir çalışmada, miR482b'nin ekspresyonunun domates bitkisinin *Phytophthora infestans*'a karşı direncini azaltmasından dolayı miR482b'nin eTM'lerini içeren lncRNA'lar ile miR482b'nin ekspresyonunu azaltmaya yönelik çalışma gerçekleştirdiler. Çalışma sonucunda lncRNA23468'in miR482b birikimini azalttığını, miR482b'nin hedeflediği NBS-LRR genlerinin ekspresyonlarının arttığını ve *P. infestans* enfeksiyonuna karşı direnci arttırdığını gözlemlediler.

Chen ve arkadaşlarının (2021) ceRNA düzenlemesi yolu ile pirinçte kuraklık ile ilişkili lncRNA ve miRNA üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda kuraklık ile ilgili 40 lncRNA, 23 miRNA ve 103 mRNA içeren ceRNA ağları tanımladılar. lncRNA (TCONS_00021861) ve miRNA (miR528) ve mRNA (YUCCA7) ekspresyon seviyelerini RT-qPCR ile incelemişlerdir. Ayrıca lncRNA ve miRNA (miR528)'nın mRNA (YUCCA7) ifadesindeki regülatör rolünü gözlemleyebilmek için, lncRNA (TCONS_00021861) ve miRNA (miR528)'yü aşırı eksprese ederek qPCR ile analiz yapmışlardır. Sonuç olarak, kuraklık ve kontrol grupları karşılaştırıldığında lncRNA (TCONS_00021861) ve mRNA (YUCCA7) ifadesinde azalış, miRNA (miR528) ifadesinde artış gözlenmiştir. lncRNA (TCONS_00021861)'nin aşırı eksprese edilerek yapılan qPCR sonuçlarında ise, lncRNA (TCONS_00021861)'nin mRNA (YUCCA7) seviyesini arttırdığı buna karşılık miRNA(miR528) aşırı ifade edilmesi sonucunda mRNA (YUCCA7) seviyelerini azalttığı bulundu.

1.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), oldukça reaktif olan ve oksijen içeren moleküllerdir. ROS'lar, oksidatif strese ve hücrel yapılar da hasara neden olabildikleri için genellikle bitkiler için zararlı kabul edilirken, aynı zamanda çeşitli bitki fizyolojik süreçlerinde önemli roller oynarlar. Patojenlere karşı savunmada, patojeni öldürebilen ve enfeksiyonun yayılmasını önleyebilen süperoksit anyonu (O_2^{\bullet}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROS üretimini tetiklenir. Sinyalleşme mekanizmasında yer alarak çeşitli bitki fizyolojik süreçlerinde sinyal molekülleri

olarak hareket edebilir. Örneğin, hidrojen peroksit (H_2O_2), bitkilerde gaz değişimini ve su kaybını düzenlemek için çok önemli olan stoma hareketini düzenlemede kritik bir rol oynar. ROS ayrıca bitki hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alır. Örneğin, hidrojen peroksit (H_2O_2), hücre bölünmesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde yer alır. ROS, tohum çimlenmesinde kritik bir rol oynar. Örneğin, çimlenme sırasında tohum kabuğunun parçalanmasında hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi yer alır [Mittler, 2017].

ROS normal şartlarda bitkiler tarafından azami miktarda üretilmektedir [Sies et al., 2020]. Az miktarda üretildiği için birçok enzimatik antioksidan ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından parçalanır. Fakat bitkide biyotik ve abiyotik stres oluştuğunda, ROS miktarı artar ve parçalanarak zararsız forma dönüşümünü sağlayan homeostatik denge bozulur. Hücre içinde bulunan pek çok molekül ile etkileşime girme kapasitesi çok yüksek olduğundan dolayı DNA, RNA, protein ve lipitler ile etkileşime girerek onlara zarar verebilir. Uzun süre reaktif oksijen türlerine maruz kalmak, oluşan hasarların telafi edilemez boyutlara ulaşmasına ve hücrelerin ölmesine neden olabilir [Osmolovskaya et al., 2018]. Dolayısıyla, ROS'un fazla miktarlarda olması bitki için toksik etki yaratır.

ROS'un dört temel formu bulunmaktadır. Bunlar O_2 (tekli oksijen), H_2O_2 (hidrojen peroksit), $O_2^{\cdot-}$ (süperoksit) ve $\cdot OH$ (hidroksil radikali)'dir.

O_2 fotosentez sonucunda ortaya çıkan bir yan üründür. Ortamda oksijen ve ışığın bulunması O_2 (tekli oksijen) oluşması için yeterli olmaktadır. Kuraklık stresinden dolayı stomaların kapanmasıyla fotosentez hızında yavaşlama meydana geldiği için fazla miktarda ışık enerjisi ortamda bulunmaktadır ve O_2 üretimini artırıcı yönde bir etki sağlamaktadır. O_2 miktarının normal olduğu koşullarda, karotenoid, plastokinon, tokoferol gibi kloroplastlarda bulunan yapılar O_2 'yi parçalayabilmektedir. Fakat O_2 miktarının çok fazla olması protein, DNA, RNA, lipit ve pigmentlerde hasar oluşturabilir ve hücre ölümlerine neden olabilir [Das et al., 2014].

H_2O_2 hem normal zamanlarda hem de bitkinin strese girdiği zamanlarda oksidatif stresle de üretilir. Kuraklık stresinde stomaların kapalı olmasıyla ribuloz difosfata bağlayacak yeterli miktarda CO_2 bulamaz, onun yerine oksijen bağlar ve fotorespirasyon artar. Kuraklıkta hücre içerisindeki H_2O_2 'nin % 70'i fotorespirasyon ile üretilir [Noctor et al., 2002].

$O_2^{\cdot-}$ 'de bitkide gerçekleşen metabolik tepkimelerden ortaya çıkan bir yan üründür. Kloroplastlarda fotosistem I merkezinde indirgenmiş ferrodoksin ve

tioredoksin NADP⁺ yerine O₂'yi O^{•-}₂'ye indirger (Mehler reaksiyonu) [Osmolovskaya et al., 2018]. O^{•-}₂ sadece kendisi hücre için büyük hasarlara sebebiyet vermez, *OH ve O₂ formlarına dönüşerek membranlardaki doymamış yağ asitlerindeki bağları kırarak lipit peroksidasyonuna sebebiyet verir [Halliwell, 2006].

OH diğer ROS türleri arasındaki en çok toksik olan formdur. Fenton reaksiyonu ile başlayan reaksiyonun tamamına Haber-Weiss reaksiyonu olan zincirleme reaksiyonda geçiş metalleri tarafından (Fe²⁺, Fe³⁺), H₂O₂ ve O^{•-}₂'nin katalize edilmesi ile oluşur [Chen et al., 1999].

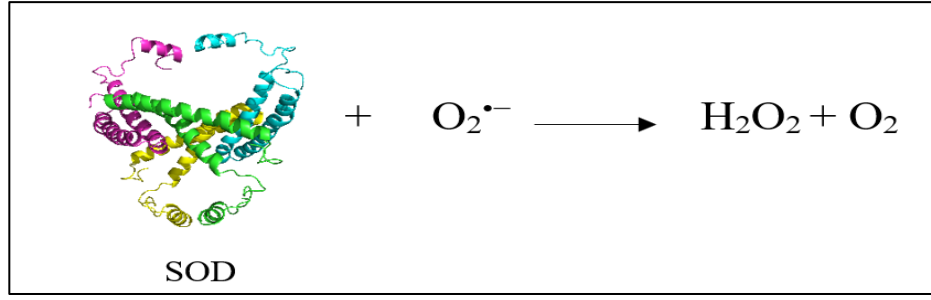
1.3.1. Reaktif Oksijen Türleri Savunma Mekanizmaları

Reaktif oksijen türlerinden kaynaklı oluşan hasarların etkilerini azaltmak veya kaldırmak için bitkiler savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki grup vardır.

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), monodehidroksiaskorbat redüktaz (MDAR, askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), peroksidaz (POD), dehidroksiaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon peroksidaz (GPX) enzimleri, antioksidan enzim grubu içerisinde dirler.

1.3.2. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz tüm oksijenli solunum yapan canlılarda olan ve metalloenzimler ailesinde bulunan enzimdir. Süperoksit dismutaz O₂⁻'yi H₂O₂'ye dönüştürerek ROS savunma hattında en ön sırada bulunduğu düşünülmektedir [Das et al., 2014]. SOD bir reaktif oksijen türünü başka bir reaktif oksijen türüne dönüştürür (Şekil 1.5). Bu yüzden oluşan hidrojen peroksitinde bir an önce parçalanması gerekmektedir. SOD aktif bağlanma bölgesinde içerdiği metal iyonlarının çeşidine göre üç çeşide ayrılmıştır. Mangan içeren aktif bağlanma bölgesi varsa Mn SOD, demir içeren aktif bağlanma bölgesi varsa Fe SOD, bakır ve çinko içeren aktif bağlanma bölgesi varsa Cu/Zn SOD denilmektedir [Wang et al., 2018]. Mn SOD mitokondride, Cu/Zn SOD sitozol, peroksisom ve kloroplastta, Fe SOD ise kloroplastlarda, lokalize olmuşlardır [Miller, 2012].

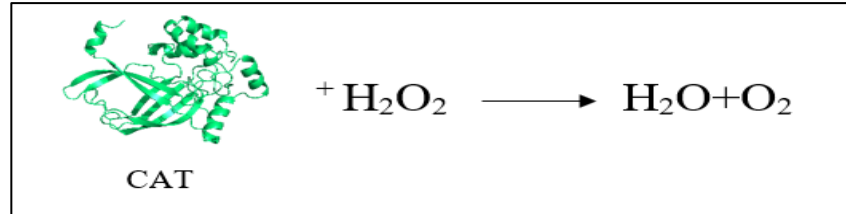


Şekil 1.5: Swiss-model homoloji modelleme kullanılarak oluşturulan SOD enziminin 3 boyutlu yapısı ve enzim reaksiyonu.

1.3.3. Katalaz (CAT)

Enzimatik antioksidanlardan biri olan katalaz birçoğu peroksizomlarda bulunur fakat sitoplazma, gliokziom mitokondrielerde de bulunmaktadır. Katalazın görevi H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye parçalamaktır (Şekil 1.6). Katalaz fotorespirasyonda, yağ asitlerinin yükseltgenmesinde, mitokondriyel ETS sisteminde ve normal şartlarda üretilen H_2O_2 'yi temizler. Katalaz genel olarak üç kategoriye sınıflandırılabilir. Birinci kategori fotorespirasyonda oluşan H_2O_2 'nin parçalanmasını sağlar ve yapraktaki temel doku olan mezofilde, fotosentetik dokuda çokça bulunurlar. İkinci kategori katalaz, damar dokuda bol miktarda bulunur. Üçüncü kategori katalazlar, yeni yetişen genç bitki ve bitki tohumlarında çokça bulunurlar ve tohumların filizlenmek için kullandığı enerjinin üretildiği glioksilat döngüsünde üretilen H_2O_2 'nin parçalanmasıyla ilişkilidir [Kireççi, 2018].

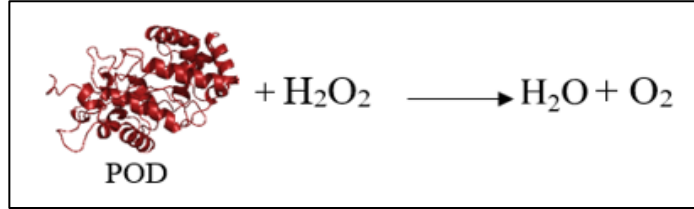
Bitkide oluşan stres ile konsantrasyonu artan H_2O_2 'in parçalanmasında katalaz temel bir enzimdir.



Şekil 1.6: Katalaz enzim reaksiyonu.

1.3.4. Peroksidaz (POD)

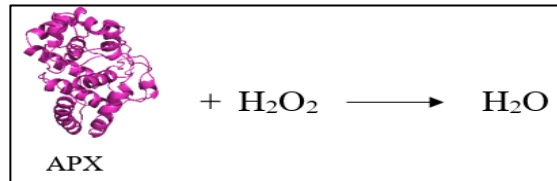
Hidrojen peroksiti indirgeyen enzimlere peroksidazlar denmektedir. Peroksidaz veya peroksit redüktazlar olarak da adlandırılan peroksitlerin parçalanmasını katalizör görevi alan geniş enzim grubudur. Peroksidaz enzimleri hidrojen peroksitin (H_2O_2) hücre için toksik olan etkilerini en aza indirmek, hücreyi korumak için hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrışmasını katalize eder (Şekil 1.7). Peroksidaz enzimi hücre duvarında önemli bir bileşen lignin oluşturmak ile de görevlidir. Lignin oluşumu sırasında fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalize ettiği için yan ürün olarak reaktif oksijen türleri üretebilir [Hiraga, 2001].



Şekil 1.7: POD enzimi reaksiyonu.

1.3.5. Askorbat Peroksidaz (APX)

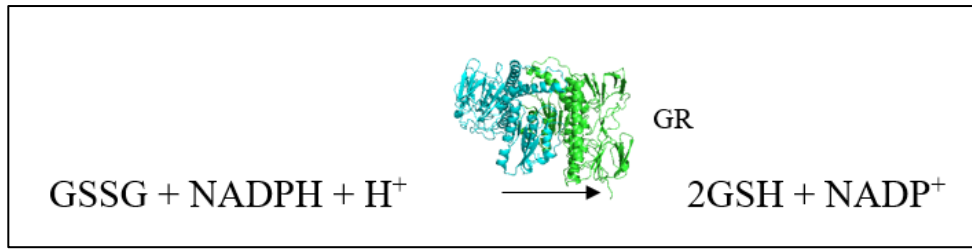
Askorbat peroksidaz hücre içerisinde mitokondrinde, kloroplast tilakoidlerinde ve stomalarında, sitozelde, gliksizomda, peroksizomda, apoplastlarda farklı izoformlarda bulunmaktadır [Shigeoka et al., 2002]. Askorbat peroksidaz H_2O_2 'yi parçalamak için askorbik asidi (AsA) kullanır. Elektron donörü olarak askorik asiti kullanarak H_2O_2 'yi suya indirgemektedir (Şekil 1.8) [Caverzan, 2012]. Askorbat peroksidaz, H_2O_2 çok düşük yoğunlukta olsa bile askorbatı substrat olarak kullandığı için etkili bir biçimde H_2O_2 'yi parçalayabilir [Anjum et al., 2016].



Şekil 1.8: APX enzimi reaksiyonu.

1.3.6. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (GR) enzimi glutasyon disülfitin (GSSG), glutatyona (GSH) indirgenmesini katalize eder (Şekil 1.9). Normal şartlarda glutasyon (GSH) oranı glutasyon disülfite (GSSG) göre daha fazladır. Bitki kuraklık gibi strese girdiğinde hücrede ROS seviyeleri artarak GSSG oranı GSH oranından fazla olur. Hücrede GSSG seviyesinin yükselmesi sonucunda hücre zarında, proteinlerde ve DNA'da hasar meydana gelebilir [Gill et al., 2013]. Çoğunlukla kloroplastlarda ve az miktarda sitozol ve mitokondride lokalizedir [Habibi, 2014].



Şekil 1.9: GR enzimi reaksiyonu.

2. METARYEL VE METOD

2.1. Bitki Materyali ve Büyütme Şartları

Bu çalışmada bitki materyali olarak tütün (*N. tabacum*) kullanılmıştır. *N. tabacum* tohumları 200 µl %70 etil alkol ile 3 dk boyunca 3 tekrarlı olarak sterilizasyona tabi tutulmuştur. Ardından ddH₂O ile 2 kez durulanmıştır. Sterilize edilen tohumlar, otoklavlanarak sterilize edilmiş turba/vermikülit (1/1, g/g) toprak karışımı ile doldurulmuş olan viyollere (130 ml) ekilerek çimlendirilmiştir (Şekil 2.1). Bitkiler 16 saatlik ışık ve ardından 8 saatlik karanlık periyotlarında, ışık yoğunluğu 15.000 lux, sıcaklığı 25±2 °C ve nem oranı %55-70 olan bitki büyütme odasında yetiştirilmiştir (Şekil 2.1).

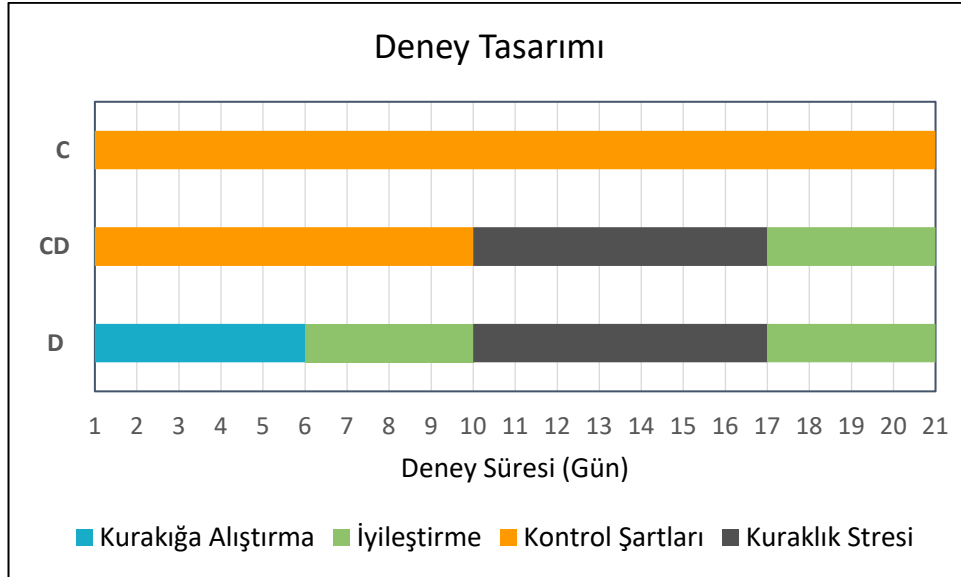


Şekil 2.1: *Nicotiana tabacum* bitkilerinin yetiştirilmesi. Tohum ekili viyoller (a) Bitki büyütme odasında büyümekte olan *N. tabacum* bitkileri (b).

Yaklaşık bir aylık fideler 0,7 L saksılara aktarıldı. Kuraklık stresi uygulaması için eşit büyüklükte rastgele fideler seçilip 3 grup oluşturuldu. Kontrol grubu (C), kuraklığa alıştırmaya (D), kuraklığa alıştırmaya uygulanmayan grup (CD) olarak isimlendirildi.

Kontrol grubu (C) ve kuraklığa alıştırmaya uygulanmayan grup (CD) toprak nem miktarı %80 oranında tutuldu. Kuraklığa alıştırmaya uygulaması için D grubundaki bitkiler 40 günlük olduklarında sulaması durduruldu. D grubunun toprak nem miktarı %30'a düştüğünde tekrardan sulandı. Bu süre beş gün sürmüştür (Şekil 2.2). Ardından D ve CD grubu yedi gün boyunca sulanmadı. Yedinci günün ardından C, CD ve D gruplarındaki 5. yapraklar aynı zamanda hasat edildi ve hızlıca sıvı azot içerisinde dondurulup -80 °C saklandı.

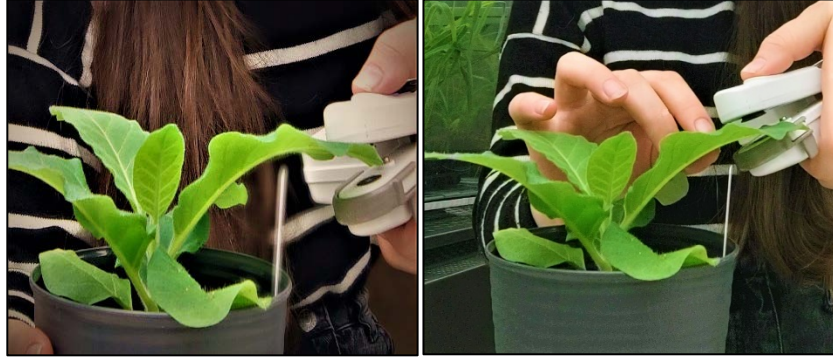
Hasattan sonra tüm gruplar tekrardan normal bir şekilde sulanarak iyileşmeleri sağlandı. Kuraklık stresi sonrası iyileşmenin ardından antioksidan enzimlerdeki değişiklikleri incelenmek üzere sulamadan dört gün sonra iyileşen bitkilerin altıncı yaprakları hasat edilerek örnekler sıvı azot içerisinde dondurulup analizlere kadar -80 °C' de saklandı.



Şekil 2.2: Deney tasarımı.

2.2. Klorofil Miktarının Belirlenmesi

Kuraklık stresinin fotosentez etkinliğine olan etkisini belirlemek için, kontrol (C) ve kuraklık stresi uygulanan kuraklığa alıştırmış (D) ve alıştırmamış (CD) bitkilerin yapraklarındaki klorofil içeriği SPAD metre ve biyokimyasal analizler ile belirlendi. Bunun için bu üç grupta yer alan bitkilerin kuraklığa alıştırmaya, iyileşme ve kuraklık stresi uygulamaları sırasında üçüncü, dördüncü, beşinci ve altıncı yapraklarının klorofil miktarı SPAD metre (SPAD-520 Plus) yardımıyla ölçüldü (Yuan et al., 2016). Ölçümler yaprağın tabanında, orta kısmından ve uç kısmından olmak üzere üç farklı kısımdan yapıldı ve bu ölçümün ortalaması alınarak her bir yaprağın klorofil miktarı belirlendi. On iki biyolojik replikanın ortalaması alınarak her bir yaprağın klorofil miktarı belirlendi. On iki biyolojik replikanın ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önem derecesi (P) Microsoft Excel programında yer alan Student's T-testi kullanılarak yapıldı ve $P < 0.05$ iki grup arasında farkın önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.3: SPAD metre ile *Nicotiana tabacum* yapraklarının klorofil miktarının ölçümü.

Biyokimyasal olarak klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarını belirlemek için, her üç grupta yer alan bitkilerin üçüncü, dördüncü, beşinci, altıncı yapraklardan yaklaşık 2 cm² kesitler alındı ve bu kesitler eşit altı parçaya bölünerek içerisinde 5ml % 100 aseton bulunan cam tüplere konuldu. Tüpler +4 °C' de 24 saat karanlık ortamda bekletildi (Şekil 2.4). 24 saat sonra örnekler; 661.6 nm, 644.8 nm, 470 nm dalga boylarında kuvarz küvet içinde spektrofotometre (Shimadzu, UV1280) ile ölçüldü. Klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarları Lichtenthaler (2001)'a göre hesaplandı.

Sonuçlar ortalama ve standart hata olarak sunulmuştur. Microsoft Excel programında Student's T-test kullanılarak gruplar arası önem derecesi belirlendi.



Şekil 2.4: Toplam klorofil miktarı ölçümü. Klorofil a, b ve karotenoid miktarının belirlenmesi için % 100 aseton içerisinde bekletilen *Nicotiana tabacum* yaprakları (2 cm²).

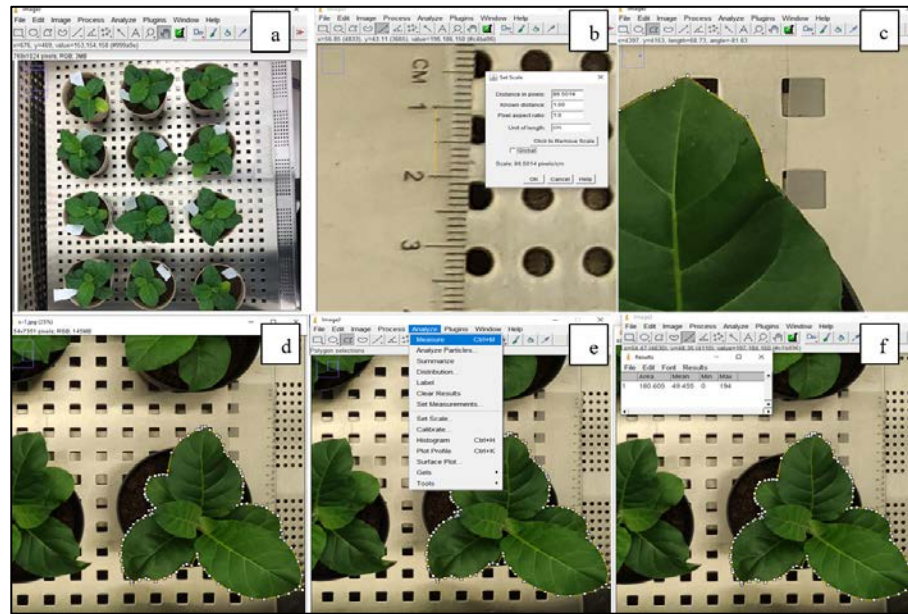
2.3. Bağıl Su İçeriği Ölçümü

Kuraklığa alıştıran (D) ve alıştırılmamış (CD) bitkilerin kuraklık stres şiddetini belirlemek için yaprakların bağıl su içeriği (RWC) Zhai ve arkadaşları (2012)'na göre kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak belirlendi. Bunun için, kuraklık stresi uygulaması sonunda, büyümesi durmuş ve tam olarak genişlemiş her grupta yer alan bitkilerin beşinci yaprakları hasat edildi. Yapraklardan toplamda 2 cm² alan kesilip eşit 10 parçaya bölündü. Bütün grupların taze yaprak ağırlığı hassas terazide tartılarak kaydedildi. Turgor ağırlığını bulabilmek için kesitler gece boyunca oda sıcaklığında distile suyun içerisinde bekletildi ve kesitlerin suya doymuş ağırlığı kaydedildi. Ardından kuru ağırlığı belirlemek için kesitler 80 °C sıcaklıkta gece boyunca bekletilerek kurutulması sağlandı. Hassas terazide örneklerin kuru ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Bağıl su içeriğini Formül 1'e göre hesaplandı [Zhai et al., 2012]. Microsoft Excel programında Student's T-test kullanılarak gruplar arasındaki farkın önem derecesi belirlendi.

$$RWC (\%) = \left[\frac{(taze\ ağırlık - kuru\ ağırlık)}{(rehidrate\ ağırlık - kuru\ ağırlık)} \right] * 100 \quad (2.1)$$

2.4. Rozet Alanı, Gövde Uzunluğu ve Çiçeklenme Süresi Ölçümü

Kuraklığa alıştıırılan (D) ve alıştıırılmamış (CD) bitkilerin kuraklık stresine cevabının kontrol grubuna göre yaprak büyümlerin gözlemleyebilmek için kuraklık stresi uygulaması boyunca bitkiler fotoğraflanarak İmageJ (www.imagej.nih.gov) uygulaması ile yaprak alanı ölçüldü [Jingwen, et al., 2012]. Bunun için, İmage J uygulaması açılarak 'file' konumundan '.jpg' fotoğraf dosyaları eklendi (Şekil 2.5.a). Rozet alan ölçümünü hassas ve tutarlı olmasını sağlamak için fotoğraf ile referans olarak cetvel de fotoğraflanmıştır. Cetvelden 1 cm'lik uzunluk düz çizgi çekilerek belirlendi, 'analyze' sekmesinden 'set scale' seçilerek 1 cm uzunluğun karşılık geldiği pixel sayısı eşitlendi (Şekil 2.5.b). Rozet alanını ölçmek için 'polygon selections' aracı seçildi ve yaprakların kenarına noktalar konularak, tüm rozet alan çerçevesi (Şekil 2.5.c-d). Rozet alanı çerçevesi belirlendikten sonra alanı hesaplamak için 'analyze' sekmesinden 'measure' seçildi (Şekil 2.5.e). Sonuç yeni bir pencerede açıldı (Şekil 2.5.f). Tüm rozet alanlar İmage J ile hesaplandıktan sonra Microsoft Excel programında Student's T-test kullanılarak gruplar arası önem derecesi belirlendi.



Şekil 2.5: İmage J uygulamasında rozet alan ölçümü.

Kuraklığa alıştıırılan (D) ve alıştıırılmamış (CD) bitkilerin kuraklık stresi uygulamasının ardından bitkilerin gövde uzunlukları bir cetvel yardımıyla topraktaki

gövde başlangıcıyla tepe dallarının altındaki gövde bitimine kadar ölçülmüş ve aralarındaki fark kontrole göre karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir.

Kuraklık stresi uygulamasının ardından tüm gruplar gün aşırı sulanarak bitkiler iyileştirilmiş ve çiçeklenme aşamamasına geçiş süreleri kaydedilmiştir.

Tüm bitkiler çiçeklendikten sonra, tekrardan bütün bitkilerin gövde uzunluğu bir cetvel yardımıyla topraktaki gövde başlangıcıyla çiçek taç yapraklarının altındaki gövde bitimine kadar ölçülüp kaydedilmiştir. Sonuç değerleri altı biyolojik tekrarın ortalaması ve standart sapması hesaplanarak ve gruplar arasındaki önem derecesi Microsoft Office Excel Student's T-testine göre belirlenmiştir.

2.5. Protein İzolasyonu

Kuraklığa alıştıırılan (D) ve alıştıırılmamış (CD) bitkilerin kuraklık stresinin yedinci gününde ve kuraklık stresi sonrası iyileştirmenin dördüncü günü bitkilerin dördüncü, beşinci ve altıncı yaprakları hasat edilerek yaprak dokularında protein izolasyonu gerçekleştirildi. Karşılaştırmalı analizler için aynı aşamalarda kontrol bitkilerinden de yaprak dokuları alınmıştır. Alınan örnekler hızlıca sıvı azot ile fikse edilerek analizlere kadar -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Protein izolasyonu, bütün örnekler için Bradford (1976) 'a göre gerçekleştirildi. Örnekler -80 °C' den alınarak hızlıca sıvı azot içeren kaba alındı. İçerisinde 3 adet çelik bilyelerin (2 mm çaplı) bulunduğu ependorf tüpler (2 ml) içerisinde 45 sn ve 25 frekansta toz haline gelene kadar parçalandı. İşlemin ardından örnekler hızlıca tekrar sıvı azotun içerisine alındı.

Homojenize edilen örneklerin içerisine 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8), 1mM ve % 2 PVP içeren 1 ml ekstraksiyon tamponu eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Vorteks işleminin ardından örnekler 10.000 rpm'de 30 dakika boyunca +4 °C'de santrifüjlendi. Santrifüj bittikten sonra dikkatli bir şekilde pelleti kaldırılmadan ve çelik bilyelere değmeden süpernatant alınarak yeni bir ependorf (1.5 ml) tüpe aktarıldı. Ekstrakt edilen proteinler ilerideki analizler için -20 °C'de saklandı.

Toplam protein miktarı Bradford (1976)'ya göre belirlendi. Bunun için, 2 mg/ml BSA (sığır serum albümini) stoğu hazırlandı ve bu stoktan 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml konsantrasyonlarında 2 ml'lik ependorf tüpler içinde seyreltik standartlar solüsyonları hazırlandı. Bu çözeltilerin spektrofotometrik değerleri okunarak Microsoft Excel programı yardımı ile hazırlanan standart eğri grafiği hazırlanarak örneklerin protein miktarlarını belirlemek için

referans olarak kullanıldı. Bunun için, 96 kuyucuklu bir kap kullanıldı ve her bir BSA solüsyonundan 5 µl ve üzerine 250 µl Bradford (SIGMA) reaktifi bir kuyucuğa eklendi. Ölçümler üç teknik tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kör için 255 µl Bradford reaktifi konuldu. Protein örnekleri için 5 µl protein ve 250 µl Bradford reaktifi eklendi. Kuyucuklara pipet ile iyi şekilde pipetaj yapıldı. Örnekler karanlıkta 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından spektral tarama çoklu kap okuyucuda (Thermo Scientific Varioskan Flash) 595 nm absorbansta ölçüldü. Ardından standart eğri grafiğine göre örneklerin toplam protein miktarı mg/ml olarak Microsoft Excel programında hesaplandı. Ekstrakt edilen protein örnekleri antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanıldı.

2.6. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

2.6.1. Katalaz Enzim Aktivitesi

Katalaz enzim aktivitesi ölçmek için deney de kullanılanlar şöyledir; 900 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8), 50 µl 200 mM H₂O₂ ve 50 µl protein örnekleri kullanıldı. Kör için 950 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8) ve 50 µl H₂O₂ kullanıldı. Ölçümler için 1.5 ml kuvartz küvet ve spektrofotometre (Shimadzu, UV1280) kullanıldı. Spektrofotometre ölçüm için 240 nm dalga boyuna ayarlandı. Kör ve protein örnekleri kuvartz küvet içerisinde 90 saniye boyunca ölçüldü ve absorbanstaki düşüş kaydedildi [Chance ve Maehly, 1995].

Katalaz enzimi hücre içerisinde oluşan oksidatif hasarı önlemek için hidrojen peroksiti (H₂O₂) su ve oksijene indirger. Bir birim katalaz aktivitesi, 1 M H₂O₂'yi hidrojen ve oksijene parçalamak için gerekli olan enzim miktarıdır. Katalaz enzim aktivitesi ölçümü Aebi (1984) 'ye göre yapılmıştır. Deney 3 teknik tekrar ve 3 biyolojik tekrarın ortalaması alınarak ve hata çubukları için ise standart hata çubukları alınarak hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel önem derecesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından TUKEY HSD testine göre belirlendi.

2.6.2. Peroksidaz Enzim Aktivitesi

Peroksidaz enzim aktivitesi Quesada et al., (1990)'ne göre yapıldı. Peroksidaz enzim aktivitesini ölçmek için deneyde kullanılanlar şöyledir; 850 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8), 50 µl % 0.02 o-Dianisidine, 50 µl 10mM H₂O₂, 50 µl protein örnekleri kullanıldı. Kör için 900 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8), 50 µl 10 mM H₂O₂ ve 50 µl % 0.02 o-Dianisidine kullanıldı. Ölçümler için 1.5 ml kuvarz küvet ve spektrofotometre (Shimadzu, UV-1280) kullanıldı. Spektrofotometre ölçüm için 460 nm dalga boyuna ayarlandı. Kör ve protein örnekleri kuvarz küvet içerisinde 90 saniye boyunca absorbans değişimi kaydedildi. Absorbans artışı ve renk değişimi gözlemlendi. Bir birim enzim, 1 dakika boyunca 1 µM hidrojen peroksiti parçalayan enzim miktarıdır. Deney 3 teknik tekrar ve 3 biyolojik tekrarın ortalaması alınarak ve standart sapması hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel önem derecesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından TUKEY HSD testine göre belirlendi.

2.6.3. Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi

Askorbat enzim aktivitesi deneyi Nakano ve Asada (1981)'ya göre gerçekleştirildi. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesini ölçmek için reaksiyonda kullanılanlar şöyledir; 750 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8), 0.1 mM EDTA, 0.5 mM 100 µl askorbik asit, 100 µl 0.1mM H₂O₂, 50 µl protein örnekleri kullanıldı. Kör için 800 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8), 0.1 mM EDTA, 0.5 mM 100 µl askorbik asit, 100 µl 0.1mM H₂O₂ kullanıldı. Ölçümler için 1.5 ml kuvarz küvet ve spektrofotometre (Shimadzu, UV-1280) kullanıldı. Spektrofotometrede 290 nm'de 90 saniyede içerisinde absorbans azalışı ölçüldü.

Askorbat peroksidaz; peroksizom, mitokondri, sitozol ve kloroplast bulunan H₂O₂'yi atmak için öncelikli antioksidan enzimdir. Askorbat peroksidaz, askorbik asiti (AA) indirgeyici özelliğinden faydalanarak H₂O₂'yi H₂O ve dehidroaskorbik asit (DHA)'ya indirgenmesini katalizler [Das et al., 2014]. Bir birim enzim, 1 dakika boyunca 1 µM askorbik asiti parçalayan enzim miktarıdır. Deney 3 teknik tekrar ve 3 biyolojik tekrarın ortalaması alınarak ve standart sapması hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel önem derecesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından TUKEY HSD testine göre belirlendi.

2.6.4. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Banowertz et al., (2004)'ne göre yapılmıştır. süperoksit dismutaz enzim aktivitesini ölçmek için; 40 µl 250 mM KH₂PO₄ (pH:7.8), 20 µl 0.75 mM NBT, 26 µl 100 mM metiyonin, 4 µl 5 mM EDTA, 90 µl 2 µM riboflavin ve 20 µl protein (5-10 mg/ml) 96 kuyulu olan TPP hücre kültürü kabı içerisine eklendi.

Kör için ise; 60 µl 250 mM KH₂PO₄ (pH:7.8), 20 µl 0.75 mM NBT, 26 µl 100 mM metiyonin, 4 µl 5 mM EDTA, 90 µl 2 µM riboflavin kullanıldı. 96 kuyucuklu kap, ölçüm için Variozkan spektrofotometre (Thermo Scientific Varioskan Flash) içerisine yerleştirilip ölçümden önce cihaz içerisinde 1 dk boyunca çalkalandı. Çalkalanmanın ardından 560 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Ölçümden sonra plaka 10 dakika boyunca floresan ışığın altında inkübasyona bırakıldı ve kap tekrar cihaz içerisine yerleştirilip bir dakikalık çalkalama işleminin ardından 560 nm'de örneklerin tekrar absorbans ölçümü alındı.

Süperoksit dismutaz enzim ölçümünde örnekler içerisinde bulunan riboflavin enzim ölçümünde bir kofaktör olarak rol alır. Riboflavin süperoksit dismutazın (SOD) nötralize edeceği süperoksit radikallerini ışık ile etkileşime girerek üretmektedir. Süperoksit radikalleri ise örneklerin içine eklenen NBT'yi azaltarak absorbans değerinde azalma meydana getirir. Sonuç olarak SOD NBT'yi indirgeyen süperoksit radikallerini nötralize eder ve örneklerde ne kadar çok SOD enzimi bulunursa absorbans değeri o kadar düşük olur.

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Kono (1978)'ya göre hesaplandı. Buna göre, bir birim enzim 560 nm'deki NBT miktarındaki değişimden kaynaklı absorbans farkını, bir dakika içerisinde % 50 oranında azaltmak için gerekli olan enzim miktarıdır. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi U/mg cinsinden ifade edildi. Deney 3 teknik ve 3 biyolojik tekrarlı gerçekleştirildi. Tekrarların ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel önem derecesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından TUKEY HSD testine göre belirlendi.

2.6.5. Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesi

Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi deneyi Çakmak vd., (2006)'ne göre gerçekleştirildi. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesini ölçmek için reaksiyonda kullanılanlar şöyledir; 850 µl hacimde 50 mM KH₂PO₄ (pH:7.8) ve 0.1 mM EDTA, 50 µl 0.5 mM GSSG, 0.12 µl hacimde NADPH ve 50 µl hacimde protein örnekleri kullanıldı. Kör için 900 µl hacimde 50 mM potasyum fosfat (KH₂PO₄) (pH:7.8) ve 0.1 mM EDTA, 0.5 mM 50 µl GSSG ve 50 µl 0.12 mM NADPH kullanılmıştır. Ölçümler 1.5 ml'lik quartz küvet kullanılarak spektrofotometre (Shimadzu, UV-1280) cihazında 340 nm'de 90 saniye boyunca absorbans ölçülerek kaydedildi.

Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi; 1 µmol GSSG (oksiteleşmiş glutasyon)'yi 25 °C'de GSH (glutasyon)'a indirgeyen 1 ünite enzim miktarıdır. Deney 3 teknik ve 3 biyolojik tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Tekrarların ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel önem derecesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından TUKEY HSD testine göre belirlendi.

2.7. İn Silico ve İn Vitro ceRNA Analizi

2.7.1. Veri Toplama

Bu çalışmada, *Nicotiana tabacum* bitkisinde kuraklık stresine cevap olarak ifadesinde farklılık meydana gelen genleri belirleyebilmek için, Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında bulunan GSE214048 numaralı transkriptom veri seti kullanılmıştır. Bu veri setinde, *N. tabacum* bitkilerine kuraklık stresi uygulanmış ve gen ifadeleri kontrol şartlarında yetiştirilen bitkilere göre belirlenmiştir. Transkriptom veri setinde her iki grup için 3'er biyolojik tekrar yer almaktadır.

GSE214048 numaralı veri seti GEO veri tabanından indirilmiştir [Web 2, 2022]. Bu veri setinde kuraklık stresine cevap olarak ifadesinde artış gözlenen genler seçilmiştir. Bu genlere ait diziler Solanaceae Genomics Network (Sol Genomics Network) veri tabanından indirilerek biyoinformatik analizlerde kullanıldı [Edwards et al., 2017]. *N. tabacum* ait miRNA veri seti (PMID: 22353177) miRBase sürüm 22.1 veri tabanından indirildi (<http://www.mirbase.org/>). *N. tabacum* lncRNA dizileri PLncDB v2.2 (Plant Long noncoding RNA Database) veri tabanından indirildi [Jin et al., 2021].

2.7.2. GSE214048 Veri Setinin Biyoinformatik Analizi

Gene expression omnibus veritabanına kayıtlı GSE214048 numaralı verisetini FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped) değerleri txt formatında indirildi. İndirilen veriseti, R programlama dilinde read.csv fonksiyonu ile yüklemesi gerçekleştirildi. RNA-seq veriseti, DEseq2 paketi kullanılarak analiz edildi [Love et al., 2014]. Veri seti içerisinde K326 ve ondan türetilen kuraklığa dirençli olan M28 tohumlarından elde edilen gruplara kuraklık stres, uygulamalısının 1, 2, 4 ve 8. saatlerinde örnekler toplanmıştır. Uzun dönem kuraklığa maruz bırakılan genleri tespit edebilmek amacıyla K326 hattının kontrol ve 8.saatteki gruplar kendi arasında karşılaştırıldı. Grupların kendi içerisindeki biyolojik tekrarlarının güvenilirliğini anlamak amacıyla PCA (principal component analysis) gerçekleştirildi. Anlamlı değişmiş genleri belirlemek amacıyla p-adjusted kesme değeri 0.01 olarak ve $\log_2(\text{Fold change})$ değeri -1'den küçük veya 1'den büyük olacak şekilde belirlendi. Volcano figüre EnhancedVolcano paketi, seçilen mRNA'lar için oluşturulan ısı haritası pheatmap paketi ile R programı kullanılarak oluşturuldu.

2.7.3. ceRNA Ağı Tanımlanması

GSE214048 numaralı veri setinden ifadelerinde farklılık belirlenen genler (DEGs)'e bağlanan miRNA ve lncRNA belirlemek için miRNA hedef tahmin aracı olan RNAhybrid kullanıldı [Krüger et al., 2006].

ceRNA ağı oluşturmak için RNAhybrid aracı sayesinde baz eşleşmesi sonucu oluşan miRNA-mRNA ve miRNA-lncRNA dublekslerinin belirlemek amacıyla kullanıldı. RNAhybrid potansiyel hedefleri tanımlamak için termodinamik olarak minimum serbest enerjiye sahip en kararlı hibridizasyonu tahmin eder.

RNAhybrid programının parametreleri şöyle ayarlandı; -p: 0.05, -e: -30, -v: 4, -u: 2, -m: 80000. Parametreler sırasıyla miRNA-mRNA ve miRNA-lncRNA hedef tahminini yapmak için kullanıldı. Girilen parametreler sonucunda p değeri 0.05'ten küçük olanlar ve minimum serbest enerji -30 kcal/mol 'den küçük olanlar hedef olarak belirlendi. Eşleşme sonucunda, en küçük minimum serbest enerjiye (mfe) sahip miRNA-mRNA ve miRNA-lncRNA olanlar seçildi [Alves et al., 2009]. ceRNA ağı tanımlamak için birbirine en iyi hibridizasyon yapan mRNA-miRNA ve aynı miRNA'

ya hibridize olan en iyi lncRNA belirlendi. Aralarından, 4 adet ceRNA ağı seçilerek kuraklık stresindeki rollerini belirlemek için her birinin ifadesi RT-qPCR ile belirlendi.

Tablo 2.1: RT-qPCR analizleri için seçilen 4 adet ceRNA regülasyon ağında yer alan mRNA-miRNA-lncRNA ilişkileri ve transkript bilgileri.

mRNA	miRNA	lncRNA
PEPC (Nitab4.5_0000221g0050.1)	miR160	lncRNA-miR160 (NTAB_LNC000053.2)
RD22 (Nitab4.5_0001403g0020.1)	miR168d	lncRNA-miR168d (NTAB_LNC015607)
AP2 (Nitab4.5_0000533g0010.1)	miR172	lncRNA-miR172 (NTAB_LNC005922.1)
F3H (Nitab4.5_0005893g0010.1)	miR390	lncRNA-miR390 (NTAB_LNC014507)

2.7.4. ceRNA Regülasyon Ağında Yer Alan miRNA-mRNA-lncRNA Eşleştirme Analizi

RNAhyrid kullanılarak elde edilen miRNA-mRNA ve miRNA-lncRNA çiftleri karşılatırılarak mRNA-miRNA-lncRNA'ların yer aldığı bir ceRNA regülasyon ağı oluşturmak için Cytoscape (3.9.1) kullanıldı [Shannon et al., 2003]. Tablo 2.2'de belirlenen miRNA, mRNA ve lncRNA'ların yer aldığı ceRNA regülasyon ağları gösterilmiştir.

Tablo 2.2: miRNA ve hedef mRNA ve lncRNA'ları.

miRNA	HEDEFLERİ	TÜR
nta-miR156a-e	NTAB_LNC006354.2	lncRNA
	NTAB_LNC006354.1	lncRNA
	NTAB_LNC005472.2	lncRNA
	Nitab4.5_0001599g0130.1	mRNA
	Nitab4.5_0000351g0090.1	mRNA
nta-miR159	NTAB_LNC017514.1	lncRNA
	NTAB_LNC012568.1	lncRNA

Tablo 2.2: Devam.

nta-miR159	NTAB_LNC004802.1	lncRNA
	NTAB_LNC004802.3	lncRNA
	Nitab4.5_0001820g0130.1	mRNA
nta-miR160a-d	NTAB_LNC016418.1	lncRNA
	NTAB_LNC013842.1	lncRNA
	NTAB_LNC012723.1	lncRNA
	NTAB_LNC012659.1	lncRNA
	NTAB_LNC011891.1	lncRNA
	NTAB_LNC010575.1	lncRNA
	NTAB_LNC003359.4	lncRNA
	NTAB_LNC002938.3	lncRNA
	NTAB_LNC001157.1	lncRNA
	Nitab4.5_0005191g0060.1	mRNA
	Nitab4.5_0004398g0080.1	mRNA
	Nitab4.5_0004398g0070.1	mRNA
	Nitab4.5_0002712g0020.1	mRNA
	Nitab4.5_0002437g0020.1	mRNA
	Nitab4.5_0001558g0060.1	mRNA
	Nitab4.5_0001423g0100.1	mRNA
	Nitab4.5_0001309g0110.1	mRNA
	Nitab4.5_0001217g0040.1	mRNA
	Nitab4.5_0000798g0090.1	mRNA
	Nitab4.5_0000714g0070.1	mRNA
	Nitab4.5_0000600g0060.1	mRNA
	Nitab4.5_0000600g0050.1	mRNA
	Nitab4.5_0000525g0010.1	mRNA
	Nitab4.5_0000380g0050.1	mRNA
Nitab4.5_0000221g0050.1	mRNA	
nta-miR164a-c	NTAB_LNC013446.1	lncRNA
	NTAB_LNC011617.1	lncRNA
	NTAB_LNC009167.1	lncRNA
	NTAB_LNC008715.1	lncRNA
	NTAB_LNC000158.3	lncRNA
	Nitab4.5_0003436g0040.1	mRNA
	Nitab4.5_0002700g0140.1	mRNA
	Nitab4.5_0002322g0010.1	mRNA
	Nitab4.5_0001608g0020.1	mRNA
	Nitab4.5_0001508g0050.1	mRNA
	Nitab4.5_0000859g0350.1	mRNA
	Nitab4.5_0000794g0140.1	mRNA

Tablo 2.2: Devam.

nta-miR164a-c	Nitab4.5_0000681g0020.1	mRNA
	Nitab4.5_0000716g0240.1	mRNA
	Nitab4.5_0000506g0240.1	mRNA
	Nitab4.5_0000468g0150.1	mRNA
	Nitab4.5_0000445g0170.1	mRNA
	Nitab4.5_0000171g0210.1	mRNA
	Nitab4.5_0000106g0430.1	mRNA
	Nitab4.5_0000010g0130.1	mRNA
nta-miR167a-e	NTAB_LNC019538.1	lncRNA
	NTAB_LNC017803.1	lncRNA
	NTAB_LNC015374.1	lncRNA
	NTAB_LNC001821.2	lncRNA
	NTAB_LNC001821.1	lncRNA
	Nitab4.5_0001894g0060.1	mRNA
	Nitab4.5_0000913g0020.1	mRNA
	Nitab4.5_0000856g0150.1	mRNA
	Nitab4.5_0000820g0050.1	mRNA
	Nitab4.5_0000121g0090.1	mRNA
	nta-miR168a-e	NTAB_LNC018989.1
NTAB_LNC018576.1		lncRNA
NTAB_LNC016718.1		lncRNA
NTAB_LNC013400.1		lncRNA
NTAB_LNC010154.1		lncRNA
NTAB_LNC004174.2		lncRNA
Nitab4.5_0004646g0090.1		mRNA
Nitab4.5_0001403g0020.1		mRNA
Nitab4.5_0000743g0050.1		mRNA
Nitab4.5_0000014g0380.1		mRNA
nta-miR169a-t	NTAB_LNC002763.2	lncRNA
	NTAB_LNC002763.1	lncRNA
	Nitab4.5_0000068g0290.1	mRNA
nta-miR171b	NTAB_LNC009972.1	lncRNA
	NTAB_LNC007308.1	lncRNA
	Nitab4.5_0001468g0070.1	mRNA
nta-miR1446	Nitab4.5_0000303g0190.1	mRNA
	Nitab4.5_0000495g0090.1	mRNA
	NTAB_LNC019322.1	lncRNA
	NTAB_LNC017843.1	lncRNA
	NTAB_LNC008725.1	lncRNA
	NTAB_LNC001990.2	lncRNA
	NTAB_LNC001588.1	lncRNA

2.7.5. Primer Dizayn

RNAhybrid aracı ile tanımlanan ceRNA ağlarındaki mRNA ve lncRNA'lar için primer tasarımı SCiTools OligoAnalyzer 3.1 kullanılarak yapıldı. Primerlerin özgünlüğü BLASTn arama motoru kullanılarak kontrol edildi (Altschul et al., 1990). miRNA'ların cDNA sentezi için primer tasarımı Varkonyi-Gasic et al., (2007)'ye göre yapıldı. Primerler ve dizileri tablo 2.3, tablo 2.4 ve tablo 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3: mRNA primer dizileri.

mRNA	Dizi 5'-3'
PEPC-qF	TGGCAGCTGAATTAGGAAGTG
PEPC-qR	GGCGTGCATCCTTCTGTA
RD22-qF	CACTTACCTTTCGTTGGCACTA
RD22-qR	GGCGTATTAGGCAGCTTAGTATT
AP2-qF	GCTCACTTGTGGAATGGAGTA
AP2-qR	CCGGAGTTGAGAATCCTGATG
F3H-qF	AATTCAGAGGCTAGTCGACAC
F3H-qR	TTGTCGAGCTTCGTCCATAAG
EF-1a -qF	GTCAAGAATGTTGCGGTTAAGG
EF-1a -qR	TGATGATAGCTTGGGAGGTAAAG

Tablo 2.4: miRNA primer dizileri.

miRNA	Dizi 5'-3'
miR160-RT	*GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTG GCAT
miR160-qF	GCGGCGTGCCTGGCTCCCTGT
miR168-RT	*GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTC CCG
miR168-qF	GCGGCGTCGCTTGGTGCAGGT
miR172-RT	*GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCT GCAG
miR172-qF	GCGGCGAGAATCTTGATGATG
miR390-RT	*GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGG TGCT
miR390-qF	GCGGCGAAGCTCAGGAGGGAT
	*evrensel geri primer (GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC)

Tablo 2.5: lncRNA primer dizileri.

lncRNA	Dizi 5'-3'
lnc-miR160-qF	TGGGTGTTGCTTGGAGAATAG
lnc-mirR60-qR	CCCTCAAATCTGCCTGACC
lnc-miR168-qF	CCTGTTGTGACTGCAACATAGA
lnc-miR168-qR	TGCGAATCTATAAGCCTTCAGC
lnc-miR172-qF	CCTTAAGCGGATTGTACATTGA
lnc-miR172-qR	TTCTGCTCCACATGATTCT
lnc-miR390-qF	CTGTAAAGCTCAGGAGGGATAG
lnc-miR390-qR	GCCATAGAACTCAGGATGGATAG

2.8. ceRNA Regülasyon Ağlarında Yer Alan lncRNA-miRNA ve mRNA'ların İfadelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi

2.8.1. Toplam RNA İzolasyonu

Kuraklığa alıştıırılarak ve alıştıırılmadan kuraklık stresi uygulanmış ve kontrol şartlarında yetiştirilmiş bitkilerden elde edilerek -80 °C saklanan örnekler sıvı azot içerisine alındıktan sonra RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için, doku örnekleri içerisinde 3 adet metal bilye bulunan endorf tüpler içinde doku parçalayıcı ile homojenize edildi. Homojenizatör 25 sn/45 frekans olarak ayarlandı ve örnekler toz haline gelmesi sağlandı.

RNA izolasyonu TRIzol metoduna göre yapıldı. Toz haline gelen bitki örnekleri hızlıca homojenizatörün bloklarından alınıp sıvı azot içerisine geri konuldu. Ardından sıvı azottan sırayla alınan örneklerin içerisine 1 ml TRIzol (Invitrogen) eklendi ve ardından endorf tüpler vortekslendi. Vorteklemeden sonra örnekler oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından örneklere 1 ml TRIzol için 200 µl kloroform eklendi. Kloroformun karışması için tüpler alt üst edildi. Örnekler oda sıcaklığında 2-3 dakikalık inkübasyona bırakıldı. Sürenin bitmesinin ardından örnekler önceden soğutulmuş santrifüj cihazında 11.000 rpm'de ve 4 °C 'de santrifüj edildi. İşlemin ardından süpernatant tüpün içerisindeki pellet kaldırılmadan ve bilyelere değmeden alındı ve yeni bir 1.5 ml tüpe aktarıldı.

RNA'yı çöktürmek için süpernatant bulunan tüplere 1ml TRIzol için 450 µl izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakikalık bir inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından örnekler 11.000 rpm ve 4 °C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından çöken RNA'yı yıkamak için öncelikle süpernatant atıldı. Kullanılan 1 ml TRizol reaktifi için 1 ml % 75 etanol ile pellet yıkandı. Ardından örnekler 11.000 rpm ve 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelleti kaybetmeden ependorf tüpler içerisinde bulunan süpernatant atıldı. Tüplerin içindeki etanolün uzaklaşması için pelletler kurumaya bırakıldı ve kurumunun ardından tüpler içerisine 35 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Örnekler -20 °C'de saklandı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflığını ölçmek için NanoDrop (Thermo Scientific, NanoDrop Lite Spectrophotometer) kullanıldı. 260/280 nm ölçüm yapılarak RNA'nın saflığı kontrol edilerek 2.0 değerine yakın olan en saf örnekler cDNA için seçildi.

2.8.2. miRNA, mRNA ve lncRNA'lardan cDNA Sentezi

mRNA'lar ve lncRNA'lar için cDNA sentezi, High Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (ThermoFisher) kullanılarak kitte bulunan protokole göre yapıldı. Reaksiyon hacmi 25 µl olarak ayarlandı. Her reaksiyon başına 2.5 µl 10x RT buffer, 1 µl 25x dNTP mix(100mM), 2.5 µl 10x random primer, 1.25 µl multiscribe reverse transkriptaz kullanıldı. Kullanılan total RNA miktarı, kullanılan cDNA kitindeki protokole göre 25 µl içerisinde 1.25 µg olacak şekilde ayarlanmak üzere; örneklerin RNA konsantrasyonlarına göre hesaplanarak eklendi ve kalan hacim ise nükleaz içermeyen su (Nuclease-Free Water) kullanılarak 25 µl reaksiyon hacmi tamamlandı.

Tüpler bir termal döngü cihazına yerleştirildi ve şartları şöyledir; 25 °C sıcaklıkta 10 dakika, 37 °C sıcaklıkta 120 dakika 85 °C sıcaklıkta 5 dakika ve 4 °C sıcaklıkta 120 dakika (sonsuz döngü) olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyon bittiğinde cDNA örnekleri alınıp RT-qPCR da kullanılmak üzere -20 °C' ye kaldırıldı.

miRNA cDNA sentezi için, Varkonyi-Gasic et al., (2007)'ye göre High Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (ThermoFisher) kullanılarak yapıldı. Toplam reaksiyon hacmi 20 µl olarak hazırlandı. Reaksiyon başına 10 µl karışım ve 10 µl RNA içermeyen su olarak hazırlandı. Karışım içerisine 2 µl 10x RT buffer, 0,5 µl 10 mM dNTP karışımı, 0,25 µl reverse transkriptaz, 4µl stem-loop RT primer ve 3,25 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Kullanılan total RNA miktarı RNA konsantrasyonlarına göre hesaplanarak eklendi ve kalan hacmi 10 µl'ye tamamlayana kadar nükleaz içermeyen su eklendi. Stem-loop primerler reaksiyona eklemeyen önce 65 °C' de 5 dk boyunca bir sıcak su banyosunda bekletildi ve ardından hemen 2 dk buz içerisinde

bekletildi. Tüpler, bir termal döngü cihazına yerleştirildi ve pulsed RT işlemi yapıldı. Cihazın döngü şartları; 16 °C' de 30 dk inkübasyon, 60 döngü boyunca 30 °C'de 30 sn, 42 °C'de 30 sn ve 50 °C'de 1 sn, reverse transcriptase inaktivesi için 85 °C'de 5 dk inkübasyon olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyon bittiğinde örnekler alınıp RT-qPCR analizinde kullanılabilecek kadar -20 °C' ye kaldırıldı.

2.8.3. Transkript Miktarının Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) Belirlenmesi

Total RNA örneklerinden miRNA, lncRNA ve mRNA'ların cDNA'ya çevrildikten sonra transkript miktarları qRT-PCR analizi ile belirlendi. qRT-PCR için Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) kiti ve içerişimde bulunan protokol kullanıldı.

miRNA cDNA örnekleri için her bir reaksiyon başına 10 µl 2X Syber Green, 2 µl cDNA, 1 µl universal geri primer (10 mM), 1 µl miRNA'ya özgü ileri primer (10 mM), 7 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Tüpler StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher) cihazına yerleştirildi ve cihaz döngü şartları şu şekilde ayarlandı; 95 °C sıcaklıkta 5 dk inkübasyon, 45 döngü için 95 °C sıcaklıkta 10 sn, 60 °C sıcaklıkta 10 sn, 72 °C sıcaklıkta 10 sn, erime eğrisinde ise 95 °C sıcaklıkta 15 sn ve 60 °C sıcaklıkta 1 dk olarak ayarlandı.

mRNA ve lncRNA cDNA'ları için her reaksiyon başına 10 µl 2X Syber Green, 1 µl cDNA, 1 µl geri primer (10 mM), 1 µl ileri primer (10 mM), 7 µl nükleaz içermeyen su eklendi.

mRNA için qRT-PCR döngü şartları şu şekilde; 95 °C sıcaklıkta 4 dk inkübasyon, 40 döngü için 95 °C sıcaklıkta 1 dk, 60 °C sıcaklıkta 1 dk, erime eğrisi için 95 °C sıcaklıkta 15 sn, 60 °C'de 1 dk ve 95 °C'de 15 sn olarak ayarlandı.

lncRNA için qRT-PCR reaksiyon şartları ise şöyledir; 95 °C sıcaklıkta 5 dk inkübasyon, 45 döngü için 95 °C'de 10 sn, 60 °C'de 15 sn, 72 °C'de 10 sn, erime eğrisinde ise 95 °C sıcaklıkta 15 sn, 60 °C sıcaklıkta 1 dk ve 95 °C sıcaklıkta 15 sn olarak ayarlandı.

Kuraklık stresi uygulanmış bitkilerde ceRNA regülasyon ağlarında yer alan mRNA, miRNA ve lncRNA'ların kontrole göre nispi transkript miktarları delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Referans gen olarak kullanılan EF-1a

(elongation factor 1 a)'ya göre mRNA, miRNA ve lncRNA döngü eşik değerleri (Ct) normalize edildi.

Transkrip miktarları 3 biyolojik ve 2 teknik tekrarın ortalaması alınarak ve hata çubukları için ise standart hata çubukları alınarak hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın önem derecesi (P) Microsoft Excel Programı'nda yer alan Student's T-testi'ne göre belirlendi ve $P < 0.05$ olduğunda iki grup arasındaki farkın önemli olduğu kabul edildi.

2.8. İstatistiksel Analiz

Morfolojik ve SPAD analizlerinde her gruptan 12'şer adet bitki kullanılmıştır. Örneklere ait değerlerin ortalamaları ve standart hataları (SE) Microsoft Excel Student's T-test programı yardımıyla hesaplanmıştır. $P < 0.05$ olarak ifade edilmiştir.

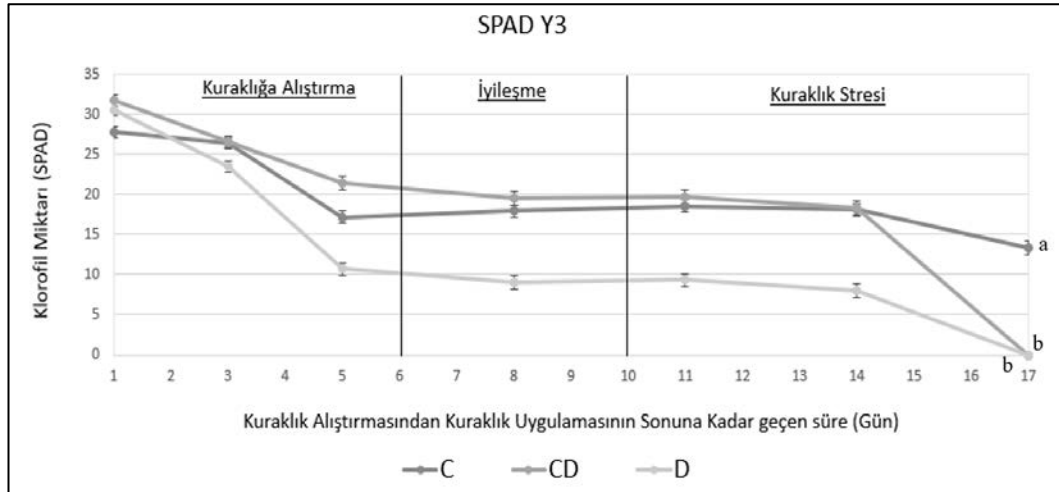
Fizyolojik ve transkripsiyonel analizlerde incelenen her uygulama grubundan 3'er adet bitki kullanılmıştır. Örneklere ait değerlerin ortalamaları ve standart hataları Microsoft Excel Student's T-test programı yardımıyla hesaplanmıştır. Üç tekrarın ortalama değerleri \pm standart hata (SE) olarak ifade edilmiş ve $P < 0.05$ değerleri anlamlı farklılık olarak kabul edilmiştir.

Biyokimyasal analizlerde, antioksidan enzim aktivitelerinde incelenen her uygulama grubundan 3'er adet bitki kullanılmıştır. Veriler SPSS istatistik programı kullanılarak "tek yönlü varyans analizi" (ANOVA) ve ardından TUKEY HSD testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Üç tekrarın ortalama değerleri \pm standart hata (SE) olarak ifade edilmiş ve $P < 0.05$ değerleri anlamlı farklılık olarak kabul edilmiştir.

3. SONUÇLAR

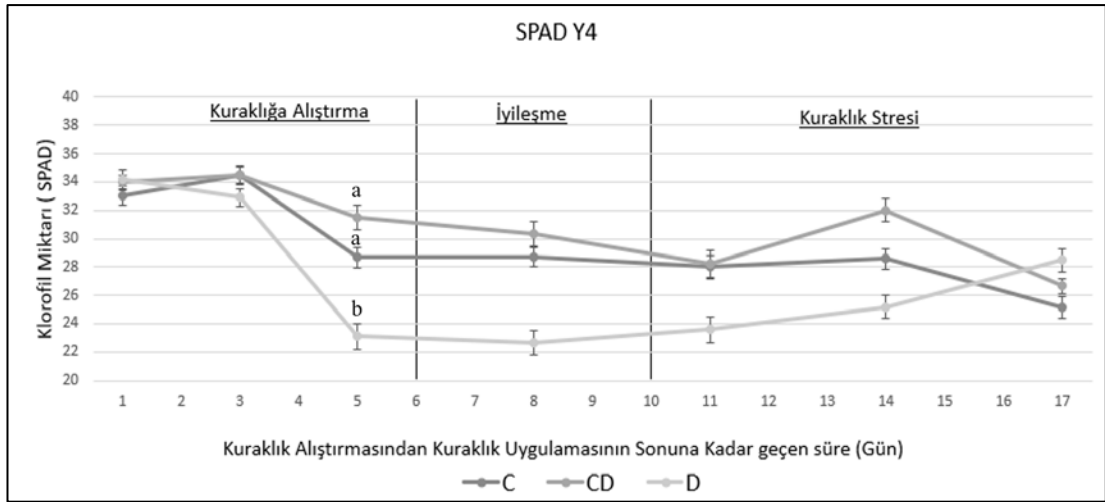
3.1. SPAD ve Klorofil Miktarı

Beş gün kuraklığa alıştırma yapılan ve ardından dört günlük iyileşme süresinin ardından kuraklığa alıştırılan (D) ve alıştırılmadan kuraklık (CD) stresi uygulanmış ve kontrol (C) şartlarında yetiştirilen bitkilerin stres boyunca yapılan SPAD ölçümleri Şekil 3.1-3.4 de gösterilmektedir. Üçüncü yaprakta yapılan SPAD ölçülerinde ilerleyen günlerde klorofil miktarında azalma gözlenmiştir (Şekil 3.1). D grubu bitkiler kuraklığa alıştırma sırasındaki 5 günlük süreçte üçüncü yapraklarının klorofil miktarında C grubuna göre % 37.55, CD grubuna göre % 49.88 oranında istatistiksel olarak önemli derecede azalma gözlenmiştir ($P<0.05$) (Şekil 3.1). CD grubu bitkiler kuraklık stresinin başladığı 5. günden 11. güne kadar klorofil miktarı sabit kalmış, 11. günden sonra hızla klorofil miktarında azalma gerçekleşmiştir. D ve CD gruplarının 11. gündeki klorofil miktarı Students T- test ile karşılaştırıldığında önemli fark bulunmuştur ($P<0.05$).



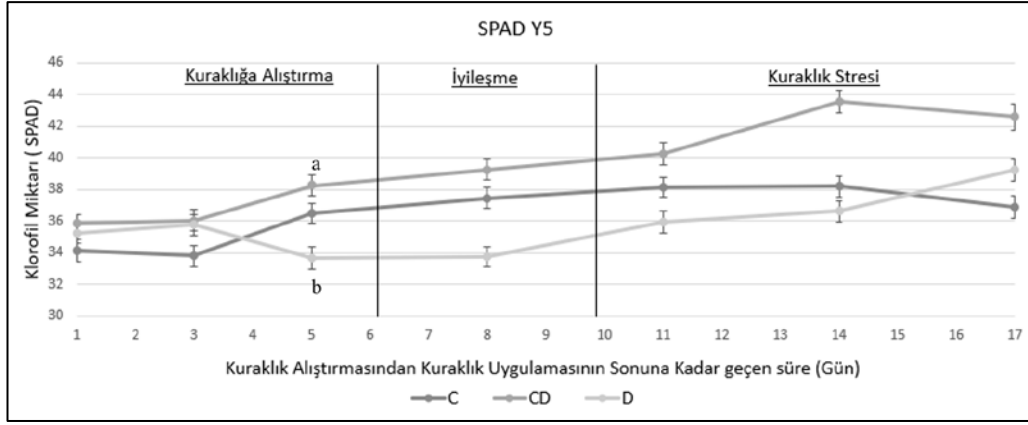
Şekil 3.1: Üçüncü yaprak (Y3) SPAD ölçümü. 1-6 günler arasında D kuraklığa alıştırılma, 6-10 günler arasında D iyileşme, 10-17 günler arasında D ve CD kuraklık stresi uygulama. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir. (n = 12, Student's T- test, farklı harfler her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder ($P<0.05$)).

Dördüncü yapraklardaki SPAD ile ölçülen klorofil miktarında kuraklığa alıştırma süresince D grubu bitkilerde klorofil miktarı uygulamanın ilk gününde diğer gruplar ile yaklaşık olarak aynı değerdeyken alıştırma süresinin sonunda C ve CD gruplarına karşı sırasıyla % 21.1 ve % 25.2 oranında istatistiksel olarak önemli derecede azalma göstermiştir ($P<0.05$) (Şekil 3.2). Uygulama süresinin bittiği 13. günde ise klorofil miktarları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($P>0.05$).



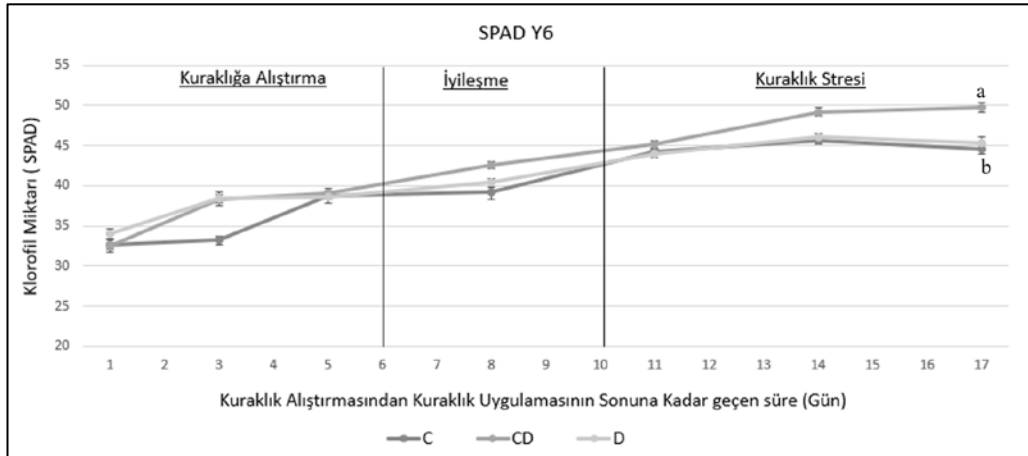
Şekil 3.2: Dördüncü yaprak (Y4) SPAD ölçümü. 1-6 günler arasında D kuraklığa alıştırılma, 6-10 günler arasında D iyileşme, 10-17 günler arasında D ve CD kuraklık stresi uygulama. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir. ($n = 12$, Student's T-test, farklı harfler her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder ($P<0.05$)).

Beşinci yapraklardaki SPAD ile ölçülen klorofil miktarında kuraklığa alıştırma süresince D grubu bitkilerde klorofil miktarı uygulamanın ilk gününde diğer gruplar ile yaklaşık olarak aynı değerlerdeyken kuraklığa alıştırma süresinin sonunda C ve CD gruplarına karşı sırasıyla % 7.70 ve % 12 oranında azalma gerçekleşmiştir. CD'ye göre istatistiksel olarak önemli derecede azalış meydana gelmiştir ($P<0.05$) (Şekil 3.3). Uygulama süresinin bittiği 13. günde ise klorofil miktarları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 3.3: Beşinci yaprak (Y5) SPAD ölçümü. 1-6 günler arasında D kuraklığa alıştıırılma, 6-10 günler arasında D iyileşme, 10-17 günler arasında D ve CD kuraklık stresi uygulama. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir (n = 12, Student's T-test, farklı harfler her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder (P<0.05).

Altıncı yapraklardaki SPAD ile ölçülen klorofil miktarında kuraklığa alıştırma süresince D grubu bitkilerde klorofil miktarı uygulamanın ilk gününde diğer gruplar ile yaklaşık olarak aynı değerlerdeyken kuraklığa alıştırma süresinin sonunda C ve CD gruplarına karşı sırasıyla % 0.60 ve % 1.2 azalış göstermiştir ancak bu farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05) (Şekil 3.4). Uygulama süresinin bittiği 13. günde klorofil miktarları karşılaştırıldığında CD grubu D grubuna göre %8.7 artış göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (P<0.05).



Şekil 3.4: Altıncı yaprak (Y6) SPAD ölçümü. 11-6 günler arasında D kuraklığa alıştıırılma, 6-10 günler arasında D iyileşme, 10-17 günler arasında D ve CD kuraklık stresi uygulama. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir (n = 12, Student's T-test, farklı harfler her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder (P<0.05).

Kuraklığa alıştırmış (D) ve alıştırmamış (CD) bitkilerin kuraklık stresi sonucu yapraklarının klorofil a, b ve karotenoid miktarları, % 100 aseton ile ekstraksiyonu ve ardından spektrometre ile ölçülerek belirlenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Beşinci yapraklardaki klorofil a, b ve karotenoid miktarları.

Klorofil Miktarı	Kontrol (C)	Kuraklığa Alıştırmamış (CD)	Kuraklığa Alıştırmış (D)
Klorofil a	22.53 ± 0.81	12.14 ± 1.44 **	12.23 ± 2.97*
Klorofil b	21.80 ± 1.86	4.46 ± 0.50**	6.16 ± 2.79**
Karotenoid	9.30 ± 0.69	5.12 ± 0.53**	5.75 ± 1.90

(n=3), Student's T-test, **($P<0.01$), *($P<0.05$).

Klorofil a miktarı gruplar arasında en yüksek 22.53 ($\mu\text{g/ml}$) ile C grubunda bulunmuştur. CD grubu 12.14 ($\mu\text{g/ml}$) klorofil a miktarı ile C'ye göre % 46.09 daha az klorofil a içeriğine sahiptir ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P<0.01$). D grubu 12.23 ($\mu\text{g/ml}$) C'ye göre % 45.73 daha az klorofil a içeriğine sahiptir ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P<0.05$). CD grubu D grubuna göre % 0.63 daha az klorofil a içeriğine sahiptir ve gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

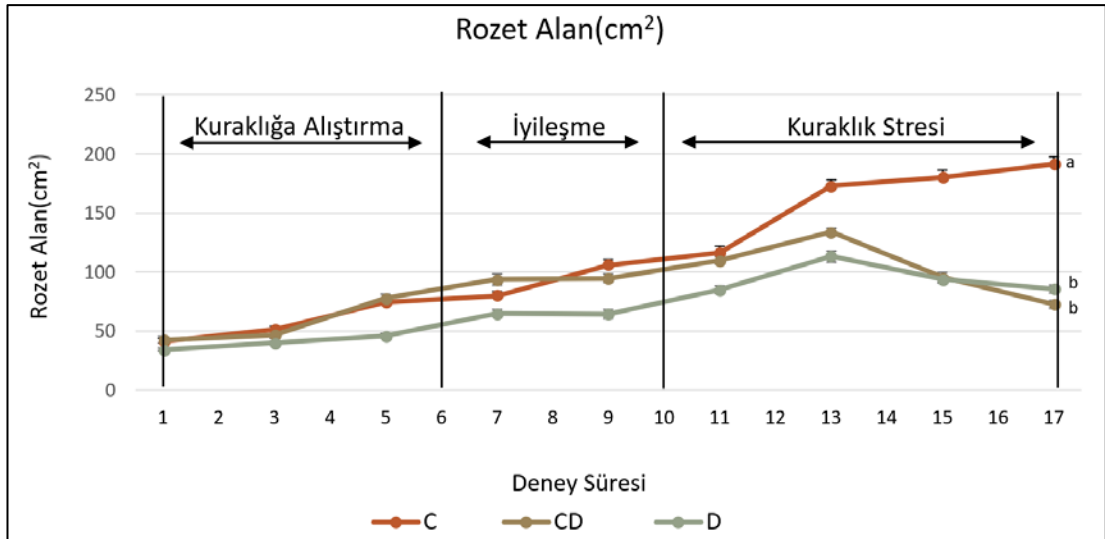
Klorofil b miktarı üç grup içerisinde en yüksek 21.80 ($\mu\text{g/ml}$) ile C grubunda bulunmaktadır. CD grubu 4.46 ($\mu\text{g/ml}$) klorofil b miktarı ile C grubuna göre % 79.54 oranında daha az klorofil b'ye sahiptir, iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P<0.01$). D grubu 6.16 ($\mu\text{g/ml}$) klorofil b miktarına sahiptir ve C grubuna göre % 71.74 daha az klorofil b miktarına sahiptir. D ve C grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P<0.01$). CD, D'ye göre % 27.59 oranında daha az klorofil b'ye sahiptir ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Karotenoid miktarı en çok C grubunda 9.30 ($\mu\text{g/ml}$) olarak bulunmuştur. CD 5.12 ($\mu\text{g/ml}$) karotenoid ile C'ye göre % 44.94 daha az karotenoid miktarına sahiptir ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P<0.01$). D grubu

5.75 ($\mu\text{g/ml}$) karotenoid ile C'ye göre % 38.17 daha az içeriğe sahiptir ve gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

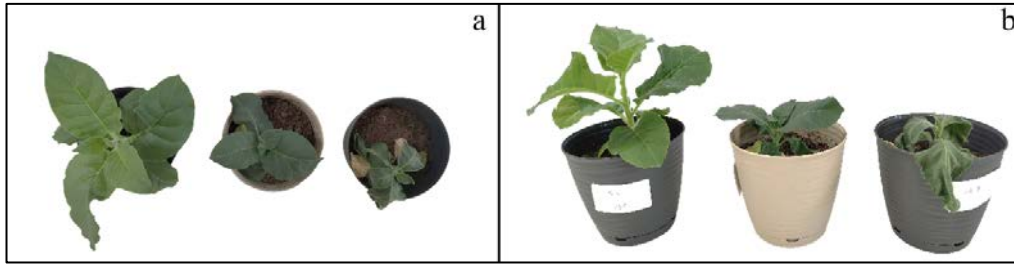
3.2. Rozet Alanı ve Bağlı Su İçeriği

Nicotiana tabacum bitkileri 4 haftalık olduklarında 3 gruba ayrıldıktan sonra D grubu bitkiler 5 gün boyunca kuraklığa maruz bırakıldı. Bu süreç boyunca rozet alan gelişim hızında D grubu *Nicotiana tabacum* bitkileri, C ve CD gruplarına kıyaslama yaprak büyüme ve genişlemesi yavaşlamıştır (Şekil 3.5). Beşinci günün sonunda dört günlük iyileşme uygulanmış ve D ve CD grupları eş zamanlı yedi gün boyunca kuraklık stresi uygulanarak gözle görülür solma bir kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. Kuraklık stresine maruz bırakıldıklarında D ve CD gruplarının rozet alanı artış hızları yaklaşık 1 hafta paralel gittikten sonra artan kuraklık stresi şiddeti ile yapraklarda solmalar meydana gelmesinden dolayı rozet alanda azalmalar kaydedilmiştir. Yedi günlük kuraklık stresi uygulaması bitiminde yapılan ölçümler sonucunda; D grubu rozet alanı, C grubu ile karşılaştırıldığında % 55.3 daha küçük, CD grubu ile karşılaştırıldığında % 15 daha büyük olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$). CD rozet alanı C ile karşılaştırıldığında % 62 daha küçük olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$).



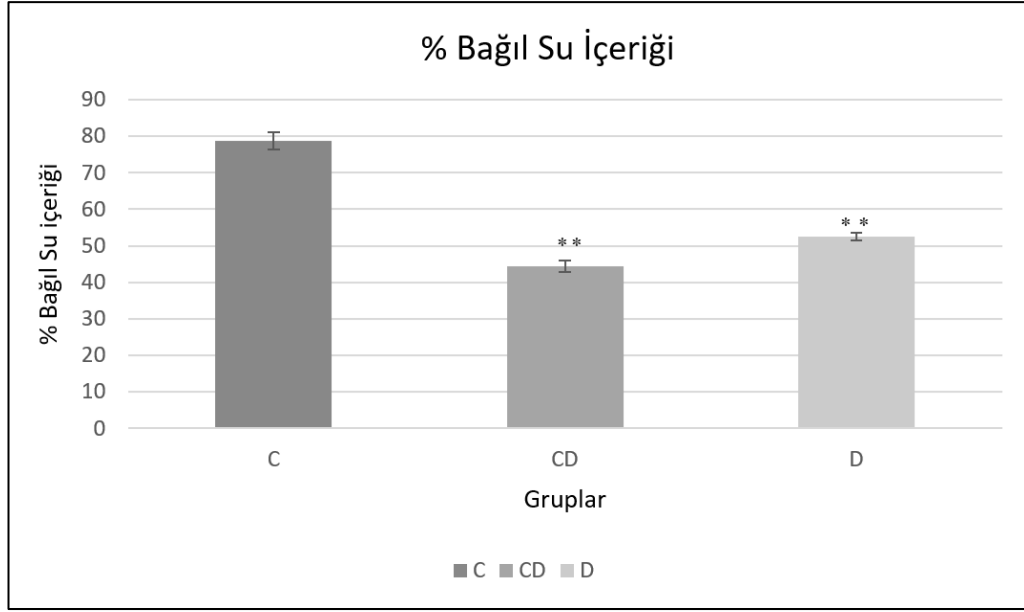
Şekil 3.5: İmage J ile rozet alan ölçüm sonuçları (cm^2). 1-6 günler arasında D kuraklığa alıştırılma, 6-10 günler arasında D iyileşme, 10-17 günler arasında D ve CD kuraklık stresi uygulama. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir ($n = 12$), farklı harfler her bir grup için anlamlı farklılıkları temsil eder ($P<0.05$).

Kuraklığa alıştırma ve kuraklık stresi uygulamaları ardından çekilen fotoğrafta kuraklığa alıştırılan ve alıştırılmayan bitkiler kuraklık stresi uygulandıında morfolojik olarak farklı tepkiler vermişlerdir (Şekil 3.6). Kuraklık stresi uygulaması alıştırılan ve alıştırılmayan her iki grupta kontrole göre gelişimsel olarak yavaşlamaya sebep olmuştur (Şekil 3.6). Kuraklığa alıştırılan (D) ve alıştırılmayan (CD) gruplar karşılaştırıldıında kuraklığa alıştırılan (D) grubun kuraklık stresini daha iyi tolere edebildiği, sadece en alt kattaki yapraklarda solma meydana gelmiştir.



Şekil 3.6: Kuraklık stresi uygulamasının son günü (17.gün) *Nicotiana tabacum* bitkisinin üstten (a) ve yandan (b) görüntüsü. (a)ve (b) için sırasıyla; C, D, CD grupları.

Bağıl su içeriği taze ağırlıktan kuru ağırlık ve rehidrate ağırlıklara göre hesaplandı. Sonuçlarına bakıldıında kontrol (C) grubunun % 78.75 ile en yüksek yüzdeye sahip olduğu görülmektedir (Şekil 3.7). Kuraklığa alıştırma yapılmayan CD grubu ise % 40 bağıl su içeriğiyle en düşük yüzdeye sahiptir. D grubu ise % 52.45 bağıl su içeriğine sahiptir. Kontrol ile CD ve D grupları karşılaştırıldıında kontrole göre sırasıyla % 49.4 ve % 34.2 daha az bağıl su içeriğine sahiptirler ve istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur ($P<0.01$). CD ve D grupları karşılaştırıldıında D grubu CD'ye göre % 30 daha fazla bağıl su içeriğine sahiptir ve istatistiksel anlamda önemli bir sonuç bulunmuştur ($P<0.01$).

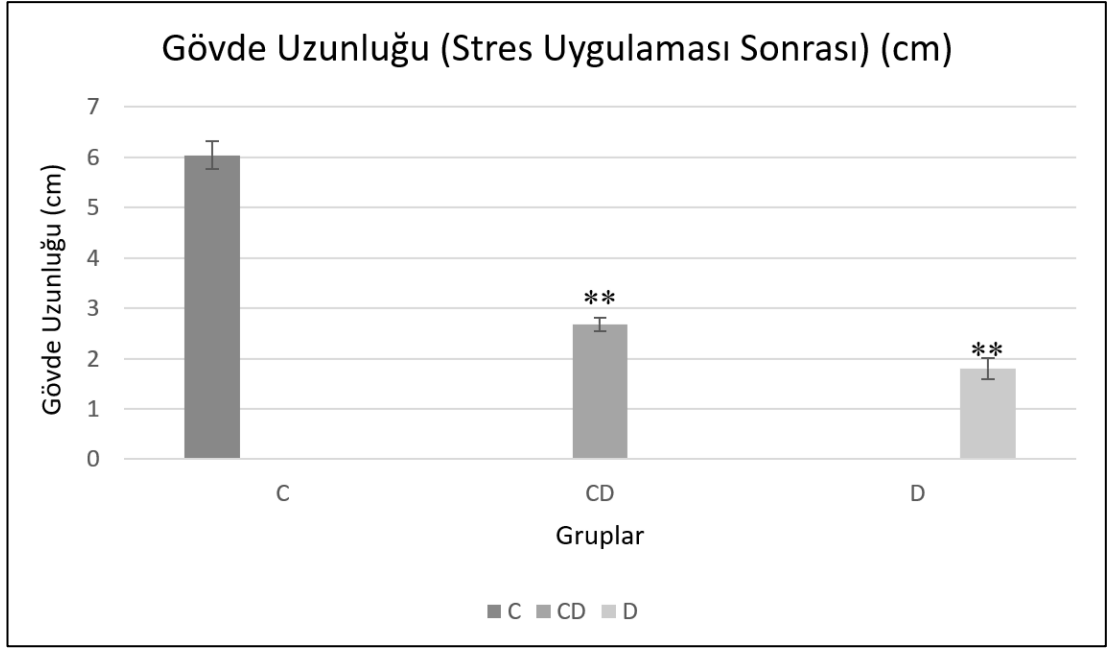


Şekil 3.7: % Bağlı su içeriği miktarları. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir (n = 5), Student's T-test *(P<0.05), **(P<0.01).

3.3. Gövde Uzunluğu ve Çiçeklenme Süreleri

3.3.1. Stres Uygulamasından Sonra Gövde Uzunluğu

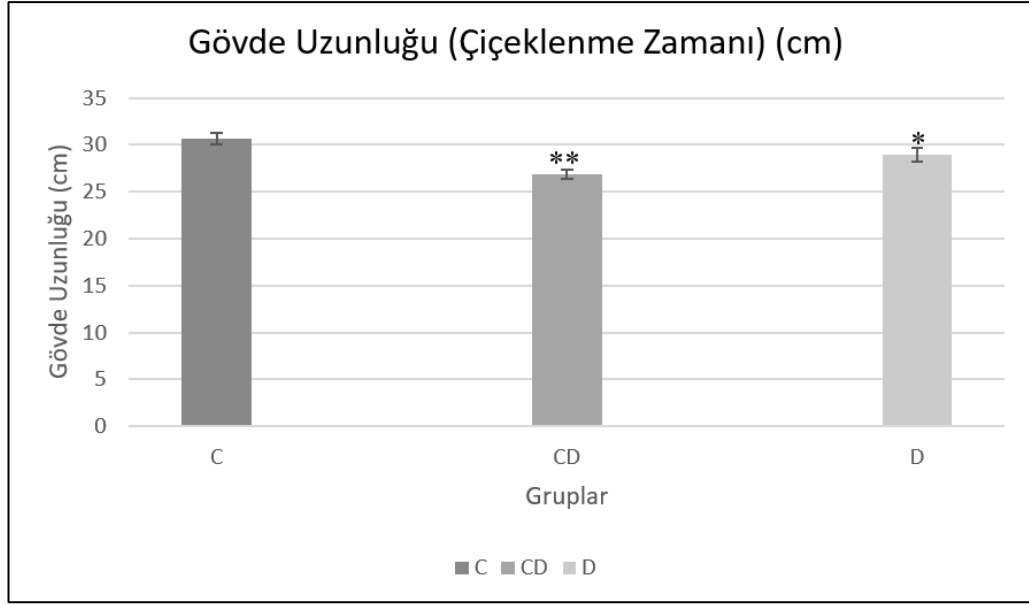
Yedi günlük kuraklık stresi uygulamasının bitmesinin ardından (17.gün) C, CD ve D gruplarındaki bitkilerin gövde uzunlukları kaydedilmiştir (Şekil 3.8). C grubu fidelerin ortalama uzunluğu 6 cm, CD grubu ortalama gövde uzunluğu 2.6 cm, D grubu gövde uzunluğu ise 1.8 cm'dir. D grubu gövde uzunluğu CD grubuna göre % 33 kısadır ve gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur (P<0.01). D grubu gövde uzunluğu ortalaması C grubu gövde uzunluğu ortalamasına göre % 70 daha kısadır ve gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur (P<0.01). CD gövde uzunluğu ortalaması C gövde uzunluğu ortalamasına kıyasla % 55 daha kısadır ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur (P<0.01)



Şekil 3.8: *Nicotiana tabacum* bitkilerinin stres uygulaması sonrası (17. Gün) gövde uzunlukları (cm) (n = 12, Student's T-test, P<0.01). Hata çubukları standart hatayı göstermektedir.

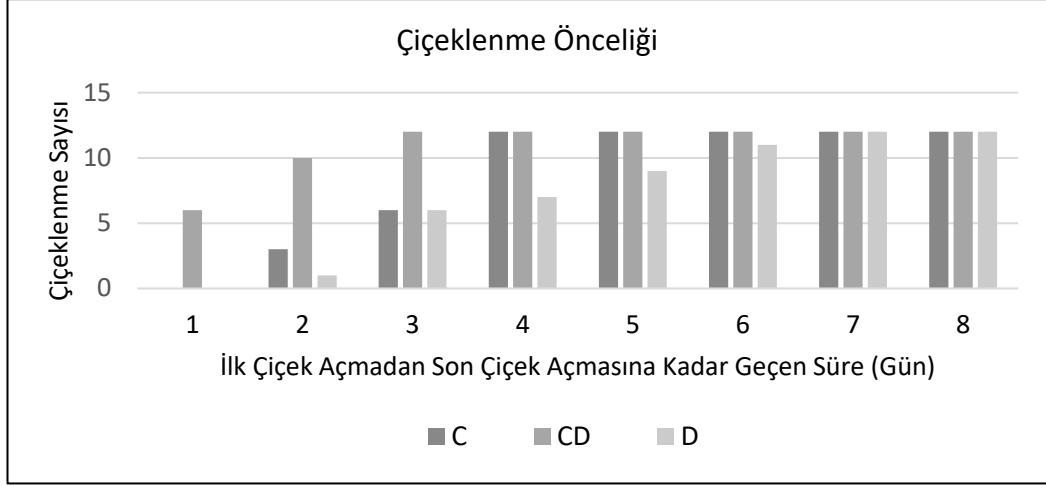
3.3.2. Çiçeklenme Zamanı Gövde Uzunluğu

Nicotiana tabacum bitkilerinin tamamı çiçeklendiğinde gövde uzunlukları tekrar ölçülerek kaydedilmiştir. C grubu gövde uzunluğu $30.7 \pm (2.1)$ cm, CD grubu $26.9 \pm (1.6)$ cm, D grubu $29 \pm (2.5)$ cm olarak ölçülmüştür (Şekil 3.9). CD grubu 26.9 cm ortalama ile diğer iki gruba göre en kısa uzunluğa sahiptir. CD gövde uzunluğu C'ye göre % 12.5 daha kısadır ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur (P<0.01). CD gövde uzunluğu D grubu ile karşılaştırıldığında % 7.2 daha kısadır, iki grup istatistiksel olarak incelendiğinde aralarında önemli fark bulunmuştur (P<0.05). D grubu ile C grubu karşılaştırılmasında D, C'ye göre % 5.7 daha kısadır ve iki grup istatistiksel olarak incelendiğinde aralarında önemli fark bulunmamıştır (P>0.05).



Şekil 3.9: *Nicotiana tabacum* bitkilerinin çiçeklenme zamanı gövde uzunlukları. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir. (n = 12, Student's T-test, P<0.05).

İlk çiçeklenmeden itibaren kaydedilen grupların çiçeklenme sayısı aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 3.10). İlk önce çiçeklenen grup; 12 fideden 6'sının çiçeklenmesiyle CD grubu olmuştur. Çiçeklenmenin 2. gününde C grubunda 3 tane, CD grubunda 10 tane, D grubunda ise 1 tane çiçeklenen bitki olmuştur. Çiçeklenmenin 3. gününde C grubundan 3 tane daha bitki çiçek açarak toplamda 6 tane, CD grubunda bütün bitkiler, D grubunda 5 tane daha bitki çiçek açarak toplamda 6 tane bitki çiçeklenmiştir. Çiçeklenmenin 4. gününde C grubundan 4 tane daha çiçeklenme olarak toplamda 10 tane bitki, D grubunda ise 1 bitki daha çiçek açarak toplamda 7 bitki çiçeklenmiştir. Çiçeklenmenin 5. ve 6. gününde C grubunda 1'er tane daha bitki çiçeklenerek toplam 6 günde 12 bitkinin hepsi çiçeklenmiştir. D grubunda 5. gün 2 tane, 6. gün 2 tane, 7. gün 1 tane daha bitki çiçeklenerek toplam 7 günde bütün bitkiler çiçeklenmiştir.

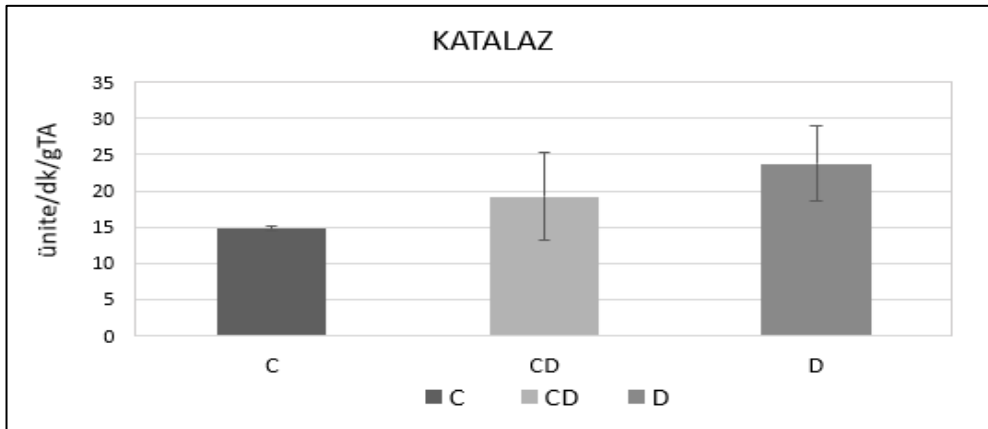


Şekil 3.10: Çiçeklenme süreleri. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir (n = 12).

3.4. Antioksidan Enzim Aktivite Analizleri

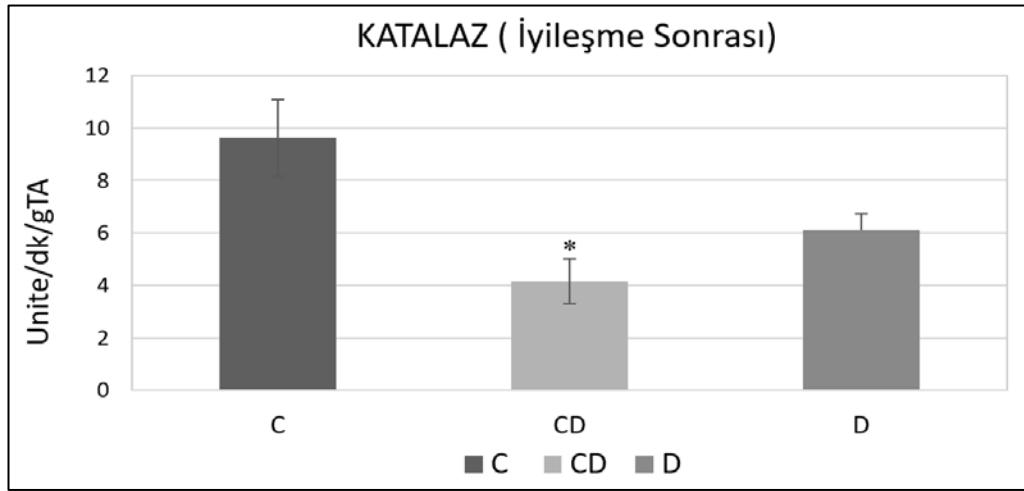
3.4.1. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi

Kontrol (C), kuraklığa alışmamış (CD) ve alışmış (D) grubu bitkilerinden alınan yaprak örneklerindeki katalaz aktivitesi aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 3.11). CD katalaz aktivitesi kontrole göre % 30 artmıştır, fakat istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). D katalaz aktivitesi C ve CD'ye göre sırasıyla % 60 ve % 23 artmıştır ancak istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 3.11: Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında katalaz (CAT) enzim aktivitesi (n=3, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. * $P<0.05$).

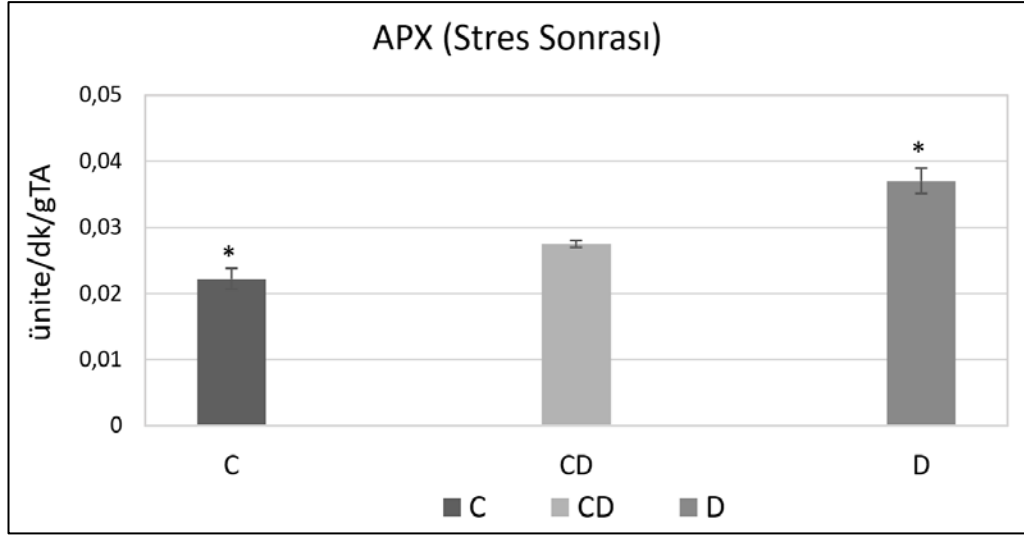
Kuraklık stresi uygulamasının ardından yapılan dört günlük iyileştirmenin bitiminde altıncı yapraklardan alınan örneklerdeki katalaz enzim aktivitesi sonuçları Şekil 3.12’de gösterilmiştir. Kuraklığa alışmamış (CD) grubun katalaz aktivitesi kontrol (C) grubuna göre % 56.6 daha az aktivite göstermiştir ve iki grup arasında istatikselsel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P<0.05$). Kuraklığa alışmamış (CD) grubu ve kuraklığa alışmış (D) grubu arasındaki aktivite karşılaştırılmasında CD D’ye göre % 31.5 oranında daha az enzim aktivitesine sahiptir ve iki grup arasında istatikselsel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). D grubu C grubuna göre % 36.7 daha az katalaz enzimine sahiptir ve iki grup arasında istatikselsel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 3.12: İyileşmenin ardından C, CD ve D gruplarında katalaz (CAT) enzim aktivitesi (n=3, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. * $P<0.05$).

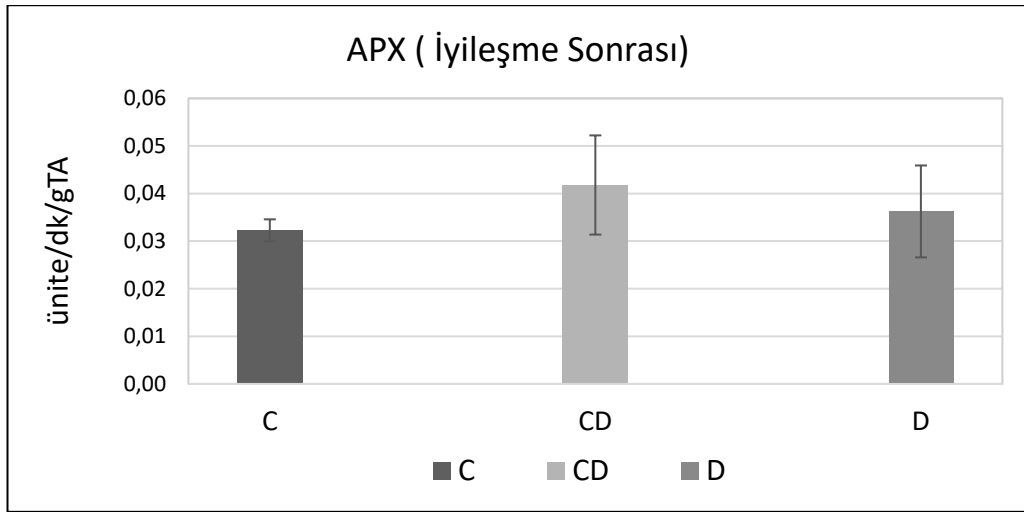
3.4.2. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi

Kontrol (C), kuraklığa alışmamış (CD) ve alışmış (D) gruplarında yer alan bitkilerin beşinci yapraklarından alınan örneklerdeki askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 3.11). CD APX aktivitesi C’ye göre % 23 fazladır, fakat istatikselsel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). D APX aktivitesi C’ye göre % 66 daha fazla artmıştır ve istatikselsel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P<0.01$). D APX aktivitesi, CD’ye göre % 34 daha fazla artmıştır ve istatikselsel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 3.13: Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi (n=3, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. *P<0.05).

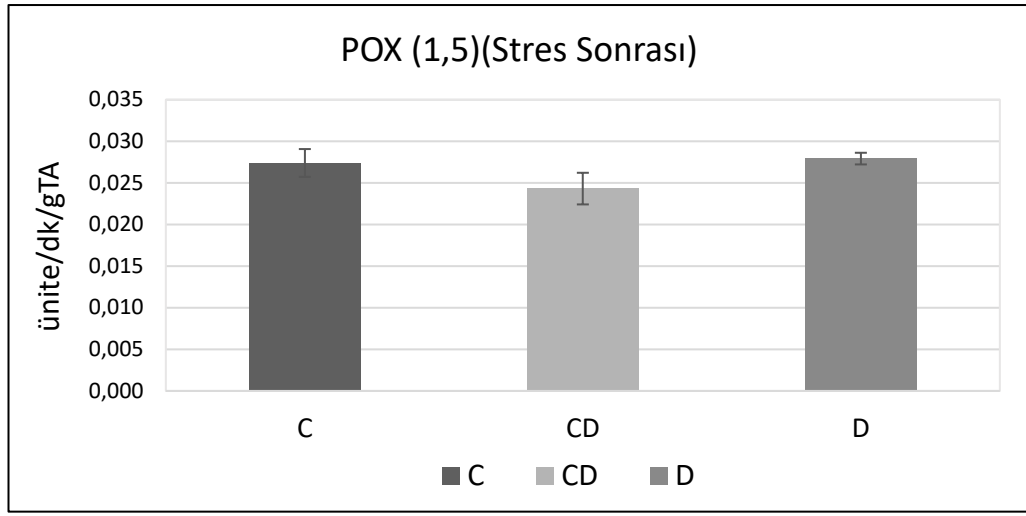
Kontrol (C), kuraklığa alışmamış (CD) ve kuraklığa alışmış (D) bitkilerin yeniden sulamanın ardından alınan yaprak örneklerindeki askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 3.12). CD askorbat peroksidaz aktivitesi C'ye göre % 31.2 fazladır, fakat istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır (P>0.05). D APX aktivitesi C'ye göre % 12.5 daha fazla artmıştır ve istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır (P>0.05). CD APX aktivitesi D'ye göre % 16.6 daha fazla artmıştır, ancak istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (P>0.05).



Şekil 3.14: İyileşmenin ardından askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi (n=3, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. *P<0.05).

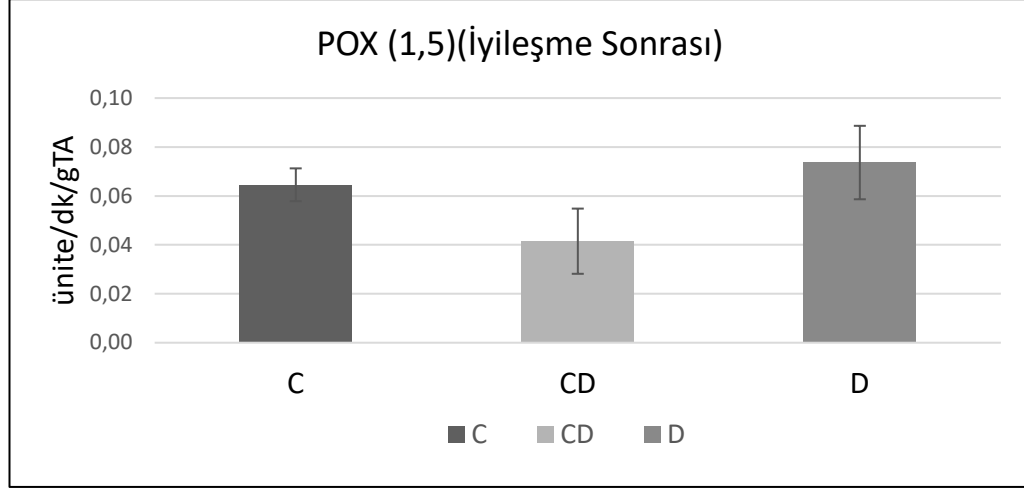
3.4.3. Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi

Kontrol (C), kuraklığa alışmamış (CD) ve alışmış (D) grubu bitkilerinden alınan beşinci yaprak örneklerindeki peroksidaz (POX) aktivitesi aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 3.13). CD peroksidaz enzim aktivitesi C'ye göre % 11.1 azalmıştır ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). CD peroksidaz enzim aktivitesi D'ye göre % 14.2 daha azdır ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). D peroksidaz enzim aktivitesi C'ye göre % 3.7 artmış ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 3.15: Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında peroksidaz (POX) enzim aktivitesi (n=3, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. * $P<0.05$).

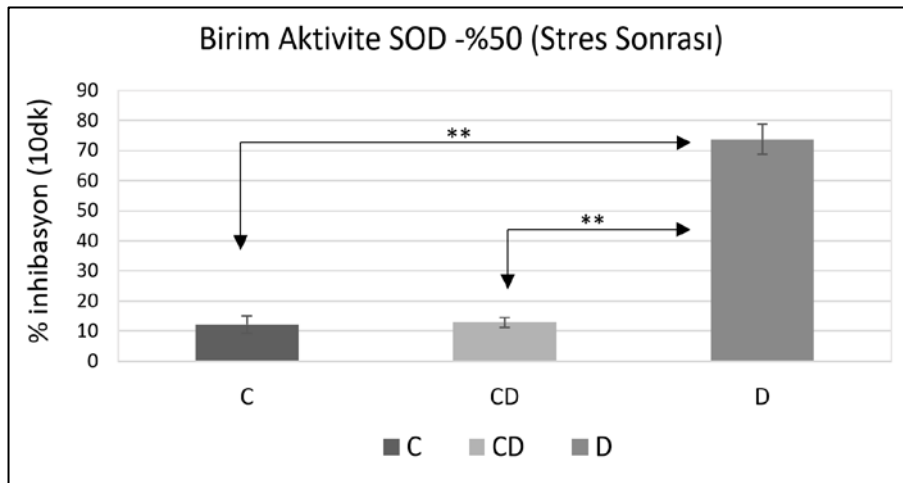
Yeniden sulamanın ardından alınan örneklerden yapılan peroksidaz enzim aktivitesi sonuçları Şekil 3.14'te gösterilmiştir. CD grubu peroksidaz aktivitesi C grubuna göre % 37 daha az aktivite göstermiştir ancak iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). CD grubu ve D grubu arasındaki aktivite karşılaştırılmasında CD, D'ye göre % 44.5 oranında daha az enzim aktivitesine sahiptir ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). D grubu C grubuna göre % 13.8 daha fazla peroksidaz enzimine sahiptir ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 3.16: İyileşmenin ardından peroksidaz (POX) enzim aktivitesi (n=3, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. *P<0.05).

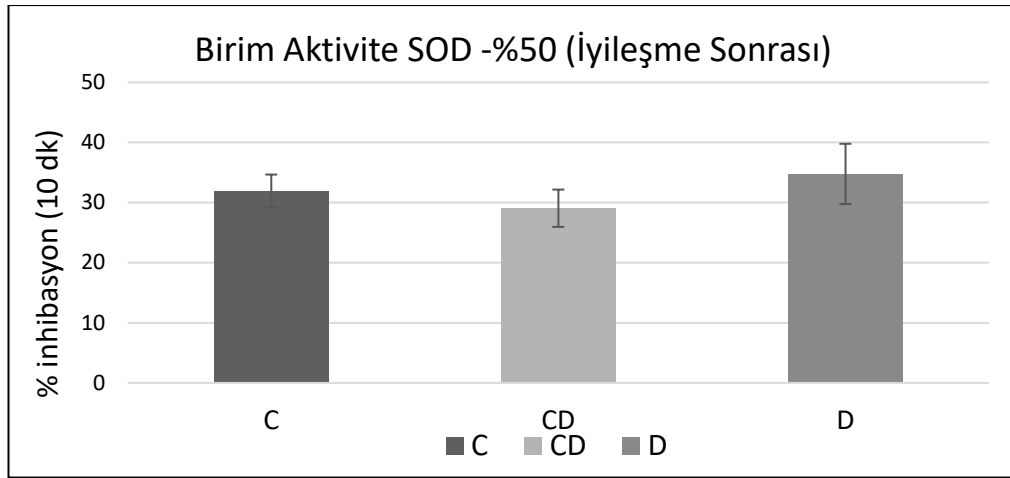
3.4.4. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi

Kontrol (C), kuraklığa alışmamış (CD) ve alışmış (D) grubu bitkilerinden alınan yaprak örneklerindeki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 3.15). D süperoksit dismutaz enzim aktivitesi C'ye göre % 502 artmış, CD'ye göre % 468 artmıştır ve istatiksel olarak önemli fark bulunmuştur (P<0.01). CD süperoksit dismutaz enzim aktivitesi C'ye göre % 5.9 artmış ve istatiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (P>0.05).



Şekil 3.17: Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi (n=3, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. *P<0.05).

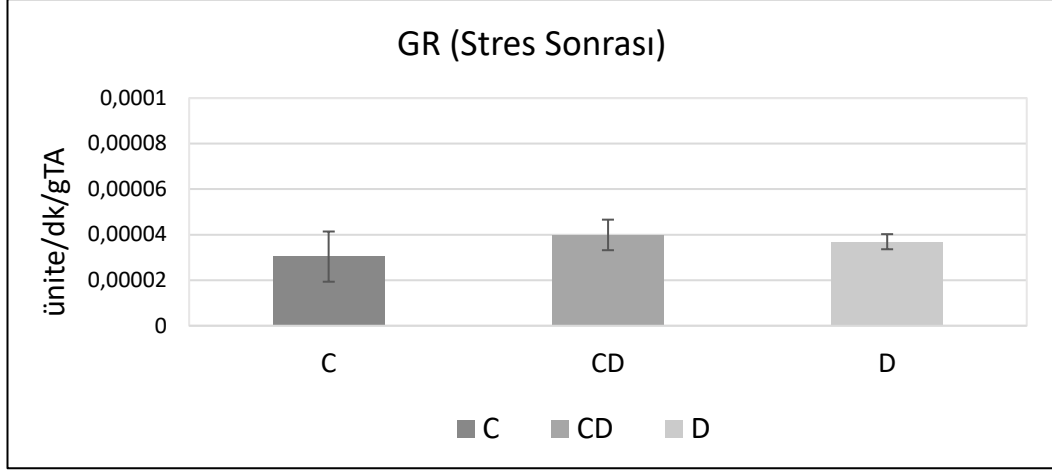
Yeniden sulamanın ardından alınan örneklerden yapılan süperoksit dismutaz enzim aktivitesi sonuçları Şekil 3.16'da gösterilmiştir. CD grubu süperoksit dismutaz enzim aktivitesi C grubuna göre % 8.9 daha azdır ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). CD grubu ve D grubu arasındaki aktivite karşılaştırılmasında CD, D'ye göre % 16.4 oranında daha az enzim aktivitesine sahiptir ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). D grubu C grubuna göre % 8.9 daha fazla süperoksit dismutaz enzim aktivitesine sahiptir ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 3.18: İyileşmenin ardından süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ($n=3$, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. $*P<0.05$).

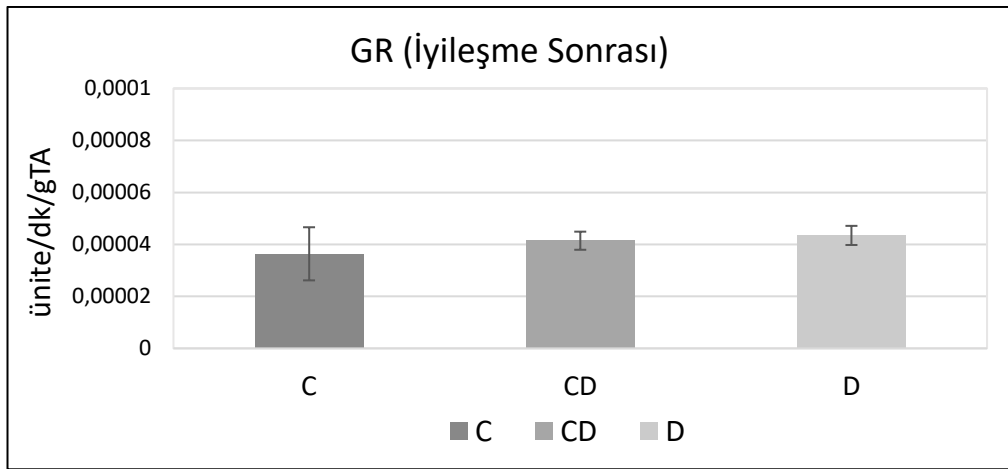
3.4.5. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesi

Kontrol (C), kuraklığa alışmamış (CD) ve alışmış (D) grubu bitkilerinden alınan yaprak örneklerindeki glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 3.17). D grubu glutasyon redüktaz aktivitesi C'ye göre % 32 artmış ve istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ($P>0.05$). D grubu glutasyon redüktaz aktivitesi CD'ye göre ise % 8 azalmış ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ($P>0.05$). CD glutasyon redüktaz enzim aktivitesi C'ye göre % 42 artmış ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 3. 19: Kontrol ve kuraklık stresi uygulamasında glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi (n=3, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. *P<0.05).

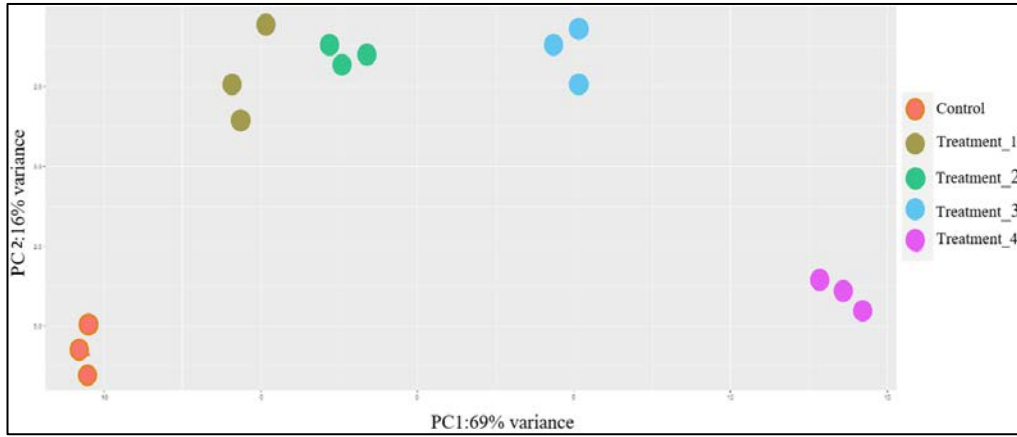
İyileşmenin ardından altıncı yapraklardan alınan örneklerdeki süperoksit dismutaz enzim aktivitesi sonuçları Şekil 3.18'de gösterilmiştir. CD grubu süperoksit dismutaz enzim aktivitesi C grubuna göre % 13.8 daha fazladır ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (P>0.05). CD grubu ve D grubu arasındaki aktivite karşılaştırılmasında CD grubu D'ye göre % 4.6 oranında daha az enzim aktivitesine sahiptir ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlemlenmemiştir (P>0.05). D grubu C grubuna göre % 13.8 daha fazla enzim aktivitesine sahiptir ve iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmemiştir (P<0.05).



Şekil 3.20: İyileşmenin ardından glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi (n=3, Tek yönlü ANOVA'yı takiben her gösterge ortalama değerleri arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi kullanıldı. *P<0.05).

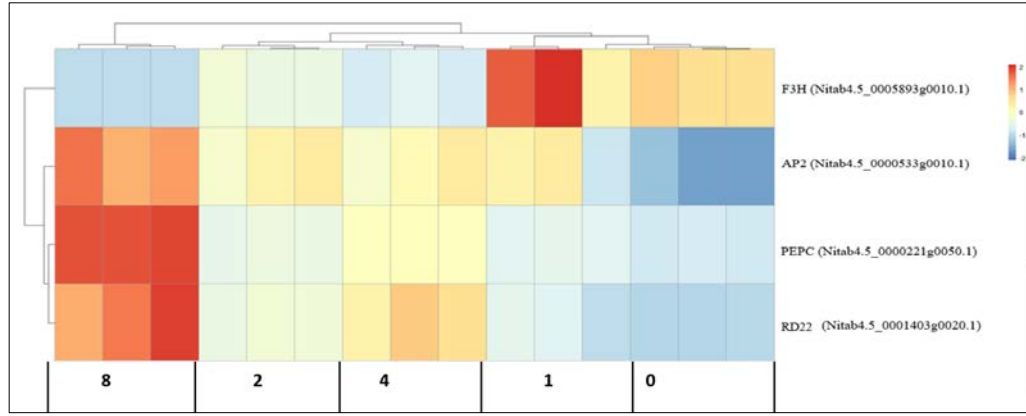
3.5. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Veri seti içerisinde K326 uygulamasının 1, 2, 4 ve 8. saatlerinde örnekler toplanmıştır. Veri setinden elde edilen grupların kendi içlerindeki biyolojik tekrarlarının dağılımlarını incelemek üzere yapılan PCA grafiği Şekil 3.21’de sunulmuştur. Kontrol, 1, 2 4 ve 8 saatlik kuraklık stresi uygulama sonrası toplanan örnekler grup içerisinde karşılaştırıldığında biyolojik tekrarların benzerlik gösterdiğini ve varyansı bozan bir örneğin olmadığı anlaşılmaktadır.



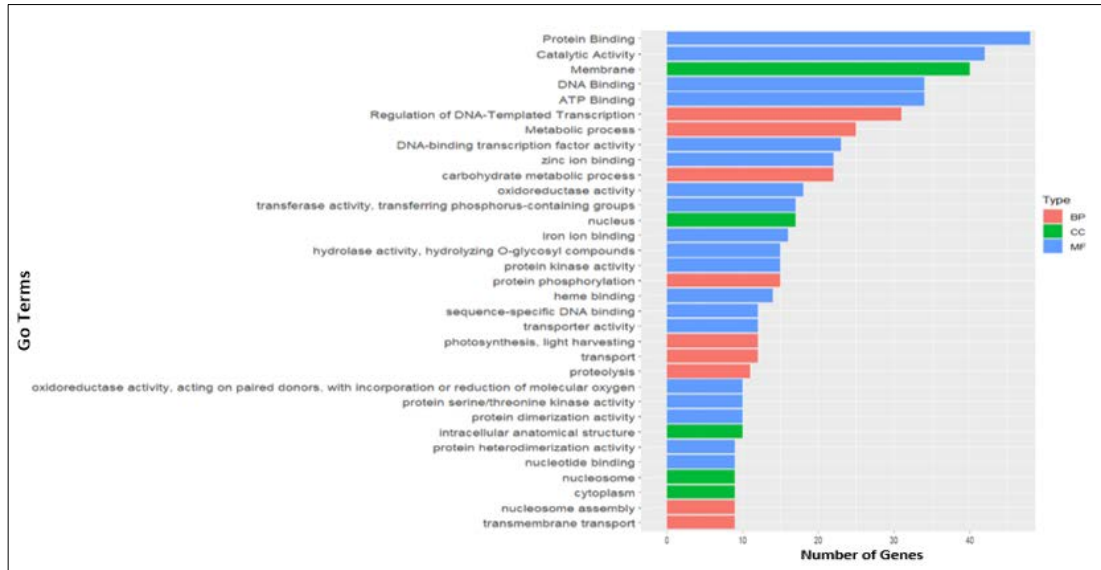
Şekil 3.21: PCA grafiği.

ceRNA ağlarındaki mRNA'ların gen ifadesindeki değişikliklerin incelenmesi için ısı haritası oluşturuldu (Şekil 3.22). F3H kuraklık stresinin sadece birinci saatinde ifadesi artmış ve ardından ifadesi azalmıştır. AP2 artan kuraklık stresi ile yukarı regüle edilmiştir. PEPC birinci, ikinci saatlerde aşağı regüle edilmişken sekizinci saatte yukarı regüle olmuştur. RD22 kuraklık stresinin birinci saatinde aşağı regüle iken ilerleyen zamanda yukarı regüle edilerek sekizinci saatte en fazla ekspresyon yapmıştır.



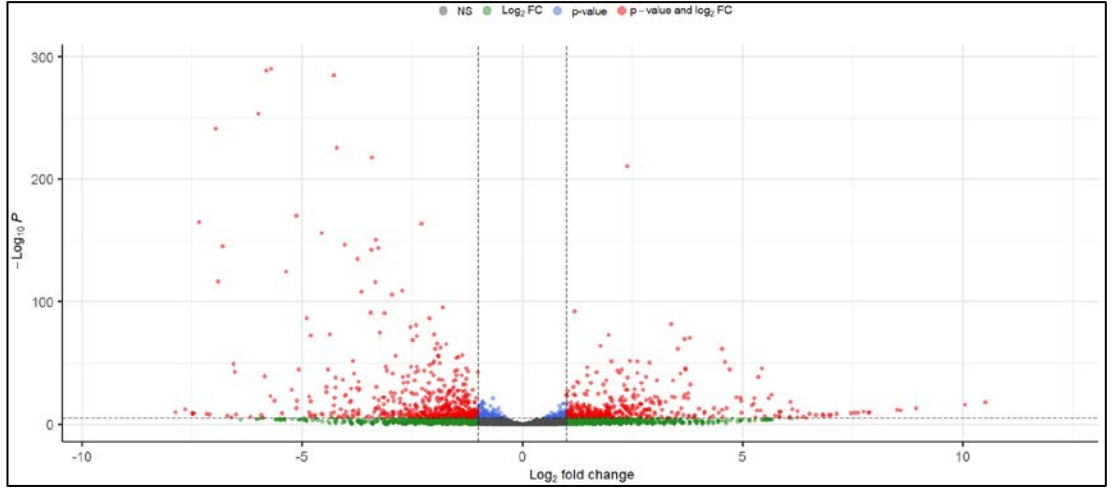
Şekil 3.22: Isı haritası.

Veri setinde analizler sonucu elde edilen uzun süreli kuraklık stresi altında ifadesinde farklılık olan genlerin biyolojik işlevlerini tahmin etmek için GO terimi kullanıldı. Veri setinin Go Terms incelemesi yapıldığında moleküler fonksiyonda ile ilgili olan protein bağlanmasında ve katalitik aktiviteye sahip genler çoğunluktadır.



Şekil 3.23: İfadesinde farklılık olan genlerin önemli ölçüde zenginleştirilmiş GO terimi analizi.

mRNA ifadelerinin x ekseni boyunca \log_2 (Fold change) değişimleri ve y ekseni boyunca p değerlerinin negatif logaritması volkan grafiği oluşturularak gösterilmiştir (Şekil 3.24).

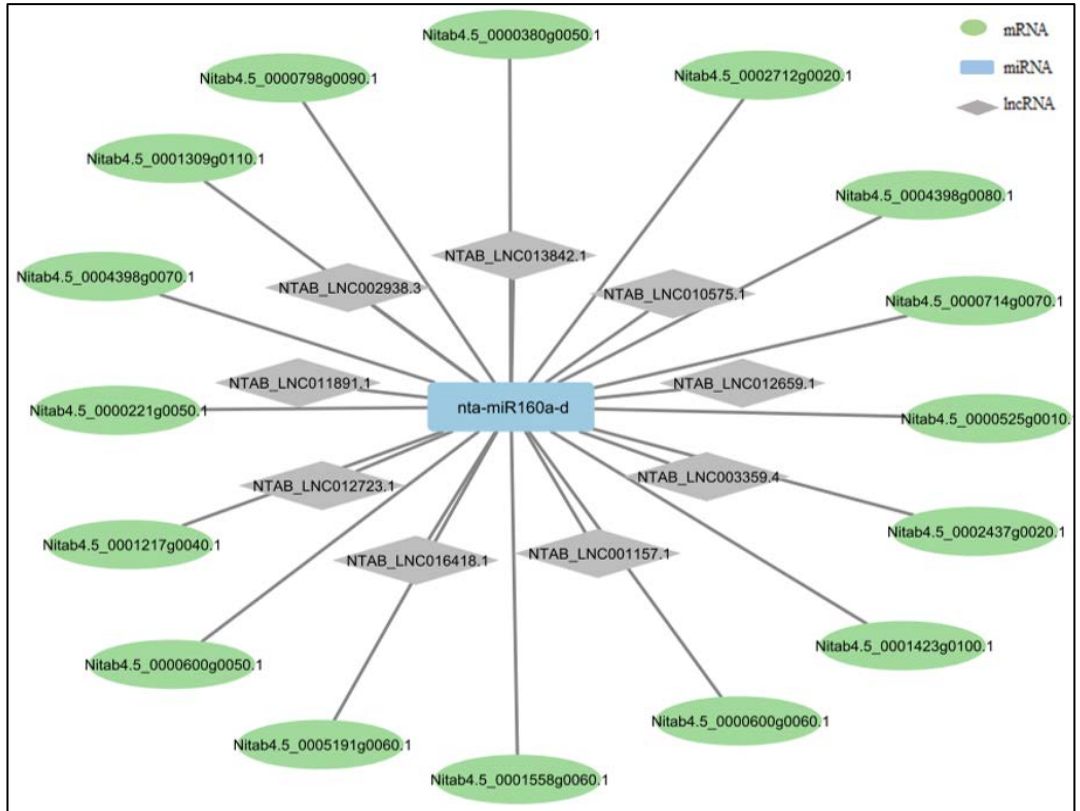


Şekil 3.24: Volkan grafiği.

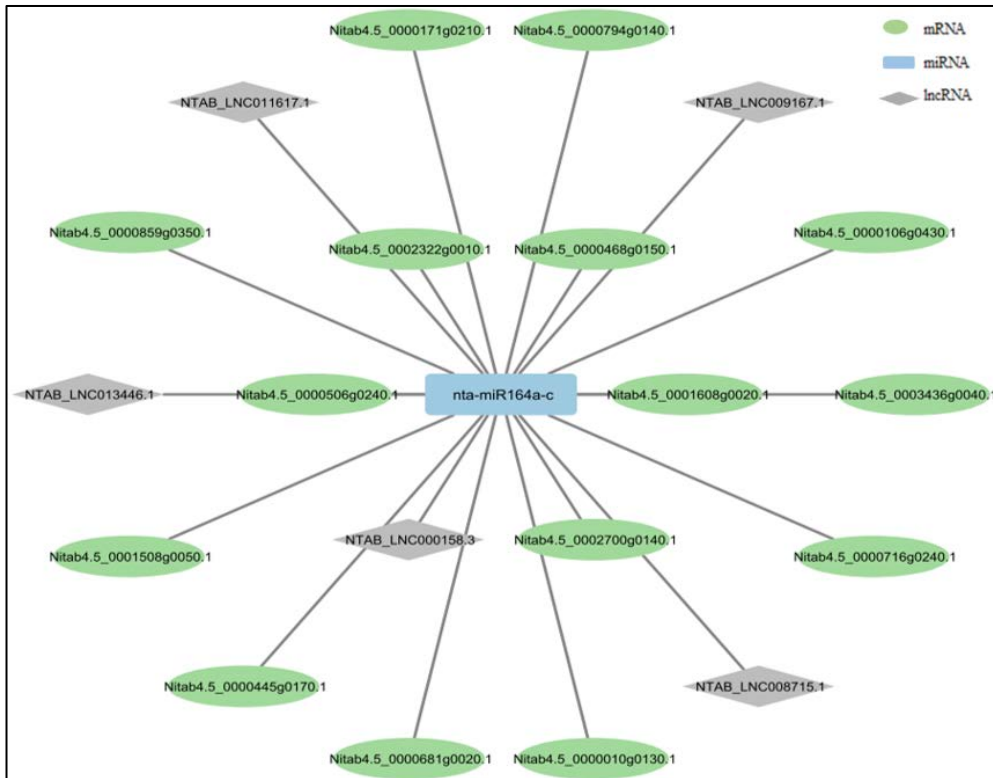
Cytoscape (3.9.1 versiyon) yazılımı tarafından oluşturulan ceRNA ağı aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 3.25-3.32). Seçilen parametreler doğrultusunda mir160 toplam 16 mRNA ve 9 lncRNA ile olası hibridizasyonu tahmin edilmiştir (Şekil 3.25). mir164 toplam 15 mRNA ve 5 lncRNA ile olası hibridizasyonu tahmin edilmiştir (Şekil 3.26). mir167 toplam 5 mRNA ve 5 lncRNA ile olası hibridizasyonu tahmin edilmiştir (Şekil 3.27). mir168 toplam 4 mRNA ve 6 lncRNA ile olası hibridizasyonu tahmin edilmiştir (Şekil 3.28). mir156 toplam 2 mRNA ve 3 lncRNA ile olası hibridizasyonu tahmin edilmiştir (Şekil 3.29). mir159 toplam 1 mRNA ve 4 lncRNA ile olası hibridizasyonu tahmin edilmiştir (Şekil 3.29). mir1446 toplam 2 mRNA ve 5 lncRNA ile olası hibridizasyonu tahmin edilmiştir (Şekil 3.30). mir171b toplam 1 mRNA ve 2 lncRNA ile olası hibridizasyonu tahmin edilmiştir (Şekil 3.30).

Ekspresyon seviyelerine bakılan ceRNA-160 ve ceRNA-168 ağı Şekil 3.31’de gösterilmiştir. ceRNA-172 ağı ve ceRNA-390 ağı Şekil 3.32’de gösterilmiştir.

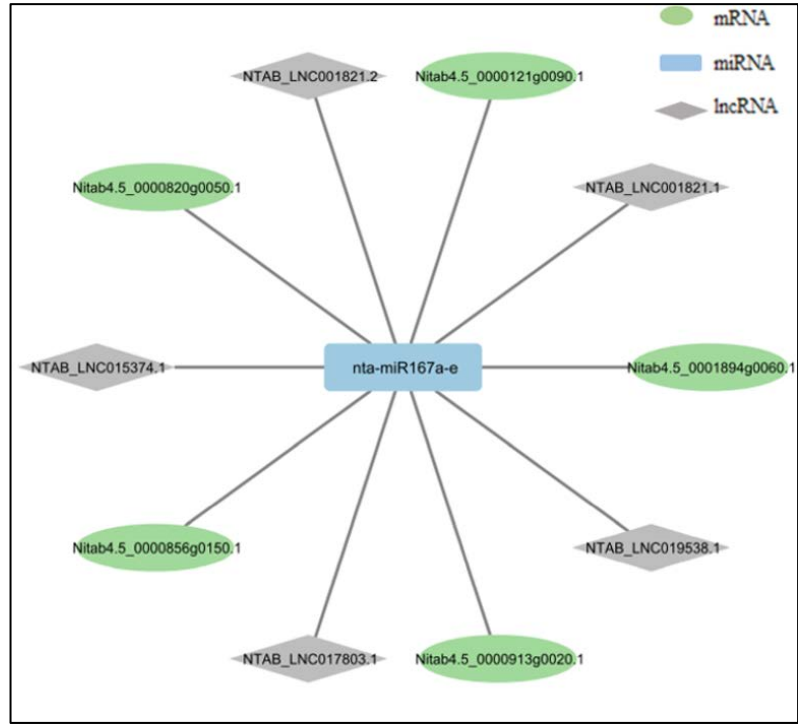
miRNA hedefleri örnekleri için hesaplanan miRNA:mRNA hibrit yapıları şekil 3.33’te gösterilmiştir. RNAhybrid ile tahmin edilen miRNA:mRNA hibritlerinin yapısı sunulmaktadır. Hedef mRNA ve lncRNA’nın miRNA bağlanma yeri üstte, tamamlayıcı miRNA alt iplikçik olarak gösterilmektedir. Hedef mRNA ya da lncRNA’nın bağlanma pozisyon noktasını, mfe değerleri (kcal/mol) ve p value değerleri verilmektedir.



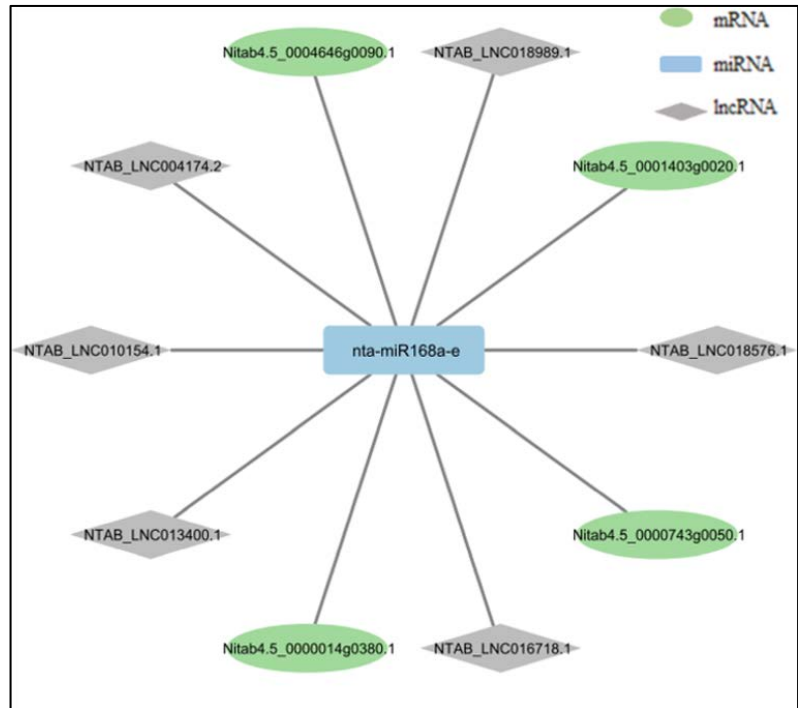
Şekil 3.25: ceRNA-160 (a-d) ağı.



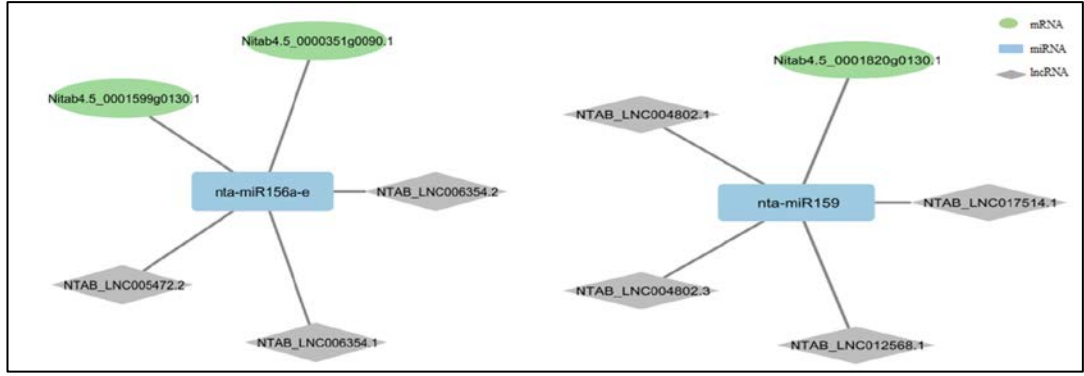
Şekil 3.26: ceRNA-164 ağı.



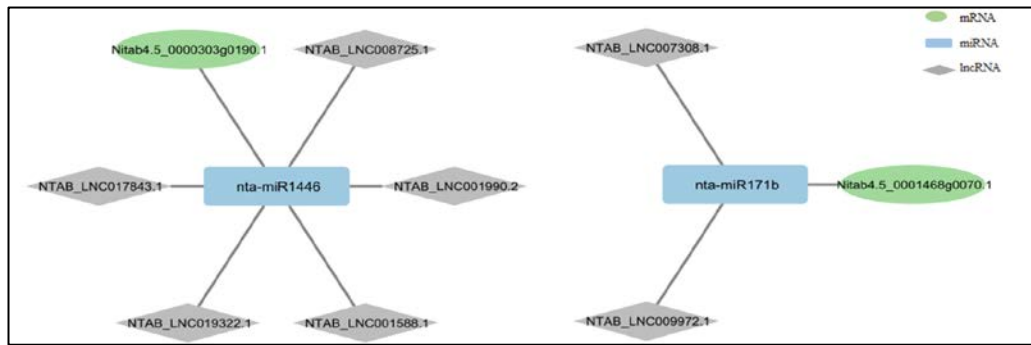
Şekil 3.27: ceRNA-167(a-e) ağı.



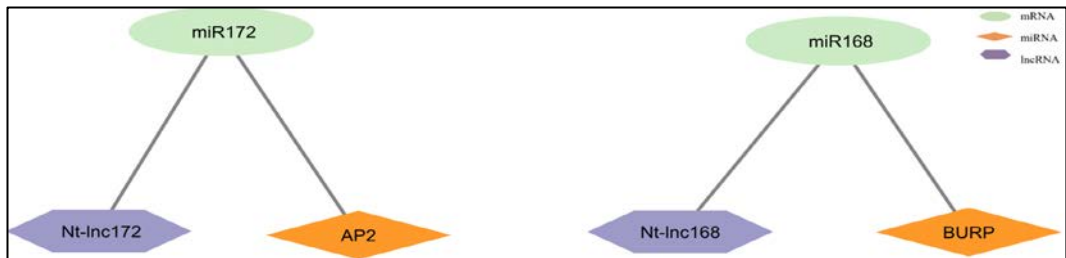
Şekil 3.28: ceRNA-168(a-e) ağı.



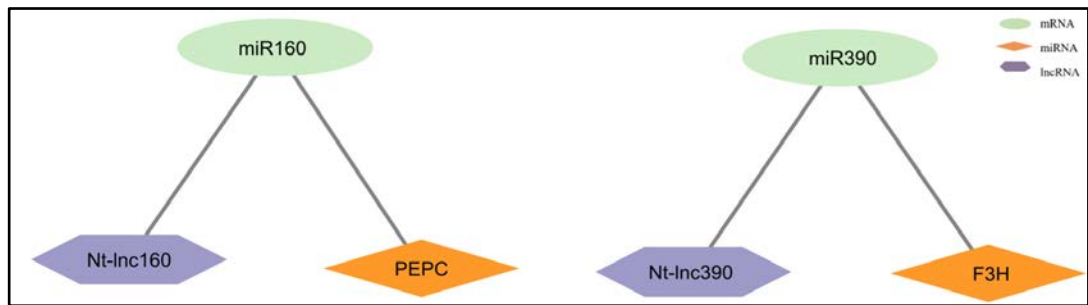
Şekil 3.29: ceRNA-156 ve ceRNA-159 ağı.



Şekil 3.30: ceRNA-1446 ve ceRNA-171b ağı.



Şekil 3.31: ceRNA-172 ve ceRNA-168 ağı.

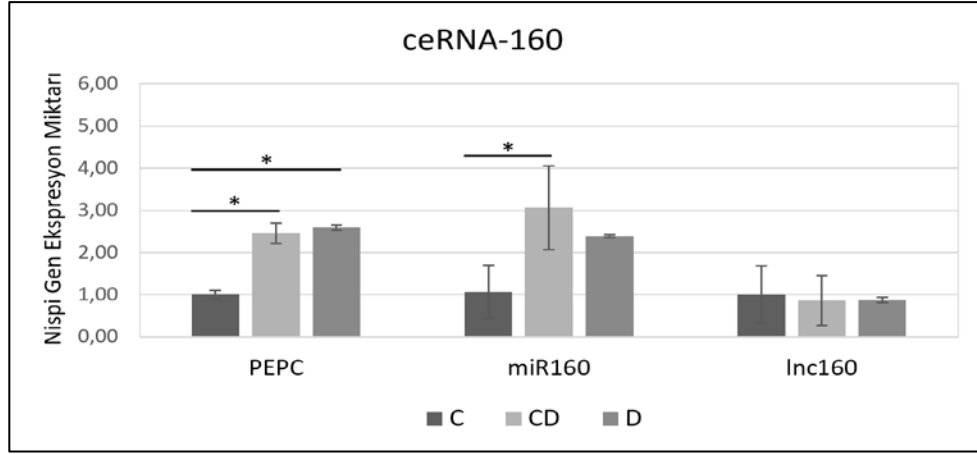


Şekil 3.32: ceRNA-160 ve ceRNA-390 ağı.

<p>mfe: -33.3 kcal/mol p-value: 0.014147</p> <p>position 1949 target 5' U U G 3'</p> <p>mRNA UGC GGGGAGCUAGGCA AUG UCCCUCGGUCCGU</p> <p>miRNA 3' ACCGU</p>	<p>mfe: -35.0 kcal/mol p-value: 0.006398</p> <p>position 372 target 5' G A AUUU G 3'</p> <p>mRNA GG UAUAU GGGGGGUCAGGCA CC GUAUG UCCCUCGGUCCGU</p> <p>miRNA 3' A</p>
<p>mfe: -34.6 kcal/mol p-value: 0.013578</p> <p>position 80 target 5' C U 3'</p> <p>mRNA UUCU CCUGCAUCGAGCGG AAGGG GGACGUGGUUCGCU</p> <p>miRNA 3' CU</p>	<p>mfe: -32.2 kcal/mol p-value: 0.006222</p> <p>position 243 target 5' C AG C 3'</p> <p>mRNA CCC UCUGCACCAAGUG GGG GGACGUGGUUCGCU</p> <p>miRNA 3' AA CU U 5'</p>
<p>mfe: -40.4 kcal/mol p-value: 0.000090</p> <p>position 1183 target 5' G C 3'</p> <p>mRNA CUGCAGCAUCAUCAGGAUUCU GACGUCGUAGUAGUUCUAAGA</p> <p>miRNA 3'</p>	<p>mfe: -38.2 kcal/mol p-value: 0.000315</p> <p>position 709 target 5' G A 3'</p> <p>mRNA CUGCAGCAUUAUCAAGAUUC GACGUCGUAGUAGUUCUAAGA</p> <p>miRNA 3' A 5'</p>
<p>mfe: -36.0 kcal/mol p-value: 0.001149</p> <p>position 275 target 5' A G A 3'</p> <p>mRNA UG UGUUCCUCCUGAGCUU AC AUAGGGAGGACUCGAA</p> <p>miRNA 3' CC G</p>	<p>mfe: -33.3 kcal/mol p-value: 0.003089</p> <p>position 256 target 5' U C A C 3'</p> <p>mRNA GG GCUAUCC UCCUGAGUU CC CGAUAGG AGGACUCGA</p> <p>miRNA 3' A G A 5'</p>

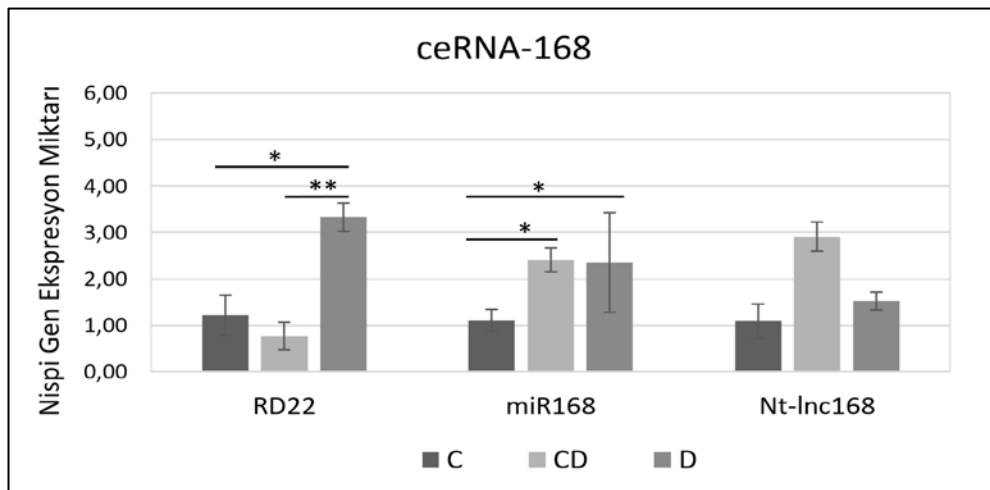
Şekil 3.33: ceRNA regülasyon ağları. Üstten alta: RNAhybrid tarafından tahmin edildiği gibi; miR160-PEPC ve Nt-lnc160, mir168-RD22-Nt-lnc-168, mir172-AP2-Nt-lnc-172, mir390-F3H-Nt-lnc-390 bağlanma bölgelerinin şeması.

ceRNA-160'ın qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri ölçülerek Şekil 3.34'te gruplar arasındaki değişimleri gösterilmiştir. PEPC ekspresyon seviyelerinde CD ve D gruplarında kontrole göre sırasıyla 2.6 ve 2.5 kat artış gerçekleşmiştir ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P < 0.05$). Kuraklığa alıştırılmamış (CD) grupta miR160 ekspresyon seviyesi kontrole göre 2.9 kat artmıştır ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($P < 0.05$). lnc160 seviyeleri gruplar arasında kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmamıştır ($P > 0.05$).



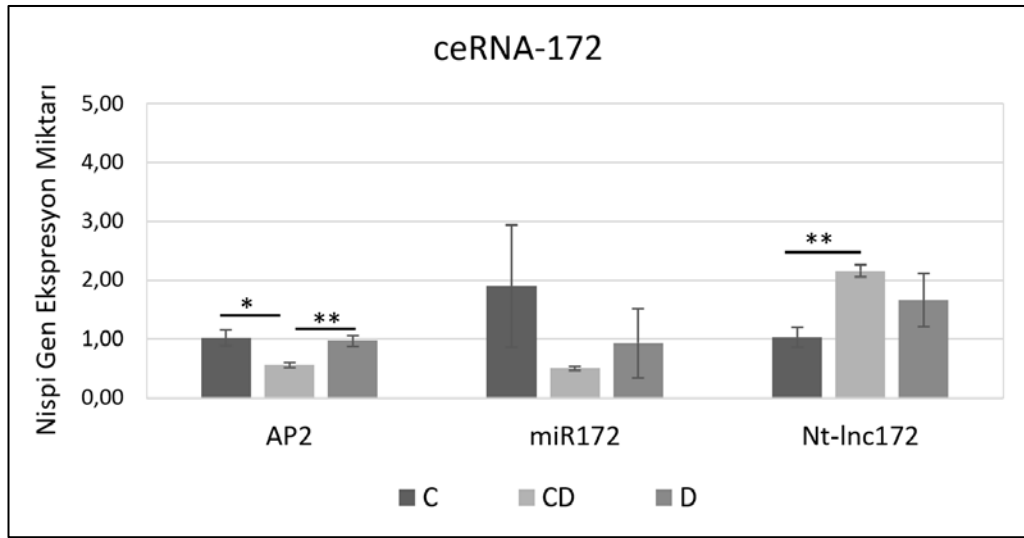
Şekil 3.34: ceRNA-160 ağı (n=3, Student's T-test. *P<0.05, **P<0.01).

ceRNA-168'in qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri ölçülerek Şekil 3.35'te gruplar arasındaki değişimleri gösterilmiştir. RD22 ekspresyon seviyelerinde D grubunda kontrole göre 2.7 kat artış gerçekleşmiştir ve istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmuştur (P<0.05). D grubundaki RD22 ekspresyon miktarı CD grubuna göre 4.3 kat artmıştır ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmaktadır (P<0.01). Kuraklığa alıştırılmamış (CD) grupta miR168 ekspresyon seviyesi kontrole göre 3.4 kat istatistiksel anlamda önemli derecede artmıştır (P<0.05). Kuraklığa alışmış (D) grupta miR168 ekspresyon seviyesi 2.2 kat artmıştır ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmaktadır (p<0.05). lnc168 seviyeleri CD ve D grubunda kontrole göre artmıştır fakat istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (P>0.05).



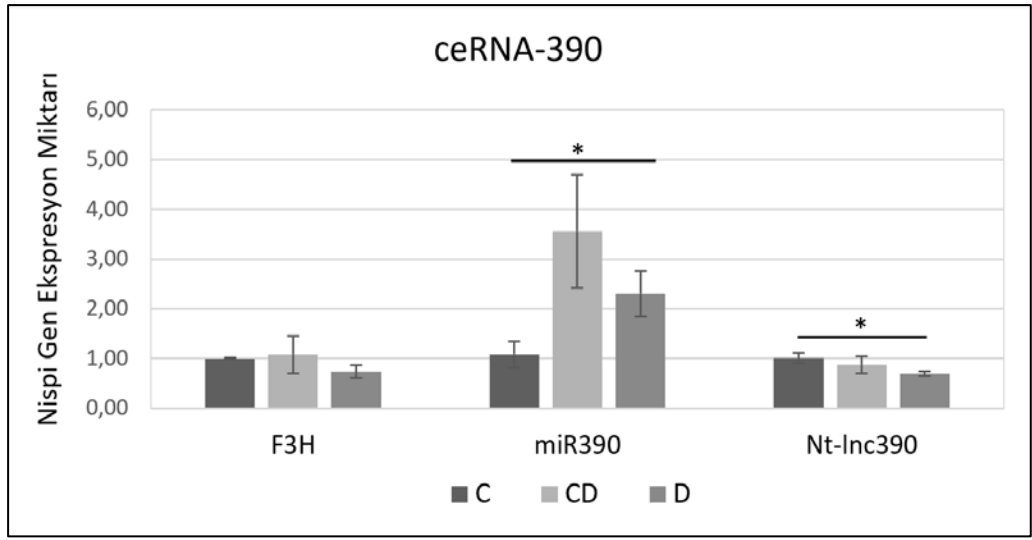
Şekil 3.35: ceRNA-168 ağı (n=3, Student's T-test, *P<0.05, **P<0.01).

ceRNA-172'nin qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri ölçülerek Şekil 3.36'da gruplar arasındaki değişimleri gösterilmiştir. AP2 ekspresyon seviyelerinde CD grubunda kontrole göre 1.8 kat, D grubuna göre 1.7 kat azalma meydana gelmiştir ve istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmuştur ($P < 0.05$). CD ve D gruplarında miR172 ekspresyon kontrole göre artış gerçekleşmemiş ve istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. ($P > 0.05$). D grubunda AP2 ekspresyon miktarı ise kontrole göre aynı kalmış ve istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). lnc172 seviyeleri CD grubunda kontrole göre 2.1 kat artmıştır ve istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur ($P < 0.01$). CD grubunda lnc168 ekspresyon miktarı ile D grubu lnc168 arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$). D grubu lnc168'de kontrol lnc168'e göre artış gözlemlenmiştir fakat istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmamıştır ($P > 0.05$).



Şekil 3.36: ceRNA-172 ağı (n=3, Student's T-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$).

ceRNA-390'nın qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri ölçülerek Şekil 3.37'de gruplar arasındaki değişimleri gösterilmiştir. F3H ekspresyon seviyelerinde CD ve D grubunda kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır ($P>0.05$). D grubunda miR390 ekspresyonu kontrole göre 2.1 kat istatistiksel olarak önemli derecede artış göstermiştir ($P<0.05$). CD grubunda miR390 ekspresyonu kontrole göre artış gerçekleşmiş, fakat, istatistiksel önemli bir fark oluşmamıştır ($P>0.05$). lnc390 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, D grubu kontrole göre 1.4 kat azalmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($P<0.05$).



Şekil 3.37: ceRNA-390 ağı (n=3, Student's T-test, * $P<0.05$, $P<0.01$).

4.TARTIŞMA

Dünya genelinde iklim şartlarının hızlı değişimi, küresel ısınma, nüfus artışı, tarımda yanlış su kullanımı, geri dönüşüme kazandırılmayan ve su kaynaklarını kirleten sanayi suları gibi birçok faktörün etkisiyle küresel çapta bitkisel üretim kuraklık stresi tehdidi ile yüz yüzedir. Bitkiler, kuraklık stresi ile başa çıkmak için fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal seviyede düzenlemeler yaparlar. Örneğin stomaların kapanması, fotosentez hızının azalması, reaktif oksijen türlerinin artması, antioksidan enzimlerin artması, erken çiçeklenme gibi tepkiler bitki tarafından üretilir [Marchin et al., 2020].

Kuraklığa alıştırma uygulama maliyetinin düşük olması, kolay uygulanabilir olması sebebiyle bitkilerin kuraklığa dayanıklı hale gelmesi için önemli bir uygulamadır [Günay vd., 2022]. Bu tez çalışmasında *Nicotiana tabacum* bitkileri üzerinde kuraklığa alıştırma yapılarak, kuraklığa alıştırılmamış bitki ve kontrole göre karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

Kuraklık stresinin klorofil ve karotenoid miktarını olumsuz olarak etkilediği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir [Efeoğlu vd., 2009]. Klorofil ve karotenoid içeriğindeki azalma, kuraklık stresinden kaynaklı stomaların kapanmasıyla birlikte hücredeki karbon miktarının azalması ile ilişkilidir [Baker et al., 2004]. Bu tez çalışmasında uygulanan kuraklık stresi sonucunda yapraklarda toplam klorofil miktarında azalma gerçekleşmiştir. Kuraklık stresine alıştırılan grubun alıştırılmayan gruba göre klorofil a % 0.63, klorofil b % 27.59 ve karotenoid % 10.95 daha fazla bulunarak istatistiksel açıdan bir fark oluşturmamıştır. Önemli bir fark oluşmamasının nedeni kuraklığa alıştırma sırasında gelişmekte olan üst yapraklardaki fotosentez hızında azalma meydana gelmesi ve kuraklık stresi altında oluşan ROS'ların fotosentez mekanizmasında hasara yol açmasından kaynaklanmış olabilir.

Kuraklık stresinin bitkiye fizyolojik olarak bir etkisi bağıl su içeriğinin (RWC) azalmaya sebep olmasıdır. RWC bitki tarafından emilen su miktarı ve terleme ile kaybedilen su miktarı arasındaki dengeyi göstermektedir [Kamanga et al., 2018]. Yaprak dokusundaki su miktarı yaprağın büyüme evrelerinde fazla, yaşlanma ve kuru madde birikimi ile de azaldığı bulunmuştur. *A. thaliana* bitkisinde birden fazla kuraklık stresi uygulayarak kuraklık hafızası oluşturulmuş bitkilerin, hiç kuraklık stresine maruz kalmayan bitkiye göre daha fazla yaprak bağıl su içeriğine (RWC) sahip oldukları gösterilmiştir [Ding et al., 2012]. Bitki gelişiminin su miktarı eksikliğinde

gerilediği ve yaprak yüzey alanında ilerleyen kuraklık stresinde azaldığı bulunmuştur [Campo et al., 2002]. Kuraklığa alıştırmamanın nispi su miktarındaki etkisi soya fasulyeleri üzerinde araştırılarak kuraklığa alıştırmalı ve stres hafızasına sahip olan grupta, kuraklığa alıştırılmamış gruba göre daha yüksek bağıl su içeriğine (RWC) sahip olduğu gözlemlenmiştir [Sintaha et al., 2022]. Buğday fidelerine de uygulanan kuraklığa alıştırma metodunun sonuçlarında da kuraklığa alıştırılan buğday fidelerinin bağıl su içeriği, alıştırılma yapılmamış gruba göre daha fazla miktarına sahiptir [Wang et al., 2015]. Benzer şekilde bu tez çalışmasında diğer araştırmacıların elde ettiği bulgular ile tutarlılık göstererek kuraklık stresi uygulanan CD ve D gruplarının nispi su miktarı kontrole göre sırasıyla % 49.4 ve % 34.1 daha azdır. Bu da bitkilere uygulanan kuraklığın bir göstergesini sunmaktadır. RWC değerleri kuraklığa alıştırılan grupta (D), alıştırılmayan gruba (CD) göre % 30 daha fazla nispi su miktarına sahip olarak kuraklığa alıştırmamanın kuraklık stresini hafiflettiğinin bir göstergesi olmuştur.

Kuraklık sonrası rozet alanı ölçümleri incelendiğinde D grubunun CD'ye göre rozet alanı % 15 daha büyük olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0.01$). Burada kuraklık hafızasına sahip olan kuraklığa alışmış (D) grubun karşılaştığı kuraklık stresini daha iyi tolere edebildiği görülmektedir. Rozet alanı ölçümü sayesinde yapraklardaki solma dereceleri karşılaştırılmaktadır. Deney sonucunda D grubunun rozet alanı daha büyük olduğu için yapraklardaki solma daha CD grubuna göre daha az olmuştur. Literatür çalışmaları incelendiğinde mısır bitkisinde kuraklığa alıştırma uygulamasının yaprak alanını kuraklığa alışmamış gruba göre daha fazla olduğu görülmüştür [Ru et al., 2022].

Kuraklık stresinde bitkiler kuraklık kaçış olarak bilinen bir tepki gerçekleştirerek çiçeklenme sürecini hızlandırırlar. Literatürde kuraklık stresi uygulanan bitkilerin, normal şartlarda gelişen kontrollerine göre daha erken çiçeklendiği kaydedildi [Franks 2011], [Kazan et al., 2016]. Çiçeklenme süreleri kaydedilen grupların sonuçları incelendiğinde literatür ile aynı sonuçları verdiği gözlemlendi. Kuraklık stresi etkilerini daha çok hisseden kuraklığa alıştırılmamış grup kuraklıktan kaçış tepkisi göstererek kontrol grubuna göre 12 örneğin 6 tanesi daha önce çiçek açmış ve kuraklığa alıştırılan gruba göre dört gün daha önce tüm bitkiler çiçek açmıştır. Gövde uzunlukları incelendiğinde D grubun ilk ölçümde gövde uzunluğu CD'ye % 33 daha kısa iken, çiçeklenme zamanındaki ölçümlerde % 7.2 daha uzun olmuştur. Kuraklık stresi CD grubunu daha çok etkileyerek gelişimini yavaşlatmıştır.

Reaktif oksijen türleri kuraklık stresinin bitkideki önemli bir biyokimyasal tepki göstergesidir. Normal şartlarda da hücre içerisinde reaktif oksijen türleri üretilse de kuraklık stresi gibi stresler altında bitkide normalden çok daha fazla düzeyde üretilmektedir [Badawi et al., 2004]. Kışlık buğdayda yapılan kuraklığa alıştırmaya çalışması sonrasında kuraklığa alıştırılmış ve alıştırılmamış gruplardaki antioksidan enzim miktarları incelendiğinde daha önceden kuraklık stresi yaşamış buğday grubunun SOD, APX, GR, CAT aktiviteleri ilk kez kuraklık stresine maruz kalan gruba göre daha yüksek oldukları gözlenmiştir [Wang et al., 2019]. Çok yıllık bir bitki olan *Alopecurus pratensis* ile yapılan kuraklığa alıştırma çalışmaları sonucunda kuraklığa alıştırılan grubun antioksidan enzim seviyelerinin kuraklığa alıştırılmayan gruba göre çok yüksek olduğu gösterilmiştir [Lukić et al., 2020]. Benzer şekilde, bu tez çalışmasında kuraklık alıştırılması yapılan grubun antioksidan enzim seviyeleri kuraklığa alıştırılma yapılmayan gruba göre artmıştır. Özellikle, D grubunda SOD enzim miktarı % 468 artmıştır ve istatistiksel olarak önemli fark oluşmuştur ($P < 0.01$). Bunun sebeplerinden SOD'ın tekli oksijeni hidrojen peroksite dönüştürdüğü için ROS savunmasında öncü olarak düşünülmektedir [Das et al., 2014]. İyileşme periyodunun ardından tekrardan ölçülen enzim aktivitesi sonuçlarında SOD, POD, APX ve GR enzim aktivitelerinde kontrole kıyasla D ve CD grupları enzim aktiviteleri benzerlik göstererek istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmamıştır. İyileşme periyodunun ardından bitkilerdeki su stresinin ortadan kaybolması ile reaktif oksijen türlerindeki azalmalar sonucunda antioksidan enzim miktarlarında azalma gerçekleşmiştir.

ceRNA (rekabet eden endojen RNA), paylaşılan mikroRNA'lar (miRNA'lar) için rekabet ederek gen ekspresyonunu düzenleyen, kodlayıcı olmayan bir RNA türüdür. miRNA'lar, haberci RNA'lara (mRNA'lar) bağlanabilen ve bunların proteinlere çevrilmesini engelleyerek gen ekspresyonunda bir azalmaya yol açabilen küçük RNA molekülleridir. ceRNA'lar, hedef mRNA'larda bulunanlara benzer miRNA yanıt elemanları (MRE'ler) içerir. MRE'leri aracılığıyla miRNA'lara bağlanarak, ceRNA'lar miRNA'ları etkili bir şekilde "süngerleyebilir" ve bunların hedef mRNA'lara bağlanmasını engelleyerek hedef mRNA'ların daha yüksek seviyelerde ifade edilmesine izin verebilir.

lncRNA'ların miRNA'lar için endojen hedef mimikleri (eTM'ler) olarak tanımlanan ilk lncRNA miR399 ile eşleşen IPS1'dir. Arabidopsis'te yapılan çalışmada IPS1 ve mRNA miR399'a bağlanmak için rekabet ettikleri bulunmuştur. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde kuraklık stresi için kritik olan genlerin

ekspresyonunu düzenleyerek bitkinin kuraklık stresi toleransını pozitif olarak düzenlediği bulunmuştur [Qin et al., 2017]. Bu tez çalışmasında dört adet ceRNA ağı tanımlanmıştır. ceRNA ağları, mRNA-miRNA ve aynı miRNA'ya hibridize olan en iyi lncRNA çiftleri arasında en iyi olası hibridizasyon yapmış olan ve en küçük minimum serbest enerjiye sahip olan çiftler seçilerek tanımlandı. Bu sayede birbirlerine tamamlayıcılık düzeyleri fazla olan mRNA, miRNA ve lncRNA'lar seçildi. Tanımlanan ceRNA ağlarının qRT-PCR ile ekspresyon seviyeleri incelendi.

Fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPC), hem monokot hem de dikot bitki türlerinde ve bazı bakterilerde bulunan önemli bir enzimdir. PEPC, karbonlu oksaloasetat oluşturmak için fosfoenolpiruvata (PEP) karbondioksitin eklenmesini katalize eder ve böylece krebs döngüsünde karbon akışını düzenler. Kuraklık stresi, PEPC aktivitesini etkileyerek, potansiyel olarak CO² fiksasyonunu artırmak ve su stresi altında trikarboksilik asit (TCA) döngüsünü sürdürmek için, kuraklık stresine yanıt olarak PEPC aktivitesi artırılabilir [Sharma and Malik, 1994]. Pamuk ve *Nicotiana tabacum*'da yapılan kuraklık çalışmalarında PEPC'nin aktivitelerinde artış gerçekleştiği bildirilmiştir [Hýsková et al., 2014], [Wei et al., 2022]. Literatürde miR160 ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, kuraklık stresinde önemli rolü olan ARF gen ailesini hedeflediği bulunmuştur [Kai et al., 2022]. ceRNA-160 ağını incelediğimizde literatüre paralel olarak PEPC seviyesinin arttığı bulunmuştur. Isı haritası incelendiğinde PEPC'nin uzun süreli kuraklık stresinde arttığı gösterilmiştir (Şekil 3.22). Bu tez çalışmasında uygulanan kuraklık stresi sonucunda incelenen veri seti ile aynı şekilde bir ekspresyon profili göstermiştir. D ve CD gruplarında sırasıyla PEPC ekspresyon miktarı kontrole göre 2.5 ve 2.6 kat artış göstermiştir. Bu sonuç her iki grubun kuraklık stresi yaşadığını ve kuraklık stresi ile ilişkili PEPC genin ekspresyon seviyesinde artış gerçekleştiğini göstermektedir. CD grubunda kontrole göre miR160'ın ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir. D grubu incelendiğinde miR160'ın hedefi olan PEPC genindeki artış, lnc160'ın miR160'a bağlanarak miRNA hedef mimikleri olarak rol oynamış olabileceğine işaret etmektedir. Bu sayede kuraklığa toleransta etkili olan PEPC aktivitesinde artış gerçekleşmiş olabilir.

ceRNA-168 ağında bulunan RD22, bitkilerde su stresine tepki olarak aktif olan ve kuraklığa oldukça duyarlı olduğu iyi bilinen bir genidir. RD22 geninin uyarılmasının ABA aracılık etmektedir [Shinozaki et al., 2007]. miR168, bitki büyümesi ve gelişiminin düzenlenmesinde yer alan bir miRNA'dır. Literatürde bilinen hedef geni ise AGO1'dir. Yapılan çalışmalar sonucunda *Arabidopsis thaliana*'da kuraklık

stresinde miR168 yukarı regüle edildiği gösterilmiştir. ceRNA-168 ağı incelendiğinde CD grubunda RD22 geninin ekspresyon seviyesinde D grubuna göre istatistiksel anlamda önemli olarak az ifade edilmiştir ($p<0.01$.) RD22 genindeki bu farklılık miR168'in kuraklık stresi ile ekspresyon seviyesinin artmasına, hedeflediği RD22 genini inhibe etmesine neden olmuştur ve ilk defa bu tez çalışmasında miR168'in RD22 genini hedeflediği gösterilmiştir. Aynı şekilde miR168 hedefi lnc168 ise miR168'e hedef mimik olarak rol oynamamıştır. D grubu kuraklığa alıştırılarak kuraklık stresinin etkilerini daha az hissettiğinden dolayı miR168 ekspresyonunda çok fazla artışa sebep olmamıştır. Isı haritası incelendiğinde RD22 geninin *Nicotiana tabacum*'da artan kuraklık stresi ile paralel olarak arttığı bulunmuştur (Şekil 3.22). CD grubunda kuraklık stresine rağmen artmamasının arkasında miR168'in hedef mRNA'nın degradasyonuna sebep olması sonucu gerçekleşebilir [Ferdous et al., 2015].

ceRNA-172 ağında bulunan AP2/ERF (APETALA2/etilen tepki faktörü), kuraklık stresi de dahil olmak üzere bitki stres tepkilerinin düzenlenmesinde yer alan bir transkripsiyon faktörleri ailesidir. AP2/ERF proteinleri, bitki kuraklığı stres tepkisinde yer alan genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Bu genlerin promotor bölgelerine bağlanırlar ve ekspresyonlarını aktive ederler veya baskırlar [Chen et al., 2022]. miR172 strese duyarlı genleri hedefleyerek bitki kuraklık toleransını düzenlemede rol oynayan miRNA ailesidir. miR172'nin pirinç, mısır ve *Arabidopsis thaliana*'da kuraklık stresi toleransını artırmada rol oynadığı gösterilmiştir [Kong et al., 2010]. *Nicotiana tabacum*'da yapılan kuraklık çalışması sonrasında miR172'nin aşağı regüle olduğu bulunmuştur [Zhou et al., 2010]. Literatürde yapılan çalışmalar sonucunda miR172'nin AP2'nin mRNA bölgesi ile tamamlayıcılığa sahip olduğu gösterilmiştir. miR172'nin, AP2'yi çiçek gelişimi sırasında baskıladığı gösterilmiştir [Chen 2014]. *Prunus mume*'de yapılan çalışmalar lncRNA XR_514690.2, ppe-miR172d'yi aşağı regüle ettiği ve çiçek gelişimi ile ilgili AP2'yi (APETALA2) yukarı regüle ettiği gösterilmiştir [Wu et al., 2019].

ceRNA ağı incelendiğinde literatüre göre kuraklık stresinde artması beklenen AP2 geninde CD grubunda kontrole göre 1.8 kat azalma gerçekleşmiştir. CD grubundaki miR172 hedef AP2 genine bağlanmasından dolayı, AP2 ekspresyon seviyesinde azalma gerçekleştiği düşünülmektedir. lnc172 ekspresyon seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı CD grubunda artış gözlemlenmiştir ($P<0.05$). lnc172'nin kuraklık stresi sonucunda arttığı söylenebilir ve kuraklık stresinde hücre içerisinde

düzenleyici olarak rol oynadığı söylenebilir. Biyoinformatik olarak tanımlanan ceRNA-172 ağının qPCR sonuçları incelendiğinde lnc172'nin miR172'ye bağlanarak miR172'nin ekspresyon seviyelerini azaltmış olabilir. Bu durumda miR172'nin hedeflediği AP2'nin ekspresyon seviyelerinde artış gerçekleşmemesinin sebebi ise AP2'nin kuraklık stresinde rol oynayan diğer genler ile etkileşime girmesinden kaynaklı olabilir. Literatürde miR172'nin çiçeklenme sırasında AP2 geninin ifadesini azalttığı gösterilmiştir ve kuraklık stresinde bitkiler erken çiçeklenmeye giderler. Bu durum, bitkilerin kuraklık stresi sırasında erken çiçeklenmeye gitmesini açıklayabilir.

Flavanon-3-Hidroksilaz (F3H), bitki sekonder metabolizmasında rol oynayan ve flavonoidlerin biyosentezinde yer alan bir enzimdir. Flavonoidler, bitkilerde pigmentler, UV koruyucular ve strese tepki modülatörleri gibi çeşitli işlevlere sahip bir grup fitokimyasaldır. Kuraklık stresine yanıt olarak, F3H gen ekspresyonunun artarak flavanonların flavonlara dönüşmesine yol açtığı gösterilmiştir [Samanta et al., 2011]. Bu flavonların, su kullanım verimliliğini iyileştirerek ve oksidatif hasarı azaltarak kuraklık stresine karşı bitki toleransını arttırdığı gösterilmiştir. Böylece, F3H ve ürettiği flavonoidler, bitkilerin kuraklık stresine verdiği tepkilerde rol oynayarak bitkilerin sınırlı su koşullarına uyum sağlamasına ve hayatta kalmasına yardımcı olur [Samanta et al., 2011]. *Nicotiana tabacum*'da aşırı eksprese edilen F3H geninin kuraklık stresi toleransını artırdığı, transgenik hatlardaki yapraklarda antioksidan enzim miktarında kontrole göre artış gözlemlenmiştir [Song et al., 2016]. Çöl bitkisi *Reaumuria Soongorica*'da kuraklık stresi altında F3H gen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Isı haritası incelendiğinde F3H geninin erken kuraklık stresi tepkisi olarak kuraklığın birinci saatinde en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşarak ilerleyen stres süresi boyunca azalmıştır (Şekil 3.22.) miR390 kök gelişimi, yaprak gelişimi ve çiçeklenme sürelerinde etkiye sahiptir. Börülceye uygulanan kuraklık stresi sonrasında miR390'nın yukarı ekspresyonu olduğu gözlemlenmiştir. ceRNA-390 ağında her iki grupta da F3H geninin ekspresyon seviyelerinde önemli bir değişim gerçekleşmemiştir. Literatüre bakıldığında *Nicotiana tabacum* ve diğer türlerde F3H geninde artış gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında literatürden farklı olarak ekspresyon seviyesinde değişim gerçekleşmemesinin nedeni ekspresyon seviyesinde artış gerçekleşen miR390'nın hedef mRNA'ya bağlanarak F3H genini baskılaması sonucunda olduğu görülmektedir. ceRNA-390 ağında lnc390'ın, miR390'na hedef taklit yaparak mRNA baskılanmasının önüne geçilemediği görülmektedir. Burada,

lnc390 kuraklık stresi ile indüklenmemesi, F3H'in farklı bir düzenleme mekanizması tarafından etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

5. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kuraklık stresi altında kuraklığa alıştırmamanın etkileri ve miRNA-lncRNA-mRNA molekülleri arasında meydana gelen rekabetçi endojen düzenleme ağları (ceRNA)'nın kuraklığa alıştırmama sırasında rolleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, ceRNA-160, ceRNA-168, ceRNA-172 ve ceRNA-390 ağlarında yer alan miRNA-lncRNA-mRNA'ların kuraklığa cevap olarak ifadelerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Bu bağlamda, ceRNA ağlarındaki rollerin daha iyi anlaşılması için mRNA, miRNA ve lncRNA'ların ekspresyonunu artırarak ya da susturarak elde edilecek mutantlar ile yapılacak kuraklık deneyleri yapılmalıdır. Böylece, kuraklığa toleranslı bitki etmek için yapılacak çalışmalara ışık tutulacaktır.

Kuraklığa alıştırmamanın kuraklık stresini hafiflettiği fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal analizler ile gruplar incelenerek gösterilmeye çalışılmıştır. Kuraklığa alıştırmama uygulaması farklı periyot ve sıklıklar ile uygulanarak bitki için en verimli ve en iyi bir şekilde kuraklık stresini atlatmasını sağlayan şekilde prosedür geliştirilebilir. Bu uygulama zirai bitkilerde uygulanarak, kuraklık stresi sırasında çiçeklenme miktarının korunmasını ve ürün verimliliği incelenebilir. Kuraklığa alıştırmamanın kuraklık hafızası oluşturması üzerindeki etkileri stres ile gelecek nesiller üzerindeki etkileri incelenerek aydınlatılabilir.

KAYNAKLAR

- Abid M., Tian Z., Ata-Ul-Karim, S. T., Liu, Y., Cui, Y., Zahoor, R., Dai, T., (2016), "Improved tolerance to post-anthesis drought stress by pre-drought priming at vegetative stages in drought-tolerant and-sensitive wheat cultivars" *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 218-227.
- Aebi H. (1984), "Catalase in vitro", *Methods in enzymology*, 105, 121–126.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. Lipman D.J. (1990), "Basic local alignment search tool", *Journal of molecular biology*, 215:403-410.
- Alves L., Jr Niemeier S., Hauenschild A., Rehmsmeier M., Merkle T. (2009), "Comprehensive prediction of novel microRNA targets in *Arabidopsis thaliana*", *Nucleic acids research*, 37(12), 4010–4021.
- Anjum N. A., Sharma P., Gill S. S., Hasanuzzaman M., Khan E. A., Kachhap K., et al. Tuteja N. (2016), "Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants", *Environmental science and pollution research*, 23(19), 19002-19029.
- Backhaus S., Kreyling J., Grant, K., Beierkuhnlein C., Walter J., Jentsch A. (2014), "Recurrent mild drought events increase resistance toward extreme drought stress", *Ecosystems*, 17(6), 1068-1081.
- Badawi G. H., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kawano N., Tanaka K., Tanaka K., (2004), "Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts", *Plant Science*, 166(4), 919-928.
- Baker N. R., Rosenqvist E., (2004), "Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities", *Journal of experimental botany*, 55(403), 1607-1621.
- Banowetza Gary M., Dierksena Karen P., Azevedoa Mark D., Stout Richard (2004), "Microplate quantification of plant leaf superoxide dismutases", *Analytical Biochemistry* 332, 314–320.
- Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. (2016), "Plant adaptation to drought stress", *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-1554.
- Berlowitz I., Torres E. G., Walt H., Wolf U., Maake C., Martin-Soelch C. (2020), "'Tobacco Is the Chief Medicinal Plant in My Work": Therapeutic Uses of Tobacco in Peruvian Amazonian Medicine Exemplified by the Work of a Maestro Tabaquero", *Frontiers in pharmacology*, 11, 594591.
- Bradford M. M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.

Campo M., Ruiz C., Lissarrague J. R., (2002), "Effect of water stress on leaf area development, photosynthesis, and productivity in Chardonnay and Airén grapevines", *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(2), 138-143.

Caverzan A., Passaia G., Rosa S. B., Ribeiro C. W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. (2012), "Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection", *Genetics and molecular biology*, 35(4 (suppl)), 1011–1019.

Cebeci İ., Demirkıran O., Doğan O., Karagöz Sezer K., Öztürk Ö., Elbaşı F., (2019), "Türkiye'nin İller Bazında Kuraklık Değerlendirmesi", (*Toprak Su Dergisi*).

Chen K., Tang W., Zhou Y., Chen J., Xu Z., Ma R., Dong Y., Ma Y., Chen M. (2022), "AP2/ERF transcription factor GmDREB1 confers drought tolerance in transgenic soybean by interacting with GmERFs", *Plant Physiology and Biochemistry*, 170, 287-295.

Chen X. (2004), "A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development", *Science*, 303(5666), 2022-2025.

Chen D., Wang S., Cao B., Cao D., Leng G., Li H., Yin L., Shan L., Deng X, (2016), "Genotypic Variation in Growth and Physiological Response to Drought Stress and Re-Watering Reveals the Critical Role of Recovery in Drought Adaptation in Maize Seedlings", *Frontiers in plant science*, 6, 1241.

Chen J., Zhong Y., Qi X. (2021), "LncRNA TCONS_00021861 is functionally associated with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) via competing endogenous RNA regulation", *BMC Plant Biology*, 21(1), 1-12.

Chen S. X., Schopfer P. (1999), "Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase", *European journal of biochemistry*, 260(3), 726-735.

Das K., Roychoudhury A. (2014), "Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants", *Frontiers in environmental science*, 2, 53.

Ding Y., Michael F., Zoya A., "Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in Arabidopsis", *Nature communications* 3.1 (2012): 1-9.

Ding Y., Virilouvet L., Liu N., Riethoven J. J., Fromm M., Avramova Z. (2014), "Dehydration stress memory genes of Zea mays; comparison with *Arabidopsis thaliana*", *BMC plant biology*, 14, 141.

Dong H., Lei J., Ding L., Wen Y., Ju H., Zhang X. (2013), "MicroRNA: function, detection, and bioanalysis", *Chemical reviews*, 113(8), 6207–6233.

- Edwards K. D., Fernandez-Pozo N., Drake-Stowe K., Humphry M., Evans A. D., Bombarely A., Allen F., Hurst R., White B., Kernodle S. P., Bromley J. R., Sanchez-Tamburrino J. P., Lewis R. S., Mueller L. A. (2017), “A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency”, *BMC genomics*, 18(1), 448.
- Efeoğlu B., Ekmekçi Y., Çiçek N., (2009), “Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery” *South African journal of botany*, 75(1), 34-42.
- Fang Y., Xiong L. (2015), “General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants”. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 72(4), 673–689.
- Ferdous J., Hussain S. S., Sih B. J. (2015), “Role of micro RNA s in plant drought tolerance”, *Plant biotechnology journal*, 13(3), 293-305.
- Ferlita A., Battaglia R., Andronico F., Caruso S., Cianci A., Purrello M., Pietro, C. D. (2018), “Non-Coding RNAs in Endometrial Physiopathology”, *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2120.
- Filipowicz W., Bhattacharyya S. N., Sonenberg N. (2008), “Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?”, *Nature reviews. Genetics*, 9(2), 102–114.
- Franco-Zorrilla J. M., Valli A., Todesco M., Mateos I., Puga M. I., Rubio-Somoza I., Levya A., Weigel D., Garcia J. A., Paz-Ares, J. (2007), “Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity”, *Nature genetics*, 39(8), 1033-1037.
- Franks S. J., (2011), “Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*”, *The New phytologist*, 190(1), 249–257.
- Gill S. S., Anjum N. A., Hasanuzzaman M., Gill, R., Trivedi D. K., Ahmad I., Pereira E., Tuteja N. (2013), “Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations”, *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 70, 204–212.
- Günay E., Yıldız M. T., Okan A., (2022), “Effects of Different Priming Treatments on Germination and Seedling Growth of Wheat under Drought Stress”, *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10(2), 303-311.
- H. Anastasov (2010) “Influence of Oxyfluorfen on Some Anatomic Indices in the Leaves of Virginia Tobacco Plant (*Nicotiana tabacum* L.)”, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24:sup1, 33-35.
- Habibi G. (2014), “Hydrogen peroxide (H₂O₂) generation, scavenging and signaling in plants”, In *Oxidative damage to plants* (pp. 557-584). Academic Press.

- Halliwell B. (2006), “Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life”, *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H., (2001), “A large family of class III plant peroxidases”, *Plant & cell physiology*, 42(5), 462–468.
- Hýsková V. D., Miedzińska L., Dobrá J., Vankova R., Ryšlavá H., (2014), “Phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme, and pyruvate, phosphate dikinase are involved in the acclimation of *Nicotiana tabacum* L. to drought stress”, *Journal of Plant Physiology*, 171(5), 19-25.
- Jacques C., Salon C., Barnard R. L., Vernoud V., Prudent M., (2021), “Drought Stress Memory at the Plant Cycle Level: A Review”, *Plants*, 10(9), 1873.
- Jiang N., Cui J., Shi Y., Yang G., Zhou X., Hou, X., Meng J., Luan, Y., (2019), “Tomato lncRNA23468 functions as a competing endogenous RNA to modulate NBS-LRR genes by decoying miR482b in the tomato-*Phytophthora infestans* interaction”, *Horticulture research*, 6.
- Jin J., Lu P., Xu Y., Li Z., Yu S., Liu J., Wang H., Chua N. H., Cao, P., (2021), “PLncDB V2.0: a comprehensive encyclopedia of plant long noncoding RNAs”, *Nucleic acids research*, 49(D1), D1489–D1495.
- Jingwen W., Hong L., (2012), “Measurement and analysis of plant leaf area based on image processing”, In *2012 International Symposium on Information Technologies in Medicine and Education (Vol. 2, pp. 1070-1074)*. IEEE.
- Kai H., Yun. W., Zhanpin Z., Yu W., Ruibing C., Lei, Z. (2022), “miR160: An indispensable regulator in plant”, *Frontiers in Plant Science*, 716.
- Kamanga R.M., Mbega E.R., Ndakidemi, P., (2018), “Drought Tolerance Mechanisms in Plants: Physiological Responses Associated with Water Deficit Stress in *Solanum lycopersicum*”, *Advances in Crop Science and Technology*, 6, 1-8.
- Kazan K., Lyons R. (2016), “The link between flowering time and stress tolerance”, *Journal of experimental botany*, 67(1), 47–60.
- Khan M. S., Khan M. A., Ahmad D. (2016). “Assessing Utilization and Environmental Risks of Important Genes in Plant Abiotic Stress Tolerance”, *Frontiers in plant science*, 7, 792.
- Khan R., Ma X., Shah S., Wu X., Shaheen A., Xiao L., Wu Y., Wang, S., (2020), “Drought-hardening improves drought tolerance in *Nicotiana tabacum* at physiological, biochemical, and molecular levels”, *BMC plant biology*, 20(1), 486.
- Kireççi O.A. (2018). “Bitkilerde Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar”. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*. 7(2): 473-483.

Kong Y., Elling A. A., Chen B., Deng X. (2010), “Differential expression of microRNAs in maize inbred and hybrid lines during salt and drought stress”, *American Journal of Plant Sciences*, 1(02), 69.

Kono Y. (1978), “Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase”, *Archives of biochemistry and biophysics*, 186(1), 189–195.

Kooyers N. J. (2015), “The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations”, *Plant science*, 234, 155-162.

Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. (2019), “miRBase: from microRNA sequences to function”, *Nucleic acids research*, 47(D1), D155–D162.

Krüger J., Rehmsmeier M. (2006), “RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible”, *Nucleic acids research*, 34(Web Server issue), W451–W454.

Lämke J., Bäurle I. (2017), “Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants”, *Genome biology*, 18(1), 124.

Lichtenthaler H.K. and Buschmann C. (2001), “Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy”, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1: F4.3.1-F4.3.8.

Liu D., Mewalal R., Hu R., Tuskan G. A., Yang X. (2017), “New technologies accelerate the exploration of non-coding RNAs in horticultural plants”, *Horticulture research*, 4, 17031.

Love M. I., Huber W., Anders S. (2014), “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2”, *Genome biology*, 15(12), 1-21.

Lukić N., Kukavica B., Davidović-Plavšić B., Hasanagić D., Walter, J. (2020), “Plant stress memory is linked to high levels of anti-oxidative enzymes over several weeks”, *Environmental and Experimental Botany*, 178, 104166.

Marchin R. M., Ossola A., Leishman M. R., Ellsworth D. S. (2020), “A Simple Method for Simulating Drought Effects on Plants”, *Frontiers in plant science*, 10, 1715.

Millar A. A., Waterhouse P. M. (2005), “Plant and animal microRNAs: similarities and differences”, *Functional & integrative genomics*, 5(3), 129–135.

Miller A. F. (2012). “Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights”. *FEBS letters*, 586(5), 585–595.

Mittler R. (2017), “ROS are good”, *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.

Nakano Y., Asada K. (1981), “Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts”, *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.

Noctor G., Veljovic-Jovanovic S. O. N. J. A., Driscoll S., Novitskaya L., Foyer C. H. (2002), “Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?”, *Annals of Botany*, 89(7), 841-850.

Osmolovskaya N., Shumilina J., Kim A., Didio A., Grishina T., Bilova T., Keltsieva O. A., Zhukov V., Tikhonovich I., Tarakhovskaya E., Frolov A., Wessjohann L. A. (2018), “Methodology of Drought Stress Research: Experimental Setup and Physiological Characterization”, *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4089.

Paramo L. A., Feregrino-Pérez A. A., Guevara R., Mendoza S., Esquivel K. (2020), “Nanoparticles in Agroindustry: Applications, Toxicity, Challenges, and Trends”, *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1654.

Qin T., Zhao H., Cui P., Albeshar N., Xiong L. (2017), “A nucleus-localized long non-coding RNA enhances drought and salt stress tolerance”, *Plant physiology*, 175(3), 1321-1336.

Quesada M. A., Tigier H. A., Bukova, M. J., Valpuesta V. (1990), “Purification of an anionic isoperoxidase from peach seeds and its immunological comparison with other anionic isoperoxidases”, *Physiologia plantarum*, 79(4), 623–628.

Ru C., Hu X., Chen D., Wang W., Song T. (2022), “Heat and drought priming induce tolerance to subsequent heat and drought stress by regulating leaf photosynthesis, root morphology, and antioxidant defense in maize seedlings”, *Environmental and Experimental Botany*, 202, 105010.

Ru C., Hu X., Chen D., Wang W., Song T. (2022), “Heat and drought priming induce tolerance to subsequent heat and drought stress by regulating leaf photosynthesis, root morphology, and antioxidant defense in maize seedlings”, *Environmental and Experimental Botany*.

Russell A., Rahman E. (2015), “Introduction: The Changing Landscape of Tobacco Use in Lowland South America. In E. Rahman (Eds.). *The Master Plant: Tobacco in Lowland South America* (pp. 1–24)”.: Bloomsbury Academic.

Samanta A., Das G., Das S. K. (2011), “Roles of flavonoids in plants”, *Carbon*, 100(6), 12-35.

Schmidt G. W., Delaney S. K. (2010), “Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress”, *Molecular genetics and genomics: MGG*, 283(3), 233–241.

Seleiman M. F., Al-Suhaibani N., Ali N., Akmal M., Alotaibi M., Refay Y., Dindaroglu T., Abdul-Wajid H. H., Battaglia M. L. (2021), “Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects”, *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(2), 259.

- Sharma P. N., Malik C. P., (1994), "Photosynthetic responses of groundnut to moisture stress", *Photosynthetica* (Czech Republic).
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002), "Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes", *Journal of experimental botany*, 53(372), 1305-1319.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007), "Gene networks involved in drought stress response and tolerance", *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
- Shulaev V., Cortes, D., Miller, G., Mittler R. (2008), "Metabolomics for plant stress response", *Physiologia plantarum*, 132(2), 199–208.
- Sies H., Jones D. P. (2020), "Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents", *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(7), 363–383.
- Sintaha M., Man C.-K., Yung W.-S., Duan S., Li M.-W., Lam H.-M. (2022), "Drought Stress Priming Improved the Drought Tolerance of Soybean", *Plants*, 11(21), 2954.
- Song X., Diao J., Ji J., Wang G., Guan C., Jin C., Wang Y. (2016), "Molecular cloning and identification of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Lycium chinense*, and its overexpression enhances drought stress in tobacco", *Plant physiology and biochemistry*, 98, 89-100.
- Spinoni J., Naumann G., Carrao H., Barbosa P. and Vogt J. (2014), "World drought frequency, duration, and severity for 1951–2010". *Int. J. Climatol.*, 34: 2792-2804.
- Tiryakioglu M., Eker S., Ozkutlu F., Husted S., Cakmak I. (2006). "Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 20, 181–189.
- 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, 12.
- Wang X., Mao Z., Zhang J., Hemat M., Huang M., Cai J., Jiang D., Zhou Q., Dai T., (2019), "Osmolyte accumulation plays important roles in the drought priming induced tolerance to post-anthesis drought stress in winter wheat (*Triticum aestivum* L.)", *Environmental and Experimental Botany*, 166, 103804.
- Wang X., Vignjevic M., Liu F., Jacobsen S., Jiang D., Wollenweber B. (2015), "Drought priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought and heat stresses occurring during grain filling in spring wheat", *Plant Growth Regulation*, 75(3), 677-687.

Wang Y., Branicky R., Noë A., Hekimi S. (2018), “Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling”, *The Journal of cell biology*, 217(6), 1915–1928.

Wang Z., Li G., Sun H., Ma L., Guo Y., Zhao Z., Gao H., Mei, L. (2018), “Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves”, *Biology open*, 7(11), bio035279.

Web 1, (2022), <https://sukhbioindia.wordpress.com/gallery/fig/>, (Erişim Tarihi: 18/06/2022).

Web 2, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE21408>, (Erişim Tarihi: 27/09/2022).

Wei Y., Li Z., Wedegaertner T. C., Jaconis S., Wan S., Zhao Z., Zhang, B. (2022), “Conservation and Divergence of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene Family in Cotton”, *Plants*, 11(11), 1482.

Wilhite D. A., Glantz M. H. (1985), “Understanding: the drought phenomenon: the role of definitions”, *Water international*, 10(3), 111-120.

Wu X., Shi T., Iqbal S., Zhang Y., Liu L., Gao Z, (2019), “Genome-wide discovery and characterization of flower development related long non-coding RNAs in *Prunus mume*”, *BMC plant biology*, 19(1), 1-17.

Zhai S. M., Gao Q., Xue H. W., Sui Z. H., Yue G. D., Yang A. F., Zhang J. R. (2012), “Overexpression of the phosphatidylinositol synthase gene from *Zea mays* in tobacco plants alters the membrane lipids composition and improves drought stress tolerance”, *Planta*, 235, 69-84.

Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., Chen, M. (2019), “Non-Coding RNAs and their Integrated Networks”, *Journal of integrative bioinformatics*, 16(3), 20190027.

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.

ÖZGEÇMİŞ

Elif MUMCU lisans eğitimini Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde 2020 yılında tamamlamıştır. 2020 yılında Doç. Dr. Fatma AYDINOĞLU danışmanlığında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.