

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MUTANT ÇELTİKLERDE (*Oryza sativa*) TUZLULUĞA TOLERANS
İLE İLGİLİ miRNA'LARIN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra İMECE
1302060034

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çimen ATAK

ARALIK 2021

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MUTANT ÇELTİKLERDE (*Oryza sativa*) TUZLULUĞA TOLERANS
İLE İLGİLİ miRNA'LARIN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Büşra İMECE
1302060034

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çimen ATAK
Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Özge ÇELİK
Doç. Dr. Sema ALİKAMANOĞLU
ARALIK 2021

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans tez çalışmalarında bilgi ve deneyimleriyle bana her zaman yön veren tecrübelerini benden esirgemeyen, her aşamada bana yol gösterici olan, akademik kişiliği, samimiyeti, iyi niyeti, çalışma prensipleri ve başarılarıyla bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman memnuniyet duyacağım Sayın değerli hocam Prof. Dr. Çimen ATAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim sırasında bana destek olan, beni tecrübeleri ile yönlendiren ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi. ALP AYAN'a, Arş. Gör. Sinan MERİÇ'e ve Arş. Gör. Tamer GÜMÜŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Pandemi dönemi içerisinde tez çalışmalarım için laboratuvar alt yapısından faydalanmamı sağlayan, çalışmalarımın gerçekleşmesi için beni destekleyen ve tez çalışmamı gerçekleştirmem için tüm imkanları sunan MedSanTek Laboratuvar Malzemeleri San. ve TİC. LTD. ŞTİ ailesine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana her zaman destek olan ve her anımda yanımda olan başta annem Gülsüm İMECE, babam Recep İMECE'ye ve sevgili kardeşim Akın İMECE'ye sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2021

Büşra İMECE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
SİMGE LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Çeltik (Oryza sativa L.)	3
2.2 Tuz Stresi ve Bitkilerin Tuz Stresine Verdikleri Cevaplar	5
2.2.1 Transkripsiyon Faktörleri	7
2.2.2 Hormonal Denge.....	7
2.2.3 İyon Homeostazı.....	9
2.2.4 Antioksidan Moleküller	10
2.2.5 Ozmoprotektanlar	11
2.3 miRNA Biyogenezi	12
2.4 Bitkilerde Tuzluluk Stresinde miRNA'larla Yapılan Çalışmalar	15
2.5 Çeltikte Tuz Stresi ile ilişkili miRNA'lar	25
2.5.1 miR156	25
2.5.1 miR159	29
2.5.2 miR169	33
2.5.3 miR393	37
2.5.4 miR398	41
2.5.5 miR820	44
3 METOT	47
3.1 Bitkilerin in-vivo Ortamda Yetiştirilmesi.....	47
3.2 RNA İzolasyonu	48
3.3 cDNA Sentezi.....	49
3.3.1 miRNA çalışması için cDNA sentezi	49
3.3.2 Gen ekspresyon çalışması için cDNA sentezi	50
3.4 Gradient PCR.....	50

3.5	Real-Time PCR Analizi.....	52
3.5.1	qRT-PZR ile miRNA İfadelerinin Gösterilmesi.....	52
3.5.2	Hedef Genlerin İfade Analizinin qRT-PZR ile Gösterilmesi.....	53
4	BULGULAR.....	56
4.1	Gradient PCR sonuçları.....	56
4.2	qRT-PZR ile miRNA İfadelerinin Gösterilmesi.....	56
4.3	Hedef Genlerin İfade Analizinin qRT-PZR ile Gösterilmesi.....	65
5	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	72
6	KAYNAKÇA.....	83



KISALTMALAR

FAO	: Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
ABA	: Absisik Asit
miRNA	: mikro RNA (küçük RNA molekülleri)
EC	: Elektriksel iletkenliği
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
TF	: Transkripsiyon Faktörü
SOS	: Sinyal iletimi
JA	: Jasmonik asit
IAA	: İndol asetik asit
GA	: Gibberellik asit
SA	: Salisilik asit
PA	: Fosfatidik asit
GR	: glutasyon reduktaz
DHAR	: Dehidroaskorbat redüktaz
MDHAR	: Monodehidroaskorbat redüktaz
GPOX	: Guaiakol peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
ASH	: Askorbik asit
GSH	: Glutasyon
CAT	: Katalaz
APX	: Askorbat peroksidaz
PEG	: Polietilen glikol
sAPX	: Stromal APX
tAPX	: Tilakoid membrana bağlı APX
mAPX	: Mikrobodimembrana bağlı APX
cAPX	: Sitozolik APX
mitAPX	: Mitokondriyal membrana bağlı APX
GR	: Glutasyon reduktaz

SOD	: Süperoksit dismutaz
POX	: Peroksidaz
AUX	: Oksin
UBC	: Ubikutin konjuge edici enzim
TSS	: transkripsiyon başlangıç bölgesi
ABRE	: Absisik aside duyarlı element
DRE	: Dehidrasyona duyarlı element
LR	: Lateral kök
UV	: Ultraviyole ışınları
UV-B	: Ultraviyole ışınları B
GOD	: Glukoz oksidaz
ncRNA	: Kodlama yapmayan RNA
lncRNA	: Uzun kodlama yapmayan RNA
siRNA	: Küçük enterferans yapan RNA
pri-miRNA	: öncül miRNA
pre-miRNA	: olgun miRNA
PK	: <i>Pokkali</i>
PB	: Pusa Basmati
DDR	: DNA hasar yanıtı
STTM	: Short Tandem Target Mimic
RNASeq	: RNA sekanslama
qRT-PCR	: Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tuz stresi altında rol oynayan miRNA'lar ve hedef aldıkları genler.	20
Tablo 2. Osmancık-97 çeltik çeşidi ve M-300-5 mutant hattına ait tohumların isimlendirilmesi	47
Tablo 3. miRNA çalışması için cDNA amplifikasyon koşullar	50
Tablo 4. cDNA PCR amplifikasyon koşulları	50
Tablo 5. miRNA'ların hedef aldıkları genlere ait belirlenen primer dizileri....	51
Tablo 6. Gradient PCR Protokolü.....	52
Tablo 7. qPCR Amplifikasyonu döngü sıcaklık, süre ve sayıları.....	53
Tablo 8. qPCR Amplifikasyonu döngü sıcaklık, süre ve sayıları.....	54
Tablo 9. Standart örneklerinin konsantrasyon değerleri.....	54
Tablo 10. 18SrRNA, mir-156a, mir-159a ve mir-169b miRNA gruplarından elde edilen Ct değerleri	60
Tablo 11. Osm-97-0 ve M-300-5-0 bitki grupları arasında belirlenen miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklar ile hedef gen bölgeleri ve hedef gen bölgelerinin bitkideki rolü	61
Tablo 12. Osm-97-0 ve Osm-97-150 bitki grupları arasında belirlenen miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklar ile hedef gen bölgeleri ve hedef gen bölgelerinin bitkideki rolü	63
Tablo 13. M-300-5-0 ve M-300-5-150 bitki grupları arasında belirlenen miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklar ile hedef gen bölgeleri ve hedef gen bölgelerinin bitkideki rolü	64
Tablo 14. UBG5, MYB ve CSD2 gen bölgelerinden elde edilen Ct değerleri.	67

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1994-2018 yılları arası Dünya genelinde çeltik üretim oranlarında ilk 10 ülke .	1
Şekil 2 Oryza sativa çiçek yapısı	4
Şekil 3. Oryza sativa spikelet yapısı	4
Şekil 4. Oryza sativa tohum yapısı	5
Şekil 5. Bitkilerde tuz stresi altında fitohormonların etkileri	8
Şekil 6. C.elegans ve mısırdaki miRNA biyogenezinin farklılıkları	13
Şekil 7. Bitki miRNA biyogenezini ve düzenlenme mekanizmaları	14
Şekil 8. Arabidopsis bitkisinin tuzluluk stresi altında miRNA'ların hedef aldığı genler	17
Şekil 9.Oryza coarctata bitkisinin tuzluluk stresi altında miRNA'ların hedef aldığı genler	18
Şekil 10. Oryza sativa'da tuz stresi altında etkili olan miRNA'lar ve etki ettikleri yolaklar	24
Şekil 11. miR156 ve SPL ilişkisi	26
Şekil 12. miR159 ve GAMYB ilişkisi	30
Şekil 13. Bitkilerde tuz toleransının transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlenmesini gösteren model.	33
Şekil 14. mir393'ün arpa bitkisinde kök gelişimi üzerine etkisi	38
Şekil 15. miR398'in bitkilerde normal ve oksidatif stres altındaki etkileri	42
Şekil 16. miR820'nin OsDRM üzerindeki etkileri.	45
Şekil 17. Osmancık-97 bitkisine ait kontrol ve 150mM NaCl stres uygulamasında yetişen çeltik bitkileri.	48
Şekil 18. M-300-5 mutant hattına ait kontrol ve 150mM NaCl stres uygulamasında yetişen çeltik bitkileri.	48
Şekil 19. Standart sapma grafiği	55
Şekil 20. Hedef gen ifadelerinin kontrol gen ifadesine göre değişimi.	55
Şekil 21. 60 °C kurulan PCR çalışma sonucu	56
Şekil 22. 18S rRNA ve miR156a Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri ..	57
Şekil 23. miR159a ve miR169b Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri	58
Şekil 24. miR393a ve miR398a Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri	59
Şekil 25. miR820a Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri	60

Şekil 26. Osm-97-0 grubunu ve M-300-5-0 grubundaki miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar.....	62
Şekil 27. Osm-97-0 grubunu ve Osm-97-150 grubundaki miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar.....	63
Şekil 28. M-300-5-0 grubunu ve M-300-5-150 grubundaki miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar.....	65
Şekil 29. UBQ5, MYB ve CSD2 Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri ..	66
Şekil 30. UBQ, DRM2 ve SPL16 Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri .	66
Şekil 31. UBQ, MYB ve CSD2 Erime (Melt curve) eğrileri.....	67
Şekil 32. UBQ, DRM ve SPL16 Erime (Melt curve) eğrileri	68
Şekil 33. Osm-97-0 ve M-300-5-0 hattında belirlenen miRNA'ların ve hedef gen bölgelerinin ifadelerindeki değişim	69
Şekil 34. Osm-97-150 bitkisinde belirlenen miRNA'ların ve hedef gen bölgelerinin ifadelerindeki değişim	70
Şekil 35. M-300-5-150 bitkisinde belirlenen miRNA'ların ve hedef gen bölgelerinin ifadelerindeki değişim	71

SİMGE LİSTESİ

%	: Yüzde değeri
dS m⁻¹	: DesiSiemens/metre
RCF	: Göreceli Santrifüj Kuvveti
Na⁺	: Sodyum iyonu
Cl⁻	: Klorür iyonu
K⁺	: Potasyum iyonu
H⁺	: Hidrojen iyonu
O₂	: Oksijen molekülü
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂O	: Su molekülü
NaCl	: Sodyum klorür
Cu	: Bakır
Zn	: Çinko
N	: Nitrojen
CH₂	: Metilen
mM	: Mili molar
C₂H₂	: Asetilen
bZIP	: Temel lösin fermuar geni
WRKY	: WRKY Transkripsiyon faktör
MYB	: Transkripsiyon faktör MYB
AP₂	: Etilene duyarlı element bağlayıcı protein
NAC	: Azot asimilasyonu düzenleyici protein
DREB	: Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı protein
HKT	: Yüksek afiniteli potasyum taşıyıcı
NHX	: Sodyum / Hidrojen değiştirici protein
SKC1	: Yüksek afiniteli potasyum taşıyıcı protein 8'in izomeri
MAPK	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
DCL1	: dsRNA-bağlanma proteini
HYL1	: Hiponastik yaprak 1 proteini

HEN1	: Küçük RNA 2'-O-metiltransferaz
HST1	: Asetillizin N-asetiltransferaz
AGO1	: Arganoute proteini
RISC	: RNA kaynaklı susturma kompleksi
HD-ZIP	: Homeodomain-lösin fermuar proteininin
STK	: serin / treonin-protein kinaz
MADS-box	: MADS kutusu
CDS	: Kodlama bölgesi
TCP	: Geçiş kontrol protokolü
ARF	: Oksin cevap yolları
TIR1	: Oksin transport inhibitör cevap proteini
GRF	: Büyüme düzenleyici faktör
HD ZipIII	: Sınıf III homeodomain lösin fermuar transkripsiyon faktörleri
SBP	: Squamosa promotör bağlayıcı protein
SPL	: Squamosa promotör bağlayıcı protein -Like
ACS	: Asetil-koenzim A sentetaz
DCL1	: Dicer Like1 proteini
PRC	: Pol-ycomb baskılayıcı kompleks
LHP	: Like-Heterokromotin Protein
QTL	: Quantitative trait loci
IPA1	: Ideal plant architecture 1
GAMYB	: Gibberellin-ilişkili alfa-amilaz
SOC1	: Anter çiçek entegratör geni
NF-Y	: Nükleer transkripsiyon faktör Y kompleksi
HAP	: Heme aktivatör protein
CBF	: CCAAT bağlama kutusu
RACK1	: C kinaz 1'i aktive eden protein yapı reseptörü
CSD	: Tamamlayıcı cinsiyet belirleme geni
DRM	: DNA metil transferaz geni
UBQ5	: Ubiquitin
HAP2C	: CCAAT-binding transcription factor subunit B family protein
AFB	: F-box domain

FLC	: Çiçeklenme lokusu C
HAT	: Histon asetiltransferaz
HMT	: Histon metiltransferaz
HDAC	: Histon deasetilaz
JMJ	: JUMONJI alan içeren protein
SWR1	: SWI2/SNF2-ilişkili protein 1
PKL	: Kromatin yeniden modelleme faktörü
ST	: Sakkaroz taşıyıcı
MFS	: Majör kolaylaştırıcı süper aile proteini
ATP's	: ATP sintatazi
CML	: 4-kumarat-CoA liagaz-1
UBL	: Ubikitin protein liagazı
RFP	: Halka Parmak proteini
CUL	: Cullin-1
CBP	: Kalsiyum bağlayıcı protein
CAM	: Calmodulin
YUC	: Yuca Geni
DELLA	: Giberellin negatif düzenleyici protein
GAMYB	: Gibberellin-ilişkili alfa-amilaz ekspresyon geni
LEAFY	: Çiçek meristem kimlik geni
SAUR	: Oksin cevap genleri
GH₃	: Oksin cevap genleri
CuSO₄	: Bakır II Sülfat
CACTA	: Sınıf II transpoze edilebilir element

ÖZET

Bu tez kapsamında T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi Labrotuarı'nda ülkemizde yaygın ekime sahip olan Osmancık-97 çeşidi ve gama radyasyonu ile tuzluluğa toleranslı olarak elde edilmiş mutant 300-5 çeltik hattının, tuz stresi altında tuzlulukla ilişkisi belirlenen miRNA profilleri (miR156a, miR159a, miR169b, miR393a, miR398a ve miR820a) ve bu miRNA'ların etki ettiği genlerin (SPL16, MYB, HAPC2, AFB2, TIR1, CSD2 ve DRM2) tuz stresindeki ifadelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Tuza toleranslı mutant ile kontrol grubu olarak belirlenen Osmanık-97 çeşidi tuzlu (150 mM NaCl) ve tuzsuz ortamlarda T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi Labrotuarı'nda in-vivo ortamda geliştirilmiştir. Hasadı yapılan bitkilerin miRNA ifadelerindeki değişimleri karşılaştırmak amacı ile miRNA izolasyonu yapılmış ardından cDNA reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve Probe tabanlı Real-Time PCR analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler Osmancık-97 bitkisi ile M-300-5 hattı arasında karşılaştırılmıştır. miRNA'ların hedef gen bölgelerindeki ifadelerin değişimlerini incelemek için tasarımı yapılan primerler ile Real-Time PCR analizi yapılmıştır. Elde edilen bulgular Osmancık-97 çeltik çeşidinde ait bitkiler ile M-300-5 hattı arasında karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada seçilen mutant bitkide tuz stresinde belirlediğimiz tüm miRNA'ların ifadelerinde artış gözlenmiştir. miRNA gruplarının hedef aldığı gen bölgelerinden metilasyon ile ilişkili gen bölgesi DRM2'de, transkripsiyon faktörü olan NF-YA (HAPC2), kök gelişimi ile ilişkili gen bölgesi AFB2 ve TIR1'de, çiçeklenme ile ilişkili gen bölgesi SPL16'da azalma meydana gelirken, MYB transkripsiyon faktöründe ve SOD ile ilişkili olan CSD2 gen bölgesinde artış olmuştur.

Yapılan bu çalışma laboratuvarımızda mutasyon ıslahı metodu ile geliştirilmiş mutant hatlar ile gerçekleştirildiğinden elde edilen miRNA ifadelerindeki değişiklikler özgün değer taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: *Oryza sativa*, Tuz stresi, miRNA, Gerçek Zamanlı PZR

ABSTRACT

In contents of thesis mutant 300-5 rice line obtained from Osmancık-97 variety, and which are tolerant to salinity with gamma radiation, were used in Istanbul Kultur University Plant Biotechnology Laboratory. It was aimed to examine the miRNA profiles (miR156a, miR159a, miR169b, miR393a, miR398a and miR820a) of mutant 300-5 rice line, whose relationship with salinity was determined under salt stress. In addition, it was aimed to examine the expressions of genes (SPL16, MYB, HAPC2, AFB2, TIR1, CSD2 and DRM2) affected by miRNAs in salt stress.

Mutant variety and Osmancık-97 species were grown in salt and salt-free environments at Istanbul Kultur University Plant Biotechnology Laboratory in-vivo. In order to compare the changes in miRNA expressions, miRNA isolation and cDNA reaction was performed. Then, Probe-based Real-Time PCR analysis was performed. Real-Time PCR analysis was performed to analyze changes in target gene regions. The findings were compared between Osmancık-97 and M-300-5 line.

As a result, an increase in salt stress was detected in all miRNA groups of the mutant line selected in this study. There was a decrease in gene regions associated with methylation targeted by miRNA groups, transcription factor HAPC2, root development and flowering. However, an increase was found in the gene region associated with SOD pathways.

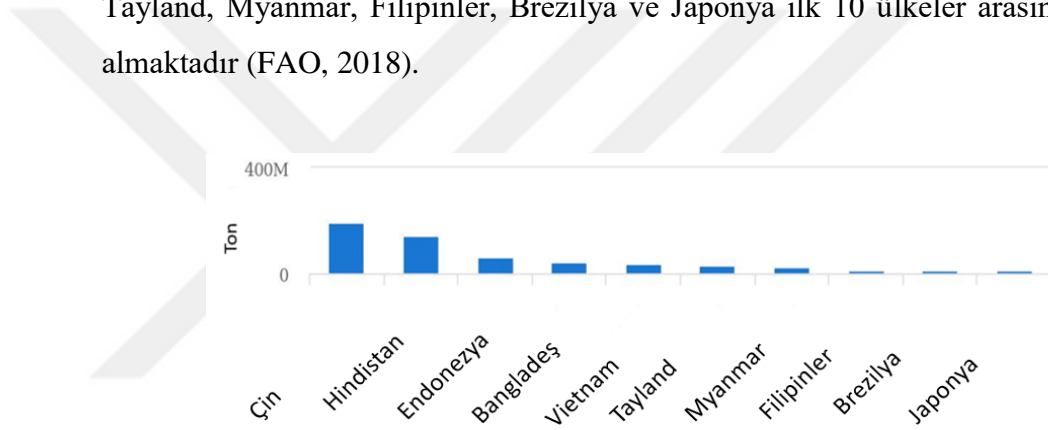
Since this study was carried out in our laboratory with mutant lines developed by the mutation breeding method, the changes in the miRNA expressions obtained are of original value.

Keywords: *Oryza sativa*, Salt stress, miRNA, Real-Time PCR

1 GİRİŞ

Çeltik bitkisi; buğday, arpa ve mısır ile birlikte dünyadaki en önemli temel gıda ürünleri arasında yer almaktadır. Dünya çapında yaklaşık 3 milyar insanın günlük ana kalori kaynağı olan çeltik ayrıca önemli miktarda mineral ve vitamin içerdiğinden, tüm tahıllar arasında en fazla sindirilebilir protein içermektedir (Bhaswati Ghosh, 2016).

Dünyada'ki çeltik üretimine bakıldığında Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization (FAO)'nun son verilerine göre Şekil 1'de de görüldüğü gibi, başta Çin olmak üzere sırasıyla Hindistan, Endonezya, Bangladeş, Vietnam, Tayland, Myanmar, Filipinler, Brezilya ve Japonya ilk 10 ülkeler arasında yer almaktadır (FAO, 2018).



Şekil 1. 1994-2018 yılları arası Dünya genelinde çeltik üretim oranlarında ilk 10 ülke (FAO,2018).

Türkiye'de 2018 verilerine göre; 120.137 ha alandan hasat yapılmış olup toplamda 940.000 ton çeltik üretimi yapılmıştır. Bu verilere bakıldığında ülkemizde, Dünya üretiminin ortalama %27,9'luk kısmını karşılayarak çeltik üretimi bakımından 86. sırada yer almaktadır (FAO, 2018).

Türkiye son derece tarıma elverişli toprak yapısına sahiptir. Fakat topraktaki bu verim sanayileşmenin artmasıyla giderek azalmaktadır. Sanayileşmeye bağlı olarak oluşan toprak kirliliği ve tarım arazilerinin azalması büyük sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Parihar, 2015).

Dünya tarımı, büyümekte olan nüfus için %70 daha fazla gıda üretmek durumundadır. Değişen çevre koşulları nedeni ile zarar gören bitki örtüsü ne yazık ki bazı bitkileri oldukça olumsuz etkilemektedir. Bu sebeple, artan gıda talepleriyle başa çıkabilmek için çevresel stres altında mahsul verimliliğini arttırmak gerekmektedir (Parihar, 2015).

Bitkiler; çimlenme ve gelişme sırasında düşük veya yüksek sıcaklık, kuraklık, ağır metaller ve tuzluluk gibi bitkilerin verimliliği üzerinde olumsuz etkilere neden olan çeşitli çevresel stres faktörlerine maruz kalmaktadırlar. Bu faktörler arasında tuzluluk, çeltik verimliliğini sınırlayan temel faktördür (Brodersen, 2008, Suralta, 2018).

Tuzluluk, temel olarak yeryüzündeki kayalardan doğal olarak oluşan tuzların çözünmesinden kaynaklanır. Yağmur ve fırtınalar da denizlerden iç alanlara kadar çözünür tuzlar taşıyabilir. Doğal afetler, farklı tuz kaynaklarını tarlalara taşıyarak uzun yağmur dönemlerinde yoğun tuz birikimine neden olabilir. Bu doğal nedenler dışında, uygun olmayan sulama uygulamaları ve yetersiz drenaj da tuz birikimine neden olabilmektedir. Tuzluluk, dünyadaki toplam kara yüzeylerinin %7'sinde önemli bir sorun haline gelmiştir (Çelik ve ark., 2019).

Ülkemizdeki tarım alanlarında, tuzluluk sorunu üzerine yapılmış olan araştırmalarda toplam tarım yapılan 1,5 milyon ha arazilerin % 41'i az tuzlu, % 33'ü tuzlu, % 0,5'i alkali, % 17,5'i ise, hem tuzlu hem de alkali olduğu ortaya konulmuştur (Korkmaz, 2016).

Tuz stresi bitkilerde sodyum kanallarını uyardığı gibi hiperosmolariteye sebep olarak absisik asit (ABA) yolaklarını da harekete geçirmektedir. Özellikle fazla tuza maruz kalan bitkilerde gen ekspresyon seviyelerindeki değişikliğe bağlı olarak protein sentezinin ve enzim aktivitelerinin değiştiği, bunun sonucunda bitkilerde fonksiyon yapısı bozulmaktadır (Zhu, 2002).

Gen ekspresyon seviyelerindeki değişimde rolü olan miRNA'ların (mikroRNA) stres altında yetişen bitkilerde pek çok gen yolaklarına etki ettiği üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bitkilerde miRNA'ların, çoğunlukla mikroarray analizi ve miRNA dizilemesi dahil olmak üzere yüksek verimli analiz yoluyla bitkilerde stres tepkilerine cevap verdiği bulunmuştur. Bitki miRNA'ları, hedef genlerini düzenleyerek bitki büyümesinin ve gelişmesinin çeşitli yönlerini etkilemektedir (Sunkar ve ark., 2004, Ding, 2009, Mittal, 2013, Chen, 2013).

Bu tez kapsamında; yerli Osmancık-97 çeşidinden geliştirilmiş mutant 300-5 hattında tuzlulukla ilişkili olarak belirlenen miRNA'ların (miR156a, miR159a, miR169b, miR393a, miR398a ve miR820a) tuz stresi altındaki ifadeleri ele alınacaktır. Ayrıca, bu miRNA'ların etki ettikleri genlerin tuz stresi altında verdikleri cevaplar ortaya konulacaktır.

2 GENEL BİLGİLER

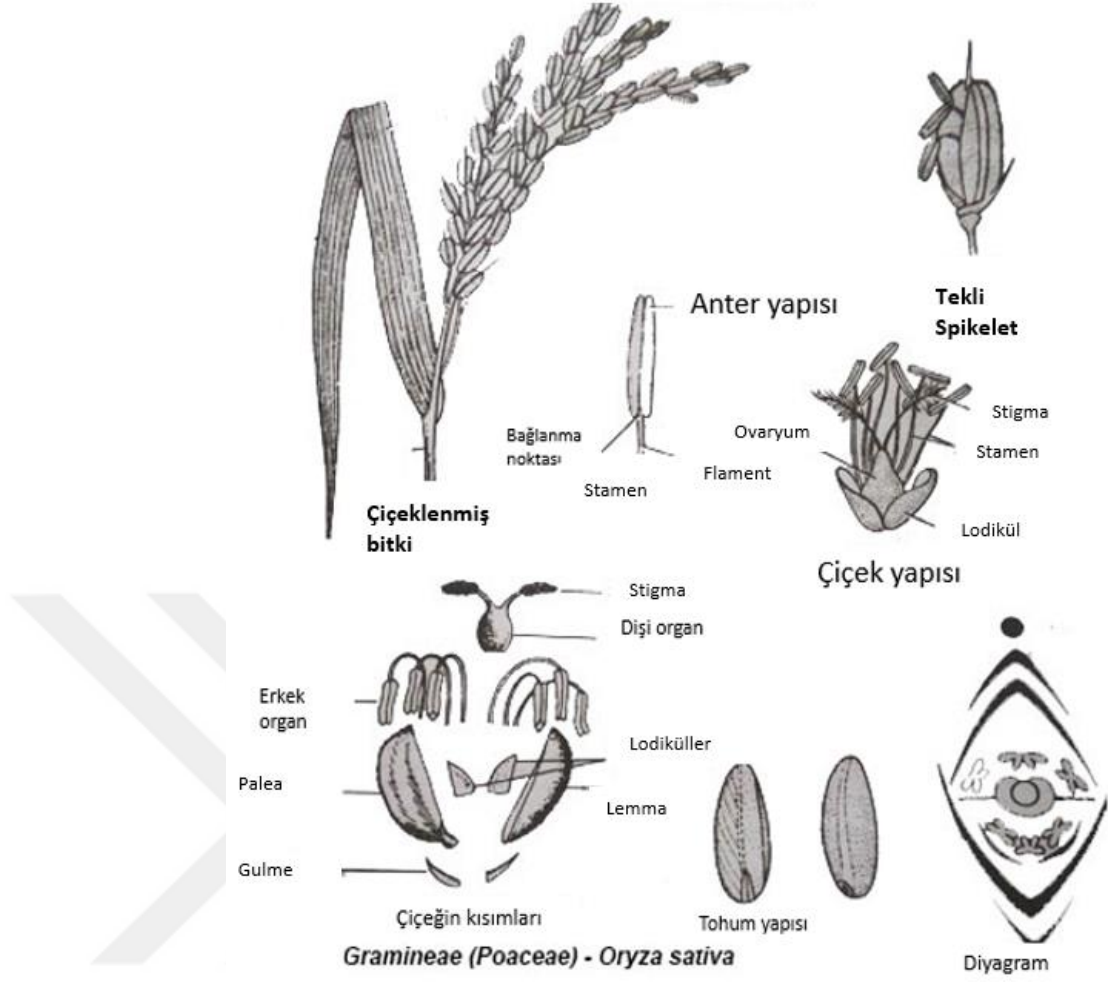
2.1 Çeltik (*Oryza sativa* L.)

Poaceae familyasının üyeleri arasında olan *Oryza sativa* L., buğday, arpa ve mısır ile birlikte dünyadaki en önemli temel ürünler arasındadır. *Oryza sativa* L., tropikal ve ılıman iklim yapısına sahip ortamlarda yarı-sulak bölgelerde yetişmeye uygun bir bitkidir. Bu ılıman iklimin hakim olduğu bölgelerde, su altında yaşayan çeltik bitkisi, *Poaceae* ailesinde yer alan diğer bitkilere nazaran, değişen iklim yapısına ve çevre koşullarına daha güçlü bir adaptasyon geliştirmiştir (Kadam ve ark. 2015). Ana vatanı Hindistan ve Endonezya olarak kabul edilen çeltik, $2n = 24$ kromozom sayısına sahip olup kendi kendine döllen tek yıllık (monokotil) bitkiler arasındadır. Çeltik türüne ait 22 alt tür bulunmaktadır (Guimaraes, 2009).

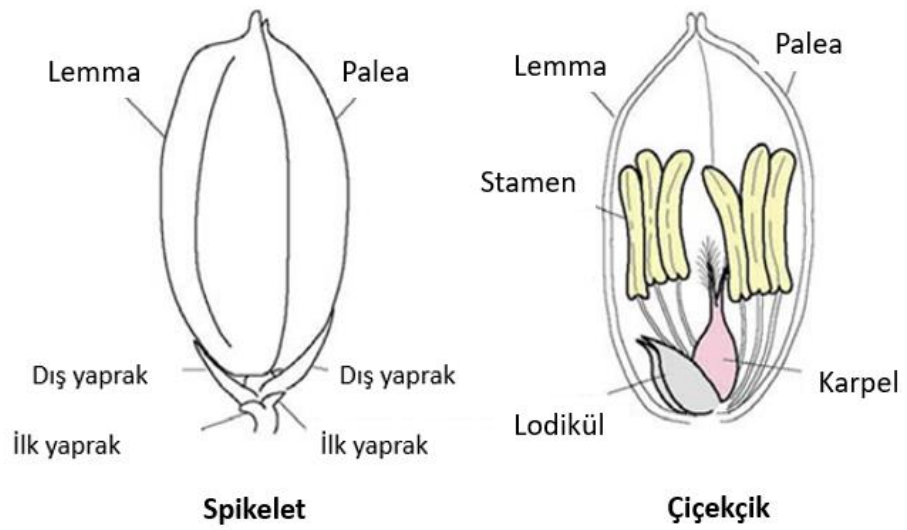
Monokotil bitkiler arasında yer alan çeltik, kromozom sayısı en az olarak tanımlanmış, model organizma olarak gösterilmektedir. Bu özelliği bakımından da tahıllar arasında referans olarak gösterildiğinden önemli bir yere sahiptir (Jackson, 2016).

Çeltik bitkisinin vejetatif gelişimi yaklaşık olarak 180 gün sürmektedir. Spikelet olarak adlandırılan çiçekleri; bir karpel ve altı stamen içerir. Dış kısmında iki lodikül ve iki asimetrik kavuzdan (lemma ve palea) oluşmaktadır ve çiçekleri petal içermemektedir. Çeltik çiçek yapısı Şekil 2’de gösterilmiştir (Izawa, 1996). Spikeletlerin detaylı yapısı da Şekil 3’te görülmektedir.

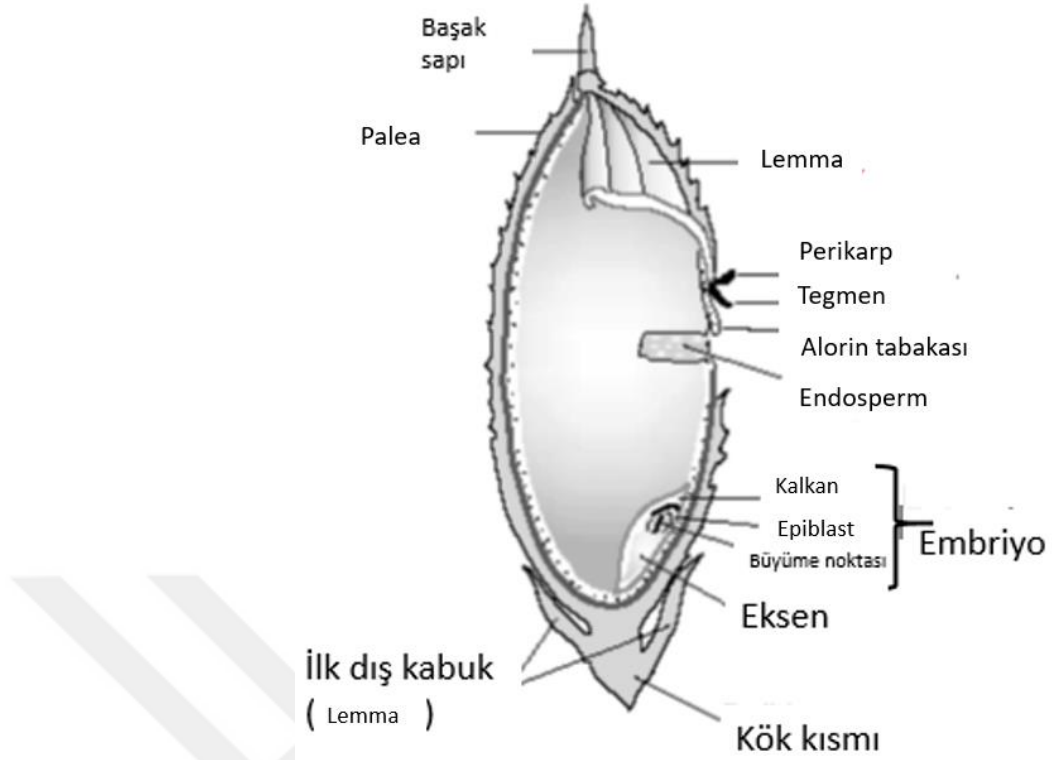
Skutellum olarak adlandırılan, olgun çeltik embriyosu; tek kotiledonlu olup endosperm yapısını da içinde barındırır. Skutellum, karbonhidrat depolayarak çimlenme sırasında embriyoya enerji sağlamaktadır. Bu yapı Şekil 4’te gösterilmiştir.



Şekil 2 *Oryza sativa* çiçek yapısı (Izawa, 1996)



Şekil 3. *Oryza sativa* spikelet yapısı (Yamaguchi, 2006)



Şekil 4. *Oryza sativa* tohum yapısı (Priya T. S., 2019)

2.2 Tuz Stresi ve Bitkilerin Tuz Stresine Verdikleri Cevaplar

Tuzluluk, dünya çapında yaklaşık 833 milyon hektar araziye etkileyen başlıca abiyotik streslerden biridir (Fahad ve ark, 2015). Tuzlu toprak yapısında, yüksek konsantrasyonda klorür, sülfat, sodyum, kalsiyum, magnezyum, potasyum karbonat gibi çözünebilir tuzlar barındırmaktadır. Bu da bitkilerin topraktan su ve besinleri almasını zorlaştırmakta ve bitkinin zararlanmasına neden olmaktadır. Elektriksel iletkenliği (EC) 4 dS m⁻¹'den fazla olan toprak tuzlu olarak kabul edilmektedir. Bu durum; doğal olarak yeryüzündeki kayalardan tuzların çözünmesiyle ya da doğal afetler ile farklı tuz kaynaklarının tarlalara taşınmasıyla yoğun tuz birikimine neden olabilmektedir. Topraktaki tuz birikimi doğal durumların haricinde, yanlış sulamalarla da ortaya çıkmaktadır. Dünyadaki sulama yapılan tarım arazilerin üçte birinden fazlası bu durumdan etkilenmektedir. Sulama yapılan tarım alanlarındaki verim, sulama gerektirmeyen tarım alanlarının verimliliğinden daha yüksek olduğu için bu

durum ulusal üretimi azaltmakta olduğundan için ciddi önem arz etmektedir (Theerawitaya, 2020, Pegler ve ark., 2020).

Mahsulün büyümesi ve üretimi için en önemli sınırlayıcı faktörlerden biri olan tuz stresi; tohum çimlenmesini, bitki büyümesini, fizyolojik süreçleri (fotosentez, solunum ve terleme), besin dengesini, zar özelliklerini ve hücrel homeostazı, enzimatik ve metabolik aktiviteleri olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Negrão ve ark., 2017). Ayrıca tuz stresi fotosentetik karbon asimilasyonunu, stomal iletkenliği ve fotosentetik elektron transportundaki verimliliğin düşmesine neden olmaktadır (Hniličková ve ark., 2019).

Tuz stresinin zararlı etkileri temel olarak 2 mekanizma nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bunlar; ozmotik stres ve iyonik toksisitedir (Na^+ , Cl^-). Ozmotik stres; bitkinin yüksek orandaki tuz içeren ortamda kökleri aracılığıyla topraktan suyu almasının zorlaşmasıdır. Bunun sonucunda iyonik toksisite oluşmaktadır. Bu durum hücrelerde Na^+ , Cl^- birikimi oluşturmakta ve hücre genişlemesiyle birlikte sürgün gelişiminin de yavaşlamasına neden olmaktadır (Hussain ve ark., 2019).

Tuz stresine maruz kalma süresine göre bitkilerin verdikleri cevaplar da değişiklik göstermektedir. Bitkiler toprakta bulunan suyu bünyesine kökleri vasıtasıyla almaktadır. Köklerinde bulunan iyon kanalları sayesinde topraktan alınan suyla birlikte tuzların alımını engelleyen mekanizmalar geliştirmişlerdir. Ancak bu durum her bitkide aynı değildir. Farklı türlerin yaşadıkları ortama adapte olabileceği farklı mekanizmalar bulunmaktadır. Tuza hassasiyet gösteren bitkiler olduğu gibi dayanıklı olanları da vardır. Topraktaki tuz oranı 200 mM ve üzerinde olan bir ortamda yaşayabilen bitkilere halofit bitkiler denilmektedir. Bu bitkiler geliştirdikleri mekanizmalar sayesinde tuza tolerans gösteren bitkilerdir. Bu durumun tam tersi olan, tuzlu topraklara adaptasyon geliştirememiş bitkiler ise glikofitler olarak adlandırılırlar (Flowers ve ark., 2010, Nikalje ve ark., 2017).

Halofit türlerinin çoğu *Chenopodiaceae*, *Poaceae*, *Fabaceae* ve *Asteraceae* familyalarında bulunur. Halofitler, yüksek tuzlu koşullarda filizlenmelerine, büyümelerine, çoğalmalarına ve yaşam döngülerini tamamlamalarına yardımcı olan bir dizi morfolojik, anatomik ve fizyolojik yapıya sahiptirler (Nikalje ve ark., 2017).

Çeltik bitkisinde tuz stresine karşı geliştirilen adaptasyon mekanizmaları iyon homeostazı, antioksidan moleküller ile reaktif oksijen türevlerinin (ROS) detoksifiye edilmesi, osmatik stres altında osmoprotektan moleküllerin üretimi, hormonal dengenin korunması, transkripsiyon faktörleri (TF) olarak sıralanabilir (Chen ve ark., 2021).

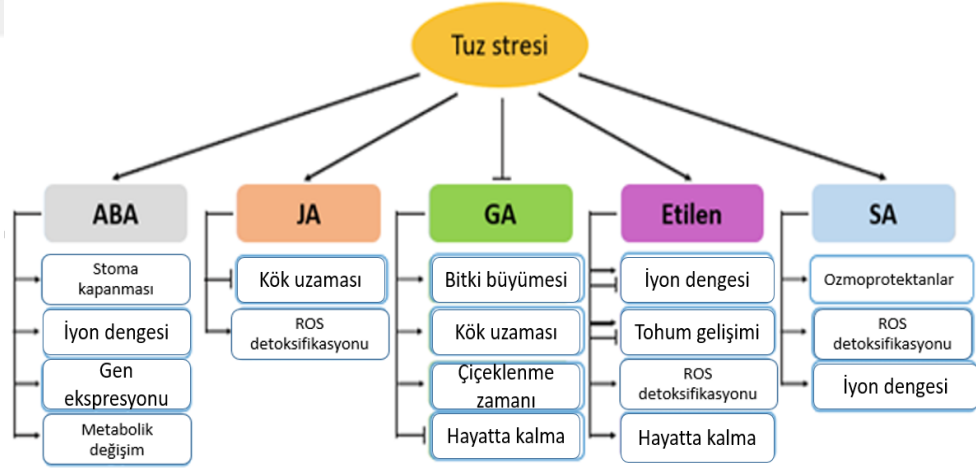
2.2.1 Transkripsiyon Faktörleri

Tuzluluk stresine yanıt olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesi, transkripsiyon faktörleri tarafından yönetilen gen ekspresyonunun yeniden programlanmasıyla gerçekleştirilir. BZIP, MYB, WRKY, AP2, NAC, C2H2 çinko parmak (zinc finger) geni ve DREB aileleri gibi transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyonunu kontrol edilmesinde önemlidir (Wang ve ark. 2016, Muchate ve ark., 2016). WRKY TF'lerin tuz, ısı, soğuk ve ozmotik stres gibi farklı stresler üzerine son yıllarda çok fazla yapılmış çalışma bulunmaktadır. Arabidopsis'te, WRKY25 ve WRKY33'ün aşırı ifadesi, SOS yolundan bağımsız olarak tuz toleransını ve ABA duyarlılığını önemli ölçüde artırmıştır. WRKY25 ve WRKY33, oksidatif stres ve ozmotik streslerin önemli bir düzenleyicisi olduğu ortaya konulmuştur (Muchate ve ark., 2016). MYB transkripsiyon faktörleri üzerine yapılan çalışmalarda; fizyolojik süreçlerde ve hücre döngüsü, hücre gelişimi, hormon sentezi ve çeşitli streslere karşı bitkilerin verdikleri cevaplar gibi biyokimyasal süreçlerde rol oynadıkları gösterilmiştir. Arabidopsis'te, soya fasulyesinde aşırı ekspresyon gösteren GmMYB76 veya GmMYB177, tuza ve donmaya karşı artan toleransla sonuçlandırılmıştır. Çeltikte OsMYB2'nin aşırı ekspresyonu, çok sayıda stres tepkisi geninin ekspresyonundaki değişikliklere yol açarak; tuza, soğuğa ve dehidrasyon streslerine karşı geliştirilmiş tolerans sergilediği vurgulanmıştır (Yang ve ark., 2012, Zhao ve ark., 2020).

2.2.2 Hormonal Denge

Fitohormonlar, bitki büyümesi ve gelişmesinde önemli bir rol oynarlar. Tuz stresine yanıt ve adaptasyon, absisik asit (ABA), jasmonik asit (JA), gibberellik asit (GA), etilen ve salisilik asit (SA) dahil olmak üzere birden fazla fitohormonun entegrasyonunu ve koordinasyonunu gerektirir (Şekil 5). Bu hormonlar arasında ABA, çeşitli abiyotik streslere verilen yanıtta en çok rol

oynayan hormondur. Köklere uygulanan ozmotik stres, hem kök hem de yaprak dokularında ABA konsantrasyonunda birkaç dakika içinde büyük bir artışa neden olur. ABA, stomatal kapanmanın düzenlenmesi, iyon homeostazı, tuz stresine yanıt veren gen ekspresyonu ve metabolik değişiklikler dahil olmak üzere tuz stresi yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir hormondur. JA, yüksek tuzluluğa maruz kaldıktan sonra kök uzamasının ve antioksidatif enzimlerin aktivasyonunun inhibisyonu için gereklidir. Tuz stresi, endojen biyoaktif GA'ların birikimini azaltarak bitki büyümesinin ve kök uzamasının engellenmesine, çiçeklenmenin gecikmesine ve yüksek tuzluluk altında hayatta kalmanın desteklenmesine yol açar. Etilenin tuz stresi toleransı üzerindeki etkisi, türe veya gene özgü bir şekilde etki eder. Etilen biyosentezi veya sinyal iletimi ile ilgili bileşenler iyon homeostazını ve tohum çimlenmesini pozitif ya da negatif olarak düzenler. Ayrıca etilen, detoksifikasyon mekanizmalarını indükler ve tuz stresi altında hayatta kalmayı destekler. SA, ozmoprotektanların birikimine, antioksidatif enzimlerin indüksiyonuna ve tuz stresi altında iyon homeostazının iyileştirilmesine katılır (Zhao ve ark., 2020).



Şekil 5. Bitkilerde tuz stresi altında fitohormonların etkileri (Zhao ve ark., 2020).

Absisik asit (ABA), Jasmonik asit (JA), Giberellik asit (GA), Salisilik asit (SA).

Tuz stresi ABA, JA, etilen ve SA hormonlarını aktiveleştirirken GA hormonunu inaktif hale getirmektedir. Tuz stresi ile birlikte miktarı artan ABA bitkide stomaların kapanması, iyon dengesi, gen ekspresyonu ve metabolik değişimleri doğrudan etkileyip aktif hale getirmektedir. Tuz stresi ile birlikte aktif hale gelen JA bitkide kök uzamasını negatif etkilemekte olup bununla

birlikte ROS detoksifiyasyonunu olumlu yönde etkilemektedir. Etilen hormonu tuz stresi ile birlikte bitkide iyon dengesini ve tohum gelişmesini hem aktifleştirir hem de inaktif hale getirmektedir. ROS detoksifikasyonu ile bitkinin hayatta kalmasını ise tuz stresi altında aktifleştirmektedir. SA tuz stresi ile beraber ozmoprotektanları, ROS detoksifikasyonunu ve iyon dengesini aktifleştirmektedir. Tuz stresi altında GA'nın inaktif hale gelmesi ile beraber bitki büyümesi, kök uzaması ve çiçeklenme zamanı olumlu yönde etkilenirken bitkinin hayatta kalması olumsuz yönde etkilenmektedir (Zhao ve ark., 2020).

2.2.3 İyon Homeostazı

Bitki hücrelerinin iyon birikimi nedeniyle zarar görmesini engelleyen bitki savunma mekanizmalarından birisi iyon homeostazıdır (Tanveer ve ark., 2019). Yüksek tuz ortamında yetişen bitkilerin sitosollerinde aşırı Na^+ birikimi meydana gelmektedir. Sitosolde biriken bu iyonlar K^+ iyonları ile rekabete girerler. Na^+ 'nın K^+ homeostazına müdahale etmesi ve özellikle çok sayıda metabolik sürece dahil olduğu göz önüne alındığında, dengeli bir sitosolik Na^+ / K^+ oranının sürdürülmesi tuzluluk tolerans mekanizmasında kilit nokta haline gelmiştir. Bu homeostatik dengenin sağlanması, Na^+ ve K^+ taşıyıcılarının faaliyeti ile olmaktadır (Assaha ve ark., 2017). Çeltik bitkisinde olumsuz koşullar altında, Na^+ iyon taşıyıcılarında; yüksek afiniteli potasyum taşıyıcı (HKT), tuza aşırı duyarlı (SOS) yolu ve Na^+ / H^+ değiştirici (NHX) önemli bir rol oynamaktadır. Çeltikte HKT'ler için, iki alt aile tanımlanmıştır. HKT1 alt ailesinin bir üyesi olan OsHKT1; kromozom 1'in SKC1 lokusunda bulunur ve sadece Na^+ taşınımına izin verir. HKT2 alt ailesinin üyesi olan OsHKT2 ise; 324 çeltik çeşidinde sürgünlerdeki Na^+ taşınımını sağlar ve K^+ ile Na^+ arasında simporter olarak işlev görmektedir. Ek olarak, vakuolar Na^+ / H^+ vakuolar membranda bulunan OsNHX1, OsNHX2, OsNHX3 ve OsNHX4 içeren iyon değiştiricilerinin Na^+ 'yı tutan antiportörler olarak işlev gördükleri bilinmektedir (Theerawitaya, 2020). Glikofitlerde ve halofitlerde Na^+ ve K^+ taşınımı ve translokasyon mekanizması temelde aynıdır, ancak glükofitler tuz stresine halofitlerden daha duyarlıdır. Bu taşıyıcıların ve kanalların, halofitlerde olduğu gibi glükofitlerin adaptasyonu için eşit derecede önemli olduğu gösterilmiş,

ancak gen ekspresyonu, proteinlerdeki yapısal farklılıklar ve translasyon sonrası modifikasyon (fosforilasyon) faaliyetlerindeki farklılıklar iki grup arasındaki tolerans farklılıklarını ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalarda; fosforilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonların, Na^+/H^+ antiporterlarından SOS1 ve ya NHX iyon taşıyıcılarının ve bu taşıyıcıların düzenleyici bileşenlerin (HAK/AKT1) aktivitesini önemli ölçüde değiştirdiği bulunmuştur (Himabindu ve ark., 2015, Assaha ve ark., 2017).

Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) kaskadları ve fosfatidik asit (PA) tuz stresi sinyal yolunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Arabidopsis'te tuz stresi toleransına katkıda bulunan MPK3, MPK4 ve MPK6'yı aktive ettiği bulunmuş ve MPK4 ve MPK6'nın tuz stresi altındaki aktiviteleri MPK2 tarafından indüklendiği gösterilmiştir. Çeltik bitkisinde, OsMPK1 geni susturulduğunda, OsMPK4'in bozulmuş aktivasyonundan kaynaklanan tuz stresine karşı aşırı duyarlı hale geldiği saptanmıştır (Zhao ve ark., 2020)

2.2.4 Antioksidan Moleküller

Bitkiler ROS'ların zararlı etkilerine karşı enzimatik yada enzimatik olmayan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon reduktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), guaiakol peroksidaz (GOPX) ve glutatyon-S-transferaz (GST) antioksidan enzimlerdir. Ayrıca enzimatik olmayan antioksidan moleküller; askorbik asit (ASH), glutatyon (GSH), fenolik bileşikler, alkaloidler, protein olmayan amino asitler, alfa-tokoferol ve karotenoidler de serbest radikallerin temizlenmesinde önemli bir rol oynarlar (Muchate ve ark., 2016).

SOD, serbest radikallere karşı geliştirilen savunma sistemlerinin en önemlilerindedir. Tuz stresi ve abiyotik stres altında, katalazlar, yağ asitlerinin β -oksidasyonu sırasında H_2O_2 'yi temizlerler. CAT, H_2O_2 'yi doğrudan H_2O ve O_2 'ye dönüştürme potansiyeli ile ROS detoksifikasyonu için vazgeçilmez bir enzimdir. Bir CAT molekülü dakikada ~ 6 milyon H_2O_2 molekülünü H_2O ve O_2 'ye dönüştürebildiğinden, CAT tüm enzimler için en yüksek devir oranlarına sahiptir. CAT aktivitesindeki artış, halofitlerde antioksidan savunmanın bir ölçüsü olarak gösterilmiştir (Lokhande ve ark. 2013). APX, CAT ile aynı işlevi

yerine getirir. Bitkilerde hücre içi H₂O₂ seviyesinin düzenlenmesi çok önemlidir. APX, stroma ve tilakoid gibi farklı hücresel bölmelerde, gliksizomlar ve peroksizomlar, sitozol ve mitokondri içeren mikro cisimde bulunur. Stromal APX (sAPX), tilakoid membrana bağlı APX (tAPX), mikrobodimembrana bağlı APX (mAPX), sitozolik APX (cAPX) ve mitokondriyal membrana bağlı APX (mitAPX) olarak kategorize edilirler. Bazı araştırmacılar bezelye, pamuk ve pirinç gibi bitkilerde tuzluluk stresinden sonra APX aktivitesinde bir artış olduğunu belirtmiştir. MDHAR aktivitesindeki artışın, transgenik tütünde tuz ve ozmotik streslere karşı artan toleransa katkıda bulunduğu da bildirilmiştir. ASH suda çözünür bir antioksidandır, tüm bitki dokularında genellikle daha yüksek fotosentetik hücreler ve meristemlerde oluşur. GR enzimi, oksitlenmiş glutatyonun NADPH'ye bağlı indirgenmesini katalize eder. GR aktivitesinin, kontrole kıyasla tuz stresli bitkilerin yapraklarında yüksek olduğu gösterilmiştir (Muchate ve ark., 2016, Assaha ve ark., 2017, Tanveer ve ark., 2019, Zhao ve ark., 2020).

2.2.5 Ozmoprotektanlar

Ozmoprotektanlar; küçük, elektriksel olarak nötr ve düşük toksisiteye sahip oldukça çözünür organik bileşiklerdir. Olumsuz bir ozmotik durumda olduklarında hücre içi ile dış ortam arasında denge kurarak hücrelerde yüksek miktarlarda birikebilirler. Yüksek çözünürlükleri ve hücre metabolik yollara çok az müdahale etmeleri nedeniyle, uyumlu çözünenler olarak da bilinirler. Ozmoprotektanlar, üç farklı sınıfa ayrılır. Bunlardan birincisi dördü amonyum bileşikleri ve türevleri, örneğin poliaminler ve betainler (glisin betain gibi). İkincisi; amino asitler ve türevlerini içerenler, örneğin prolin ve ektoin. Üçüncüsü; şekerler ve türevlerini içerenler, örneğin oligosakaritler (sükroz, trehaloz, rafinoz, stakioz, verbasse), fruktan ve şeker alkolleri (polioller: gliserol, inositol, arabitol, maltitol, sorbitol, mannitol ve D-ononitol) içerenlerdir.

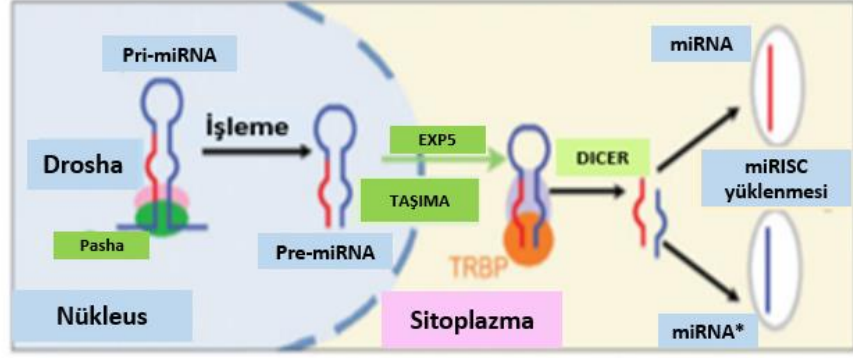
Bitkiler tuz stresi altındayken iki durumla karşı karşıya kalırlar. Bunlardan ilki; bitki su potansiyelini azaltan yüksek Na⁺ konsantrasyonundan kaynaklanan ozmotik streştir, ikincisi Na⁺ ve Cl⁻'nin daha yüksek konsantrasyonunun temel besinlerin mevcudiyetini ve asimilasyonunu sınırladığı iyonik stresin neden olduğu beslenme dengesizliğidir. Bu nedenlerden dolayı yüksek NaCl'den

kaynaklanan hipertonic koşullar altındaki bitkilerde, hücrenin içinden dışarıya su çıkışı meydana gelir. Bu durum hücrenel bileşenlerin yoğunluğunu artırır ve yüksek iyon konsantrasyonu proteinlerin yapısını değiştirir. Proteinlerin yüzeylerinde biriken koruyucu osmolitler yapılarını stabilize ederek proteinleri doğal yapılarına geri döndürmeye yardımcı olur. Bu nedenle, osmolitler, ozmotik ve tuz streslerine karşı bu koruyucu rol nedeniyle ozmoprotektanlar olarak kabul edilmektedir (Hossain ve ark., 2019).

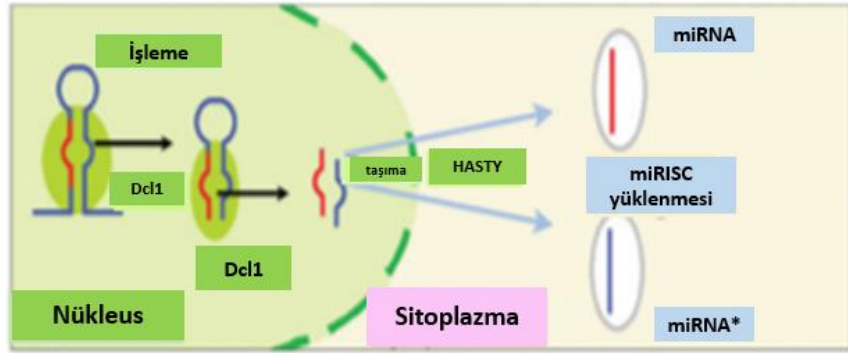
2.3 miRNA Biyogenezi

İlk mikroRNA'lar (miRNA) 1993 yılında Ambros ve Ruvkun tarafından *Caenorhabditis elegans*'ta lin-4 geninde keşfedilmiştir. Lin-4, Horvitz'in laboratuvarı tarafından *C. elegans* larvalarının zamansal gelişimini düzenleyen genlerden biri olarak nitelendiriliyordu. Daha sonra 1987'de aynı grup, lin-4'teki bir mutasyonun, başka bir gendeki, lin-14'teki bir mutasyona zıt bir fenotipe sahip olduğunu, ancak bir boş-lin-4 hattındaki lin-14 baskılayıcı mutasyonunun doğal tip olduğunu buldu. Lin-4 ve lin-14 üzerinde çalışmalar devam etti, ancak daha sonra lin-4'ün bir protein kodlayan RNA değil, aslında küçük, protein kodlamayan RNA olduğunu keşfetmişlerdir. O zamandan beri miRNA'lar tüm hayvan modeli sistemlerinde tespit edilmiş ve bazılarının türler arasında yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 1993)

MikroRNA'lar (miRNA'lar), çok hücreli organizmalarda biyolojik işlemleri düzenleyen yaklaşık olarak 20-24 nükleotitlik uzunlukta küçük RNA'lardır. Bu moleküller transkripsiyon sonrası ve translasyonel seviyelerde gen ekspresyonunu düzenleyen küçük RNA ailesinin yaygın üyeleridir. Hayvanlardan farklı olarak, bitki miRNA'ları hedef mRNA ile çok yüksek tamamlayıcılığa sahiptir ve biyogenezleri farklıdır. miRNA'lar, tamamlanmamış gövde-ilmek yapısını barındıran daha uzun transkriptlerden türetilirler. Hayvan ve bitki miRNA'larının oluşum süreçleri Şekil 6'da gösterilmiştir (Tarver ve ark. 2012).



C. elegans miR-1



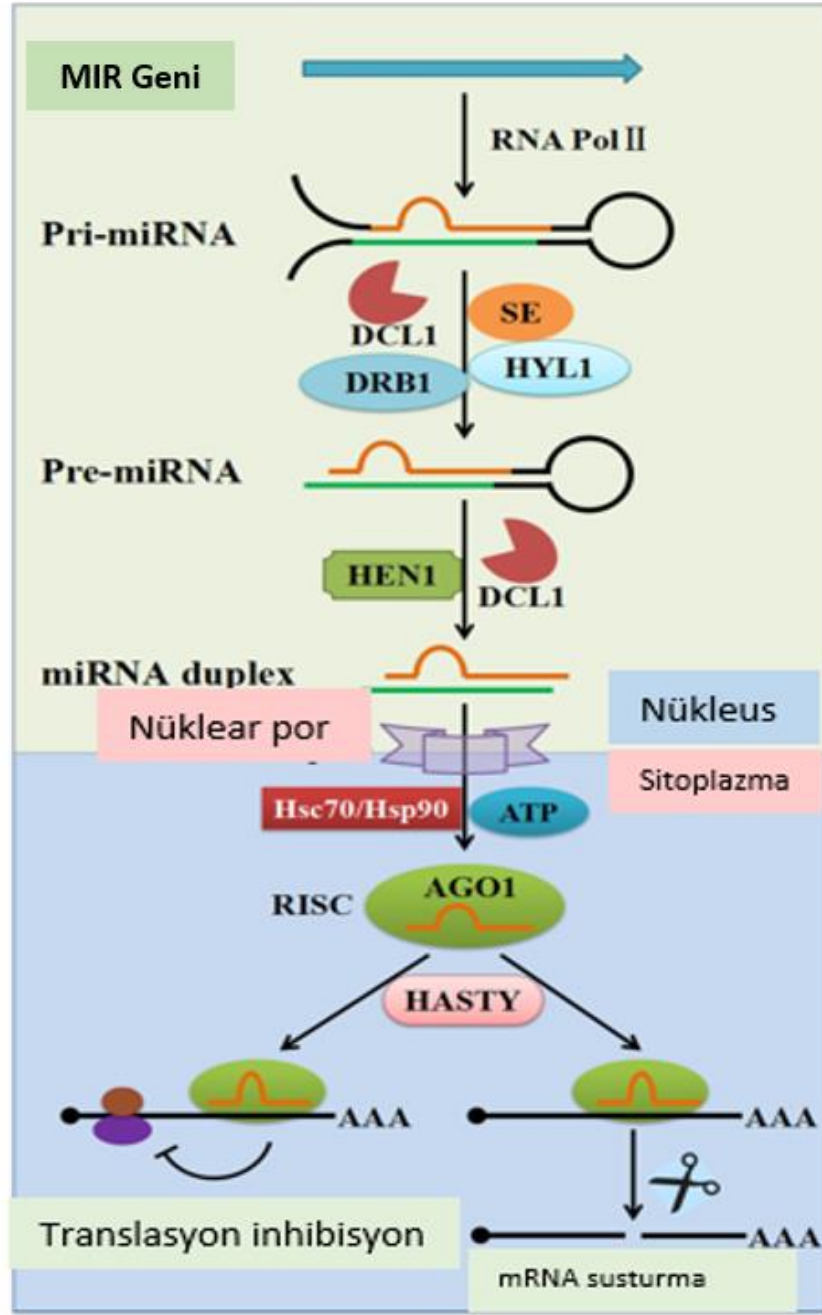
Maize MIR-156a

Şekil 6. *C.elegans* ve mısırdaki miRNA biyogenezin farklılıkları (Tarver ve ark. 2012).

Öncül miRNA (pri-miRNA), olgun miRNA (pre-miRNA), Exportin-5-Ran-GTP C (EXP5), Dicer Like 1 (DCL1), TAR RNA binding protein (TRBP)

Hayvanlardaki miRNA oluşumu yukarıda ve bitkilerin ki aşağıda gösterilmiştir. Hayvan miRNA'larının işlenmesi hem nukleusta hem de sitoplazmada gerçekleşir. Ancak bitkilerde işlem tamamen nukleusta gerçekleşir.

Bitkilerde, miRNA geni, Şekil 7'de görüldüğü gibi RNA polimeraz II tarafından normal transkripsiyonel şekilde, destekleyici moleküller ile birlikte dsRNA-bağlanma proteini 1(DCL1) / hiponastik yaprak 1 (Hyponastic leaves1 (HYL1)) tarafından birincil miRNA'dan öncü miRNA'ya transkribe edilmektedir (Parmar ve ark., 2020, Narjala ve ark., 2020, Gautam ve Gupta 2019).



Şekil 7. Bitki miRNA biyogenezi ve düzenlenme mekanizmaları (Liu ve ark., 2017).

RNA polimeraz II (RNA Pol II), Öncül miRNA (pri-miRNA), olgun miRNA (pre-miRNA), Dicer Like 1 (DCL1), Argonot 1 (AGO1), Dicer benzeri 1 (DICER1), Serrat (SE), Hua geliştirici 1; (HEN1), Çift iplikli RNA bağlayıcı protein 1 (DRB1) Hiponastik yapraklar 1 (HYL1), RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC).

Öncü miRNA, karakteristik gövde-ilmek yapısında; zıt kollarda olgun miRNA-birincil miRNA dizisini taşımaktadır. Bitkilerdeki öncü miRNA, 3' ucunda küçük RNA 2'-O-metiltransferaz (HEN1) tarafından metillenmekte ve Protein asetillizin N-asetiltransferaz (HST1) tarafından sitoplazmaya getirilmektedir. Olgun miRNA- birincil miRNA dupleksini bölünür ve ortaya

çıkan olgun miRNA, arganoute proteini (AGO1) tarafından RNA kaynaklı susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex (RISC)) topluluğuna yüklenirken birincil miRNA bozulmaktadır (Parmar ve ark., 2020, Narjala ve ark., 2020, Gautam ve Gupta 2019).

Olgun bir miRNA, ya proteinlerin translasyon işlemini doğrudan durdurmaktadır ya da dolaylı olarak aynı kökenli mRNA'ları hedefleyerek gen ekspresyonunu inhibe etmektedir. miRNA'lar hormon dengesini ve gelişimsel süreçleri düzenleyen hormon sinyal yollarının temel bileşenlerini düzenlemektedir. Bitkilerde miRNA'lar; büyüme, gelişim, morfoloji, çiçeklenme ve çevresel strese oluşturulan cevaplara etki ettiği kadar sinyal iletimi gibi metabolik süreçlerle de ilişkilidir (Parmar ve ark., 2020, Narjala ve ark., 2020, Gautam ve Gupta 2019). miRNA'lar bitki gelişimini etkileyen genlerin ekspresyonuna etki ettiği gibi aynı zamanda kendi biyogenezinde de rol oynamaktadır. DCL1 genini kodlayan mRNA, miR162'nin hedef bölgesi olduğu yine aynı çalışmada gösterilmiştir (Xie ve diğerleri 2003). *Arabidopsis* üzerine yapılan farklı çalışmalarda miR168'in, AGO1-RISC ile ilişkili olduğu, AGO1'in ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. miRNA'lar ayrıca oksin yolağının çeltik ve *Arabidopsis*'te önemli bir rol oynadığını, kök geliştirilmesinde tamamlayıcı rollere sahip olduğu ortaya konulmuştur (Meng ve ark., 2010). Yaklaşık olarak 133 adet miRNA'nın özellikle *Arabidopsis*'te doku ve kök bölgesine spesifik olarak ifade edildiği gösterilmiştir (Breakfield ve ark., 2012).

2.4 Bitkilerde Tuzluluk Stresinde miRNA'larla Yapılan Çalışmalar

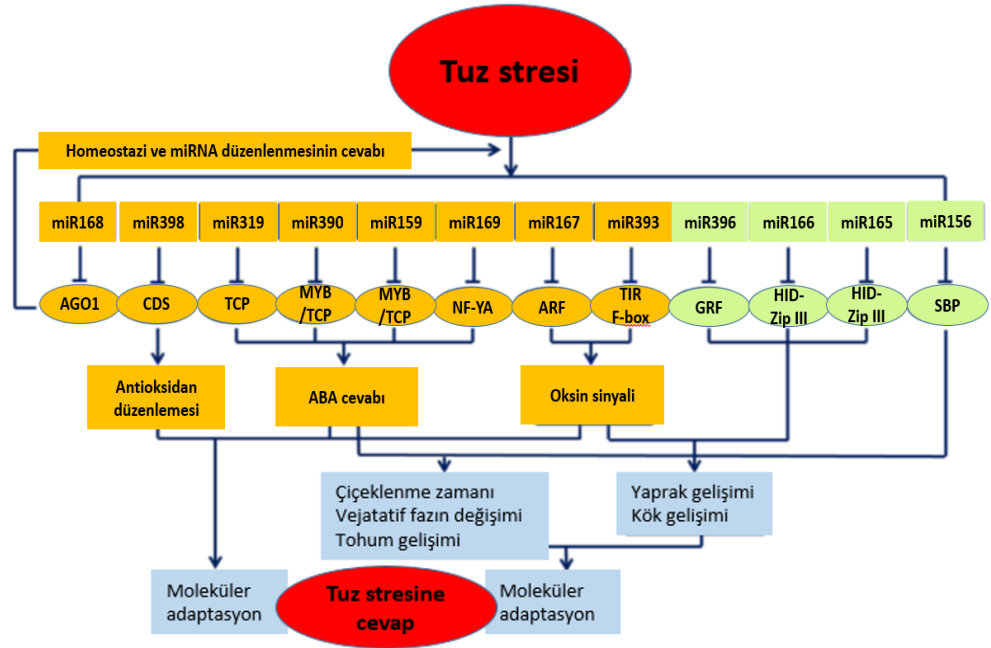
miRNA'lar, bitkilerde aynı gen ailesine ait çok sayıda gen bölgesini hedef almaktadır. Yapılmış olan çalışmalarda, miRNA'ların belirli koşullar altında belirli hedef genlerin ekspresyonunu seçici olarak düzenleyebildiği ortaya çıkarılmıştır. Mısır bitkisinde miRNA'larının dizilenmesinden elde edilen veriler, bu miRNA'ların çoğunun bitki gelişimi ve organ oluşumunda rol oynayan TF'leri hedeflediğini göstermiştir. MYB, NAC1 ve homeodomain-lösin fermuar proteininin (HD-ZIP) TF'leri sırasıyla zma-miR159a / b, zma-miR164a / b / c / d ve zma-miR1661 / m'nin hedef bölgeleri olduğu gösterilmiştir (Sunkar ve ark. 2012).

Yapılan benzer çalışmalarda *Arabidopsis*'ten de benzer sonuçlar elde edilmiştir. MADS kutusu (MADS-box) proteinleri ve çinko-parmak proteinleri de dahil olmak üzere diğer transkripsiyon faktörleri, bitkilerde tuz stresine yanıt veren faktörler olarak rapor edilmiştir. Transkripsiyon faktörlerine ek olarak, çeşitli miRNA hedef genleri farklı metabolik yollarda veya çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (Xu ve ark. 2016).

Transgenik çeltik ve *Arabidopsis* bitkilerinde osa-miR396'nin aşırı ekspresyonu, ebeveynlere kıyasla tuz stresinde azalan bir toleransına yol açmıştır (Gao ve ark., 2010). Benzer çalışmalarda, osa-miR393, transgenik çeltik ve *Arabidopsis*'te aşırı eksprese edildi, bu da transgeniklerin vahşi tipli bitkilerle karşılaştırıldığında tuz stresine daha duyarlı olmasına neden olmuştur (Gao ve ark., 2011).

miR417'nin aşırı ekspresyonuna sahip transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde tohum çimlenmesi, vahşi tip bitkiler ile karşılaştırıldığında yüksek tuz veya ABA varlığında geciktirilmiştir. Bu sonuçlar, miR417'nin tuz stresi koşulları altında muamele edilen *Arabidopsis* bitkilerinde tohum çimlenmesinde olumsuz bir rol oynadığını göstermiştir (Jung ve Kang 2007).

Şekil 8'de gösterilen diyagramda *Arabidopsis* üzerine yapılmış olan bir çalışmada, tuzluluk stresine maruz bırakılan bitkide hangi miRNA'ların hangi gen bölgelerini hedef aldıkları gösterilmiştir (Lotfi ve ark., 2017).



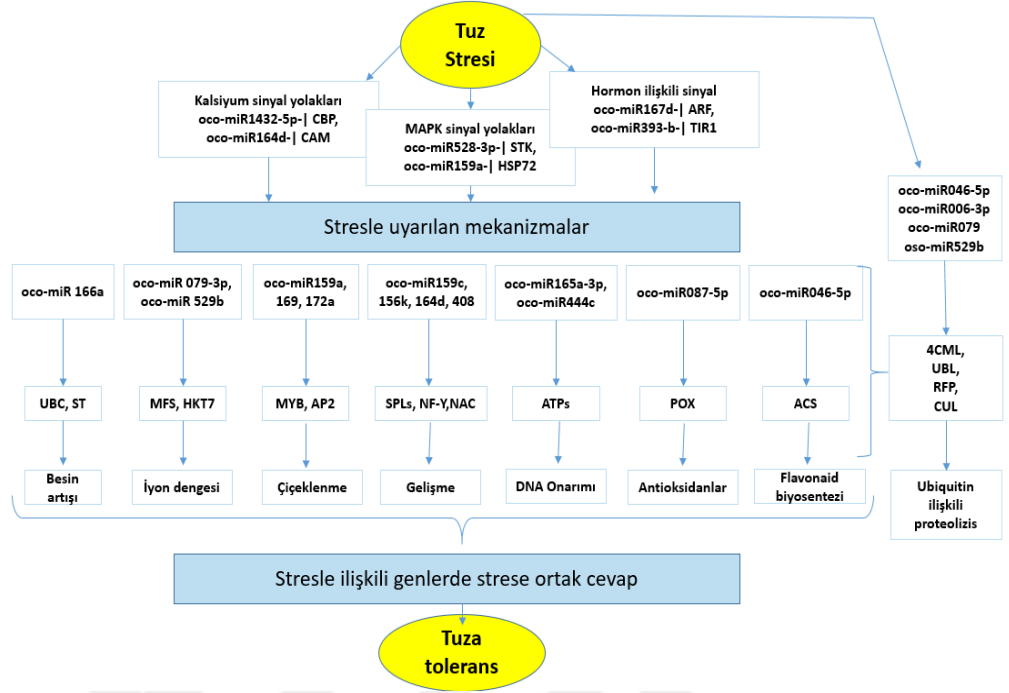
Şekil 8. *Arabidopsis* bitkisinin tuzluluk stresi altında miRNA'ların hedef aldığı genler (Lotfi ve ark., 2017'den düzenlenmiştir).

Kodlama bölgesi CDS, Geçiş kontrol protokolü TCP, Oksin cevap yolları ARF, Oksin reseptörü TIR1, Büyüme düzenleyici faktör GRF, Sınıf III homeodomain lösin feruar transkripsiyon faktörleri HD ZipIII, SQUAMOSA promotör bağlayıcı protein SBP

Tuz stresi altında *Arabidopsis*'te miR398 CDS yolağına doğrudan etki ederek antioksidan düzenlenmesini etkiler, miR319, miR390, miR159, miR169 sırasıyla TCP, MYB/TCP ve NF'ye doğrudan etki ederek ABA cevabını etkilerler, miR167 ve miR393 sırası ile ARF ve TIR F-box proteinlerini doğrudan etkileyerek oksin sinyal yollarına etki ederler. Tüm bunlarında sonucunda bitkide moleküler adaptasyon düzenlenir ve sinyal yollarına cevap oluşturulur. miR396 doğrudan GRF proteinine etki eder, miR166 ve miR165 doğrudan HD ZipIII proteinine etki ederek oksin sinyal yolları ile birlikte yaprak ve kök düzenlenmelerinde etkili olurlar. Bunun sonucunda bitkide moleküler adaptasyon sağlanarak tuz stresine cevap oluşturulur. miR156 SBP proteinini etkileyerek ABA cevabı ile birlikte bitkide çiçeklenme zamanını, vejetatif faz değişimini ve tohum çimlenmesini düzenleyerek bitkide moleküler adaptasyonu sağlar ve bitkide tuz stresine cevap oluşturulur.

Model organizma olan *Arabidopsis* üzerinde düzenlenen tuzluluk stresi altında görev alan miRNA'ların hedef aldıkları proteinlerin şematize edilmesi çeltik bitkileri üzerinde de yapılmıştır. Aşağıdaki Şekil 9'da *Oryza coarctota* bitkisinde Mondal ve arkadaşları tuz stresi altında özellikle hangi miRNA'ların

etki gösterdiğini ve bu belirlenen miRNA'ların hedef aldığı proteinlerle birlikte bitkide etki ettiği yollar görülmektedir.



Şekil 9. *Oryza coarctata* bitkisinin tuzluluk stresi altında miRNA'ların hedef aldığı genler (Kumar Mondal ve ark., 2015'ten düzenlenmiştir).

Ubikitin-konjüge edici enzim (UBC); Sakkaroz taşıyıcı (ST); Majör kolaylaştırıcı süper aile proteini (MFS); MYB; Etilene duyarlı element bağlayıcı protein (AP2); SPB benzeri proteinler (SPL); Oksin cevap yolları faktörü (ARF); Nükleer transkripsiyon faktörü Y (NF-Y); Azot Asimilasyonu düzenleyici protein (NAC); ATP sintatazi (ATP's); peroksidad (POX); Asetil-koenzim A sentetaz (ACS); 4-kumarat-CoA liagaz-1 (CML); Ubikitin protein liagazı (UBL); Halka Parmak proteini (RFP); Cullin-1 (CUL); serin / treonin-protein kinaz 38 (STK); Kalsiyum bağlayıcı protein (CBP); Katyon taşıyıcı HKT7 (HKT7); Calmodulin (CAM).

Tuz stresi altında *O.coarctata* bitkisinde özellikle CBP ye doğrudan etki eden miR1432, CAM proteinlerine doğrudan etki eden miR164d kalsiyum sinyal yollarında etkilidir. STK proteinine doğrudan etki eden miR528, HSP72 proteinine doğrudan etki eden miR159a, MAPK sinyal yollarının düzenlenmesinde etkilidir. ARF proteinini doğrudan etkileyen miR167d, TIR1 proteinini doğrudan etkileyen miR393b, hormonlarla ilişkili sinyal yollarının düzenlenmesinden sorumludur. Kalsiyum, MAPK ve hormonlarla ilişkili sinyal yolları stres mekanizmalarının geliştirilmesinden sorumludur. Bitki stres mekanizmalarını etkileyen miRNA'lar sırasıyla; miR166a ubikitin konjuge edici enzim (UBC) ve ST proteini doğrudan etkileyerek besin alınımını düzenler, miR079 ve miR529b MFS VE HKT7'yi etkileyerek iyon dengesine etki eder, miR159a ve miR169b MYB, AP2'ye etki ederek çiçeklenmeyi etkilerler, miR159c, miR156k/miR164d/miR408 SPL, NF-Y, NAC'ye etki ederek

büyüme ve gelişmeyi düzenlerler, miR165a ve miR444c ATP'lere etki ederek bitki metabolizmasını ve DNA onarım mekanizmalarını etkilerler, miR087 doğrudan POX proteinine etki ederek anitoksidanların düzenlenmesine etki eder, miR046 doğrudan Asetil-koenzim A sentetaz (ACS) proteinini etkileyerek flavonoidlerin biyosentezine etki etmektedir. Tüm bu mekanizmalar ile birlikte ubikutin ilişkili proteinlerin sentezini düzenleyen miRNA'lar (miR046, miR006, miR079, miR529b) tuzlulukla ilişkili genleri etkileyerek bitkide tuz stresine cevap oluşturulur ve tuza tolerans sağlarlar (Kumar Mondal ve ark., 2015).

Tuzluluk stresi altında bitkiler farklı cevaplar sergilemektedir. Tuz stresi altında yetiştirilen bitkiler üzerine yapılmış olan çalışmalardan derlenen sonuçlara göre, belli başlı miRNA'lar bu miRNA'ların stres koşullarında nasıl cevap verdikleri ve hedef aldıkları gen bölgeleri aşağıdaki Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Tuz stresi altında rol oynayan miRNA'lar ve hedef aldıkları genler (Lotfi ve ark., 2017, Zhou ve ark., 2010, Banerjee ve ark., 2016, Xu ve ark., 2021).

Sayı	miRNA	Bitki türü	Düzenleyici etkisi	Hedef gen bölgesi
1	miR156	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	SPL
		<i>Panicum virgatum</i>	Gen ifadesinde artış	SPL
		<i>Raphanus sativus</i>	Gen ifadesinde artış	SPL
		<i>Populus trichocarpa</i>	Gen ifadesinde azalış	POPTR_0007s01030
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	SPB
2	miR157	<i>Panicum virgatum</i>	Gen ifadesinde artış	SPB
3	miR159	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde azalış	MYB transcription factor
		<i>Nicotiana tabacum</i>	Gen ifadesinde azalış	MYB transcription factor
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	MYB transcription factor
		<i>Panicum virgatum</i>	Gen ifadesinde artış	MYB transcription factor
4	miR160	<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde azalış	ARF
		<i>Triticum aestivum</i>	Gen ifadesinde artış	ARF
		<i>Gossypium raimondii</i>	Gen ifadesinde artış	ARF
		<i>Raphanus sativus</i>	Gen ifadesinde azalış	ARF
		<i>Setaria italica</i>	Gen ifadesinde azalış	ARF
5	miR162	<i>Panicum virgatum</i>	Gen ifadesinde artış	DCL1
		<i>Setaria italica</i>	Gen ifadesinde artış	DCL1
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	DCL

Tablo 1. devamı

6	miR164	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	NAC family gene
		<i>Raphanus sativus</i>	Gen ifadesinde artış	NAC domain containing protein
		<i>Populus trichocarpa</i>	Gen ifadesinde artış	POPTR_0007s08420
7	miR165	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	Class III HD-ZIP TF
8	miR166	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	SBP
		<i>Glycine max</i>	Gen ifadesinde artış	SBP
		<i>Zea mays</i>	Gen ifadesinde artış	SBP
		<i>Medicago sativa</i>	Gen ifadesinde azalış	HD-Zip III
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	HD-Zip TF
9	miR167	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	ARF6, ARF8
		<i>Nicotiana tabacum</i>	Gen ifadesinde azalış	ARF TF
		<i>Triticum aestivum</i>	Gen ifadesinde artış	ARF
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	ARF
10	miR168	<i>Hordium vulgare</i>	Gen ifadesinde azalış	AGO1
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	AGO1
		<i>Saccharum spp</i>	Gen ifadesinde artış	AGO1
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	AGO 1
11	miR169	<i>Glycine max</i>	Gen ifadesinde artış	CBF HAP2-like factor
		<i>Raphanus sativus</i>	Gen ifadesinde artış	NF-Y
		<i>Zea mays</i>	Gen ifadesinde artış	NF-Y
		<i>Cucumis sativus</i>	Gen ifadesinde artış	NF-Y
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	NF-Y

Tablo 1. devamı

12	miR171	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	SISCL
		<i>Hordium vulgare</i>	Gen ifadesinde artış	Protein FAN
		<i>Setaria italica</i>	Gen ifadesinde azalış	GAI
		<i>Solanum linnaeanum</i>	Gen ifadesinde azalış	SISC
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	SISC
13	miR172	<i>Raphanus sativus</i>	Gen ifadesinde artış	AP2
		<i>Gossypium raimondii</i>	Gen ifadesinde azalış	AP2
		<i>Populus trichocarpa</i>	Gen ifadesinde artış	POPTR_0008s04490
		<i>Solanum linnaeanum</i>	Gen ifadesinde azalış	AP2
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	AP2
14	miR319	<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	TCP TF
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	TCP TF
		<i>Solanum linnaeanum</i>	Gen ifadesinde azalış	TCP TF
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	TAS3
15	miR390	<i>Medicago truncatula</i>	Gen ifadesinde azalış	LRR
16	miR393	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	F-box protein; AFB2; Auxin receptor; TIR1
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	TIR1, AFB2, AFB3, F- box domain, MYB TF
		<i>Medicago sativa</i>	Gen ifadesinde azalış	F-box protein
17	miR394	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	F-box protein
		<i>Glycine max</i>	Gen ifadesinde azalış	F-box protein
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde azalış	F-box protein

Tablo 1. Devamı

18	miR395	<i>Cucumis sativus</i>	Gen ifadesinde artış	ATP sulfurylase
		<i>Raphanus sativus</i>	Gen ifadesinde artış	ATP sulfurylase
		<i>Panicum virgatum</i>	Gen ifadesinde azalış	ATP sulfurylase
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	CYB5A
19	miR396	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	GRL TF
		<i>Nicotiana tabacum</i>	Gen ifadesinde artış	GRL TF
		<i>Panicum virgatum</i>	Gen ifadesinde artış	GRL TF
		<i>Raphanus sativus</i>	Gen ifadesinde artış	TF bHLH74
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	GRF
20	miR397	<i>Panicum virgatum</i>	Gen ifadesinde azalış	cDNA l-ascorbate oxidase precursor
		<i>Solanum linnaeanum</i>	Gen ifadesinde artış	laccase
21	miR398	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde azalış	Cu/ZnS SOD
		<i>Cucumis sativus</i>	Gen ifadesinde azalış	Cu/Zn SOD
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde azalış	Cu/Zn SOD
22	miR399	<i>Cucumis sativus</i>	Gen ifadesinde artış	Protein PHR1-LIKE 1-like
		<i>Panicum virgatum</i>	Gen ifadesinde azalış	DHX
		<i>Triticum aestivum</i>	Gen ifadesinde artış	DHX
		<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	E2
23	miR402	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gen ifadesinde artış	DML3
24	miR408	<i>Triticum aestivum</i>	Gen ifadesinde artış	ERF1A
25	miR820	<i>Oryza sativa</i>	Gen ifadesinde artış	DRM2

Tablo kısaltmaları; SPL; Squamosa-Promotor Binding Protein-Like, SPB; SBP-box gene family, AUX; Auxin response Factor, DCL1; Dicer Like 1 ERF1A; Peptide chain release factor; plantacyanin, HD-ZIP III; Class III homeodomain leucine zipper protein, ARF; Putative auxin response transcription factor, AGO; ARGONAUTE1 protein, CBF; CCAAT-binding factor, NF-Y; Nuclear transcription factor Y, SISCL3; Scarecrow-like transcription factor, GAI; Gibberellic acid insensitive, AP2; Ethylene-responsive transcription factor, TCP; Teosinte branched, TAS3; Trans-acting siRNA, DRM2; Yeniden düzenlenen Metilaz 2 Domains, DML3; Demeter-Like protein 3, E2; ubiquitin conjugating enzyme protein, Cu/Zn SOD; copper/zinc superoxide dismutase, DHX; ATP-dependent RNA helicase, GRF; Growth-regulating factor, ATP; Adenosine-5 -triphosphate Sulfurylase, LRR; Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, CYB5A; Cytochrome b5-like heme/steroid bağlanma proteini, TF; Transkripsiyon faktörü.

Aşağıdaki Şekil 10'da tuz stresi altında *Oryza sativa*'da etkili olan bilinen ve henüz işlevi bilinmeyen miRNA'lar gruplara ayrılarak gösterilmiştir.

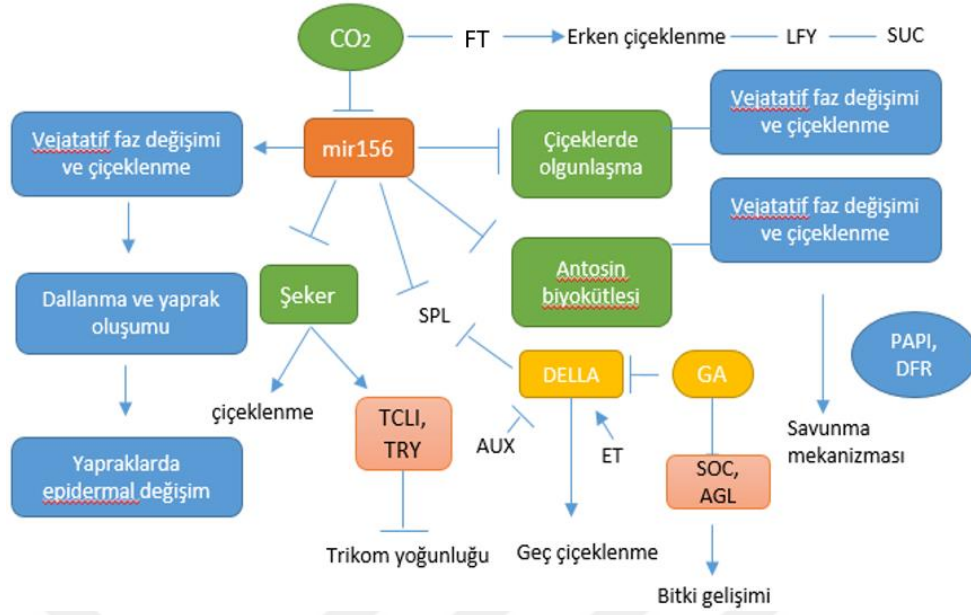
mekanizmalarını etkileyerek bitkide koruma mekanizmalarına etki etmektedir. miR529a, miR397b, miR195, miR210, miR2118r, miR04, miR210 sırası ile M fazı fosfoprotein, tubilin, REFC, kinezin, CDTIA, MAP65/ASE1 ve DNA polimeraza etki ederek hücre bölünmesi üzerine etki göstermektedir (Kumar Mondal ve ark., 2017).

2.5 Çeltikte Tuz Stresi ile ilişkili miRNA'lar

2.5.1 miR156

miR156 bitki miRNA'ları içerisinde ilk tanımlanmış olan miRNA'dır (Yue Ma ve ark., 2020). miR156 bitki büyümesinde ve stres toleransında oldukça fazla etkilere sahiptir. Squamosa Promotore Binding Protein-Like (SPL) hedef aldığı transkripsiyon faktörüdür. SPL proteini çok yönlü bir protein olup şu ana kadar bilinen, korunmuş 76 aminoasit Squamosa Binding Protein (SBP) domaini vardır. İlk SPL proteini *Antirrhinum majus*'ta AP1 geninde, erken çiçeklenme ile ilişkili Squamosa promotöründe tanımlanmıştır. *Arabidopsis thaliana*'da 16, *Oryza sativa*'da 19, *Maize*'de 31 aileden oluşan SPL proteini geniş bir gen ailesine sahiptir. Çeltikte ve *Arabidopsis*'te SPL, miR156 tarafından düzenlenir. miR156 bitkide büyüme, gelişme, faz değişimi, çevresel strese cevap oluşturma ve savunma mekanizmalarında oldukça önemli bir karaktere sahiptir. Bitkilerde miR156, SPL'yi düzenleyerek bir dizi fenotipik varyasyonlara neden olmaktadır. Bu varyasyonlar arasında bitki boyu, yaprak morfolojisi, dal sayısı, trikoma yoğunluğu, gövde kalınlığı, biyokütle verimi, tane verimi ve stres tepkisi sayılabilir (Jeyakumar ve ark., 2020).

Şekil 11.'de miR156 ile SPL proteini arasındaki ilişkisinin genetik modifikasyonda miR156'nın direkt yada dolaylı olarak nasıl etki gösterdiği aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Jeyakumar ve ark., 2020).



Şekil 11. miR156 ve SPL ilişkisi (Jeyakumar ve ark., 2020'den düzenlenmiştir).

FT; Flowering Locus L, LFY; Yeşil yaprak, SUC; Sukroz, SPL; Squamosa promoter-binding-like protein, TCL1; Trichomeless 1, TRY; Triptychon transkripsiyon faktörü, GA; Gibberellik asit, AUX; Oksin, ET; Etilen, SOC; Suppressor of overexpression of contans, AGL; Agamous Like, PAP1; Production of anthocyanin pigment 1, DFR; Dihidroflavanol 4-Redüktaz.

miR156/SPL proteini, mahsul geliştirmede çok yönlü bir rol oynar. miR156/SPL etkileşimi vejetatif fazda çiçeklenmeyi, yaprak ve dal oluşumunu teşvik etmektedir. Son bulgularda oksin ve etilen gibi bitki hormonlarının miR156 ekspresyonunu düzenlediğini göstermektedir. miR156'nın şekerler tarafından negatif düzenlenmesi çiçeklenmeyi ve trikomun baskılanmasına neden olur. DELLA proteinleri, SPL protein aktivitelerini etkiler ve baskılar (Jeyakumar ve ark., 2020 ve Yue Ma ve ark., 2020).

Bir bitkinin yaşam döngüsü, iki ana faz geçişini içerir. İlk aşama gençlik aşamasından yetişkin aşamasına geçişi içerirken, ikinci aşama erişkinden üreme aşamasına geçişi içermektedir. Bu faz geçişlerinin kontrolünden iki ana miRNA türü, miR156 ve miR172 sorumludur. miR156 seviyesinin fide aşamasında daha yüksek olduğu ve zamanla kademeli olarak azaldığı görülürken, miR172 ekspresyonunun erken aşamada daha düşük olduğu ve bitki büyümesi ve gelişmesiyle birlikte giderek arttığı bulunmuştur. *Arabidopsis*'te miR156'yı aşırı ifade eden bitkiler, uzun süreli bir genç faz gösterirken miR156 bastırılmış hat, önemli ölçüde kısa genç faz göstermiştir. Yapılmış olan bu çalışmalar sonucunda miR156'nın vejetatif faz geçişinin ana düzenleyici faktörü olduğunu göstermektedir. Genç sürgünlerde miR156 seviyesi daha yüksektir ve bu da daha

düşük SPL seviyelerine neden olmaktadır. Sürgünlerin gelişimi sırasında miR156 ekspresyonunun kademeli olarak aşağı regülasyonu, SPL ekspresyonunun yukarı regülasyonuna yol açar, böylece bitkide faz geçişini indükler. Gelişimsel geçişin doğru zamanlaması, bitkilerin hayatta kalma ve üreme başarısı için kritiktir. Faz geçişi, çeşitli bitkilerin genç ve yetişkin beslenme aşamaları arasındaki miR156 ekspresyonu ile düzenlenir (Jeyakumar ve ark., 2020).

Wang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada miR156 geninin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak *Populus canadensis*'te SPL geninin transkripsiyonunu azaltmış ve genç faz evresini uzattığını bulmuşlardır (Wang ve ark., 2011).

Türler arasındaki morfolojik çeşitliliğe rağmen miR156-SPL yolağı, heteroplastide bir ana anahtar olarak korunmuş gibi görünmektedir. Bu aynı zamanda *Arabidopsis*'te trikoma dağılımının zamansal kontrolünde ve *Cardamine hirsuta*'da yaprakların yaşa bağlı düzenlenmesinde ortaya çıkarmıştır. Ortaya konulmuş bu bulgularla miR156 ve miR172'nin ilgili hedefleriyle hem vejetatif hem de üreme olgunlaşmasında işlev gördüğünü ve farklı genetik yollarla düzenlenmesine rağmen bu iki gelişimsel geçiş arasında yakın bir bağlantı olduğu ortaya çıkarılmıştır (Jeyakumar ve ark., 2020).

Arshad ve arkadaşları yüksek sıcaklık altında yetiştirilen alfalfa bitkilerinde miR156'nın proteomik değişimleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Kontrol örnekleri ile miR156 ekspresyon seviyesi artırılmış bitkiler 24 saat boyunca 40 derece altında yetiştirildiklerinde mutant bitkilerde kontrole göre prolin ve antioksidan seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca mutant bitkide SPL proteini, MYB transkripsiyon faktörü, etilen transkripsiyon faktörü, ABA cevap faktörü ve Zing Finger transkripsiyon ailesinin ekspresyon seviyelerinin arttığı elde edilmiştir. miR156'nın yüksek sıcaklıkta protein ekspresyonunda pozitif bir sonuç verdiği ve bitkide abiyotik strese önemli etkilere yol açtığı gibi kuraklık stresi ile tuz stresinde oldukça etkili olduğu savunulmuştur (Arshad ve ark., 2020).

miR156 ve SPL geni bitkiler üzerinde bitki gelişiminde, patojenlere karşı oluşturulan cevaplarda ve strese çok önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle miR156 biyotik ve abiyotik stres toleransı arasındaki denge ilişkisinde önemli bir rol göstermektedir (LuZang ve ark.,2019). *Arabidopsis* üzerinde Cadmium

stresinde yapılan bir çalışmada; miR156'yı aşırı ifade eden bitkilerin, daha uzun birincil köklere, daha yüksek biyokütle üretimi ve klorofil birikimi ile Cd stresine karşı daha yüksek tolerans sergilediğini ortaya koymuşlardır. Bunun aksine, miR156 ekspresyon seviyesi az olan bitkiler Cd stresine duyarlılık göstermiştir (LuZang ve ark.,2019).

Çeltikte kuraklık stresi altında stres ile ilişkili olan miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde artış görülürken OsmiR156d ve OsmiR156g profillerinin kuraklık stresinde gen ifadesinde azalış olduğu tespit edilmiştir (Bae, 2019).

Bitkilerdeki gençlikten yetişkinliğe geçiş, bitkisel büyüme ve bitki gelişim dönemleri değişiklik içerir ve bu gelişim dönemleri arasındaki geçişin zamanlanması tarım için önemli sonuçları oluşturur. miR156, bitkilerdeki bu geçişi ve sürgün olgunlaşmasını düzenlemektedir (Coi ve ark., 2020).

Yangtuo Coi ve arkadaşları Like-Heterokromotin Protein 1 (OsLHP1) üzerine yaptıkları bir araştırmada *Arabidopsis thaliana*'da, histon H3 trimetilasyonunun MIR156a/c lokusundaki lizin 27 (H3K27me3) üzerinde birikmesi, gelişim aşamasına bağlı olarak Pol-ycomb baskılayıcı kompleks 1 (PRC1) veya PRC2 tarafından düzenlendiğini belirtmişlerdir. OsLHP1 fonksiyonunun kaybı, miR156b/c/i/e'nin anormal ekspresyonuna bağlı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu fonksiyon kaybı, *Oryza sativa*'nın fonksiyonel olarak *Arabidopsis* LHP1'den farklı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, OsLHP1 – miR156 – SPL yolağının düzenlenmesi vejetatif dönemin ve bitki gelişim dönemlerinin değişmesini sağlayabileceğini ortaya koymuşlardır (Coi ve ark., 2020).

Ürünlerin yetiştirilmesinde miR156 / SPL proteini düzenleyici yolağını değiştiren nicel özellik lokusları (Quantitative trait loci, QTL)'ler ideal bitki yapısı (ideal plant architecture 1, IPA1), Squamosa promoter-binding-like protein 16 (GW8/SPL16)ve Squamosa promoter-binding-like protein 13 (GLW7/SPL13) kullanımları, bitki gelişim dönemlerini ve tane boyutunu organize ederek tahıl verimini büyük ölçüde iyileştirdiği belirtilmiştir (Miao ve ark., 2019).

Çeltik üzerine yapılmış olan çalışmada, miR156'nın tohum dormansisini geliştirdiğini ve tohum gelişimini olumlu yönde etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, yapılan çalışmada, miR156'nın, GA yolundaki IPA1 ve birçok ifadesi

azalan genler aracılığı ile tohum dormansi halini ve fide büyümesini düzenlediğini göstermişlerdir. ABA, bitkinin abiyotik ve biyotik streslere adaptasyonunu artıran önemli stres fitohormonudur. miR156abcdghijkl ve miR156abckl'de tohumlarda azalmış ABA seviyeleri göstermiş ve azalmış olan ABA seviyeleri, miR156 mutantlarında bozulmuş GA yolağı oluşturmuştur. Bozulmuş GA yolu ile, miR156 mutasyonlarının yapraklarda terlemeyi, su kaybı oranlarını düşürdüğünü ve fidelerin kuraklık stresi toleransının iyileştirildiği bulunmuştur. GA yolağındaki eksiklik abiyotik stres direncini artırabileceğini ileri sürmüşlerdir (Miao ve ark., 2019).

2.5.1 miR159

miR159 bitkilerde MYB transkripsiyon ailelerini hedef alarak özellikle gibberellin-ilişkili alfa-amilaz ekspresyon (GAMYB) gen ailesine, çiçeklenme ve male-steril (erkek verimlilik) özelliğine etki etmektedir. miR159-GAMYB ilişkisi özellikle *Arabidopsis* ve çeltik bitkilerinde tanımlanmıştır.

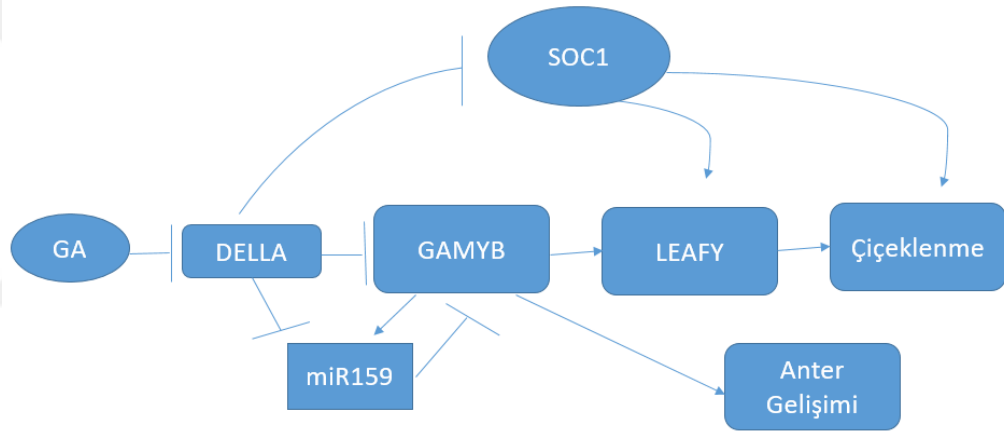
GAMYB gen ailesi, hem tohumlarda hem de anterlerde gibberellin (GA) sinyallerinin önemli ileticisi olarak hareket eden R2R3 MYB transkripsiyon faktör gruplarını kodlamaktadır. Bununla birlikte, miR159'un yokluğunda, düzensiz GAMYB ekspresyonu, istenmeyen fenotiplerin oluşmasına yol açmaktadır (Zheng ve ark., 2020).

MYB proteinleri çok geniş aileye sahiptir. Çeltik bitkisinde 183 MYB üyesi bulunmaktadır. Bazı MYB aileleri örneğin; OsMYB30, OsARM1, OsMYB2, OsMYB91 ve OsMYB1 bitki büyümesi, gelişmesi ve abiyotik strese karşı oluşturulan savunma mekanizmalarının düzenlenmesinde çok önemli rollere sahiptir. Özellikle OsMYB6 kuraklık ve tuzluluk stresine karşı kritik bir role sahiptir. Çeltik üzerine yapılan bir çalışmada OsMYB6'nın aşırı ekspresyonu kuraklık ve tuzluluğa karşı bitkinin direncini arttırmış ve kontrol grupları ile transgenik bitkiler karşılaştırıldığında MYB6 ekspresyonu artan transgenik bitki yapraklarındaki kıvrılma ve yaşlanma azalmıştır (Tang ve ark., 2019).

miR159a ve miR159b (miR159ab) çift mutant içeren bitkilerde, kıvrılmış yapraklar ve bodur bitki boyu olmak üzere bitkide ciddi büyüme ve gelişimsel kusurlar ortaya konulmuştur. Ayrıca miR159'un aşırı eksprese olması

anter gelişimini de etkilemekte ve miR159 polen doğurganlığında çok önemli bir rol oynamaktadır. Polenle taşınan miR159, döllemeden sonra merkezi hücrede MYB33 ve MYB65 ekspresyonunu ortadan kaldırarak endosperm nükleus bölünmesini ve tohum gelişimini teşvik etmektedir. miR159, GA destekli yapraklarda yer alan proteinleri kodlayan GAMYB ile ilişkili genlerin mRNA'sını doğrudan etkileyerek kısa günlük fotoperiyodu ve gelişmeyi düzenlemektedir. İlave olarak miR159-MYB33, ilişkisi Arabidopsis'te vejetatif faz değişikliğinin bir modeli olarak da işlev gördüğü ortaya çıkarılmıştır (Jin-Feng Chen ve ark., 2020).

miR159'un GAMYB geni üzerine etkisi ile dolaylı yoldan çiçeklenme ve anter gelişimi üzerine etkileri Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. miR159 ve GAMYB ilişkisi (Achard ve ark., 2004'den düzenlenmiştir).

Anter çiçek entegratör geni (SOC1), Giberellin (GA); Giberellin negatif düzenleyici protein (DELLA), gibberellin-ilişkili alfa-amilaz ekspresyon geni (GAMYB), çiçek meristem kimlik geni (LEAFY).

GA-DELLA sinyalizasyon sistemi miR159 / GAMYB ve SOC1 ile çiçek gelişimini düzenlemektedir. GA-DELLA sinyal yolu aracılığıyla kısa gün fotoperiyotlarında çiçek gelişiminin düzenlenmesini Şekil 12'de detaylı olarak gösterilmiştir. Burada GA, GAMYB (ör. MYB33) ve SOC1'in DELLA baskılanmasını hafifleterek çiçek meristemini düzenleyen LEAFY geninin aktivitesini arttırmaktadır. Bu aktivasyon, GAMYB transkript seviyelerinin transkripsiyon sonrası düzenleyicisi olan miR159'un GA aktivasyonu ile yönetilmektedir. GA'ya bağlı homeostatik mekanizma, GAMYB seviyelerinin düzenlenmesi yoluyla kısa gün fotoperiyotunda çiçek geçişinin ve anter

gelişiminin hassas bir şekilde düzenlenmesini sağlamaktadır (Achard ve ark., 2004).

Oryza sativa ile yapılmış olan bir çalışmada, kontrol bitki ile Short Tandem Target Mimic (STTM) transgenik çeltik bitkisinde miR159 seviyeleri ve kök, gövde, yaprak, tohum gibi bitkinin farklı yapılarındaki miR159 seviyeleri ile GMYB seviyelerine bakılmıştır. Sonuç olarak miRNA aktiviteleri azaltılmış olan transgenik bitkilerde miR159 ve OsGAMYB ekspresyonlarının azaldığı görülmüş özellikle miR159 seviyeleri kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında; kök, yaprak, salkım, spikelet ve tohumda eşit seviyede gözlemlenirken STTM transgenik bitkide en az salkım yapısında gözlemlenmiştir. Bitkinin tohum, yaprak ve uzunluğuna bakıldığında kontrol örneklerinde miR159 seviyesi normal iken tohum yapısı daha büyük, yapraklar daha geniş ve bitki boyunun daha uzun olduğu ortaya konulan bulgular arasındadır (Zhao ve ark., 2017).

Piriformospora indica bitki köklerinde çevresel strese bitkiye tolerans sağlayan bir mantar türüdür. Fard ve arkadaşları *Oryza sativa* bitkisinde kuraklık stresi altında *Piriformospora indica* uygulanan bitkiler ile kontrol bitkileri arasında kuraklık ve tuzluluk stres cevaplarına etkisi olan önemli 2 miRNA değişimlerini incelemişlerdir. Sonuç olarak miR159 ve miR396'nın kuraklık stresinde sırası ile gen ifadelerinin arttığı ve azaldığı bulunmuştur. Ancak *Piriformospora indica* ile birlikte kuraklık stresine maruz bırakılan çeltik bitkisinde her iki miRNA'nın da ekspresyon seviyelerinin artışı gözlemlenmiş bunun sonucunda; hiposensivite, bitki büyümesinin düzenlenmesi ve kuraklık stresine cevap yolları ile doğrudan ilişkili olan MYB ve GRF transkripsiyon faktörlerine miR159 ve miR396'nın doğrudan etki ettiğini ortaya koymuşlardır (Fard ve ark., 2017).

Tuzlulukla ilişkili miRNA profilleri çıkarılan darı bitkisinde RNA sekanslama (RNASeq) ve Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre 448 miRNA grubu içinden 81 tanesinin stresle ilişkili olduğu bulunmuştur. Bunların içinden miR159 tuz stresinde ekspresyonu en fazla artan miRNA olarak raporlanmıştır. miR159 ekspresyonu artış gösterirken MYB transkripsiyon faktörünün ekspresyon seviyesi buna bağlı olarak azalış göstermiştir (Shinde ve ark., 2020).

Sinningia speciosa, (menekşe) ile yapılan çalışmada miR159'un çiçeklenme zamanına nasıl etki ettiğini tanımlamak için transgenik hale getirilen menekşeler ile kontrol grupları arasında karşılaştırma yapılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda; miR159'un 8 miRNA ailesinden en fazla korunan miRNA olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak miR159'un GAMYB ekspresyonunu düzenlediği ve çiçeklenme zamanına doğrudan etki ettiği ortaya çıkarılmıştır. miR159 seviyesi bastırılmış olan bitkilerde kısa gün fotoperiyodunda 20 günde çiçeklenme görülürken, miR159 ekspresyon seviyeleri yüksek olan bitkiler kısa gün fotoperiyodunda 37 günde çiçeklenme göstermiştir (Xiaoyan Li ve ark., 2013).

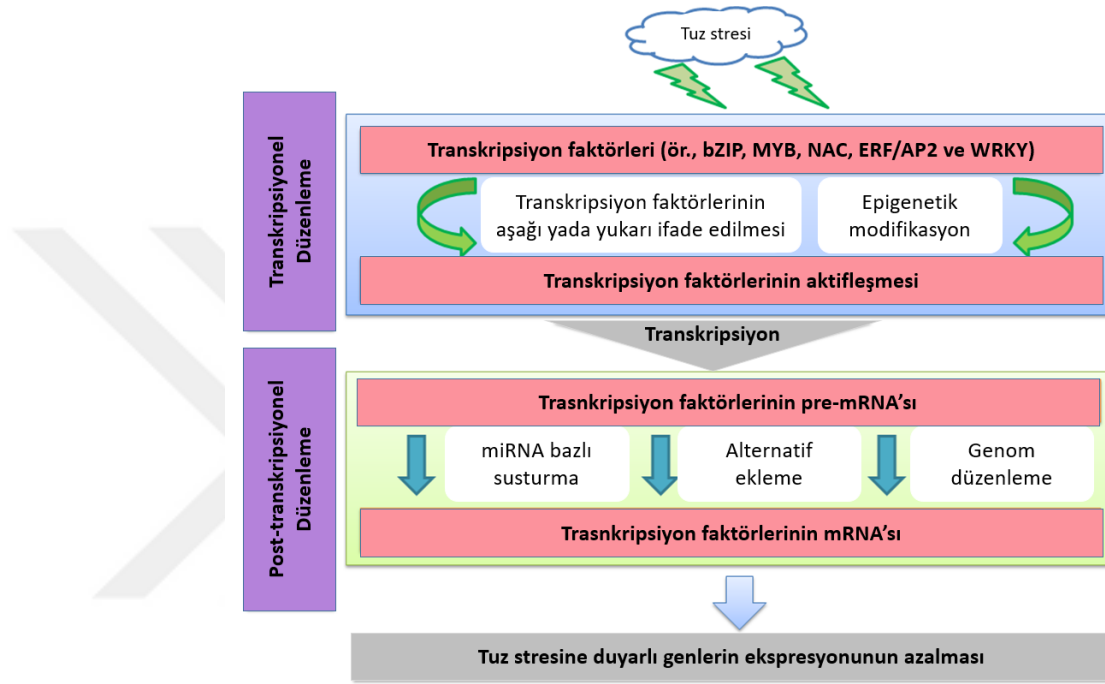
Oryza glaberrima ile yapılmış olan çalışmada 48 saat 200 mM tuzluluk stresi altında etki gösteren miRNA'ları RNAseq çalışması ile toplamda 29 bilinen ve 32 adet yeni düzenlenen miRNA olarak tanımlamışlardır. Sekans sonuçları ve qRT-PCR sonuçlarından elde edilen bulgular benzer sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlara göre miR159 ekspresyonu tuz stresi altında artış gösterirken, miR159'un hedef aldığı MYB transkripsiyon faktör ailelerinin ekspresyon seviyelerinde düşüş görülmüştür (Mondal ve ark., 2018).

Kumar Mondal ve arkadaşları *Oryza coarctata* üzerine yaptıkları benzer bir çalışmada miR159 ekspresyon seviyesinin 24 saat 450 mM NaCl altında yetişmiş olan bitkilerde up-regule olduğunu bulmuşlardır (Mondal ve ark., 2015).

Tao Xue ve arkadaşları *Arabidopsis* primer kök gelişimi üzerine yaptıkları bir çalışmada miR159'un yeni bir görevini ortaya koymuşlardır. Kök gelişiminde rol alan miRNA'ların dışında miR159'un primer kök gelişiminde, kök uzunluğunda etkisinin olduğunu savunmuşlardır. MYB65 geni transfekte edilen bitkiler ile kontrol grupları arasında kök gelişimleri karşılaştırıldığında transgenik bitkilerde köklerin daha uzun olduğu ortaya konulmuştur. Aynı şekilde MYB33 ve MYB101 ile transgenik hale getirilen bitkilerde de kontrol örneklerine göre daha uzun kök yapılarına saptanmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda miR159'un daha önce tanımlanmamış bir etkisini ortaya çıkarmışlardır (Tao Xue ve ark., 2017).

Tuz stresinin bitkide transkripsiyon ve post-transkripsiyon seviyelerinde gen ifadelerinde değişim oluşturduğu ortaya konulmuştur. *Arabidopsis*'te bZIP, MYB, NAC, ERF/AP2 ve WRKY gibi transkripsiyon faktörlerinin tuz stresine

maruz kalmış bitkilerde gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol aldığı belirtilmiştir. Transkripsiyon seviyesinde gen ifadesine etki eden diğer unsurun da epigenetik modifikasyonların olduğu belirtilmiştir. Tuz stresinde post-transkripsiyon seviyesinde gen anlatımının değişimine etki eden unsurlar ise RNAi molekülleri, alternatif splicing ve genom düzenleme (genome editing) olduğu aşağıdaki Şekil 13’ te özetlenmiştir (Singh ve Roychoudhury 2021).



Şekil 13. Bitkilerde tuz toleransının transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlemesini gösteren model (Singh ve Roychoudhury 2021).

Transkripsiyon faktörleri ya epigenetik olarak modifiye edilir ya da tuz stresinin algılanması üzerine ekspresyon seviyeleri yukarı veya aşağı regüle edilir. Transkripsiyon faktörlerinin pre-mRNA'sının sentezini takiben, transkripsiyon faktörlerinin olgun mRNA'sını elde etmek için miRNA temelli susturma, alternatif splicing veya genom düzenleme gibi farklı mekanizmalar yoluyla transkripsiyon sonrası düzenlemeye tabi tutulurlar ve bu da tuz stresine duyarlı genlerin ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır (Singh ve Roychoudhury 2021).

2.5.2 miR169

Nuklear Transkripsiyon faktörü (NF) bitkiler üzerinde, yaprak gelişimi, kuraklık direnci ve tuz stresine oluşturulan direncin düzenlenmesi gibi oldukça

önemli rollere sahiptir. Nüklear transkripsiyon faktör Y kompleksi (NF-Y), heme aktivatör protein (HAP) yada CCAAT bağlama kutusu (CBF) olarak da bilinmektedir (Pereira ve ark., 2018). CCAAT ökaryotik promoterlerdeki en yaygın unsurlardan biridir. Tüm ökaryotik genlerin % 30'unda bulunur ve transkripsiyon başlangıç bölgesinin (TSS) 80 ila 100 baz çifti (bp) yukarısında bulunmaktadır. NF-Y üç alt birim içerir. Bunlar; NF-YA, NF-YB, ve NF-YC' dir. Tümü DNA bağlanması için gereklidir. *Arabidopsis*'te, NF-YA alt birimini kodlayan 10 gen, NF-YB alt birimi için 10 gen ve NF-YC alt birimi için 9 gen varken çeltik bitkisinde 10 gen NF-YA, 11 gen NF-YB, 7 gen NF-YC kodlamaktadır. Bitki NF-Y genlerinin tümü, DNA bağlanması ve protein-protein etkileşimlerinden sorumlu olan evrimsel olarak korunmuş bir alan içerirken amino asit sekansında çeşitli korunmamış bölgeler içermektedir (Zhao ve ark., 2009).

NF-YA genleri *Arabidopsis*'te gametogenez, embriyogenez, tohum ve çiçeklenme gelişiminde görev alırken, NF-YB; embriyogenez, tohum ve nodül gelişimi, çiçeklenme zamanı, kloroplast biyogenezi, hücre çoğalması, endosperm gelişimi, kök uzaması, fotosentezden görev alır. NF-YC ise çiçeklenme zamanının kontrolü, nodül kontrolü ve kök gelişiminden sorumludur (Pereira ve ark., 2018).

NF'ler ABA yolağı ile miR169 ailelerinin hedefi olarak biyotik ve abiyotik strese karşı bitki direncini düzenlerler. Bitkiler üzerinde miR169 ile yapılmış olan çok farklı çalışmalar bulunmaktadır. miR169c'nin domatestede aşırı ekspresyonu, Çoklu İlaça Dirençli protein-1'in (Multi-Drug Resistant protein-1) post-transkripsiyonel olarak düzenlenmesi yoluyla stomatal açıklığı düzenlediği ve dehidrasyon toleransı sağladığı bulunmuştur.

Arabidopsis'te miR169'un aşırı ifadesi, strese yanıt olarak erken çiçeklenme oluşturmuş ve AtNF-YA2 transkripsiyon faktörünü baskılayarak kök yapısının düzenlendiği ortaya konulmuştur. Ek olarak, miR169a ve miR169i'nin *Arabidopsis*'te NF-YA5 gen bölgesini hedefleyerek kuraklık stresine toleransı düzenlediği bildirilmiştir. Osa-miR169g ve osa-miR169n/o'nun yüksek tuzlulukta ekspresyon seviyesinin arttığı elde edilmiş ve yüksek tuzluluk stresine yanıt olarak NF-YA8'i parçaladığı bulunmuştur. miR169a'nın aşırı ekspresyonu, farklı *Magnaporthe oryzae* suşlarında aşırı duyarlılık ile sonuçlanmıştır. miR169o'nun aşırı ifadesi çeltikte bakteriyel

yıkıma duyarlılık oluştururken, domateste miR169 gri küflere karşı direnci artırdığı bulunmuştur (Rao ve ark., 2020).

Oryza sativa bitkilerinde tuzluluk stresi altında NF-YA transkripsiyon faktörlerinin etkileri incelendiğinde miR169g ve miR169n'nin çeltikte tuzluluğa duyarlı miRNA'lar olduğu belirlenmiştir. Absisik aside duyarlı element (cis-acting abscisic acid responsive element, ABRE)'nin varlığı miR169n'nin upstream bölgesinde bulunmuştur. Bundan dolayı miR169n'nin ABA tarafından düzenlenebileceğini ileri sürmüşlerdir. Zhao daha önce yapmış oldukları benzer çalışmalarda miR169g'nin dehidrasyona duyarlı bir element (DRE) aracılığıyla kuraklıktan kaynaklanan ozmotik stres tarafından indüklendiğini bulduklarını öne sürmüşlerdir. Bu nedenle, yapmış oldukları çalışmada miR169 ailesinin kuraklığa ve tuz stresine hem benzer hem de farklı tepkiler gösterdiğini savunmuşlardır (Zhao ve ark., 2009).

Yan Li ve arkadaşları patlama mantarı *Magnaporthe oryzae*'ya maruz kalan çeltik bitkisinde miR169'un bitki koruma mekanizmaları üzerinde nasıl etkileri olduğunu araştırmışlardır. *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101 suşu) aracılı transformasyon yoluyla p35S:MIM169a bitkilere transfekte edilerek transgenik bitki elde edilmiştir. Kontrol ve transgenik bitkiler *Magnaporthe oryzae* maruz bırakıldıktan sonra miR169 seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Sonuç olarak miR169'un patlama mantarına karşı çeltik bitkilerinde bitki koruma mekanizmaları üzerinde negatif düzenleyici olduğu bulunmuştur. miR169a'nın aşırı ifade edilmesi, hedef genlerinin baskılanmasına ve *M. oryzae*'ye duyarlılığın artmasına yol açmıştır (Yan Li ve ark., 2017).

Arabidopsis'te kuraklık stresine karşı mir169 ekspresyonu incelendiğinde; mir169 susturulmuş olan bitkilerde doğrudan NFYA5 genine etki ettiği için nfya5 protein ekspresyonu inhibe edilmiş bunun sonucunda bitkilerin kuraklığa karşı hassasiyetlerinin arttığı tespit edilmiştir. NFYA5 aşırı eksprese edilen bitkiler kuraklığa daha duyarlı hale geldikleri tespit edilmiştir (Li ve ark., 2008).

Soya fasulyesi ve mısırlarda tuzluluk, kuraklık ve soğuk stresi altında miR169 ekspresyonundaki değişimler gözlemlendiğinde Yun Xu ve arkadaşları soya fasulyesinde tuz stresi altında yetişen bitkilerde özellikle en fazla artışın miR169d'de olduğunu gözlemlemiştir. Bunu takiben tuz stresi altında en fazla artış gösterenler sırası ile miR169k/l, miR169n, miR169c ve miR169i'dir. Mısır

bitkisinde ise miR169c ve miR169m/n/q tuz stresinde artış göstermiştir. Genel olarak 3 stres koşullarında da miR169 ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada transgenik *Arabidopsis*'lerde çiçeklenme zamanları da karşılaştırılmıştır. Transgenik bitkilerde çiçeklenmenin teşvik edildiği ancak bu erken çiçeklenmenin fotoperiyottan etkilenmediği gözlemlenmiştir (Xu ve ark., 2014).

Zhao ve arkadaşları çeltik bitkisini 150 mM NaCl konsantrasyonunda 0, 0.5, 2, 6, 24 ve 48 saat yetiştirdikten sonra miR169'un etkilerini incelemişlerdir. miR169'un geniş bir aileye sahip olduğunu ve 17 bilinen alt üyesinin olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, miR169g ile birlikte miR169n ve miR169o'nun yüksek tuzlulukla indüklendiği bulunmuştur. miR169n ve miR169o, bir miRNA gen kümesinde konumlandırıldığında yukarı akış bölgesinde sırasıyla dehidrasyona duyarlı element (DRE) ve ABRE cis-hareket elementleri olduğunu ve NF-YA transkripsiyon faktörünün, tuzla indüklenebilir miR169 üyelerinin hedef geni olduğunu göstermişlerdir. Yapılan çalışmaları *Arabidopsis* miR169 ile karşılaştırdıklarında ath-miR169'un da yüksek tuzda indüklendiği bulunmuştur (Zhao ve ark., 2009).

Oryza sativa Nipponbare'de nitrojen (N) açlığı altında küçük RNA molekülleri, mRNA ve lncRNA'lar RNASeq ile ortaya çıkarılarak stres altındaki değişimleri incelendiğinde küçük RNA-Seq verilerinin analizi, N açlığa duyarlı miRNA'ları ve miR169 aile üyelerinin gen ifadelerinin azaldığını belirlemişler ve RNA-Seq ile qRT-PCR çalışmaları yapılarak NF-YA'nın baskılanmasına neden olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmada bitkinin kök ve sürgünleri üzerine analizler yapılmış ve miR169'un ekspresyonu köklerde stres arttıkça azalış gösterirken, sürgünlerde stresle doğru orantılı miR169'un ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (Shin ve ark., 2018).

Kushawaha ve arkadaşları çeltikte yüksek sıcaklık ve farklı ışık koşulları altındaki strese bağlı olarak miR169 ekspresyonundaki değişimi incelemişlerdir. miR169'un çeltik miRNA'ları arasında en fazla korunmuş miRNA ailesi olduğunu ve çeşitli abiyotik stres altında farklı etkiler gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmadan elde edilen verilere göre miR169'un NF-Y transkripsiyon seviyelerini negatif düzenlediğini ve bunun sonucunda bitkinin primer kök gelişimi, tohum gelişimi, çiçeklenme, gametogenez, ABA sinyal

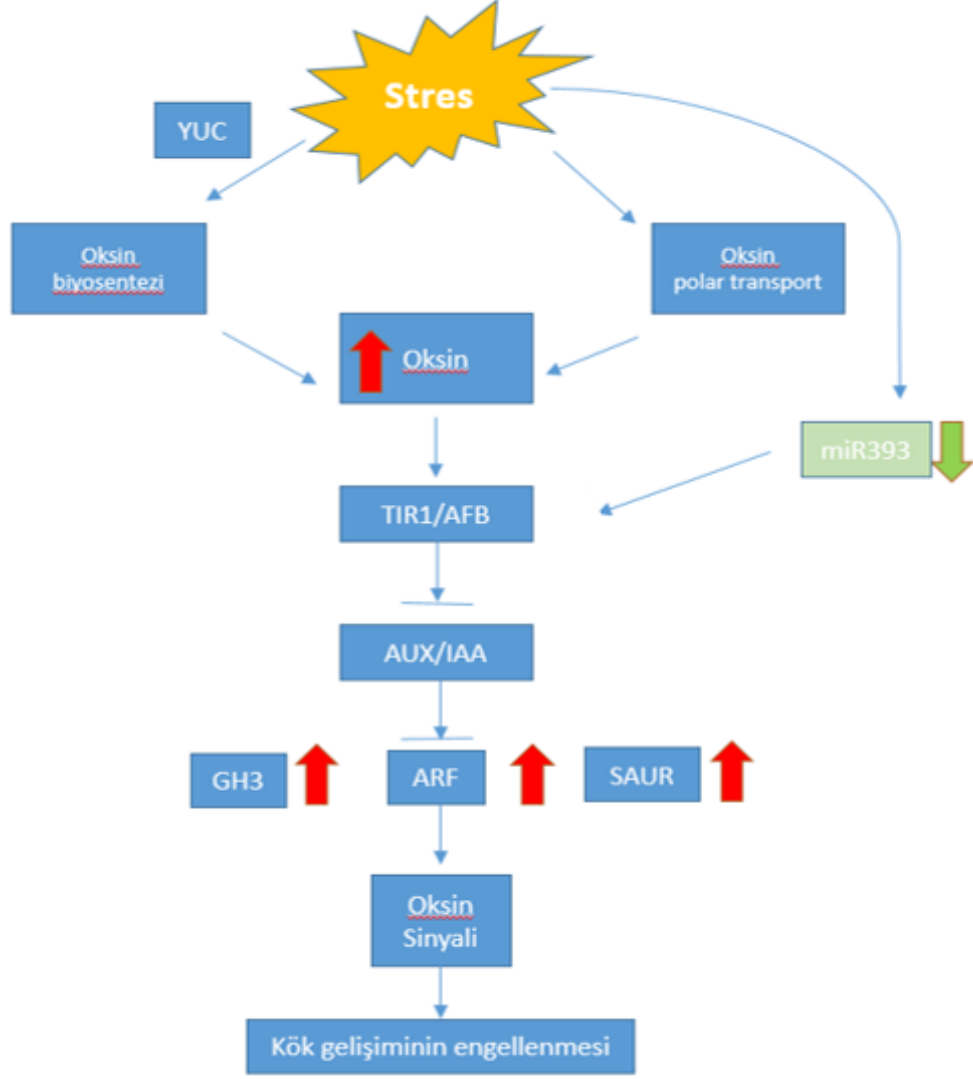
yolağı ve ısıya, kuraklığa, ışık stresine geliştirilen cevapların düzenlenmesinin etkilendiğini belirtmişlerdir (Kushawaha ve ark., 2019).

Stres koşulları altında miRNA profillerinin bitkilerdeki çiçeklenme etkisi üzerine yapılmış olan bir çalışmada miR169'un soğuk, kuraklık ve tuz stresi altında artan ekspresyon seviyesinin erken dönemde çiçeklenme oluşumunu tetiklediği öne sürölmektedir. miR169'un hedef aldığı transkripsiyon faktörü NF-Y2 normalde çiçeklenme lokusu C'yi (FLC) aktiveleştirerek, çiçeklenmeyi geciktirmektedir ancak miR169 ekspresyonu arttığında NF-Y2 bozulur ve erken dönemde çiçeklenen fenotipler ortaya çıkmaktadır (Kazan ve Lyons, 2015).

2.5.3 miR393

miR393; transport inhibitor yanıt 1 (TIR1) ve oksin sinyal F-BOX (AFB) proteinlerini doğrudan hedef alan küçük RNA molekülüdür. Bitkilerde kök gelişiminin düzenlenmesinde görev alan bu proteinler stres altında miR393 ekspresyonundaki değişime bağlı olarak kök gelişiminin düzenlenmesini değiştirirler.

Şekil 14' te miR393'ün stres altında bitkide hangi yollara etki ederek kök gelişimini nasıl etkilediği açıklanmıştır.



Şekil 14. miR393'ün arpa bitkisinde kök gelişimi üzerine etkisi (Bai ve ark., 2016'den düzenlenmiştir).

Yucca geni (YUC); taşıma inhibitörü yanıt proteini 1 (TIR1), oksin-sinyal F-box protein (AFB), Oksin (AUX); İndol asetik asit (IAA); Oksin cevap faktörü (ARF), oksin cevap genleri (SAUR ve GH3).

miR393 ekspresyonu, hedef genleri TIR1 / AFB'nin ekspresyonunu yükselten ve kök apeksinde (AUX / IAA gibi oksine duyarlı genlerin ifadesindeki artış ile karakterize edilen) oksin sinyallesini uyararak stres tarafından gen ifadesi azalır. SAUR, GH3 ve ARF, böylece kök uzamasının engellenmesine yol açar (Bai ve ark., 2016).

Iglesias ve arkadaşları, NaCl stresinin, at-miR393a'nın transkripsiyonunu artırarak miR393 ekspresyonunu indüklediğini ve TIR1 ile AFB2 reseptörlerinin seviyelerinde azalmaya yol açtığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, NaCl etkisi altında Aux / IAA baskılayıcılarının stabilizasyonunu tetikleyerek oksin sinyallesinin azalmasına yol açmış ayrıca, miR393'ün

tuzluluk sırasında lateral kök (LR) başlangıcının, ortaya çıkmasının ve uzamasının baskılanmasına neden olduğu belirtilmiştir. miR393ab mutant bitkileri, tuzluluk sırasında kontrol bitkilerle karşılaştırıldığında LR'lerde yüksek seviyelerde reaktif oksijen türleri (ROS) ve azaltılmış askorbat peroksidaz (APX) enzimatik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu nedenle TIR1 ve AFB2 reseptörlerinin miR393 regülasyonu, *Arabidopsis*'te tuzluluğa alışma sırasında doku ve zamana özgü büyüme yanıtlarını ve toleransı koordine etmek için oksin sinyalleme ve spesifik redoks ilişkili bileşenler arasında kritik bir kontrol noktası olabileceği vurgulanmıştır (Iglesias ve ark., 2014).

Arabidopsis ile yapılmış olan farklı bir çalışmada Chen ve arkadaşları pmiR393a, pmiR393b ve TIR1 ile transgenik hale getirilen hatlarda ve kontrol örneklerinde 200mM NaCl stresi altında miR393'ün etkilerine gösterdiğini, miR393 ve hedef TIR1'in tuz stresi yanıtlarında yer aldığını ve hem miR393 hem de hedef TIR1'in NaCl muamelesinden sonra ekspresyon seviyelerindeki artışı Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time Polymerase Cycle Reaction (qPCR)) ile göstermişlerdir (Chen ve ark., 2014).

C kinaz 1'i aktive eden protein yapı reseptörü (Scaffold protein Receptor for Activated C Kinase 1) (RACK1) bitki stres hormonları ile ABA yolağının negatif düzenleyicisi iken oksin yolağının pozitif düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. RACK1'in *Homo sapiens*, *C.elegans*, *Arabidopsis* gibi pek çok organizmada miRNA biyogenezi ile ilişkili olduğu tanımlanmıştır. RACK1 proteini; sinyal transdüksiyonu, transkripsiyon düzenlenmesi, büyüme hormonları, kuraklık ve tuzluluk, stres kondisyonlarının kontrol edilmesi, immunité ve yaşlanma gibi çeşitli sinyal yollarını etkilemektedir.

Gao ve arkadaşları 150 mM ve 75mM NaCl stresi altında yetiştirilmiş olan *Oryza sativa* ve *A.tumafaciens* aracılığı ile *Nicotiana benthamiana* bitkilerine osa-miR393 transfekte edilerek elde ettikleri mutant bitkilerde miR393 ekspresyon seviyelerini incelenmişlerdir. Sonuç olarak; tuz stresi arttıkça çeltik bitkilerinin kök uzunlukları ve bitki boyları kısalmıştır. miR393 ekspresyon seviyesindeki artış bitkide stres altında negatif etki gösterdiği belirtilmiştir. Çeltik ve *Arabidopsis*'te osa-miR393 aşırı ifade edildiğinde, transgenik bitkiler tuzluluk ve alkali strese karşı artan bir hassasiyet göstermiş bu sonuçlara göre osa-miR393'ü bitkide tuz stres tepkilerinin negatif düzenleyicisi olarak tanımlamışlardır (Gao ve ark., 2011).

Farklı çevresel stres koşulları altında *Oryza sativa* ile yapılmış olan çalışmada yanal köklerin gelişimi üzerine etkili olan miR390 ve miR393'ün rolleri incelenmiştir. Bunun için kuraklık, tuzluluk, ultra viyole ışınları (UV), patojen, yüksek metal stresi altında yetiştirilen bitkilerden elde edilen miR390 ve miR393 qPCR örnekleri vektöre aktararak transgenik bitki eldesinde kullanılmıştır. Sonuç olarak miR390 eksprese eden bitkide yanal köklerin oluşumunda olumlu bir etki oluşurken, miR393 eksprese eden bitkilerde miR393'ün hedef aldığı OsTIR1 ekspresyonu azalarak yanal kök oluşumu negatif etkilendiği gözlemlenmiştir (Yuzhu Lu ve ark., 2018).

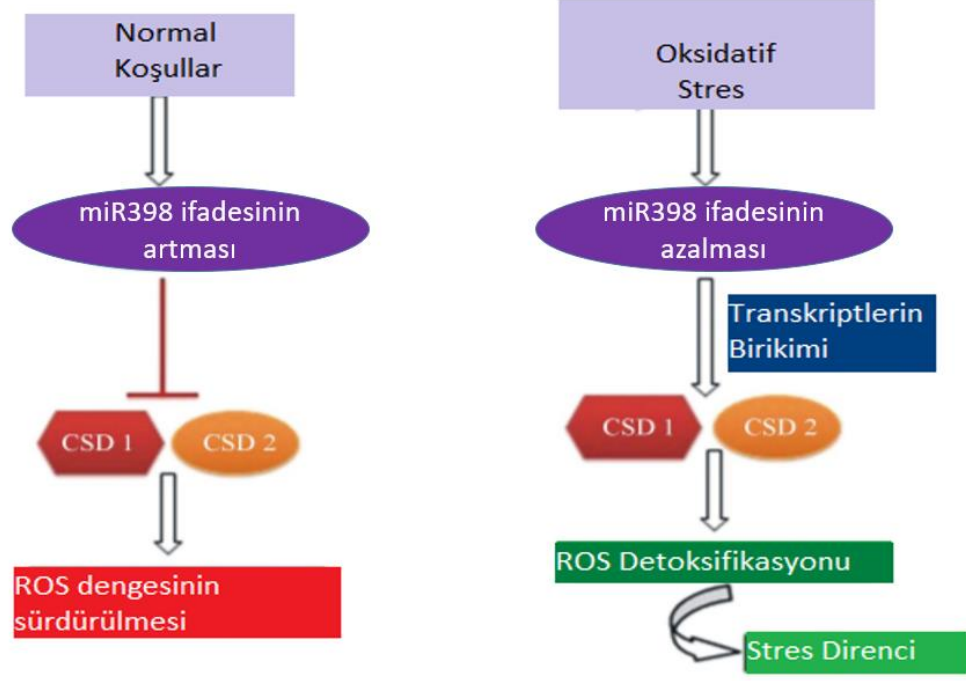
Junming Zhao ve arkadaşları *Oryza sativa* ile yapmış oldukları bir çalışmada osa-miR393 ile transgenik hale getirilen bitkilerde tuzluluk kuraklık ve sıcaklık altında bitki fizyolojisindeki değişimleri incelediklerinde kontrol örneklerine göre elde ettikleri transgenik bitkilerde (miR393 ekspresyon seviyesi fazla olan bitkiler) kök gelişimleri oldukça fazla olup, yaprak gelişimleri de transgenik bitkilerde daha uzun bulunmuştur. Kontrollere kıyasla Na⁺ ve K⁺ alımında transgenik bitkilerin nasıl performans gösterdiğini araştırmak için, normal koşullar altında ve 200 mM NaCl uygulanmış bitkilerde kök ve sürgünlerin Na⁺ ve K⁺ içerikleri ölçülmüştür. Bu deney sonucunda ilginç olarak mutant bitkilerde kontrol bitkilerine göre hem normal hem de 200 mM NaCl konsantrasyonu altında kök ve sürgünlerde daha fazla K⁺ birikimi bulunmuştur. Transgenik çeltiklerde aşırı miR393 ekspresyonu, hedeflerinin, OsTIR1 ve OsAFB2'nin transkripsiyonunun azalmasına neden olmuş ancak IAA içeriğini değiştirmemiştir, bu da oksin sinyaline hiposensitivite yoluyla kontrol tip örneklerinden daha fazla kök sürgünü oluşturmasına yol açmıştır. İlginç olarak; sadece çok yüksek pre-OsamiR393a ekspresyon seviyelerine sahip transgenik soyların kontrol bitkilere göre cüce fenotip ile sonuç verdiği bulunmuştur. pre-OsamiR393a'nın düşük ekspresyon seviyeleri, kontrol örneklerinden daha az ve daha uzun kök sürgünü sergilemiştir. miR393'ün doz etkisinin, hedef gen ekspresyonunu düzenlemede hassas ve ilginç bir rol oynayabileceğini ve böylece, konsantrasyonlarına bağlı olarak bitki hormonlarının ortaya çıkardığı etkilere benzer bir şekilde genel fenotipi etkileyebileceğini belirtmişlerdir (Junming Zhao ve ark., 2019).

Xia ve arkadaşları tuz stresi altında *Oryza sativa*'daki miR393 ekspresyonundaki değişimi incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada, iki çeltik

oksin reseptör geni OsTIR1 ve OsAFB2'nin OsmiR393 tarafından hedeflendiğini göstermişlerdir. OsmiR393'ü aşırı eksprese eden çeltik bitkilerinde iki yeni fenotip ile karşılaşmışlardır. Bu fenotipler normale göre daha fazla sürgün oluşturmuş ve erken çiçeklenme sergilemişlerdir. Daha önceden gözlemledikleri miR393'ün aşırı ifadesinde oluşan iki fenotip de tuz ve kuraklık toleransının azalması ve oksin'e aşırı duyarlılık ile sonuç vermiştir. OsmiR393 aşırı ifade eden çeltik, sentetik oksin uygulamasına aşırı duyarlılık göstermiştir. Bu duyarlılığın sebebi şu şekilde açıklanmıştır; OsmiR393'ü aşırı eksprese eden çeltiklerde, OsTIR1 ve OsAFB2 ekspresyon seviyesi azalmasına bağlı olarak oksin sinyaline karşı aşırı duyarlılık oluşmaktadır (Xia ve ark., 2012).

2.5.4 miR398

Bitkilerde miR-398, bakır (Cu)/çinko (Zn) tamamlayıcı cinsiyet belirleme genleri (CSD1 ve CSD2) hedef almaktadır. CSD1 ve CSD2 Cu/Zn içeren SOD enzimleridir ve sırasıyla sitoplazma, kloroplast ve peroksizomlarda bulunur. SOD'ları kodlayan farklı genlerin ifadeleri farklı şekilde düzenlenmektedir. *A. thaliana*'da ve çeltikte tanımlanan miR398; Cu/Zn-SOD'u kodlayan iki hedef gen CSD1 ve CSD2 transkriptlerinin bölünmesine aracılık ederek hem abiyotik hem de biyotik streslere yanıt olarak anahtar roller oynadığı belgelenmiştir (Leng ve ark., 2017). CSD1 ve CSD2, ozon, Ultraviyole ışınları B (UV-B) ve yüksek ışık seviyeleri gibi ROS birikimini tetikleyen streslere yanıt olarak gen ifadesi artmaktadır (Lu ve ark., 2011). Şekil 15'te miR398'in normal koşullar altında ve oksidatif streste nasıl etki gösterdiği görülmektedir.



Şekil 15. miR398'in bitkilerde normal ve oksidatif stres altındaki etkileri (Bej ve Basak, 2014).

CSD1: Süper Oksit Dismutaz enzimleri CSD2: Süper Oksit Dismutaz enzimleri ROS: Reaktif Oksijen Türevleri.

Şekil 15'te görüldüğü gibi normal koşullar altında miR398'in ekspresyon seviyesi yüksek iken CSD1 ve CSD2'yi baskılayarak ROS dengesinin sürdürülmesi sağlanırken oksidatif stres altında miR398'in ekspresyon seviyesi negatif etkilenir ve bunun sonucunda transkriptlerin birikimi ile birlikte CSD1 ve CSD2'nin aktifleşmesi sağlanır. CSD1 ve CSD2 aktifleştiğinde ROS detoksifikasyonu ile birlikte strese direnç oluşturulduğu gösterilmiştir (Bej ve Basak, 2014).

Yuzhu ve arkadaşları *Oryza sativa*'da tuzluluk, kuraklık, CuSO₄ stresi altında miR398, CSD1 ve CSD2 ekspresyonlarını incelemişlerdir. 400 mM NaCl 4, 8, 16, 24, 48, 72 ve 96 saat bitkilere uygulanmış, sonuçta Os-miR398 ekspresyon seviyeleri 16. saatten sonra düşüş göstermiştir. Buna bağlı olarak OsCSD1 ve OsCSD2 ekspresyon seviyeleri artış göstermiştir (Lu ve ark., 2011).

Bej ve Basak *Oryza sativa* üzerine yapmış oldukları araştırmada tuz stresi altında etkisini gösteren miRNA'ları belirlemiş ve tuz stresi altında çeltik bitkisinde sadece miR398b'nin ifadesinin azaldığını tespit etmişlerdir (Bej ve Basak, 2014).

Yong He ve arkadaşları domates bitkisinde 100 mM NaCl stresi altında yetiştirdikleri kontrol ve transgenik bitkiler arasında miR398'in ekspresyon seviyelerindeki değişimleri, miR398'in hedef aldığı proteinlerdeki değişimler ile bitkideki CAT, GR, SOD, APX, glukoz oksidaz (GOD) ve GDHAR enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuç olarak tuz stresi altında miR398b ekspresyon seviyesi düşüş göstermiştir. miR398b ekspresyon seviyesi yüksek olduğunda bitkideki CSD1 gen ekspresyon seviyesi azaldığını ve SOD aktivitesinin düştüğünü vurgulamışlardır. Ek olarak miR398b'nin APX, CAT ve GSH aktivitesini düşürdüğü ve uzun vadede H₂O₂ birikmesine yol açtığı bulunmuştur. miR398b'nin aşırı ifadesi oksidatif hasarı da arttırmıştır. miR398b'nin aşırı ifadesi, uzun süreli tuz stresinde fotoinhibisyonu indüklemiş ve fotosentezi azaltmıştır. Oksidatif stres ve fotoinhibisyonun bir sonucu olarak miR398b'nin aşırı ekspresyonu, domatesin toprak tuzluluğuna duyarlılığını arttırmıştır (Yong He ve ark., 2020).

Sunkar ve arkadaşları *Arabidopsis* 'te oksidatif stres altında miR398'in rolünü incelemişlerdir. miR398 ekspresyonunun oksidatif stres tarafından transkripsiyonel olarak ifadesinin düştüğünü bunun sonucunda CSD1, CSD2 birikimi ve oksidatif stres toleransı için önemli olduğunu göstermişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda, CSD2'nin miR398'e dirençli bir formunu aşırı eksprese eden transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin, normal bir CSD2'yi aşırı eksprese eden bitkilerden daha fazla CSD2 biriktirdiğini ve dolayısıyla ağır metaller ve diğer oksidatif streslere çok daha toleranslı olduklarını göstermişlerdir (Sunkar ve ark., 2006).

Isı stresi, bitki büyümesini, gelişimini ve üretkenliğini sınırlayan önemli bir faktördür; bu nedenle bitkiler, yüksek sıcaklık stresiyle başa çıkmak için özel uyarlanabilir mekanizmalar geliştirmişlerdir. Kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNA), birçok biyolojik süreçte önemli rol oynayan düzenleyici RNA sınıflarıdır. Genom çapında transkriptomik analizler ile çok fazla ncRNA'ların ısı stresi altında ifade edildiği ortaya çıkarılmıştır. Jianguo Zhao ve arkadaşları ısı stresi ile ilgili artan sayıda düzenleyici miRNA, siRNA ve uzun kodlama yapmayan RNA (lncRNA) gibi ncRNA'ların ekspresyonlarındaki değişimleri belirtmişlerdir. Bu inceleme sonucunda, bitkilerdeki özellikle miRNA'lar, Küçük enterferans yapan RNA (siRNA'lar) ve bunların hedeflerindeki ısı stresi yanıtlarında ncRNA'ların rolüne değinmişlerdir. miR398-CSD / CCS-HSF,

miR396-WRKY6, miR159-GAMYB ve TAS1-HTT-HSF yolları bitki ısı toleransının düzenlediğini ortaya çıkartmışlardır. Araştırma sonucu miR398'in ısı stresi altında *Oryza sativa*'da ekspresyonunun düştüğü belirtilmiştir (Jianguo Zhao ve ark., 2016).

2.5.5 miR820

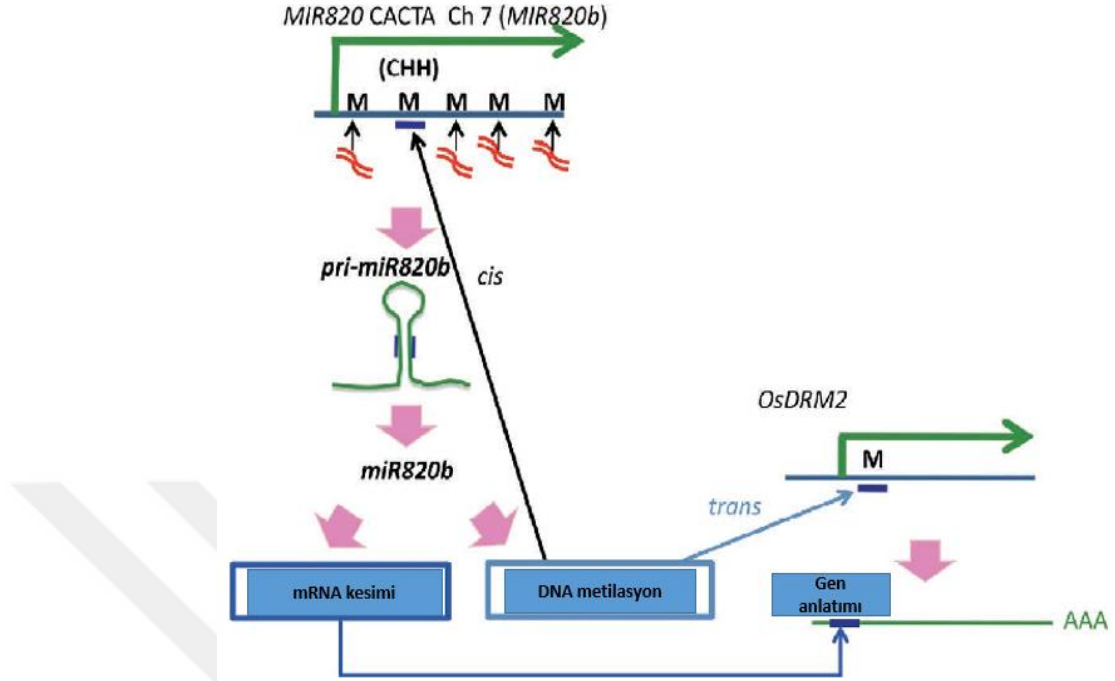
miR820, embriyonik dokularda tanımlanan genç, çeltik bitkisine özgü bir miRNA ailesi olarak ifade edilmektedir. miR820'nin sınıf II transpoze edilebilir bir element olan CACTA familyası transpozonlarından türetildiği düşünülmektedir (Nosaka ve ark. 2012). miR820 ailesinin genleri iki farklı küçük RNA'dan oluşmaktadır. Bunlardan 21-22 nt uzunluğundaki miRNA'lar DCL-1'i, 24-nt uzunluğundaki miRNA'lar DCL-3'ü hedef almaktadır. 21-22 nt uzunluğundaki miR820, CACTA lokusunun promoterinin metilasyonunu önleyerek çeltik genomunda OsDRM2'yi (DNA metil transferaz) negatif olarak düzenlemektedir. 24-nt uzunluğundaki miR820, OsDRM2'nin ve ayrıca kendi lokusunun RNA aracılı epigenetik modifikasyonlarını indükleyerek hareket etmektedir (Nosaka ve ark. 2013).

Şekil 16'da miR820'nin işlevi anlatılmaktadır. Aşağıdaki Şekil 16'da gösterildiği gibi miR820'nin DNA metilasyonunu tetikleyerek OsDRM2 üzerine nasıl etkide bulunduğu şekilde açıklanmaktadır.

miR820'nin hareketi için pri-miR820 transkriptleri esas olarak kromozom 7 üzerindeki MIR820b lokusundan kopyalanmaktadır. pri-miR820b'den işlenen miR820b, miR820 genomik bölgesinde (cis olarak) CH₂ DNA metilasyonunu indüklemektedir. Bunun sonucunda, bu lokustan miR820 transkripsiyonu gerçekleşir. miR820b ayrıca hem OsDRM2 genomik bölgesinde (trans olarak) DNA metilasyonunu indükler böylelikle hedef gen bölgesi parçalanır, hem de miR820b mRNA parçalanmasına neden olarak yine hedef gen bölgesinin parçalanmasına sebep olur. Bu nedenle miR820'nin cis ve trans olmak üzere düzenlenen iki işlevi olduğu yapılan araştırmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır (Nosaka ve ark., 2013).

Yapılan bazı çalışmalar, tuz, kuraklık ve arsenik stresi gibi abiyotik stresler altında miR820'nin ekspresyon seviyelerinin düzensizleştiğini belirtmişlerdir. Çeltik spesifik olarak tanımlanmış olan Osa-miR820'nin

kuraklık, tuz ve arsenik stresi altında aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Sharma, Phancal ve ark., 2015).



Şekil 16. miR820'nin OsDRM üzerindeki etkileri (Nosaka ve ark., 2013).

M; metilasyon, CHH: Metil grubu.

Osa-miR820 bitkide erken gelişim evrelerinde gelişim gösterirken tuz stresi altında ekspresyon seviyesinin bozulduğu ortaya konularak, tuza duyarlı ve toleranslı tür olan *Pusa Basmati* (PB) ve *Pokkali* (PK) türleri üzerinde tuz stresinde yapılmış olan çalışmalarda miR820 ekspresyonları sırayla; üst spiklet yapılarında PB'de miR820 seviyesi yüksek iken tuz varlığında artış göstermiş, PK türlerinde ise normal koşullara göre tuz varlığında miR820'de azalış gözlemlenmiştir. Alt spiklet yapılarında ise bu durum tam tersi sonuç vermiş, PB türlerinde tuz varlığında normale göre miR820 seviyesinde düşüş, PK türlerinde tuz varlığında normal koşullara göre miR820 seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu durum yapraklarda incelendiğinde PB türlerinde normal koşullara göre tuz stresi altında yetişen bitkide miR820 seviyesi azalırken, PK türlerinde de tuz stresi altında normal koşullara göre miR820 seviyesinde azalış görülmüştür ancak normal koşullar altında PK türlerinin yapraklarındaki miR820 ekspresyon seviyesi PB türlerinin yapraklarına göre çok fazla olduğu da ortaya konulmuştur. Sonuç olarak bitkinin farklı yapılarında miR820 seviyelerinin değişkenlik gösterdiği savunulmuştur (Sharma ve ark., 2015).

Bu tez kapsamında M-300-5 hattı ile Osmancık-97 eltik bitksinde miR156a, miR159a, miR169b, miR393a, miR398a ve miR820a ekspresyonları ele alınarak ve tuz stresi altındaki cevaplar ortaya konulacaktır.



3 METOT

3.1 Bitkilerin in-vivo Ortamda Yetiştirilmesi

Bu çalışmada kullanılan tohumlar İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarından alınmıştır. Bu tohumlar Osmancık-97 çeltik çeşidi ile bu çeşitten geliştirilen mutant M-300-5 hattına aittir.

Osmancık-97 çeltik çeşidi ve M-300-5 mutant hattına ait tohumlar Tablo 2’de gösterildiği gibi isimlendirilmiştir.

Tablo 2. Osmancık-97 çeltik çeşidi ve M-300-5 mutant hattına ait tohumların isimlendirilmesi

Çeşitler	Uygulama	İsimlendirme
Osmancık-97	150mM NaCl uygulanmayan	Osm-97-0
Osmancık-97	150mM NaCl uygulanan	Osm-97-150
M-300-5	150mM NaCl stresi uygulanmayan	M-300-5-0
M-300-5	150mM NaCl stresi uygulanan	M-300-5-150

Osm-97-0, Osm-97-150, M-300-5-0 ve M-300-5-150 uygulamalarının her biri için 5 adet olmak üzere 4 tekrarlı olarak seçilen tohumlar plastik bitki büyütme kaplarına poli etilen glikol (polyethilen glycol, PEG) içerisine ekildi. PEG içerisinde tohumlardan elde edilen fideler (çimlenmenin 7. gününden itibaren) Yoshida besin solüsyonu ile sulandı (Masood ve ark., 2004). 14 günlük çeltik fidelerinin tuz stresine karşı verdikleri cevabı belirlemek amacıyla 150 mM NaCl kullanıldı. 7 gün boyunca tuz stresine maruz bırakılan fideler hasat edildi. Hasat edilen bitkiler aşağıda Şekil 17 ve Şekil 17’ de görülmektedir.



Şekil 17. Osmancık-97 bitkisine ait kontrol ve 150mM NaCl stres uygulamasında yetişen çeltik bitkileri.



Şekil 18. M-300-5 mutant hattına ait kontrol ve 150mM NaCl stres uygulamasında yetişen çeltik bitkileri.

3.2 RNA İzolasyonu

Hasadı yapılan bitkilerin yapraklarından, bekletilmeden, aynı gün içerisinde mirVana™ miRNA izolasyon kiti kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu için 0.1g tartılan bitki yaprakları sıvı azot ile birlikte önceden steril edilmiş olan havan içerisinde ezilerek içerisine Lysis Binding solusyonundan 1mL eklendi. Ardından elde edilen homojenizatın 1/10

haciminde Additive solusyonu eklenerek 10 dakika buz içerisinde inkübe edildi. 10 dakika sonrasında buzdan alınan örneklere homojenizat ile 1:1 oranda Acid-phenol:chloroform eklendi ve 5 dk. 10.000 RCF'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüp içerisine alındı. Elde edilen üst faz hacminin 1/3 oranında önceden hazırlanmış olan %100 etanol eklendi. Filter cartidge ve collection tüpler hazırlanarak elde edilen homojenizat ortalama 600-700uL filter cartidge içerisine eklendi ve 15 saniye 10.000 RCF'de santrifüj edilerek alt faz yeni bir tübe alındı, ardından bu işlem 2 defa tekrar edilerek toplanan alt faz yeni bir cartidge filter içerisine alındı ve üzerine 2/3 hacminde %100 etanol eklenerek 15 sn. 10.000 RCF'de santrifüj edildi.

Filtre kit içerisinden çıkan Wash Solution 1 ile 700uL eklenerek 15 sn. 10.000 RCF'de santrifüj edildi ve 1. yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından Wash Solution 2/3 ile 500uL eklenerek 15 saniye 10.000 RCF'de santrifüj edip 2. yıkama işlemi tamamlandı. Ardından önceden 95 dereceye getirilmiş olan Elution Solution'dan her örnek başına 30-40 µL eklenerek 20-30 sn. spin edildi ve total RNA örnekleri fitreden collection tüp içerisinde toplandı.

Total RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayini Nanodrop Implen NP80 cihazında ölçüldü (Yang, ve ark., 2009).

3.3 cDNA Sentezi

Total RNA örnekleri ile 2 farklı cDNA sentezi yapılmıştır.

3.3.1 miRNA çalışması için cDNA sentezi

TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription (RT) Kit prosedürüne uygun olarak cDNA eldesi sağlandı. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı (0.15 µL 100mM dNTPs (with dTTP) + 1µL MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL + 1.50 µL 10× Reverse Transcription Buffer + 0.19 µL RNase Inhibitor, 20 U/µL + 4.16 µL Nuclease-free Su) son hacim 7 uL olacak şekilde prosedürde belirtildiği gibi hazırlandı. Ardından 5 µL RNA örnekleri eklenerek 3 µL 5× RT Primer eklendi ve PCR tüpleri PCR cihazına yerleştirildi. Cihaza aşağıdaki

Tablo 3' te belirtilen sıcaklık ve sürelerde protokol uygulandı (Beatty ve ark., 2009).

Tablo 3. miRNA çalışması için cDNA amplifikasyon koşulları

İşlev	Sıcaklık	Dakika
İlk aktivasyon	16°C	30 dk
Ters çevrim	42°C	30 dk
İnaktivasyon	85°C	4 dk
Durduma	4°C	∞

3.3.2 Gen ekspresyon çalışması için cDNA sentezi

iScript cDNA isolation kit prosedürüne uygun olarak cDNA eldesi sağlandı. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı (4 µL 5X iScript cDNA + 1 µL iScript Reverse Transcriptase + 13 µL Nuclease-free Su) son hacim 17 µL olacak şekilde prosedürde belirtildiği gibi hazırlandı. Ardından 2 µL RNA örnekleri eklenerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tüpleri PCR cihazına yerleştirildi. Cihaza aşağıdaki Tablo 4' te belirtilen sıcaklık ve sürelerde protokol uygulandı (Ibraheem ve ark., 2011).

Tablo 4. cDNA PCR amplifikasyon koşulları

İşlev	Sıcaklık	Dakika
İlk aktivasyon	25°C	5 dk
Ters çevrim	46°C	20 dk
İnaktivasyon	95°C	1 dk
Durduma	4°C	-

3.4 Gradient PCR

miRNA'ların hedef aldıkları genlere ait belirlenen primer dizileri aşağıda Tablo 5' te belirtildi. Primer çiftleri ile kontrol grubu olan Osm-97-0 cDNA örnekleri ve negatif kontrol için Nuclease free water kullanılarak Gradient PCR

yapıldı. Bu çalışma için DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) kullanıldı. Karışım; 12,5 uL mix + 8,5 Nuclease free water + 2 uL cDNA olacak şekilde hazırlandı, vortexte karıştırıldı ve 0,2 uL PCR tüplerine dağıtıldı. PCR tüplerine 1 Forward Primeri + 1 uL Reverse primeri eklenerek hazırlanan karışım tekrar vorteks cihazında karıştırıldı.

Tablo 5. miRNA'ların hedef aldıkları genlere ait belirlenen primer dizileri

Primer ismi	Sekans	Loc Numarası	İlişkili miRNA	Ürün boyutu
OsTIR1	F 5'-TCAAGAGTTGCGGGTCTTCC-3' R 5'-CCCCTGCATGACTCCACAAT-3'	LOC_Os05g05800	mir-393a	270 bp
OsHAP2C	F 5'-GTGATGTCATCCTCCCGAGT-3' R 5'-ATTTCATGGAGGTACGGCTTG-3'	LOC_Os03g07880	mir-169a	166 bp
OsAFB2	F 5'-GGACAAAGGCTTGAAGTGG-3' R 5'-GGCTTCCCTGGCTCAAGAAT-3'	LOC_Os04g32460	mir-393a	255 bp
GAMYB	F 5'-CTGGGGACACTTCACCTCAT-3' R 5'-ATGATACCGTCGCCAAGAAC-3'	LOC_Os01g59660	mir-159b	154 bp
DRM2	F 5'-GGTGACGCTTCAGTGGGTAA-3' R 5'-TACAGGCGCATCGAGACATC-3'	LOC_Os03g02010	mir-820a	155 bp
CSD2	F 5'-GCATGTCAACTGGACCACAC-3' R 5'-AGTAAGGGGGATCTGGCTGT-3'	LOC_Os07g46990	mir-398a	152 bp
OsSPL6	F5'-AACCGAGGAGAGCCCATACT-3' R5'-ATGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'	LOC_Os08g41940	mir-156a	244 bp

Tablo kısaltmaları: OsTIR1; transport inhibitor response 1, OsHAP2C; CCAAT-binding transcription factor subunit B family protein, expressed (Synonym NF-YA), OsAFB2; F-box domain ve LRR containing protein, GAMYB; MYB family transcription factor, DRM2: DNA methyltransferase protein, CSD2; copper/zinc superoxide dismutase 2, OsSPL16; SBP-box gene family member.

Tüpler Applied Biosystems™ Veriti Thermal Cyclers, 96-well cihazına aşağıdaki Tablo 6'da belirtilen protokole uygun şekilde konuldu.

Tablo 6. Gradient PCR protokolü

Adım	Sıcaklık	Zaman	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	1 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	30
Bağlanma	55-56-57-58-59-60°C	30sn	
Uzama	72°C	1dk	
Son uzama	72°C	5 dk	1

Elde edilen PCR sonucundaki en iyi primer bağlanma sıcaklığı agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

3.5 Real-Time PCR Analizi

Real Time PCR çalışmasında miRNA ekspresyonlarındaki farklılıklar Taqman probe yöntemi kullanılarak belirlendi, miRNA'ların hedef aldıkları genlerin ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar da SYBR Green yöntemi kullanılarak belirlendi (Raghuram ve ark., 2014).

3.5.1 qRT-PZR ile miRNA İfadelerinin Gösterilmesi

miRNA çalışması için gerekli PCR reaksiyon karışımı TaqMan microRNA Assay kit prosedüründe yer aldığı gibi hazırlandı. Karışım içerisinde; 1 µL TaqMan microRNA Assay (20X) primeri + 10 µL TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG + 8 µL Nuclease-free su, son hacim 19 µl olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım vorteks ile karıştırıldı. Sonrasında karışım eşit bir şekilde 0,1mL'lik 96 kuyucuklu plate içerisine dağıtıldı.

Uygun kalitede olan cDNA örnekleri, tuzlulukla ilişkili miRNA analizini yapmak üzere belirlenmiş olan osa-miR56a, osa-miR159a, osa-miR169b, osa-

miR393a, osa-miR398a, osa-miR820a problemleri TaqMan™ MicroRNA Assay metoduna uygun olarak çalışıldı. Çalışmada 18S rRNA kontrol grubu olarak kullanıldı. Elde edilmiş olan cDNA örnekleri (10ng konsantrasyona sahip RNA'dan elde edilmiştir) 1 µL hacminde plate içerisine eklendi. Negatif kontrol olarak belirlenen kuyucuklara nuklease free water eklendi. Plate üzeri seal ile kapatıldı, 750 RCF'de 10 sn karıştırılarak ardından Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazına aşağıdaki Tablo 7' de belirtilen kondisyonlarda yerleştirildi (Beatty, ve ark., 2009).

Tablo 7. qPCR Amplifikasyonu döngü sıcaklık, süre ve sayıları

İşlev	Sıcaklık	Dakika	Siklus sayısı
UNG Aktivasyonu	50°C	2 dk	1
Enzim aktivasyonu	95°C	1 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	40
Bağlanma ve sonlanma	60°C	60 sn	40

Real time cihazında, belirlenmiş olan tuzlulukla ilişkili miRNA ifadeleri, referans olarak kullanılan Kontrol Osmancık-97 çeltik çeşidi ve bu çeşitten elde edilmiş olan 150 mM NaCl'ye toleranslı olarak belirlediğimiz M-300-5 mutantının miRNA ifadeleri karşılaştırılarak analiz edildi.

3.5.2 Hedef Genlerin İfade Analizinin qRT-PZR İle Gösterilmesi

Gen ekspresyon analizi için *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* protokolüne uygun bir şekilde deney düzeneği oluşturuldu. Her primer çifti için ayrı ayrı karışım hazırlandı. Bu karışımlar 1,5 mL eppendorf tüpleri içerisine 10 uL 2X *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* + 1 uL Forward Primeri + 1 uL Reverse Primeri + 7 uL Nuclease Free water olarak hazırlandı ve vortexte karıştırılarak 0,1'lik platelere 19 uL olarak dağıtıldı. Ardından 1 uL cDNA örnekleri plate içerisine dağıtılarak 750 RCF'de 10 sn karıştırılarak ardından Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazına aşağıdaki Tablo 8' de belirtilen koşullarda yerleştirildi. Çalışmada endojen kontrol olarak Ubiquitin 5 primeri kullanıldı (Raghuram ve ark., 2014).

Tablo 8. qPCR Amplifikasyonu döngü sıcaklık, süre ve sayıları

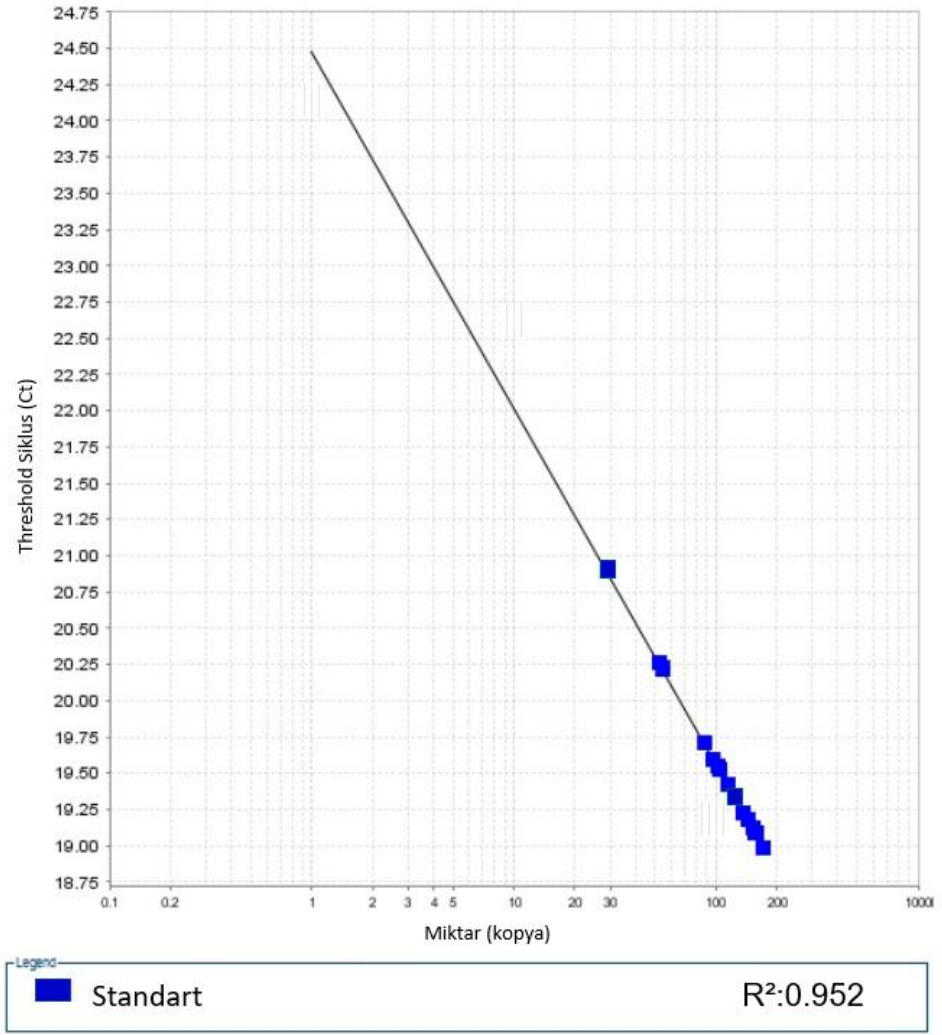
Adım	Enzim Aktivasyonu	PCR	
		Siklus (40)	
		Denatürasyon	Bağlanma /Sonuzama
Zaman	10 dk	15 sn	60 sn
Sıcaklık	95 °C	95 °C	60 °C

Osm-97-0 örneklerinden aşağıdaki Tablo 9’ da gösterilen konsantrasyon değerlerinde seri dilisyon yapılp endojen kontrol UBQ5 (Wang ve ark., 2012) primerleri ile reaksiyon kurularak standart sapma grafiği ve doğruluk (R^2) değeri belirlenmiştir.

Tablo 9. Standart örneklerinin konsantrasyon değerleri

Örnek ismi	Konsantrasyon ng/uL
Osm-97-0 /Std1	1000.00
Osm-97-0 /Std2	100.00
Osm-97-0 /Std3	10.00
Osm-97-0 /Std4	1.00

Elde edilen verilerin standart sapma grafiği ve doğruluk (R^2) değeri aşağıdaki Şekil 19’ da gösterilmiştir.



Şekil 19. Standart sapma grafiği

Real Time PCR sonuçlarından elde edilen Ct değerleri Şekil 20’ de belirtilen Pfaffle formülasyonuna yerleştirilerek miRNA ve gen ekspresyonlarındaki artış ve azalış miktarları belirlendi.

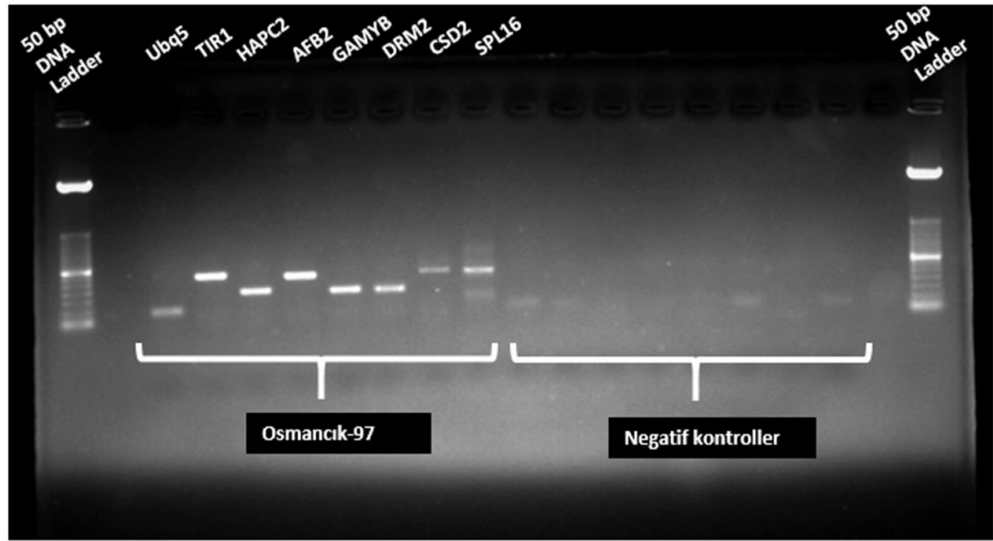
$$\text{Gen ekspresyon oranı} = \frac{\left(\text{Etkinlik}_{\text{Hedef}} \right)^{\Delta\text{Ct hedef (kontrol-örnek)}}}{\left(\text{Etkinlik}_{\text{Referans}} \right)^{\Delta\text{Ct referans (kontrol-örnek)}}$$

Şekil 20. Hedef gen ifadelerinin kontrol gen ifadesine göre değişimi (Pfaffle, 2001).

4 BULGULAR

4.1 Gradient PCR sonuçları

Gradient PCR sonuçlarına göre primerler en iyi 60°C’de çalışmıştır. 60 °C’de tüm primerlerle kurulan PCR sonucuna ait bant profilleri aşağıda Şekil 21’ de gösterilmiştir.

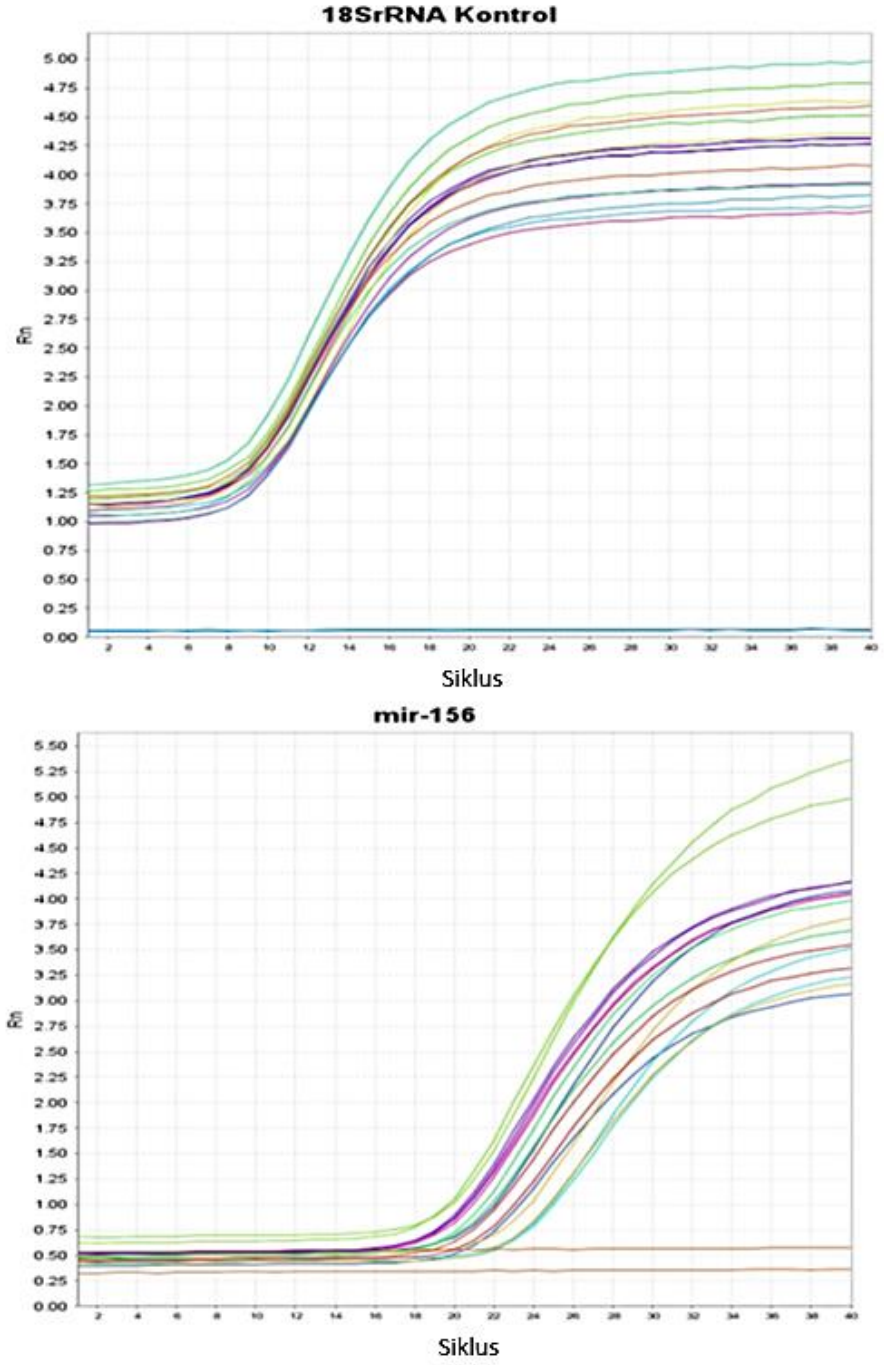


Şekil 21. 60 °C kurulan PCR çalışma sonucu

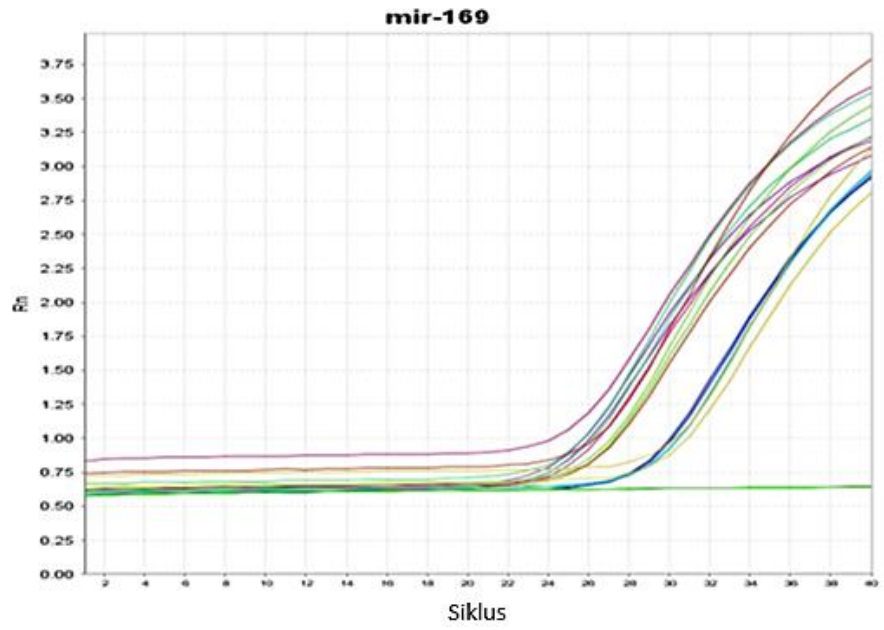
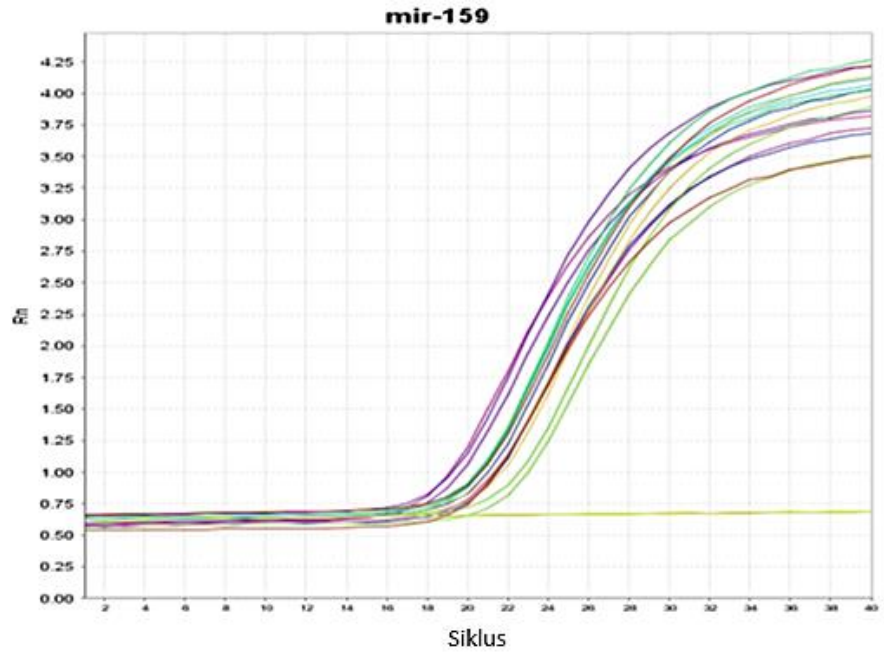
Primerlerin bağlanma sıcaklıklarını belirlemek için Osm-97-0 örneklerinden elde edilen cDNA’lar kullanıldı. Örnekler %1’lik olarak hazırlanan agaroz jelde 80V’da 40 dk yürütüldükten sonra Şekil 21’ deki sonuçlar elde edilmiştir.

4.2 qRT-PZR ile miRNA İfadelerinin Gösterilmesi

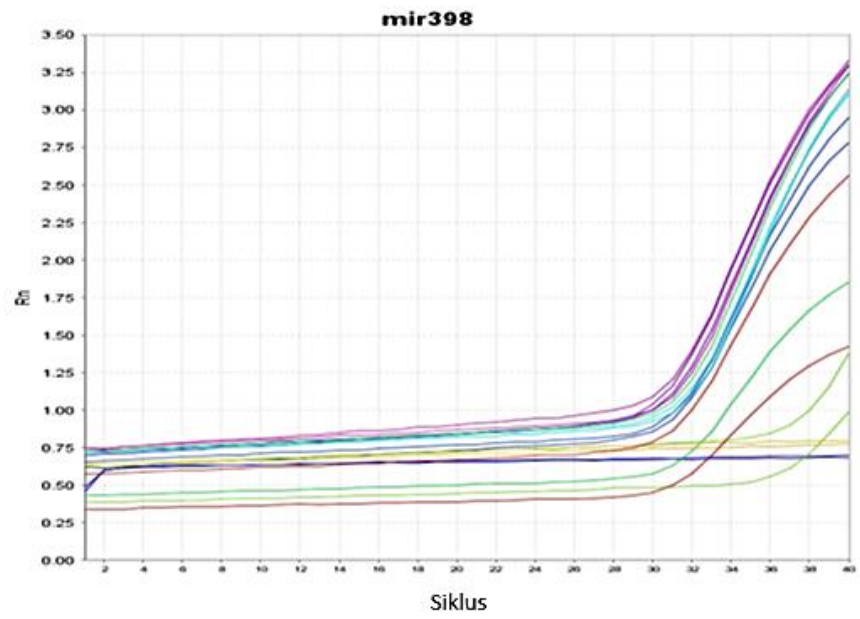
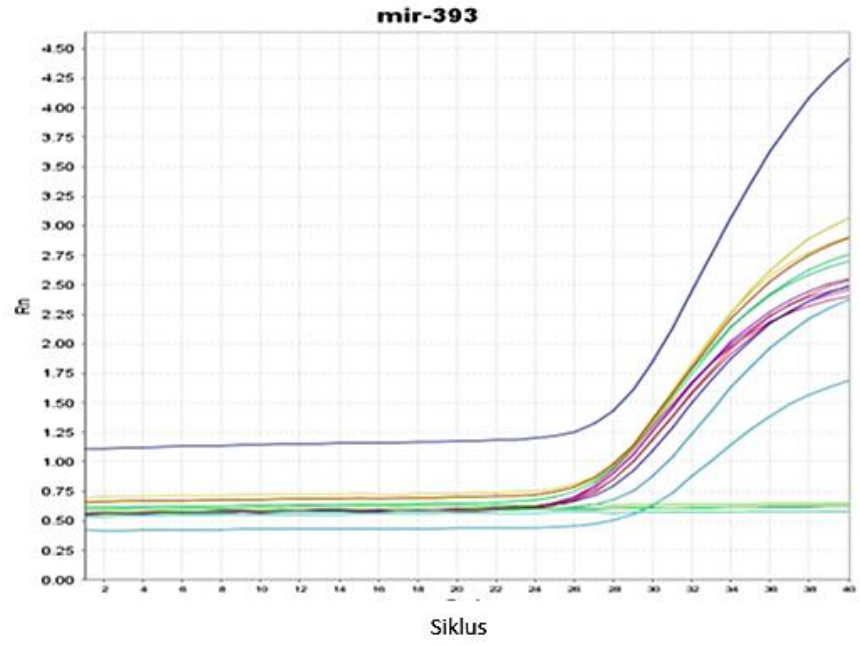
Osm-97-0 ve Osm-97-150 grupları ile M-300-5-0 ve M-300-5-150 hatlarında belirlenen 18SrRNA, miR156a, miR159a ve miR169b miRNA gruplarının ekspresyon seviyelerinden elde edilen amplifikasyon grafikleri aşağıdaki Şekil 22, Şekil 23, Şekil 24 ve Şekil 25’ de gösterilmiştir.



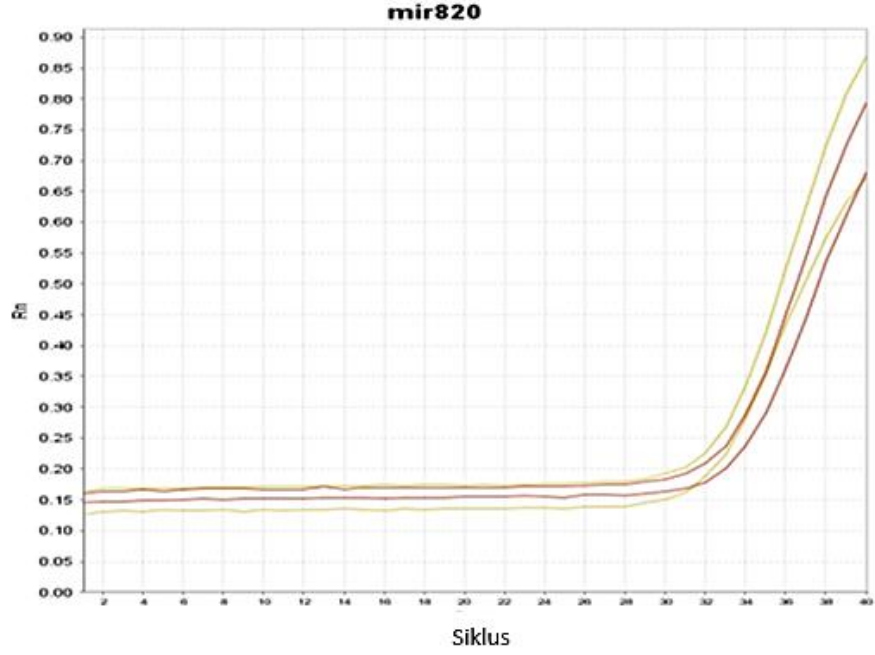
Şekil 22. 18S rRNA ve miR156a Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri



Şekil 23. miR159a ve miR169b Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri



Şekil 24. miR393a ve miR398a Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri



Şekil 25. miR820a Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri

Çalışma sonucunda elde edilen Ct değerleri aşağıdaki Tablo 10' da verilmiştir.

Tablo 10. 18SrRNA, mir-156a, mir-159a ve mir-169b miRNA gruplarından elde edilen Ct değerleri

Örnek	Hedef Genler						
	18SrRNA	mir-156a	mir-159a	mir-169b	mir-393a	mir-398a	mir-820a
Osm-97-0	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
	9,70	22,42	24,24	28,13	27,09	30,78	31,67
Osm-97-150	18SrRNA	Mir-156a	Mir-159a	Mir-169b	mir-393a	mir-398a	mir-820a
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
M-300-5-0	18SrRNA	Mir-156a	Mir-159a	Mir-169b	mir-393a	mir-398a	mir-820a
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
M-300-5-150	18SrRNA	Mir-156a	Mir-159a	Mir-169b	mir-393a	mir-398a	mir-820a
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
	9,63	22,71	20,85	28,15	26,41	30,62	28,75
	9,63	20,00	19,73	23,90	24,45	30,10	27,72

Elde edilen Ct değerlerinde kontrol (housekeeping) gen olarak seçilen 18SrRNA diğer miRNA bölgelerine göre daha erken pik vermiştir. Çeltik üzerine housekeeping genlerin ekspresyon seviyeleri ile ilgili yapılan çalışmada 18SrRNA'nın 10-18. siklus aralıklarında pik verdiği belirtilmiştir (Xu ve ark., 2015).

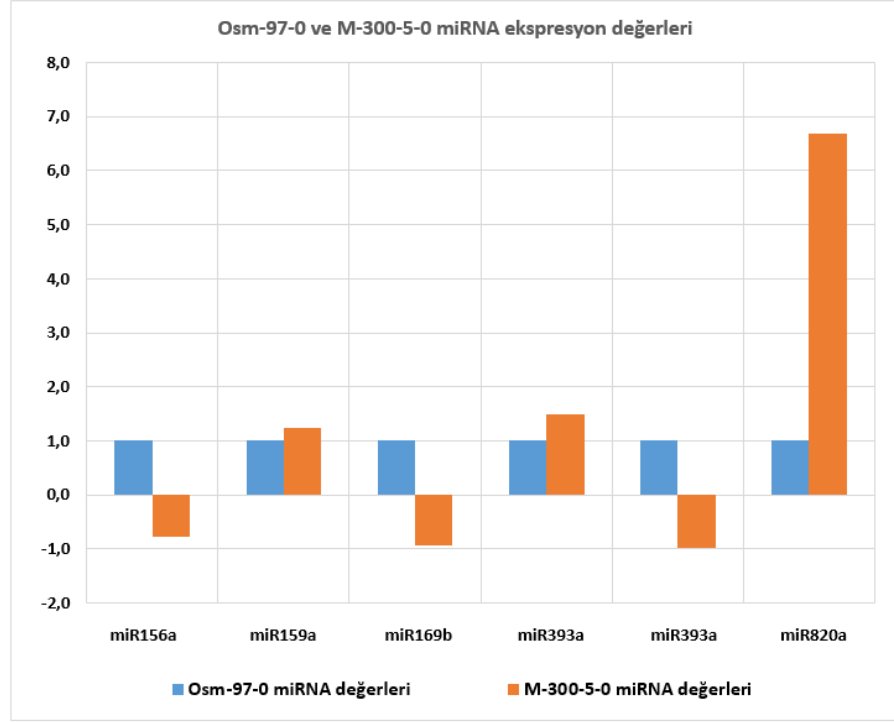
Taqman probe'ları ile belirlenen miRNA'ların Ct değerleri belirtilen Pfaffl formülasyonuna yerleştirilerek miRNA'ların Osm-97-0, Osm-97-150, M-300-5-0 ve M-300-5-150 örneklerine ait ekspresyon seviyeleri ile hedef gen bölgeleri ve hedef gen bölgelerinin bitkideki rolü aşağıdaki Tablo 11, Tablo 12 ve Tablo 13' de gösterilmiştir.

Tablo 11' de herhangi bir stres uygulaması yapılmadığında normal koşullarda yetiştirilen Osm-97-0 ve M-300-5-0 örneklerinden elde edilen değerler belirtilmiştir.

Tablo 11. Osm-97-0 ve M-300-5-0 bitki grupları arasında belirlenen miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklar ile hedef gen bölgeleri ve hedef gen bölgelerinin bitkideki rolü

miRNA'lar	Hedef gen bölgesi	Bitkideki rolü	Ekspresyon seviyeleri
			M-300-5-0
miR-156a	SPL16	Çiçeklenme	0.78
miR-159a	MYB	Giberellin ve anter gelişimi	1.23
miR-169b	NF-YA (HAPC2) CAAT-BOX	Kök gelişimi, tohum gelişimi, çiçeklenme, gametogenez, ABA sinyal yolağı ve abiyotik strese geliştirilen cevaplar	0.93
miR-393a	AFB2/TIR1	Kök gelişimi	1.48
miR-398a	CSD2	SOD aktivitesi	0.98
miR-820a	DRM	Metilasyon	6.69

Bu değerler arasındaki farklılıklar Şekil 26' da ortaya konulmuştur.



Şekil 26.Osm-97-0 grubunu ve M-300-5-0 grubundaki miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar

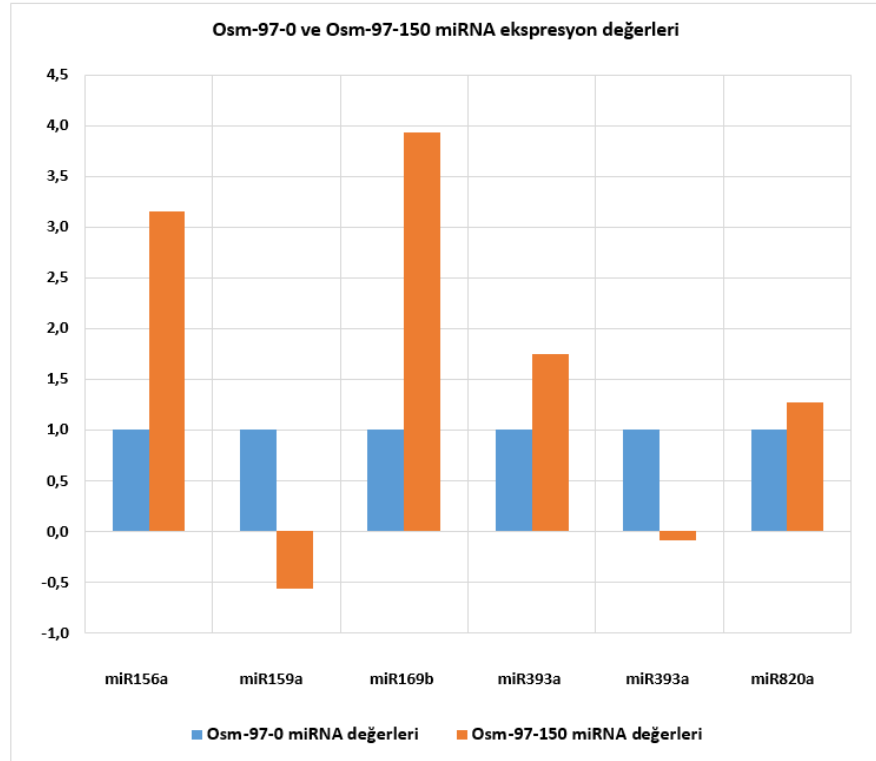
Osm-97-0 grubu ile karşılaştırıldığında mutant 300-5 hatlarındaki miRNA ekspresyonlarındaki değişim miR156a, miR169b ve miR398a için sırasıyla 0.78, 0.93 ve 0.98 oranında düşerken, miR159a, miR393a ve miR820a için sırasıyla 1.23, 1.48 ve 6.69 oranında artış görülmüştür. Özellikle miR820a'daki 6.69 katlık artış ile seçilen miRNA gruplarında en fazla artış gösteren miRNA olmuştur. Bu miRNA'nın hedef geni DRM2 olup hücrede transkripsiyon sonrası metilasyonda etkili olduğu bilinmektedir.

Tablo 12'de ortamda 150mM NaCl stresinde Osm-97-150 örneklerinden elde edilen veriler verilmiştir.

Tablo 12. Osm-97-0 ve Osm-97-150 bitki grupları arasında belirlenen miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklar ile hedef gen bölgeleri ve hedef gen bölgelerinin bitkideki rolü

miRNA'lar	Hedef gen bölgesi	Bitkideki rolü	Ekspresyon seviyeleri
			Osm-97-150
miR-156a	SPL16	Çiçeklenme	3.15
miR-159a	MYB	Giberellin ve anter gelişimi	0.56
miR-169b	NF-YA (HAPC2) CAAT-BOX	Kök gelişimi, tohum gelişimi, çiçeklenme, gametogenez, ABA sinyal yolağı ve abiyotik strese geliştirilen cevaplar	3.93
miR-393a	AFB2/TIR1	Kök gelişimi	1.75
miR-398a	CSD2	SOD aktivitesi	0.09
miR-820a	DRM	Metilasyon	1.27

Bu değerler arasındaki farklılıklar Şekil 27' de ortaya konulmuştur.



Şekil 27. Osm-97-0 grubunu ve Osm-97-150 grubundaki miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar

Osm-97-0 grubu ile karşılaştırıldığında 150mM NaCl altındaki Osm-97-150 bitkilerinde miRNA ekspresyonlarındaki değişimleri miR156a, miR169b,

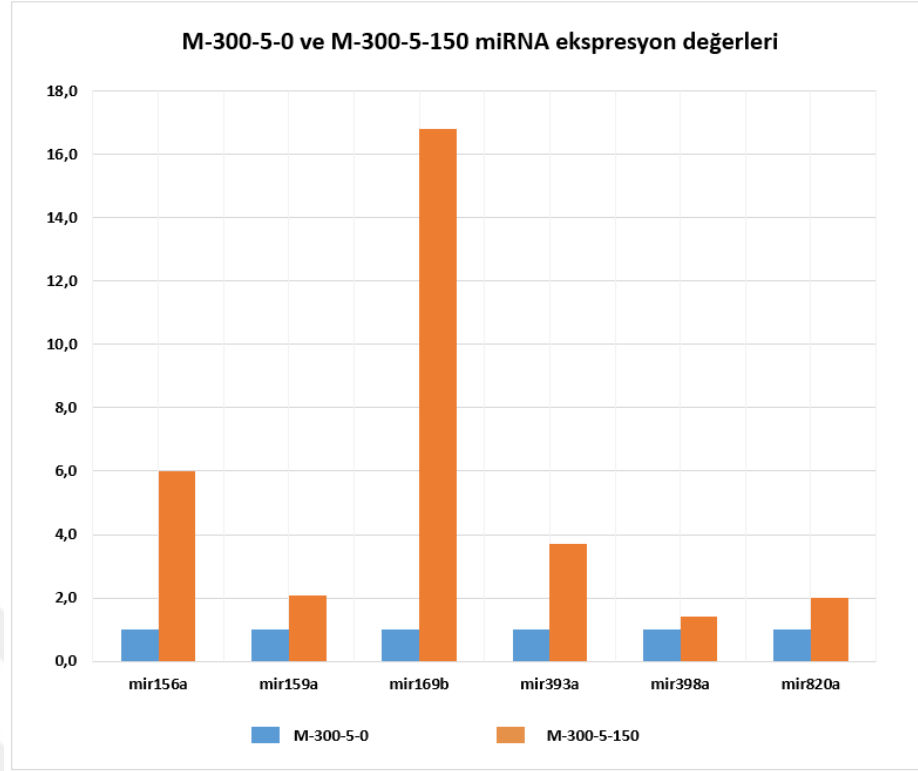
miR393a ve miR820a ekspresyonu sırasıyla 3.15, 3.93, 1.75 ve 1.25 oranında artarken, miR159a ve miR398a ekspresyonu sırasıyla 0.56 ve 0.09 oranında düşüş gösterdi. Osmancık-97 çeltik çeşidi tuz stresi altında miRNA ekspresyon değerleri incelendiğinde en fazla nükleer transkripsiyon faktörünü etki eden gen bölgesi 3.93 oranında ve çiçeklenme ile ilişkili gen bölgelerinde 3.15 oranında bir artış gözlemlendi.

Tablo 13' te 150mM NaCl stresinde M-300-5-150 örneklerinden elde edilen veriler gösterilmiştir.

Tablo 13. M-300-5-0 ve M-300-5-150 bitki grupları arasında belirlenen miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklar ile hedef gen bölgeleri ve hedef gen bölgelerinin bitkideki rolü

miRNA'lar	Hedef gen bölgesi	Bitkideki rolü	Ekspresyon seviyeleri
			M-300-5-150
mir156a	SPL16	Çiçeklenme	6.00
miR159a	MYB	Giberellin ve anter gelişimi	2.10
mir169b	NF-YA (HAPC2) CAAT-BOX	Kök gelişimi, tohum gelişimi, çiçeklenme, gametogenez, ABA sinyal yolağı ve abiyotik strese geliştirilen cevaplar	16.80
mir393a	AFB2/TIR1	Kök gelişimi	3.70
mir398a	CSD2	SOD aktivitesi	1.40
mir820a	DRM	Metilasyon	2.00

Bu değerler arasındaki farklılıklar Şekil 28' de ortaya konulmuştur.

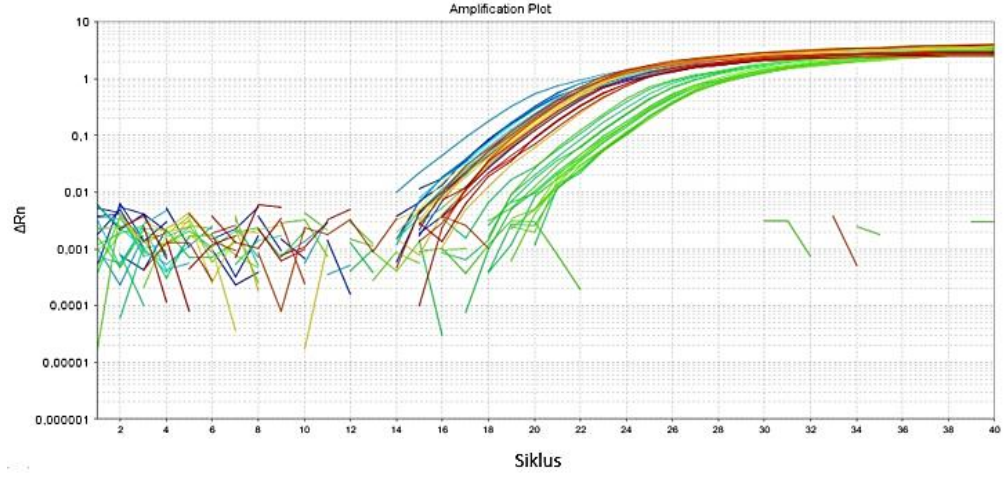


Şekil 28. M-300-5-0 grubunu ve M-300-5-150 grubundaki miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar

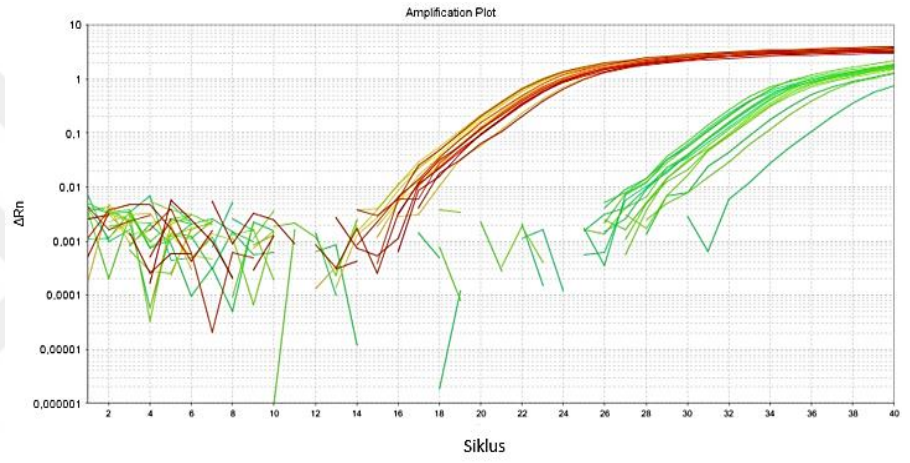
M-300-5-0 grubu ile karşılaştırıldığında 150mM tuz stresinde M-300-5-150 örneklerine ait seçilen tüm miRNA gruplarının ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Özellikle transkripsiyon faktörüne etki eden miR169b, çiçeklenme üzerine etki eden miR156a ve kök gelişimi üzerine etkili olan miR393a artışları diğer miRNA'lara göre daha fazla olmuştur.

4.3 Hedef Genlerin İfade Analizinin qRT-PZR ile Gösterilmesi

Tuzlulukla ilişkili olarak belirlediğimiz miRNA'ların hedef aldıkları gen bölgelerindeki ekspresyon değişimleri incelendiğinde UBQ5, MYB, CSD2, DRM2 ve SPL16 gen bölgesinden elde edilen amplifikasyon grafikleri Şekil 29 ve Şekil 30' da gösterilmiştir.



Şekil 29. UBQ5, MYB ve CSD2 Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri



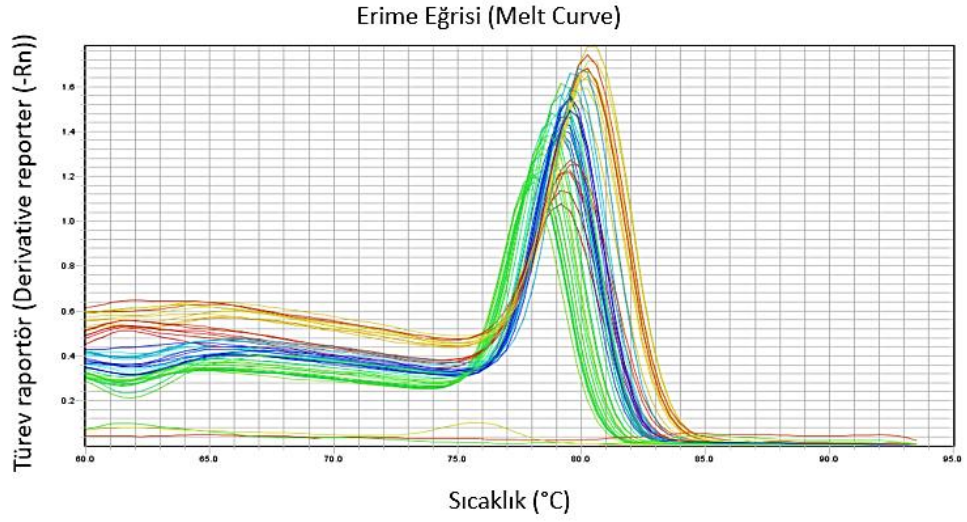
Şekil 30. UBQ, DRM2 ve SPL16 Amplification Plot (Rn vs. Cycle) eğrileri

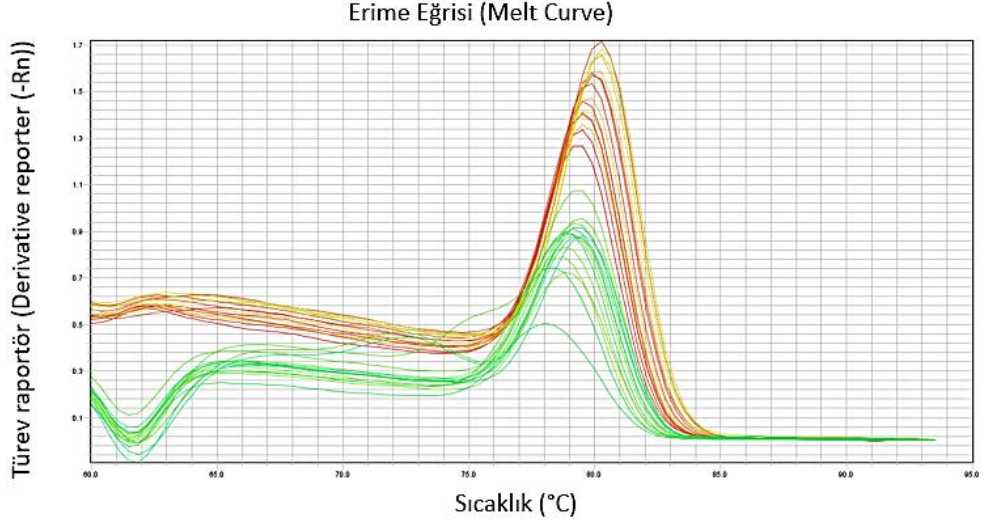
Çalışma sonucunda elde edilen Ct değerleri aşağıdaki Tablo 14' te verilmiştir.

Tablo 14. UBQ5, MYB ve CSD2 gen bölgelerinden elde edilen Ct değerleri

Örnek	Hedef Genler				
	Ubq 5	MYB	CSD2	DRM2	SPL16
Osm-97-0	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
	19,63	23,23	20,08	34,64	27,92
	Ubq 5	MYB	CSD2	DRM2	SPL16
Osm-97-150	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
	19,64	23,29	19,70	32,62	28,62
	Ubq 5	MYB	CSD2	DRM2	SPL16
M-300-5-0	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
	19,90	22,45	20,24	32,41	25,63
	Ubq 5	MYB	CSD2	DRM2	SPL16
M-300-5-150	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
	19,16	22,50	19,02	31,72	26,72

UBQ5, MYB ve CSD2 gen bölgelerinden elde edilen erime eğrilerinin grafikleri Şekil 31 ve Şekil 32’ de gösterilmiştir.

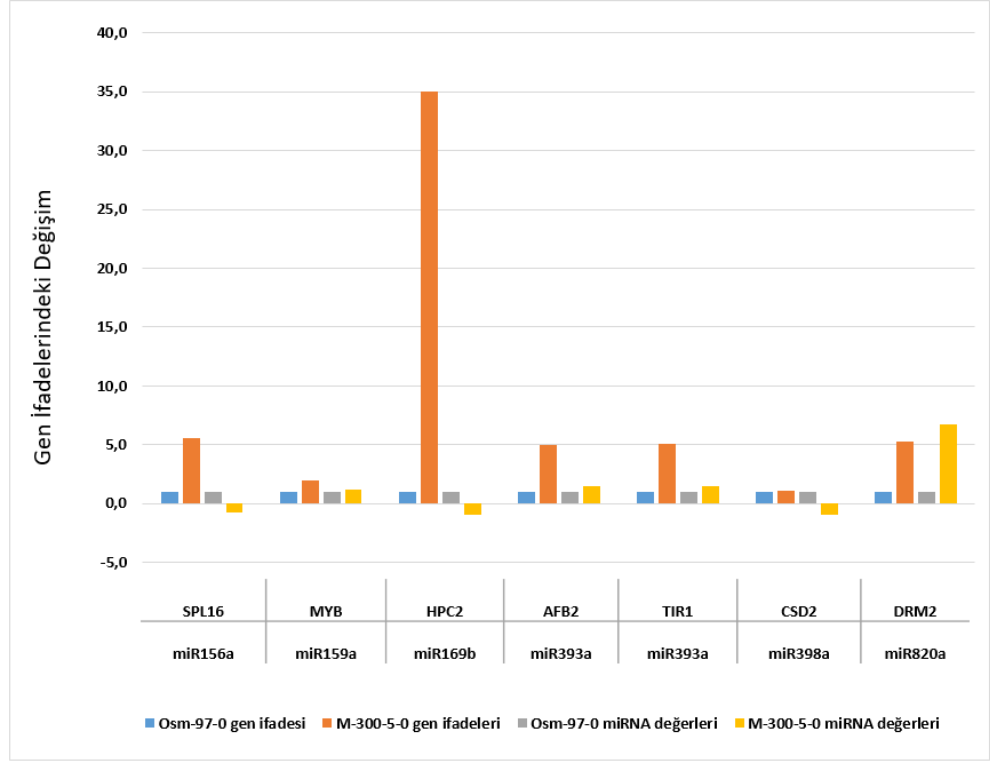




Şekil 32. UBQ, DRM ve SPL16 Erime (Melt curve) eğrileri

Elde edilen Ct değerleri aşağıdaki şekil belirtilen Pfaffl formülasyonuna yerleştirilerek Osm-97-0, Osm-97-150, M-300-5-0 ve M-300-5-150 bitkilerindeki miRNA'ların hedef gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler aşağıdaki Şekil 33, Şekil 34 ve Şekil 35' te gösterilmiştir.

Osm-97-0 grubuna göre M-300-5-0 grubundaki miRNA ve gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar Şekil 33' te ortaya konulmuştur.

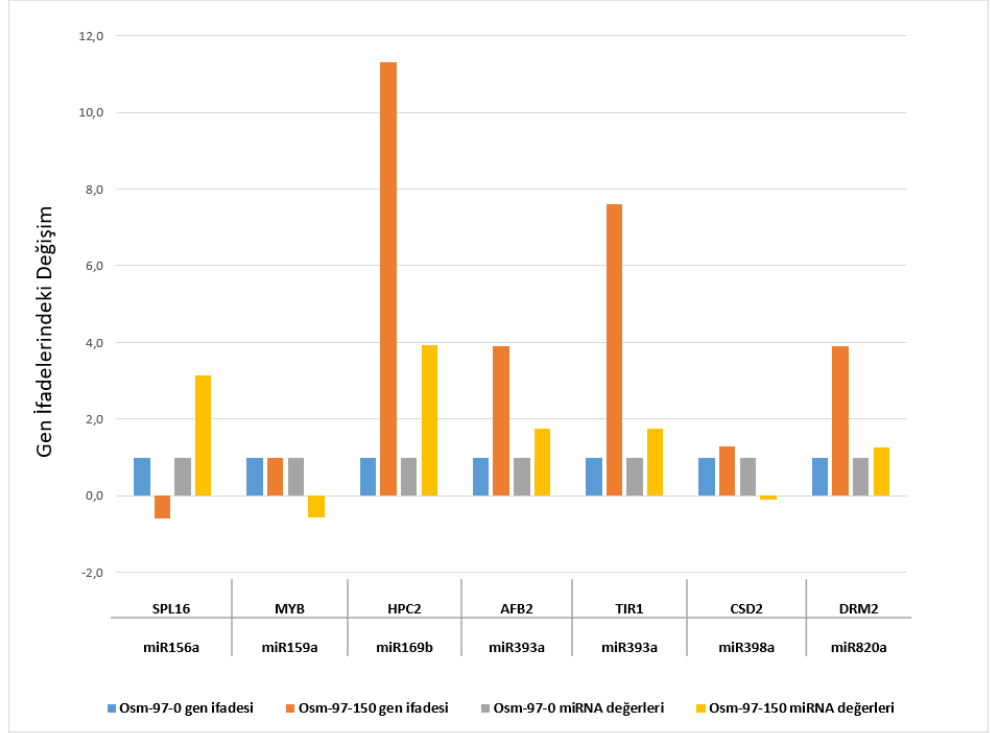


Şekil 33. Osm-97-0 ve M-300-5-0 hattında belirlenen miRNA'ların ve hedef gen bölgelerinin ifadelerindeki değişim

Tuz stresi uygulanmayan Osm-97-0 ve M-300-5-0 örneklerindeki gen ekspresyonları karşılaştırıldı. Osm-97-0 örneklerinde SPL16, MYB, HAPC2, AFB2, TIR1, CSD2 ve DRM2 gen bölgelerinin ekspresyonları Osm-97-0'a göre, M-300-5-0 hatlarında bu gen bölgelerinin ifadeleri sırayla 5.6, 2.0, 35, 5.0, 5.1, 1.1 ve 5.3 oranında artış gösterdi.

Şekil 33' te gen ifadelerinde en fazla artış 35 oranında HAPC2 gen bölgesinden elde edildi. En az artış ise 1.1 oranında CSD2 gen bölgesinde görüldü.

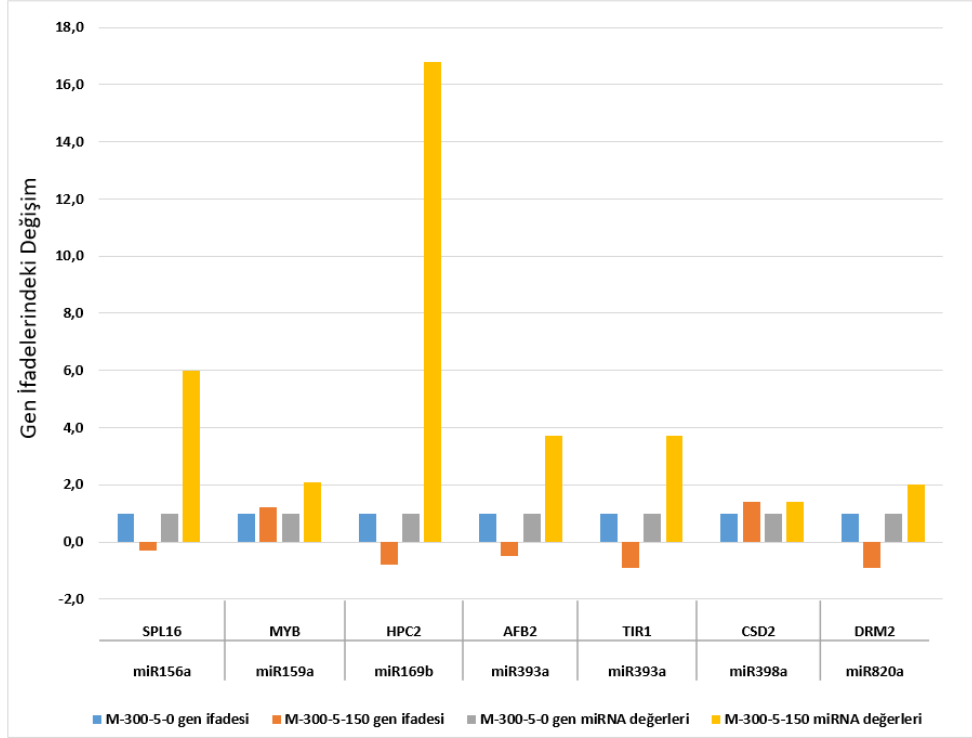
Osm-97-0'a göre tuz stresi uygulanan çeltiklerdeki ekspresyon seviyeleri aşağıdaki Şekil 34' te gösterilmiştir.



Şekil 34. Osm-97-150 bitkisinde belirlenen miRNA'ların ve hedef gen bölgelerinin ifadelerindeki değişim

Belirlenen genlerdeki ekspresyon seviyelerindeki değişimler sırası ile HAPC2, AFB2, TIR1, CSD2 ve DRM2 gen bölgelerinde 11.3, 3.9, 7.6, 1.3 ve 3.9 oranında artarken, SPL16 ekspresyonunda 0.6 oranında azalma gözlemlendi. Ele alınan gen bölgelerinden sadece MYB ekspresyonunda bir değişim gözlemlenmedi.

M-300-5-0'a göre M-300-5-150 örneklerindeki miRNA grupları arasındaki değişim oranları aşağıdaki Şekil 35' te gösterilmiştir.



Şekil 35. M-300-5-150 bitkisinde belirlenen miRNA'ların ve hedef gen bölgelerinin ifadelerindeki değişim

M-300-5-0'a göre M-300-5-150 örneklerinde SPL16, HPC2, AFB2, TIR1 ve DRM2 gen ekspresyonları sırasıyla 0.3, 0.8, 0.5, 0.9 ve 0.9 oranında azalış gösterirken MYB ve CSD2 gen ekspresyonları 1.2 ve 1.4 oranında artış göstermiştir. Tuz stresinde mutant bitkide gen ekspresyonunda en fazla azalma kök gelişimi ile ilişkili gen bölgelerinde olmuştur. Gen ekspresyonlarındaki en fazla artış ise gibberellin ve anter gelişiminde etkili olan gen ile SOD enzimleri ile ilişkili gen bölgelerinde görülmüştür.

5 TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez kapsamında yürütölen çalışmalarla Osmancık-97 çeltik çeşidi ve İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarlarında geliştirilen tuzluluğa toleranslı çeltik mutantlarında tuzlulukla ilişkili hedef genlerdeki ekspresyon seviyelerinin farklılıkları gösterilmiştir.

Osm-97-0 çeltik çeşidinden geliştirilen mutant M-300-5-0 hattı tuzluluğa toleranslı bir hat olarak belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında öncelikle tuzlulukla ilişkili olarak belirlenen miRNA'lar ve hedef gen bölgeleri açasından Osm-97-0 çeşidine ve M-300-5-0 hattına ait bitkilerin normal koşullardaki cevapları ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre mutant hattın Osm-97-0'dan farklı cevap verdiği saptanmıştır.

miR169b ekspresyonu Osm-97-0 ile M-300-5-0 hattı karşılaştırıldığında mutantlarda 0.93 oranında ekspresyonda bir azalma söz konusu olduğunda miR169b'nin etki ettiği kök gelişimi, tohum gelişimi, çiçeklenme, gametogenez, ABA sinyal yolağı ve abiyotik strese geliştirilen cevaplar ile ilişkili gen bölgesi NF-YA (HAPC2) nüklear transkripsiyon faktöründe 35 katlık bir artış meydana gelmiştir. Yapılan çalışmalarda miR169 ailesinin farklı NF-YA genlerine etki ettiklerini belirtmişlerdir. Yüksek tuz stresi altında çeltik bitkisinde 11 NF-YA genin ekspresyonu düşerken diğer NF-YA ekspresyonlarında değişim olmadığını göstermişlerdir. (Yan-Li ve ark., 2017). Arabidopsis'te yapılan bir çalışmada miR169d'nin aşırı ekspresyonu erken çiçeklenme ile sonuçlanmış ve miR169d hedef geni olan AtNF-YA2'nin aşırı ekspresyonu geç çiçeklenmeye neden olmuştur. miR169 ailesinin AtNF-YA transkripsiyon faktörünü baskılayarak stres kaynaklı çiçeklenmeyi düzenlediğini ve bunun da çiçeklenme lokusu C (FLOWERING LOCUS C (FLC)) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Fotoperiyot, ortam sıcaklığı, yaşlanma ile ilişkili miRNA (miR156) ve gibberelin gibi diğer çiçeklenme ile ilişkisi olan yolaklarda yer alan genlerin ve miRNA'ların ekspresyonunun, miR169d-aşırı ekspresyonlu bitkilerde etkilenmediği gösterilmiştir. Bunun sonucunda stres kaynaklı erken çiçeklenmenin miR169'un aracılık ettiği yeni bir sinyal yolu olduğu öne sürölmüştür (Xu ve ark., 2014).

Süper oksit dismutaz (SOD) yolaklarına etki eden genler ve çiçeklenme ile ilişkili gen ifadelerinde de gen anlatımı seviyelerinde artış bulunmuştur. Bu gen ifadelerinin ekspresyon seviyeleri sırasıyla incelendiğinde M-300-5-0 bitki gruplarında miR398a ekspresyon seviyesi 0.98 oranında azaldığında SOD yolakları ile ilişkili CSD2 gen ifadesi Osm-97-0 bitkisine oranla 1.1 oranında artış meydana gelmiştir. Tuzluluğa toleranslı bitki olan *Pokkali* çeltik çeşidi ve tuz stresine hassas tür olan *Pusa Basmati* çeltik çeşidi üzerine yapılmış olan çalışmada miR398a ekspresyon seviyesi normal koşullarda tuza dayanıklı türde daha yüksek olarak bulunmuştur (Goswami ve ark., 2020).

miR156a ekspresyon seviyesi M-300-5-0 bitki gruplarında 0.78 oranında azaldığında çiçeklenme ile ilişkili SPL16 gen bölgesinde 5.6 oranında ekspresyon seviyesinde artış meydana gelmiştir. Tuz uygulaması altında tuza duyarlı ve toleranslı mısır genotiplerinin karşılaştırmalı analizinde miR156'da tuza toleranslı mısır hattı NC286'nın köklerinde ekspresyonun azaldığı gösterilmiştir (Ding ve ark., 2009). Arpa bitkisi üzerine yapılmış olan bir çalışmada da yine tuz stresinde miR156 ekspresyon seviyesinin düştüğü bulunmuştur (Lv ve ark., 2012. Deng ve ark., 2015). Buna karşılık yapılmış olan bir başka çalışmada tuz stresi altında enginar dokularında miR156 ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (De Paola ve ark. 2012). Xie ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada *Gossypium hirsutum* bitkisinde miR156 ekspresyon seviyesini tuz stresinde arttığını bulmuşlardır (Xie ve ark., 2021). *Oryza sativa* üzerine yapılan bir çalışmada miR156 ekspresyon seviyesinin tuz stresinde arttığını bulmuşlardır (Xie ve ark., 2012).

Giberellin ve anter gelişimine etkisi olan MYB faktörü, kök gelişimine etkisi olan AFB2 ve TIR1 gen bölgeleri ile metilasyonla ilişkili DRM2 gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerinde hem miRNA gruplarında hem de miRNA'ların hedef gen bölgelerinde artış meydana gelmiştir. Bu gen bölgelerini hedef alan miRNA'lara baktığımızda ise sırası ile miR159a ekspresyonunda 1.23 oranında mutant bitkide artış gözlemlenirken miR159a'nın hedefi olan MYB gen bölgesinin ekspresyonunda 2 kat bir artış ortaya çıkmıştır. *Pokkali* üzerine yapılan bir çalışmada kök ve sürgündeki miR159a'nın NaCl stresinde ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (Goswami ve ark., 2020). Parmar ve arkadaşları yaptıkları çalışma sonunda transkripsiyon faktörlerini hedefleyen miRNA'ların tuz stresinde artan ekspresyonunun, bitkide tuzluluğa direnç

sağladığını ifade etmişlerdir. Arabidopsis ve tütün bitkilerine ait tuza toleranslı mutant bitkilerin (AmMYB1 ve TaMyb73) MYB transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonunun, Arabidopsis ve tütün bitkisinde tuz toleransını arttırdığı gösterilmiştir (Parmar ve ark., 2020).

miR393a ekspresyonunda M-300-5-0 bitki gruplarında 1.48 oranında artış meydana gelirken miR393a'nın hedef gen bölgeleri sırasıyla AFB2 ve TIR1 ekspresyon seviyeleri 5.0 ve 5.1 oranında artış göstermiştir. *Oryza sativa* bitkisinde yapılmış olan bir çalışmada artan mir393a ekspresyon seviyesinin bitkide tuza toleransında arttığı ortaya konulmuştur (Gao ve ark., 2010). Tuza toleranslı *S. alterniflora* bitkisi ile yapılmış olan bir çalışmada miR393a ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde halofit bitki olan *Halostachys caspica* üzerine yapılmış bir çalışmada mir393a ekspresyon seviyesinde artış bulunmuştur (Yang ve ark., 2015).

miR820a ekspresyonunda M-300-5-0 bitki gruplarında 6.69 oranında artış meydana gelirken miR820a'nın DNA metilasyonu ile ilişkili hedef gen bölgesi olan DRM2 ekspresyonu 5.3 oranında artış göstermiştir. Bitkide radyasyon uygulaması sonucunda DNA metilasyonunu etkileyen değişimlerin oluşması söz konusudur. Yapılan çalışmalarda stres koşullarının epigenetik modifikasyonlara yol açabildiği ve böylelikle gen ekspresyonunun yanı sıra genom stabilitesinin de değişebileceği dolayısıyla epigenetik modifikasyonların stres altında adaptasyonda rol oynayabileceği vurgulanmıştır (Horemans ve ark., 2019; Schmid ve ark., 2018). İyonlaştırıcı radyasyon (IR) hücrelerde özellikle reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumuna neden olur. Radyasyonun bu indirek etkisi DNA hasarı gibi önemli biyolojik zararlanmaların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (West ve ark., 2000; Esnault ve ark., 2010; Aresta ve ark., 2016; Biermans ve ark., 2015; Van Hoeck ve ark., 2017). Yapılan araştırmalarda bitkilerin IR'nin zararlı etkilerinden korunmak için bazı mekanizmalar geliştirdiği ifade edilmektedir. Bunlar arasında özellikle antioksidanlardaki artış ve DNA onarım mekanizmalarını söylemek mümkündür (Esnault ve ark., 2010; Biermans ve ark., 2015). Onarılmadan kalan DNA'daki değişimler mutasyonlara neden olur. Ayrıca, *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada radyasyonun histon modifikasyonları ve DNA metilasyonlarına neden olduğu gösterilmiştir (Jin-Hong Kim ve ark., 2019).

mir-820a ekspresyonundaki artış çeltik üzerine yapılmış olan bir çalışmada tuza toleranslı çeşitte de elde edilmiştir (Sharma ve ark., 2021). *Pokkali* ve *Pusa basmati* ile yapılan çalışmada bitkilerin yaprak, spikelet, salkım kısımlarındaki mir820 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde normal koşullarda sadece yaprak kısımlarından alınan örneklerde *Pokkali* bitkisinde *Pusa basmati* bitkisine göre artış gözlemlenmiştir (Sharma ve ark., 2015).

Kumar ve arkadaşları *Oryza glaberrima* ile yapmış oldukları çalışmada tuz stresi ile birlikte bitkide DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları meydana geldiğini ifade etmektedirler. Bunun yanında epigenetik varyasyonların siRNA moleküllerini de etkileyerek dolaylı yoldan gen ekspresyonunu baskıladığı ve arttırdığı söylemektedirler (Mondal ve ark., 2018).

Yapmış olduğumuz çalışmada özellikle çeltik bitkisine özgü olarak tanımlanan miR820a ve hedef gen bölgesi olan DRM2 ekspresyonu M-300-5-0 bitki gruplarında Osm-97-0 bitkilerine göre bir artış göstermiştir. Genelde miRNA bölgesindeki ekspresyonun artmasına bağlı olarak hedef gen bölgesinin baskılanarak ekspresyonunda azalma meydana gelmesi beklenir. Çalışmamızda mir-820a ekspresyonunun artmasına bağlı olarak DRM2 gen bölgesinde saptadığımız artışa, mutant hatta oluşan DNA metilasyonu ile ilişkili farklı mekanizmaların devreye girme olasılığının yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

Osmancık-97 çeltik çeşidinin tuz stresi altında vermiş olduğu cevaplar incelendiğinde belirlenen miRNA grupları arasında en fazla artış miR169b'de 3.93 oranında gözlemlenmiştir. Tuza hassas bir tür olan *Pusa basmati* çeltik çeşitlerinde tuz stresi altında çalışılan miRNA'ların ekspresyon seviyeleri Goswami ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu çeşidin tuz stresi altında mir169b ekspresyonlarında artış meydana geldiği ifade edilmektedir (Goswami ve ark., 2020). mir169b'nin etki ettiği kök gelişimi, tohum gelişimi, çiçeklenme, gametogenez, ABA sinyal yolağı ve abiyotik strese geliştirilen cevaplar ile ilişkili gen bölgesi HAPC2 nükleer transkripsiyon faktörünün ekspresyon seviyesi ise tuz stresinde 11.3 oranında en fazla artış gösteren gen bölgesi olmuştur. *Setaria italica* SiNF-YA1'in aşırı ekspresyonu, süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) aktivitesini artırarak transgenik tütünde kuraklık ve tuz toleransını arttırdığı belirtilmiştir (Feng ve ark., 2015). Nükleer faktör Y veya CCAAT bağlayıcı faktör (HAP/NFY/CBF) olarak da bilinen hem aktivatör proteini (HAP), bitki büyümesi, gelişmesi ve stres

tepkilerinin düzenlenmesinde önemli işlevlere sahiptir. Nipponbare çeltik çeşidinden elde edilen HAP2E genini aşırı ekspre eden transgenik bitkide tuz stresinde bu genin biyotik ve abiyotik dirençler kazandırdığını, fotosentez ve kök sürgün sayılarını artırmaya katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Alam ve ark., 2015). Burada tuz stresinde Osm-97-150 bitkilerinde hem miRNA ekspresyonunda hem de miRNA'ların hedef gen bölgelerinde bir artış gözlenmiştir. Benzer bir şekilde Arabidopsis üzerine yapılan araştırmalarda nükleer transkripsiyon faktörü (NF-Y) komplekslerinin kuraklık ve tuz stresi altında ekspresyon seviyelerinde bir artış gösterdiği ortaya konulmuştur. Özellikle kuraklık ve tuz stresine karşı bitki üzerinde kontrol sağlayan NF-Y kompleklerinde stres altında bitkide kontrol gruplarına göre artış göstererek fenotipte iyileştirici etki göstermektedir. miR169a'yı aşırı ifade eden bitkiler, gelişmiş yabancı tip ile karşılaştırıldığında yaprakta su kaybı ve kuraklık stresine karşı toleranslı bitkiler elde edilmiştir (Pereira ve ark., 2018).

mir393a ekspresyonu Osm-97-150 bitkisinde tuz stresinde 1.75 oranında artış gösterirken, hedef gen bölgeleri kök gelişimine etki ettiği bilinen AFB2 ve TIR1'in ekspresyon oranları sırasıyla 3.9 ve 7.1 oranında artış göstermiştir. Burada mir393a'nın tuz stresi altında çeltik bitkisinde ekspresyonunun artması beklenen bir sonuç iken, etki ettiği gen bölgelerinde ekspresyon seviyesinin çok fazla artmasının bir sebebi de bitkinin tuz ortamında ilk olarak etkilendiği kısımlardan birinin köklerinin olmasıdır (Hakim ve ark., 2013, Turan ve ark., 2010). *Oryza sativa* üzerine yapılan farklı bir çalışmada da tuz stresinde mir393a ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (Xia ve ark., 2012). Tuz stresi üzerine yapılan farklı çalışmalarda oksin ilişkili gen bölgesi olan TIR ve AFB2'nin stres altında artan mir393a ekspresyonu ile birlikte inaktif olduğunu fakat stres altında mir167'nin IAA hormonunu baskıladığını ve bunun sonucunda TIR ve AFB2 gen bölgesinin doğrudan aktif hale geldiği ortaya konulmuştur (Ribba ve ark., 2020). Arabidopsis bitkisinde tuz stresi ile ilgili yapılan çalışmalarda tuz stresinde miR393a'nın ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Iglesias ve ark.2014). Çeltik bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada tuz stresi altında mir393a'nın bitkide tuz adaptasyonunu negatif yönde etkilediği vurgulanmaktadır. Ganie ve arkadaşları çeltikte tuz stresi altında mir393a'nın olgun (osa-mir393a) ve öncü (pre-mir393a) formlarındaki değişimlerle beraber hedef gen bölgesi olan TIR'in promotöründe tuz stresi ile birlikte metilasyon

meydana geldiğini göstermişlerdir. Çalışmanın sonucunda tuz stresi ile birlikte hassas ve dayanıklı tür olarak belirledikleri çeltikler sırası ile FL478 ve IR29'da osa-mir393a'nın ekspresyon seviyesinin düştüğü ve TIR geninde ekspresyonun arttığını gözlemlemişlerdir. Strese bağlı olarak gerçekleşen promotör bölgesindeki metilasyonun gen ekspresyonuna etki ettiği vurgulanmaktadır (Ganie ve ark. 2015). Çeltik üzerine yapılmış farklı bir çalışmada da tuz stresinin bitkide doğrudan metilasyonu tetiklediği gösterilmiştir. Epigenetik varyasyonlar sonucunda küçük RNA molekülleri (siRNA) devreye girerek bitkideki gen ekspresyonunu etkilediği söylenmiştir (Kumar ve ark., 2017).

Çeltiklere özgü bir miRNA olan miR820a üzerine tuz stresi ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda özellikle ekspresyon seviyesinin artış gösterdiği ön plana çıkmıştır. Bu çalışmada tuz stresinde tuza dayanıklı Pokkali bitkisinde yapraklardan elde edilen mir820 ekspresyon seviyesi tuza hassas olan Pusa basmati çeşidine göre yüksek bulunmuştur. Buna karşılık bitkinin spikelet ve salkımları gibi farklı bölgelerinden elde edilen mir820 ekspresyon seviyesi ise tuz stresinde Pusa basmati bitkisinde daha yüksek çıkmıştır (Sharma ve ark., 2015). Çeltik yapraklarından elde edilen örneklerimizde Osm-97-150 bitkisinde tuz stresinde Osm-97-0 bitkisine göre miR820a ekspresyonunda 1.27 oranında artış gözlemlenmiştir. miR820a'nın etki ettiği DNA metilasyonu ile ilişkili olan DRM2 gen ekspresyonunda ise 3.9 oranında bir artış gözlemlenmiştir. Tuza toleranslı çeltik bitkisi ile yapılmış olan farklı bir çalışmada mir820a'nın aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. Aynı zamanda bu çeltik bitkilerinin tuz stresi altında kök ve bitki gelişimleri ile başak boyutlarında kontrol gruplarına göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Sharma ve ark., 2021).

Osm-97-150 bitkisinde miR156a ekspresyonunda 3.15 oranında tuz stresinde artış meydana gelmiştir. mir156a'nın etki ettiği çiçeklenme ile ilişkili gen bölgesi olan SPL16'nın gen ekspresyonu ise tuz stresinde mir156a'nın artan ekspresyonu sonucunda 0.6 oranında azalmıştır. Domates bitkisinde yapılan benzer çalışmada da tuz stresine bağlı olarak miR156a ekspresyonunda artış gözlemlendiği ortaya konulmuştur (Çakır ve ark., 2021). Alfa alfa bitkisinde tuz stresinde yapılan bir çalışmada mir156a ekspresyon seviyesinin arttığı ve buna bağlı olarak etki ettiği gen bölgesi SPL'nin ekspresyon seviyesinin düştüğü bulunmuştur (Arshad ve ark., 2017). Alfa alfa bitkilerinde yapılan farklı bir çalışmada mir156 ekspresyonu yükseltelen transgenik bitkilerde tuz stresinde

normal ve transgenik bitkilerdeki mir156 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde transgenik bitkilerde aşırı bir artış saptanmıştır (Wang ve ark., 2021)

Tuz stresi altında Osmancık-97 bitkisinde ekspresyon seviyesinde en fazla azalma görülen miRNA ise 0.09 oranında mir398a olmuştur. SOD enzimleri ile ilişkili olan miR398a ekspresyonundaki düşüşe bağlı olarak CSD2 gen bölgesinde ise tuz stresinde 1.3 oranında artış gözlemlendi. *Arabidopsis* üzerine yapılan benzer çalışmalarda tuz stresi altında mir398 ekspresyonunda düşüş elde edilmiştir (Sunkar ve ark., 2009).

Osmancık-97 bitkilerinde tuz stresine bağlı olarak mir159a ekspresyonu 0.56 oranında düşüş göstermiştir. Özellikle giberellin ve anter gelişiminde rol alan MYB gen ekspresyonu ise miR159a'nın ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak herhangi bir değişim sergilememiştir. Yapılmış olan benzer çalışmalarda da tuz stresinde çeltik bitkilerinde mir159a ekspresyonunda azalma meydana gelmiştir (Lotfi ve ark., 2017). Bu çalışmada hassas tür olarak seçilen *Oryza sativa* bitkisinde de 150mM NaCl stresinde mir159a ekspresyon seviyesinde benzer oranda bir azalma elde edilmiştir. *Arabidopsis* üzerine MYB ailesi transkripsiyon faktörlerinin en büyük grubu olan R2R3-MYB proteinleri ile yapılmış olan çalışmada DNA metilasyonunu algılamada önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır (Wang ve ark., 2020). *Alfa alfa* bitkileri ile tuz stresinde yapılan bir çalışmada MYB transkripsiyon faktörlerinin stres altında DNA metilasyonu ile ilişkisi açıklanmıştır. Bitkilerin tuzluluk stresine transkriptomik tepkisi, kısmen gen promotör dizilerindeki epigenetik değişiklikleri düzenlediği ifade edilmektedir. Transkripsiyon faktörü MsMYB4, yoncanın tuzluluk stresine verdiği yanıtın önemli bir gen olduğu ortaya konulmuş ancak onu kodlayan genin epiallellerinin kalıtımı henüz araştırılmadığına değinilmiştir. MsMYB4'ün aktivasyonu, promotör sekansının belirli bölgelerinde artan bir histon H3K4 trimetilasyonu ve H3K9 asetilasyonu seviyesi ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda yoncadaki tuzluluk stresine yanıt olarak MsMYB4'ün DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları ile aktivasyonunda kritik bir rol olduğunu göstermişlerdir (Dong ve ark., 2020).

Tuzluluğa toleranslı M-300-5 mutant hattının belirlenen miRNA'lar ve hedef gen bölgeleri açısından tuzluluk stresinde vermiş oldukları cevaplar bu

çalışmada ele alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mutant hatta ait bitkilerin tuz stresi altında seçilen miRNA gruplarına ait (miR-156a, miR-159a, miR-169b, miR-393a, miR-398a ve miR-820a) ekspresyon seviyeleri incelendiğinde belirli oranlarda artış saptanmıştır. Bu miRNA grupları arasında ekspresyonda en fazla artış gösteren mir169b olmuştur. Belirlediğimiz miRNA gruplarının hedef aldıkları gen bölgelerinde miRNA'ların artışına bağlı olarak HAPC2, SPL16, AFB2, TIR1 ve DRM2 gen ekspresyonları sırasıyla 0.8, 0.3, 0.5, 0.9 ve 0.9 oranında azalmıştır. Ancak, MYB ve CSD2 gen ekspresyonlarında sırasıyla 1.2 ve 1.4 oranında artış saptanmıştır.

Yapılmış olan bir çalışmada tuza dayanıklı çeltik çeşitlerinde tuz stresi altında seçilen miRNA'ların ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. Goswami ve arkadaşları tuza dayanıklı çeltik türünde tuz stresi altında; mir156a, mir393a ve mir398a ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlerken, mir169b ekspresyonunda azalma saptamıştır (Goswami ve ark., 2020).

Tuzluluk stresi altında gen ekspresyonunun bitki gelişiminin düzenlenmesinde epigenetik modifikasyonun önemini Roy yapmış olduğu bir çalışmada ortaya koymuştur. Soya fasulyesinde tuzluluk stresi tarafından indüklenen 49 transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Bu 49 transkripsiyon faktöründen 45'inin tuzluluk stresinde indüklenebilirliğini gösterilmiş ve bunlardan 10 tanesinin demetilasyon ajanı 5-aza-2-deoksisitidine yanıt olarak soya fidelerinde yukarı regüle edildiği bulunmuştur. Tuzluluk stresinin, sırasıyla b-ZIP ve AP2/DREB ailesi üyesi ile birlikte MYB transkripsiyon faktörü dahil olmak üzere 10 transkripsiyon faktörünün 4'ünün metilasyon seviyesini etkilediği ortaya konulmuştur. Yapılan araştırmada bitki stres sinyalini algıladığında MAPK ve ikincil metabolit olan stres cevap yolları aktifleşmektedir. Bunun sonucunda transkripsiyon faktörleri (AREB/ABF, RAB18, MYC/MYB, DREB, RD22 ve WRKY) devreye girer ve kromatin yeniden şekillenmesinin epigenetik düzenlenmesi tetiklenerek bitkide abiyotik strese tolerans ve adaptasyon sağlandığı vurgulanmıştır (Roy ve ark., 2016).

Zhou ve arkadaşları çay bitkisinde SOD ile ilişkili gen bölgelerini ve bu gen bölgelerine etki eden miRNA'ları tanımlamıştır. Yapılan çalışma sonucunda SOD ile ilişkili olarak MSD, FSD ve CSD gen aileleri tanımlanmıştır. CSD gen ailesinin de birden fazla alt grubunun olduğu ve bu gen ailelerinin ekspresyon

seviyelerinin 5 adet miRNA (miR398a, miR164-1, miR54, miR166-5d-1 ve miR159a) ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Zhou ve ark., 2019).

Zhu ve arkadaşları mir393a'nın tuz stresi altında bitkilerde CSD gen bölgesi üzerine etkilerini incelemiştir. Yapmış oldukları araştırma sonuçlarında, abiyotik stres altında bitkide SOD ile ilişkili gen bölgelerinin (CSD1 ve CSD2) miR393a ekspresyonuna bağlı olarak artış azalış gösterdiği gibi miR393a ilişkisi olmadan da ekspresyonunda değişim olabileceği ortaya konulmuştur (Zhu ve ark., 2011).

Mutant 300-5 hattında tuz stresinde miR159a ekspresyonundaki artış sonucunda, hedef gen bölgesinin ifadesinde düşme beklenirken bitkide epigenetik düzenlenmelerin stres ile birlikte tetiklenerek MYB transkripsiyon faktörünün de artışına neden olduğu söylenebilir. Benzer şekilde mir398a ekspresyonundaki artışa bağlı olarak hedefi CSD2 gen ifadesinin baskılanması beklenirken burada da bir artış saptamamızın sebebi; CSD gen bölgelerinin birden fazla miRNA grupları ile ilişkili olduğu ve mir159a'nın ekspresyonun artmasına bağlı olarak transkripsiyon faktörlerinin de etkilenmesi ile beraber dolaylı olarak epigenetik değişimlerin olduğu nedenler arasında sayılabilir. Biz bu çalışmada CSD gen bölgeleri ile ilişkili olarak tanımlanan 5 miRNA'dan miR159a ve miR398a ekspresyonlarını ele aldık. miRNA profillerinin artması ile beraber CSD gen bölgesinde de elde edilen artışın sebebinin net olarak belirlenebilmesi için belirtilen diğer miRNA profillerinin de tuz stresinde ekspresyonlarının çalışılması gerekmektedir.

Çeşitli çeltik türlerinde tuz stresi ile metilasyon ilişkisi incelenen bir çalışmada kök ve sürgünündeki sitozin metilasyon durumuna bakılmıştır. Sürgünlerde normal koşullarda CCGG dizilerinin toplam metilasyonu *Nipponbare*'de %46.4, *Geumgangbyeo*'da %48.6, *Pokkali*'de %57.2 ve *IR29*'da %59.3 iken kökte toplam metilasyon *Geumgangbyeo*'de %19.8, *Nipponbare*'de %32.6 olarak bulunmuştur. Sürgünde, tuzluluk stresinde bu oran *IR29*'da %59.3'ten %51.7'ye, *Geumgangbyeo*'da %48.6'dan %34.5'e toplam metillenmiş bantların yüzdesinin düştüğü, ancak *Nipponbare*'de %46.4'ten %57.6'ya, *Pokkali*'de %57.2'den %65.3'e arttığı bulunmuştur. Karan ve arkadaşları farklı pirinç genotiplerinde tuzluluk stresi ile DNA metilasyonunun değiştiğini göstermişlerdir. Dört pirinç genotipinin tümünde hem kontrol hem de tuzluluk stresi altında sürgünde kökten daha yüksek düzeyde tamamen metillenmiş ve

hemimetillenmiş bantların genel bir eğilimi gözlenmiştir. Tamamen metillenmiş lokuslar hemimetillenmiş lokuslardan daha fazla olarak bulunmuştur (Karan ve ark., 2012).

Jin-Hong Kim *Arabidopsis* 'te miR156 / 159 / 160 / 166 / 390 / 393 / 398, UV-B- veya oksidatif strese duyarlı olduğu ve bitkide strese karşı düzenlenen cevaplara katıldığı belirtilmiştir. Ancak bitkilerde miRNA'lar ile DNA hasar yanıtı (DDR) / DNA onarımı arasında doğrudan bir ilişki olduğunu destekleyen bilgi olmamakla birlikte IR kaynaklı *Arabidopsis* miR840 ve miR850 dahil olmak üzere bitkiye özgü ve genotoksik strese duyarlı miRNA'ların, DDR ve DNA onarımındaki işlevleri açısından karakterize edilmeye devam ettiğini belirtmiştir (Jin-Hong Kim 2019).

IR etkisine maruz kalan bitkide DNA kırıkları ve epigenetik modülatörler devreye girerek ATM/ATR bağımlı TF'leri ya da DDR sensörlerini uyarmaktadır. Bunun sonucunda epigenetik modülatörlerle beraber kromatin düzenleyiciler, histon modifiye edici enzimler ve şaperonlar, DNA metilasyon enzimleri ve düzenleyicileri, kodlama yapmayan RNA molekülleri uyarılmaktadır (Jin-Hong Kim 2019).

Arabidopsis üzerine yapılmış olan bir çalışmada gama radyasyonuna maruz bırakılan bitki fidelerinde histon modifikasyonları incelenmiştir. Çalışma sonucunda gama ışınlamasının *Arabidopsis* fidelerinde dinamik histon modifikasyonlarını indüklediğini göstermişlerdir. Bunlar arasında, H3'ün (H3K4me3) lys 4'ünde metilasyon, genellikle DNA onarımında yer alan gama ışını ile indüklenebilir lokuslarda bulunurken, H3'ün (H3K9ac) lys 9'unda asetilasyon yalnızca AtAgo2 lokusunda zenginleştirildiği bulunmuştur (Mondal ve ark., 2016).

Tuz stresi ile metilasyon arasındaki ilişki üzerine yapılmış olan araştırma sonuçlarında çeltik bitkisinde DNA metilasyonunda tuzluluğa bağlı değişikliklerin mitotik hücre bölünmeleri yoluyla korunabileceği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2015). Tuza toleranslı bir buğday hattında (SR3) somatik hibridizasyon tarafından indüklenen DNA metilasyonundaki değişiklikler, tuz toleransına katkıda bulunduğu belirtilmiştir. (Wang ve diğerleri, 2014).

Bitkide epigenetik modifikasyonlar, belirli çevresel streslere tekrar tekrar maruz kalma sırasında stres toleransının hafızasına aracılık etmektedir (Yang ve ark., 2017). Soya fasulyesinde DNA metilasyonu ile bazı transkripsiyon

faktörlerinin aktive edilmesi veya baskılanması, tuz toleransı ile ilgili olduğu belirlenmiştir (Song ve diğerleri, 2012). Yang ve arkadaşları bitkilerdeki tuz stresine verilen yanıtları incelediğinde *Arabidopsis* ve buğdayda tuz stresine yanıt olarak Yüksek Afiniteli K⁺ Kanalı (HKT) ekspresyonunun düzenlenmesinde DNA metilasyonunun rol oynadığını söylemişlerdir. Stres yanıtları sırasında belirli lokuslarda DNA metilasyonunu ve histon modifikasyonunu kontrol eden mekanizmalar ile gen ekspresyonunu düzenlemek için siRNA'ların üretimi ve belirli lokuslara iletilerek epigenetik düzenlemedeki rolünün ortaya çıkarılması için daha fazla çalışmanın gerekli olduğu belirtilmiştir (Yang ve ark., 2017).

Bu çalışma sonucunda, elde edilen mutant M-300-5 hattına ait bitkilerde Osm-97-0'a göre tuz stresi uygulanmamış koşullarda tuzlulukla ilişkili olarak tanımlanan mir156a, mir169b ve mir398a ekspresyonlarında azalma söz konusu iken, bu miRNA gruplarının hedef aldıkları gen bölgelerinde artış bulunmuştur. Mutant hattımıza ait bitkilerde mir159a, mir393a ve mir820a ekspresyonlarında artış bulunurken bu miRNA gruplarının hedef aldıkları gen bölgelerinde de artış saptanmıştır.

Mutant hattımıza ait bitkilerde tuz stresi altında çalışma kapsamında değerlendirilen tüm miRNA'ların ifadelerinde artış saptanmıştır.

Mutant hattında tuz stresinde metilasyon ile ilişkili gen bölgesi DRM2'de, transkripsiyon faktörü olan NF-YA (HAPC2), kök gelişimi ile ilişkili gen bölgesi AFB2 ve TIR1'de, çiçeklenme ile ilişkili gen bölgesi SPL16'da azalma meydana gelirken, MYB transkripsiyon faktöründe ve SOD ile ilişkili olan CSD2 gen bölgesinde artış olmuştur.

Bu tez kapsamında ele alınan tuz stresine toleranslı mutant hatta ait miRNA cevapları ilk kez yapılmıştır. Tuza toleranslı mutant M-300-5 hattına ait bitkilerde saptanan tuz toleransı ile ilişkili miRNA'ların gen ifadelerindeki artışlar mutant bitkinin tuza toleranslı olduğunu destekleyen sonuçları göstermektedir.

6 KAYNAKÇA

Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C., & Harberd, N. P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA.

Aresta, M., Dibenedetto, A., & Quaranta, E. (2016). State of the art and perspectives in catalytic processes for CO₂ conversion into chemicals and fuels: The distinctive contribution of chemical catalysis and biotechnology. *Journal of Catalysis*, 343, 2-45.

Arshad, M., Puri, A., Simkovich, A. J., Renaud, J., Gruber, M. Y., Marsolais, F., & Hannoufa, A. (2020). Label-free quantitative proteomic analysis of alfalfa in response to microRNA156 under high temperature. *BMC genomics*, 21(1), 1-18.

Assaha, D. V., Ueda, A., Saneoka, H., Al-Yahyai, R., & Yaish, M. W. (2017). The role of Na⁺ and K⁺ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. *Frontiers in physiology*, 8, 509.

Bai, B., Bian, H., Zeng, Z., Hou, N., Shi, B., Wang, J., ... & Han, N. (2017). miR393-mediated auxin signaling regulation is involved in root elongation inhibition in response to toxic aluminum stress in barley. *Plant and Cell Physiology*, 58(3), 426-439.

Banerjee, A., Roychoudhury, A., & Krishnamoorthi, S. (2016). Emerging techniques to decipher microRNAs (miRNAs) and their regulatory role in conferring abiotic stress tolerance of plants. *Plant Biotechnology Reports*, 10(4), 185-205.

Beatty, P. H., Shrawat, A. K., Carroll, R. T., Zhu, T., & Good, A. G. (2009). Transcriptome analysis of nitrogen-efficient rice over-expressing alanine aminotransferase. *Plant Biotechnology Journal*, 7(6), 562-576.

Bej, S., & Basak, J. (2014). MicroRNAs: the potential biomarkers in plant stress response. *American Journal of Plant Sciences*, 2014.

Biermans, G., Horemans, N., Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Saenen, E., Van Hees, M., ... & Cuypers, A. (2015). *Arabidopsis thaliana* seedlings show an age-

dependent response on growth and DNA repair after exposure to chronic γ -radiation. *Environmental and experimental botany*, 109, 122-130.

Breakfield, N. W., Corcoran, D. L., Petricka, J. J., Shen, J., Sae-Seaw, J., Rubio-Somoza, I., ... & Benfey, P. N. (2012). High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in Arabidopsis. *Genome research*, 22(1), 163-176.

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880), 1185-1190.

Chen, J. F., Zhao, Z. X., Li, Y., Li, T. T., Zhu, Y., Yang, X. M., ... & Wang, W. M. (2021). Fine-tuning roles of Osa-miR159a in rice immunity against *Magnaporthe oryzae* and development. *Rice*, 14(1), 1-11.

Chen, Z., Hu, L., Han, N., Hu, J., Yang, Y., Xiang, T., ... & Wang, L. (2015). Overexpression of a miR393-resistant form of transport inhibitor response protein 1 (mTIR1) enhances salt tolerance by increased osmoregulation and Na⁺ exclusion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 56(1), 73-83.

Cui, Y., Cheng, J., Ruan, S., Qi, P., Liu, W., Bian, H., ... & Hu, X. (2020). The heterochronic gene *Oryza sativa* LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 modulates miR156b/c/i/e levels. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(12), 1839-1852.

Çakır, Ö., Arıkan, B., Karpuz, B., & Turgut-Kara, N. (2021). Expression analysis of miRNAs and their targets related to salt stress in *Solanum lycopersicum* H-2274. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 283-290.

Çelik, Ö., Meriç, S., Ayan, A., & Atak, Ç. (2019). Epigenetic analysis of WRKY transcription factor genes in salt stressed rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Environmental and Experimental Botany*, 159, 121-131.

De Paola, D., Cattonaro, F., Pignone, D., & Sonnante, G. (2012). The miRNAome of globe artichoke: conserved and novel micro RNAs and target analysis. *BMC genomics*, 13(1), 1-14.

Deng, P., Wang, L., Cui, L., Feng, K., Liu, F., Du, X., ... & Weining, S. (2015). Global identification of microRNAs and their targets in barley under salinity stress. *PLoS One*, *10*(9), e0137990.

Denver, J. B., & Ullah, H. (2019). miR393s regulate salt stress response pathway in *Arabidopsis thaliana* through scaffold protein RACK1A mediated ABA signaling pathways. *Plant signaling & behavior*, *14*(6), 1600394.

Ding, D., Zhang, L., Wang, H., Liu, Z., Zhang, Z., & Zheng, Y. (2009). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of botany*, *103*(1), 29-38.

Dong, W., Gao, T., Wang, Q., Chen, J., Lv, J., & Song, Y. (2020). Salinity stress induces epigenetic alterations to the promoter of MsMYB4 encoding a salt-induced MYB transcription factor. *Plant Physiology and Biochemistry*, *155*, 709-715.

FAO, 2018 Crops and Livestock Products, Link:
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/TP>

Feng, Z. J., He, G. H., Zheng, W. J., Lu, P. P., Chen, M., Gong, Y. M., ... & Xu, Z. S. (2015). Foxtail millet NF-Y families: genome-wide survey and evolution analyses identified two functional genes important in abiotic stresses. *Frontiers in plant science*, *6*, 1142.

Flowers, T. J., Galal, H. K., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, *37*(7), 604-612.

Gao, P., Bai, X., Yang, L., Lv, D., Pan, X., Li, Y., ... & Zhu, Y. (2011). osa-MIR393: a salinity-and alkaline stress-related microRNA gene. *Molecular biology reports*, *38*(1), 237-242.

Gautam, T., & Gupta, P. K. (2020). Sequence variation in genes encoding miRNAs/targets and other related approaches for possible use in crop improvement. *Plant Breeding*, *139*(1), 28-41.

Ghosh, B., Md, N. A., & Gantait, S. (2016). Response of rice under salinity stress: a review update. *Rice research: open access*, 1-8.

Goswami, K., Mittal, D., Gautam, B., Sopory, S. K., & Sanan-Mishra, N. (2020). Mapping the salt stress-induced changes in the root miRNome in Pokkali rice. *Biomolecules*, *10*(4), 498.

Guimaraes, E. P. (2009). Rice breeding. In *Cereals* (pp. 99-126). Springer, New York, NY.

Gupta, O. P., Meena, N. L., Sharma, I., & Sharma, P. (2014). Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. *Molecular Biology Reports*, *41*(7), 4623-4629.

Hakim, M. A., Juraimi, A. S., Hanafi, M. M., Ali, E., Ismail, M. R., Selamat, A., & Karim, S. R. (2014). Effect of salt stress on morpho-physiology, vegetative growth and yield of rice. *Journal of environmental biology*, *35*(2), 317.

He, Y., Zhou, J., Hu, Y., Fang, C., Yu, Y., Yang, J., ... & Zhu, Z. (2021). Overexpression of sly-miR398b increased salt sensitivity likely via regulating antioxidant system and photosynthesis in tomato. *Environmental and Experimental Botany*, *181*, 104273.

Himabindu, Y., Chakradhar, T., Reddy, M. C., Kanygin, A., Redding, K. E., & Chandrasekhar, T. (2016). Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. *Environmental and Experimental Botany*, *124*, 39-63.

Hniličková, H., Hnilička, F., Orsák, M., & Hejtnák, V. (2019). Effect of salt stress on growth, electrolyte leakage, Na⁺ and K⁺ content in selected plant species. *Plant, Soil and Environment*, *65*(2), 90-96.

Horemans, N., Spurgeon, D. J., Lecomte-Pradines, C., Saenen, E., Bradshaw, C., Oughton, D., ... & Adam-Guillermin, C. (2019). Current evidence for a role of epigenetic mechanisms in response to ionizing radiation in an ecotoxicological context. *Environmental Pollution*, *251*, 469-483.

Hossain, M. A., Kumar, V., Burritt, D. J., Fujita, M., & Mäkelä, P. S. (2019). *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. Proline Metabolism and Its Functions in Development and Stress Tolerance*. Springer Nature Switzerland, 41-72

Hussain, S., Shaukat, M., Ashraf, M., Zhu, C., Jin, Q., & Zhang, J. (2019). Salinity stress in arid and semi-arid climates: Effects and management in field crops. *Climate change and agriculture*, 13.

Ibraheem, O., Dealtry, G., Roux, S., & Bradley, G. (2011). The Effect of Drought and Salinity on the Expressional Levels of Sucrose Transporters in Rice (*Oryza sativa*'Nipponbare) Cultivar Plants. *Plant Omics*, 4(2), 68-74.

Iglesias, M. J., Terrile, M. C., Windels, D., Lombardo, M. C., Bartoli, C. G., Vazquez, F., ... & Casalongué, C. A. (2014). MiR393 regulation of auxin signaling and redox-related components during acclimation to salinity in Arabidopsis. *PLoS One*, 9(9), e107678.

Izawa, T., & Shimamoto, K. (1996). Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. *Trends in Plant Science*, 1(3), 95-99.

Jackson, S. A. (2016). Rice: the first crop genome. *Rice*, 9(1), 1-3.

Jagadeeswaran, G., Saini, A., & Sunkar, R. (2009). Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis. *Planta*, 229(4), 1009-1014.

Jerome Jeyakumar, J. M., Ali, A., Wang, W. M., & Thiruvengadam, M. (2020). Characterizing the role of the miR156-SPL Network in plant development and stress response. *Plants*, 9(9), 1206.

Joo-Yeon Bae, Department of International Agricultural Technology, Seoul National University, 2019

Jung, H. J., & Kang, H. (2007). Expression and functional analyses of microRNA417 in Arabidopsis thaliana under stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(10-11), 805-811.

Kadam, N. N., Yin, X., Bindraban, P. S., Struik, P. C., & Jagadish, K. S. (2015). Does morphological and anatomical plasticity during the vegetative stage make wheat more tolerant of water deficit stress than rice?. *Plant physiology*, 167(4), 1389-1401.

Karan, R., DeLeon, T., Biradar, H., & Subudhi, P. K. (2012). Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PloS one*, 7(6), e40203.

- Kazan, K., & Lyons, R. (2016). The link between flowering time and stress tolerance. *Journal of experimental botany*, 67(1), 47-60.
- Kim, J. H., Ryu, T. H., Lee, S. S., Lee, S., & Chung, B. Y. (2019). Ionizing radiation manifesting DNA damage response in plants: An overview of DNA damage signaling and repair mechanisms in plants. *Plant Science*, 278, 44-53.
- KORKMAZ, N., GÜNDÜZ, M., & Şerafettin, A. Ş. I. K. (2016). Gediz Nehrinin güneyindeki tarım alanlarının taban suyu seviyesi ve kalitesinin zamansal değişimi. *Derim*, 33(2), 263-278.
- Kumar, V., Khare, T., Shriram, V., & Wani, S. H. (2018). Plant small RNAs: the essential epigenetic regulators of gene expression for salt-stress responses and tolerance. *Plant cell reports*, 37(1), 61-75.
- Kushawaha, A. K., Khan, A., Sopory, S. K., & Sanan-Mishra, N. (2019). Light Regulated Osa-miR169e Is Implicated during Priming under High Temperature Stress in Rice. *American Journal of Plant Sciences*, 10(09), 1662.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, 75(5), 843-854.
- Leng, X., Wang, P., Zhu, X., Li, X., Zheng, T., Shangguan, L., & Fang, J. (2017). Ectopic expression of CSD1 and CSD2 targeting genes of miR398 in grapevine is associated with oxidative stress tolerance. *Functional & integrative genomics*, 17(6), 697-710.
- Li, W. X., Oono, Y., Zhu, J., He, X. J., Wu, J. M., Iida, K., ... & Zhu, J. K. (2008). The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *The Plant Cell*, 20(8), 2238-2251.
- Li, X., Bian, H., Song, D., Ma, S., Han, N., Wang, J., & Zhu, M. (2013). Flowering time control in ornamental gloxinia (*Sinningia speciosa*) by manipulation of miR159 expression. *Annals of botany*, 111(5), 791-799.

- Li, Y., Zhao, S. L., Li, J. L., Hu, X. H., Wang, H., Cao, X. L., ... & Wang, W. M. (2017). Osa-miR169 negatively regulates rice immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in plant science*, 8, 2.
- Liu, S. R., Zhou, J. J., Hu, C. G., Wei, C. L., & Zhang, J. Z. (2017). MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in microbiology*, 8, 1801.
- Lokhande, V. H., Mulye, K., Patkar, R., Nikam, T. D., & Suprasanna, P. (2013). Biochemical and physiological adaptations of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* (L.) L.,(Aizoaceae) to salinity. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59(10), 1373-1391.
- Lotfi, A., Pervaiz, T., Jiu, S., Faghihi, F., Jahanbakhshian, Z., Khorzoghi, E. G., & Fang, J. (2017). Role of microRNAs and their target genes in salinity response in plant s. *Plant Growth Regulation*, 82(3), 377-390.
- Lu, Y., Feng, Z., Bian, L., Xie, H., & Liang, J. (2010). miR398 regulation in rice of the responses to abiotic and biotic stresses depends on CSD1 and CSD2 expression. *Functional Plant Biology*, 38(1), 44-53.
- Lu, Y., Feng, Z., Liu, X., Bian, L., Xie, H., Zhang, C., ... & Liang, J. (2018). MiR393 and miR390 synergistically regulate lateral root growth in rice under different conditions. *BMC plant biology*, 18(1), 1-12.
- Lv, S., Nie, X., Wang, L., Du, X., Biradar, S. S., Jia, X., & Weining, S. (2012). Identification and characterization of microRNAs from barley (*Hordeum vulgare* L.) by high-throughput sequencing. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 2973-2984.
- Ma, Y., Xue, H., Zhang, F., Jiang, Q., Yang, S., Yue, P., ... & Zhang, Z. (2021). The miR156/SPL module regulates apple salt stress tolerance by activating MdWRKY100 expression. *Plant biotechnology journal*, 19(2), 311.
- Masood, M. S., Seiji, Y. A. N. A. G. I. H. A. R. A., Shinwari, Z. K., & Anwar, R. A. S. H. I. D. (2004). Mapping quantitative trait loci (QTLs) for salt tolerance in rice (*Oryza sativa*) using RFLPs. *Pak. J. Bot*, 36(4), 825-834.

- Miao, C., Wang, Z., Zhang, L., Yao, J., Hua, K., Liu, X., ... & Zhu, J. K. (2019). The grain yield modulator miR156 regulates seed dormancy through the gibberellin pathway in rice. *Nature communications*, *10*(1), 1-12.
- Mittal, D., Mukherjee, S. K., Vasudevan, M., & Mishra, N. S. (2013). Identification of tissue-preferential expression patterns of rice miRNAs. *Journal of Cellular Biochemistry*, *114*(9), 2071-2081.
- Mohsenifard, E., Ghabooli, M., Mehri, N., & Bakhshi, B. (2017). Regulation of miR159 and miR396 mediated by *Piriformospora indica* confer drought tolerance in rice. *Journal of Plant Molecular Breeding*, *5*(1), 10-18.
- Mondal, S., Go, Y. S., Lee, S. S., Chung, B. Y., & Kim, J. H. (2016). Characterization of histone modifications associated with DNA damage repair genes upon exposure to gamma rays in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of radiation research*, *57*(6), 646-654.
- Mondal, T. K., Ganie, S. A., & Debnath, A. B. (2015). Identification of novel and conserved miRNAs from extreme halophyte, *Oryza coarctata*, a wild relative of rice. *PLoS One*, *10*(10), e0140675.
- Mondal, T. K., Panda, A. K., Rawal, H. C., & Sharma, T. R. (2018). Discovery of microRNA-target modules of African rice (*Oryza glaberrima*) under salinity stress. *Scientific reports*, *8*(1), 1-11.
- Muchate, N. S., Nikalje, G. C., Rajurkar, N. S., Suprasanna, P., & Nikam, T. D. (2016). Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance. *The Botanical Review*, *82*(4), 371-406.
- Narjala, A., Nair, A., Tirumalai, V., Hari Sundar, G. V., & Shivaprasad, P. V. (2020). A conserved sequence signature is essential for robust plant miRNA biogenesis. *Nucleic acids research*, *48*(6), 3103-3118.
- Negrão, S., Schmöckel, S. M., & Tester, M. (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of botany*, *119*(1), 1-11.
- Nikalje, G. C., Srivastava, A. K., Pandey, G. K., & Suprasanna, P. (2018). Halophytes in biosaline agriculture: Mechanism, utilization, and value addition. *Land Degradation & Development*, *29*(4), 1081-1095.

Nosaka, M., Itoh, J. I., Nagato, Y., Ono, A., Ishiwata, A., & Sato, Y. (2012). Role of transposon-derived small RNAs in the interplay between genomes and parasitic DNA in rice.

Nosaka, M., Ono, A., Ishiwata, A., Shimizu-Sato, S., Ishimoto, K., Noda, Y., & Sato, Y. (2013). Expression of the rice microRNA miR820 is associated with epigenetic modifications at its own locus. *Genes & genetic systems*, 88(2), 105-112.

Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and Pollution research*, 22(6), 4056-4075.

Parmar, S., Gharat, S. A., Tagirasa, R., Chandra, T., Behera, L., Dash, S. K., & Shaw, B. P. (2020). Identification and expression analysis of miRNAs and elucidation of their role in salt tolerance in rice varieties susceptible and tolerant to salinity. *PloS one*, 15(4), e0230958.

Pegler, J. L., Nguyen, D. Q., Grof, C. P., & Eamens, A. L. (2020). Profiling of the salt stress responsive microRNA landscape of C4 genetic model species *Setaria viridis* (L.) Beauv. *Agronomy*, 10(6), 837.

Peng, T., Qiao, M., Liu, H., Teotia, S., Zhang, Z., Zhao, Y., ... & Tang, G. (2018). A resource for inactivation of microRNAs using short tandem target mimic technology in model and crop plants. *Molecular plant*, 11(11), 1400-1417.

Pereira, S. L., Martins, C. P., Sousa, A. O., Camillo, L. R., Araújo, C. P., Alcantara, G. M., ... & Costa, M. G. (2018). Genome-wide characterization and expression analysis of citrus NUCLEAR FACTOR-Y (NF-Y) transcription factors identified a novel NF-YA gene involved in drought-stress response and tolerance. *PLoS One*, 13(6), e0199187.

Pereira, S. L., Martins, C. P., Sousa, A. O., Camillo, L. R., Araújo, C. P., Alcantara, G. M., ... & Costa, M. G. (2018). Genome-wide characterization and expression analysis of citrus NUCLEAR FACTOR-Y (NF-Y) transcription factors identified a novel NF-YA gene involved in drought-stress response and tolerance. *PLoS One*, 13(6), e0199187.

Pereira, S. L., Martins, C. P., Sousa, A. O., Camillo, L. R., Araújo, C. P., Alcantara, G. M., ... & Costa, M. G. (2018). Genome-wide characterization and expression analysis of citrus NUCLEAR FACTOR-Y (NF-Y) transcription factors identified a novel NF-YA gene involved in drought-stress response and tolerance. *PLoS One*, 13(6), e0199187.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

Priya, T. R., Nelson, A. R. L. E., Ravichandran, K., & Antony, U. (2019). Nutritional and functional properties of coloured rice varieties of South India: a review. *Journal of Ethnic Foods*, 6(1), 1-11.

Raghuram, B., Sheikh, A. H., & Sinha, A. K. (2014). Regulation of MAP kinase signaling cascade by microRNAs in *Oryza sativa*. *Plant signaling & behavior*, 9(10), e972130.

Rao, S., Balyan, S., Jha, S., & Mathur, S. (2020). Novel insights into expansion and functional diversification of MIR169 family in tomato. *Planta*, 251(2), 1-17.

Ribba, T., Garrido-Vargas, F., & O'Brien, J. A. (2020). Auxin-mediated responses under salt stress: From developmental regulation to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany*, 71(13), 3843-3853.

Roy, S. (2016). Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant signaling & behavior*, 11(1), e1117723.

Ruelland, E., & Zachowski, A. (2010). How plants sense temperature. *Environmental and experimental botany*, 69(3), 225-232.

Schmid, M. W., Heichinger, C., Schmid, D. C., Guthörl, D., Gagliardini, V., Bruggmann, R., ... & Grossniklaus, U. (2018). Contribution of epigenetic variation to adaptation in *Arabidopsis*. *Nature communications*, 9(1), 1-12.

Sharma, N., Kumar, S., & Sanan-Mishra, N. (2021). Osa-miR820 regulatory node primes rice plants to tolerate salt stress in an agronomically advantageous manner. *bioRxiv*.

Sharma, N., Panchal, S., & Sanan-Mishra, N. (2015). Protocol for artificial microRNA mediated over-expression of miR820 in indica rice. *American Journal of Plant Sciences*, 6(12), 1951.

Shin, S. Y., Jeong, J. S., Lim, J. Y., Kim, T., Park, J. H., Kim, J. K., & Shin, C. (2018). Transcriptomic analyses of rice (*Oryza sativa*) genes and non-coding RNAs under nitrogen starvation using multiple omics technologies. *BMC genomics*, 19(1), 1-20.

Shinde, H., Dudhate, A., Anand, L., Tsugama, D., Gupta, S. K., Liu, S., & Takano, T. (2020). Small RNA sequencing reveals the role of pearl millet miRNAs and their targets in salinity stress responses. *South African Journal of Botany*, 132, 395-402.

Singh, A., & Roychoudhury, A. (2021). Gene regulation at transcriptional and post-transcriptional levels to combat salt stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 173(4), 1556-1572.

Song, Y., Ji, D., Li, S., Wang, P., Li, Q., & Xiang, F. (2012). The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. *PloS one*, 7(7), e41274.

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

Suralta, R. R., Kano-Nakata, M., Niones, J. M., Inukai, Y., Kameoka, E., Tran, T. T., ... & Yamauchi, A. (2018). Root plasticity for maintenance of productivity under abiotic stressed soil environments in rice: Progress and prospects. *Field Crops Research*, 220, 57-66.

Tang, Y., Bao, X., Zhi, Y., Wu, Q., Guo, Y., Yin, X., ... & Liu, K. (2019). Overexpression of a MYB family gene, OsMYB6, increases drought and salinity stress tolerance in transgenic rice. *Frontiers in plant science*, 10, 168.

Tanveer, K., Gilani, S., Hussain, Z., Ishaq, R., Adeel, M., & Ilyas, N. (2020). Effect of salt stress on tomato plant and the role of calcium. *Journal of Plant Nutrition*, 43(1), 28-35.

- Tarver, J. E., Donoghue, P. C., & Peterson, K. J. (2012). Do miRNAs have a deep evolutionary history?. *Bioessays*, 34(10), 857-866.
- Theerawitaya, C., Samphumphuang, T., Tisarum, R., Siangliw, M., Cha-um, S., Takabe, T., & Toojinda, T. (2021). Transcriptional expression of Na⁺ homeostasis-related genes and physiological responses of rice seedlings under salt stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 30, 81-91.
- Turan, M. A., Elkarim, A. H. A., & Taban, S. (2010). Effect of salt stress on growth and ion distribution and accumulation in shoot and root of maize plant. *African Journal of Agricultural Research*, 5(7), 584-588.
- Van Hoeck, A., Horemans, N., Nauts, R., Van Hees, M., Vandenhove, H., & Blust, R. (2017). *Lemna minor* plants chronically exposed to ionising radiation: RNA-seq analysis indicates a dose rate dependent shift from acclimation to survival strategies. *Plant Science*, 257, 84-95.
- Wang, B., Luo, Q., Li, Y., Yin, L., Zhou, N., Li, X., ... & Dong, A. (2020). Structural insights into target DNA recognition by R2R3-MYB transcription factors. *Nucleic acids research*, 48(1), 460-471.
- Wang, H., Zhang, M., Guo, R., Shi, D., Liu, B., Lin, X., & Yang, C. (2012). Effects of salt stress on ion balance and nitrogen metabolism of old and young leaves in rice (*Oryza sativa L.*). *BMC plant biology*, 12(1), 1-11.
- Wang, J. W., Park, M. Y., Wang, L. J., Koo, Y., Chen, X. Y., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2011). miRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS genetics*, 7(2), e1002012.
- Wang, M., Qin, L., Xie, C., Li, W., Yuan, J., Kong, L., ... & Liu, S. (2014). Induced and constitutive DNA methylation in a salinity-tolerant wheat introgression line. *Plant and Cell Physiology*, 55(7), 1354-1365.
- Wang, W., Huang, F., Qin, Q., Zhao, X., Li, Z., & Fu, B. (2015). Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress and subsequent recovery. *Biochemical and biophysical research communications*, 465(4), 790-796.

West, C. E., Waterworth, W. M., Jiang, Q., & Bray, C. M. (2000). Arabidopsis DNA ligase IV is induced by γ -irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *The Plant Journal*, 24(1), 67-78.

Xia, K., Wang, R., Ou, X., Fang, Z., Tian, C., Duan, J., ... & Zhang, M. (2012). OsTIR1 and OsAFB2 downregulation via OsmiR393 overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *PLoS one*, 7(1), e30039.

Xie, K., Shen, J., Hou, X., Yao, J., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2012). Gradual increase of miR156 regulates temporal expression changes of numerous genes during leaf development in rice. *Plant physiology*, 158(3), 1382-1394.

Xu, H., Bao, J. D., Dai, J. S., Li, Y., & Zhu, Y. (2015). Genome-wide identification of new reference genes for qRT-PCR normalization under high temperature stress in rice endosperm. *Plos one*, 10(11), e0142015.

Xu, M. Y., Zhang, L., Li, W. W., Hu, X. L., Wang, M. B., Fan, Y. L., ... & Wang, L. (2014). Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in Arabidopsis thaliana. *Journal of experimental botany*, 65(1), 89-101.

Xu, T., Zhang, L., Yang, Z., Wei, Y., & Dong, T. (2021). Identification and Functional Characterization of Plant MiRNA Under Salt Stress Shed Light on Salinity Resistance Improvement Through MiRNA Manipulation in Crops. *Frontiers in Plant Science*, 12, 972.

Xue, T., Liu, Z., Dai, X., & Xiang, F. (2017). Primary root growth in Arabidopsis thaliana is inhibited by the miR159 mediated repression of MYB33, MYB65 and MYB101. *Plant Science*, 262, 182-189.

Yamaguchi, T., & Hirano, H. Y. (2006). Function and diversification of MADS-box genes in rice. *TheScientificWorldJOURNAL*, 6, 1923-1932.

Yang, H., Schmuke, J. J., Flagg, L. M., Roberts, J. K., Allen, E. M., Ivashuta, S., ... & Christian, A. T. (2009). A novel real-time polymerase chain reaction method for high throughput quantification of small regulatory RNAs. *Plant biotechnology journal*, 7(7), 621-630.

- Yang, X., & Li, L. (2012). Analyzing the microRNA transcriptome in plants using deep sequencing data. *Biology*, *1*(2), 297-310.
- Yang, Y., & Guo, Y. (2018). Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist*, *217*(2), 523-539.
- Yung, W. S., Li, M. W., Sze, C. C., Wang, Q., & Lam, H. M. (2021). Histone modifications and chromatin remodelling in plants in response to salt stress. *Physiologia Plantarum*, *173*(4), 1495-1513.
- Zhang, L., Ding, H., Jiang, H., Wang, H., Chen, K., Duan, J., ... & Wu, G. (2020). Regulation of cadmium tolerance and accumulation by miR156 in Arabidopsis. *Chemosphere*, *242*, 125168.
- Zhao, B., Ge, L., Liang, R., Li, W., Ruan, K., Lin, H., & Jin, Y. (2009). Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC molecular biology*, *10*(1), 1-10.
- Zhao, C., Zhang, H., Song, C., Zhu, J. K., & Shabala, S. (2020). Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. *The innovation*, *1*(1), 100017.
- Zhao, J., He, Q., Chen, G., Wang, L., & Jin, B. (2016). Regulation of non-coding RNAs in heat stress responses of plants. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1213.
- Zhao, J., Yuan, S., Zhou, M., Yuan, N., Li, Z., Hu, Q., ... & Luo, H. (2019). Transgenic creeping bentgrass overexpressing Osa-miR393a exhibits altered plant development and improved multiple stress tolerance. *Plant biotechnology journal*, *17*(1), 233-251.
- Zheng, Z., Wang, N., Jalajakumari, M., Blackman, L., Shen, E., Verma, S., ... & Millar, A. A. (2020). miR159 represses a constitutive pathogen defense response in tobacco. *Plant physiology*, *182*(4), 2182-2198.
- Zhou, C., Zhu, C., Fu, H., Li, X., Chen, L., Lin, Y., ... & Guo, Y. (2019). Genome-wide investigation of superoxide dismutase (SOD) gene family and their regulatory miRNAs reveal the involvement in abiotic stress and hormone response in tea plant (*Camellia sinensis*). *PloS one*, *14*(10), e0223609.
- Zhu, C., Ding, Y., & Liu, H. (2011). MiR398 and plant stress responses. *Physiologia plantarum*, *143*(1), 1-9.

Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53(1), 247-273.

