



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜS BİTKİLERİNDE ABİYOTİK VE BİYOTİK STRESLE İLİŞKİLİ
miRNA'LARIN *İN SİLİKO* BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERVET BOZKURT

OCAK

**SÜS BİTKİLERİNDE ABİYOTİK VE BİYOTİK STRESLE İLİŞKİLİ
miRNA'LARIN *İN SİLİKO* BELİRLENMESİ**

Servet BOZKURT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Doç. Dr. Sevgi MARAKLI

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2021

Servet BOZKURT tarafından hazırlanan “**Süs Bitkilerinde Abiyotik ve Biyotik Stresle İlişkili miRNA’ların İn Siliko Belirlenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Amasya Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Sevgi MARAKLI

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan: Prof. Dr. Tuba Yıldırım

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Behcet İNAL

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Siirt Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 15.01.2021

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Meryem EVECEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Abdüssamed Mirzaya

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Servet BOZKURT

15.01.2021

SÜS BİTKİLERİNDE ABİYOTİK VE BİYOTİK STRESLE İLİŞKİLİ miRNA'ların *İN SİLİKO* BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Servet BOZKURT

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2021

ÖZET

Mikro RNA'lar, gen anlatımını post-transkripsiyonel ya da post-translasyonel seviyelerde etkileyen kısa kodlama yapmayan RNA dizileridir. Süs bitkileri, dünya bahçecilik endüstrisinde önemli bir konuma sahiptir. Peyzaj mimarisindeki estetik değerlerinin yanı sıra tıbbi ve ekonomik açıdan da önemli bitkilerdir. Bu tezin amacı; *Petunia hybrida*, *Castanea sativa*, *Yucca filamentosa*, *Opuntia streptacantha*, *Cichorium intybus*, *Cynara cardunculus*, *Asparagus officinalis* ve *Ginkgo biloba* süs bitkilerinde abiyotik ve biyotik stres ile ilişkili yeni miRNA dizilerinin bilgisayar temelli yaklaşımlarla tanımlanmasıdır. Bu bitkilerin EST veri tabanlarında sıkı kriterler uygulanarak yapılan BLAST aramaları sonucunda yeni miRNA'lar, *in siliko* olarak tanımlandı. Pre-miRNA dizilerinin ikincil yapıları, RNAfold Web Server kullanılarak belirlendi. Yeni tanımlanan miRNA dizileri ve referans miRNA dizileri arasındaki evrimsel ilişki Clustal Omega ve MEGAX ile araştırıldı. Potansiyel hedef genlerin rollerinin belirlenmesi için GO ve KEGG analizleri de BLAST2GO programı kullanılarak gerçekleştirildi. *Petunia hybrida* (phy-miR168 ve phy-miR399), *Castanea sativa* (csa-miR169), *Yucca filamentosa* (yfi-miR169), *Opuntia streptacantha* (osa-miR169), *Cichorium intybus* (cin-miR169), *Cynara cardunculus* (cca-miR169), *Asparagus officinalis* (aof-miR2930) ve *Ginkgo biloba* (gbi-miR10982) bitkilerinin bulunduğu sekiz süs bitkisinde, beş miRNA ailesine ait dokuz yeni miRNA dizisi ilk defa tanımlandı. Filogenetik analizler, yeni tanımlanan miRNA'lar ile referans miRNA'lar arasında oldukça fazla benzerlik olduğunu gösterdi. GO'nun biyolojik süreçler, hücresel bileşen ve moleküler fonksiyonlarla zenginleştirme analizlerinde potansiyel hedef genlerin; strese cevap, oksidasyon-redüksiyon süreci, hücresel metabolik süreç, protein bağlanması vb. gibi süreçlerde rol oynadığı belirlendi. Ayrıca KEGG sonuçlarında da bu genlerin; steroid biyosentezi, pürin metabolizması, karotenoid biyosentezi gibi yirmi altı farklı metabolik yolda yer aldığı belirlendi. Bu tez, süs bitkilerinin genomlarında, farklı miRNA ailelerinin ve onların hedeflerinin belirlendiği ilk detaylı çalışmadır. Elde edilen sonuçların farklı renk ve kokuda strese dayanıklı süs bitkilerinin üretimine katkı sağlaması beklenmektedir.

Sayfa Adedi : 120

Anahtar Kelimeler : Peyzaj Bitkileri, Kısa kodlama yapmayan RNA'lar, Epigenetik

Danışman : Doç. Dr. Sevgi MARAKLI

IN SILICO DETERMINATION of ABIOTIC and BIOTIC STRESS RELATED miRNAs
in ORNAMENTAL PLANTS

(M.Sc. Thesis)

Servet BOZKURT

AMASYA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2021

ABSTRACT

Micro RNAs are small non-coding RNAs, regulating gene expression at post-transcriptional or post-translational levels. Ornamental plants hold an important status within the horticultural industry of the world. In addition to their aesthetic value in landscape architecture, they are also medicinally and economically important plants. The aim of this thesis was computational characterisation of abiotic and biotic stress-related novel miRNA sequences in ornamental plants including *Petunia hybrida*, *Castanea sativa*, *Yucca filamentosa*, *Opuntia streptacantha*, *Cichorium intybus*, *Cynara cardunculus*, *Asparagus officinalis* and *Ginkgo biloba*. *In silico* identification of new miRNAs based on BLAST searches of the EST database of these plants was performed by using stringent criteria. The secondary structures of pre-miRNAs were determined by using RNAfold Web Server. Evolutionary relationships between novel miRNAs and reference miRNAs were investigated via Clustal Omega and MEGAX. GO and KEGG analyses were also performed to identify the roles of potential target genes by BLAST2GO. Nine novel miRNAs belonging to five miRNA families in eight ornamental plants consisting of *Petunia hybrida* (phy-miR168 and phy-miR399), *Castanea sativa* (csa-miR169), *Yucca filamentosa* (yfi-miR169), *Opuntia streptacantha* (osa-miR169), *Cichorium intybus* (cin-miR169), *Cynara cardunculus* (cca-miR169), *Asparagus officinalis* (aof-miR2930) and *Ginkgo biloba* (gbi-miR10982) were identified for the first time. Phylogenetic analyses showed that there are very similar sequences between novel miRNAs and reference miRNAs. Enrichment analysis of GO with biological processes, cellular component and molecular functions revealed that potential target genes were involved in response to stress, oxidation-reduction process, cellular metabolic process, protein binding, etc. Moreover, KEGG results also indicated that these genes play important roles in twenty-six different metabolic pathways such as steroid biosynthesis, purine metabolism, carotenoid biosynthesis, etc. This thesis is the first detailed investigation about the determination of different miRNA families and their targets in genomes of ornamental plants. Obtaining results are expected to contribute for production of stress resistance ornamental plants with different colour and scent.

Page Number : 120

Key Words : Landscape Plants, Non coding RNAs, Epigenetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Sevgi MARAKLI

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda benden sevgi, destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Sevgi MARAKLI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm kolaylıkları sağlayarak desteğini arkamda hissettiğim daire başkanım Recep ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Tuba YILDIRIM'a ve Doç. Dr. Behcet İNAL'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	16
2. GENEL BİLGİLER	18
2.1. Süs Bitkileri	18
2.2. Petunya (<i>Petunia hybrida</i>).....	19
2.3. Kestane (<i>Castanea sativa</i>).....	20
2.4. Avize Çiçeği (<i>Yucca filamentosa</i>).....	20
2.5. <i>Opuntia streptacantha</i>	20
2.6. Yabani Hindiba (<i>Cichorium intybus</i>).....	20
2.7. Yabani Enginar (<i>Cynara cardunculus</i>).....	21
2.8. Kuşkonmaz (<i>Asparagus officinalis</i>).....	21
2.9. Mabet Ağacı (<i>Ginkgo biloba</i>).....	21
2.10. Kodlama Yapmayan RNA (Non-coding RNA - ncRNA)	21
2.10.1. ncRNA dizilerinin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması.....	22
2.10.2. ncRNA'ların önemi.....	24
2.11. Küçük İnterferans RNA (Small Interfering RNA - siRNA).....	25

2.11.1. siRNA'ların genomda tanımlanması.....	25
2.11.2. siRNA'ların sentezi, gen anlatımının düzenlenmesindeki rolleri ve önemi.....	25
2.12. Küçük Nükleolar RNA (Small Nucleolar RNA - snoRNA).....	26
2.12.1. snoRNA sentezi	27
2.12.2. snoRNA'nın gen anlatımının düzenlenmesindeki rolü ve önemi	27
2.13. Mikro RNA (Micro RNA - miRNA)	28
2.13.1. miRNA'ların genomda tanımlanması	28
2.13.2. miRNA sentezi.....	29
2.14. Bitki ve Hayvan miRNA'larının Analiz Yöntemleri	31
2.14.1. <i>In siliko</i> yöntemler	31
2.14.2. Deneysel yöntemler	32
2.14.3. miRNA'ların gen anlatımının düzenlenmesindeki rolleri ve önemi.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1. miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi	35
3.2. Blast Analizleri	35
3.3. Eleme Süreci	36
3.4. pre-miRNA İkincil Yapılarının Oluşturulması	37
3.5. Filogenetik Analizler	37
3.6. miRNA Hedef Genlerinin Hedeflenmesi.....	38
3.7. miRNA Hedef Genlerinin GO ve KEGG Analizleri	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi	39
4.2. pre-miRNA İkincil Yapılarının Belirlenmesi	41

4.3. Filogenetik Analizler	47
4.3.1. miRNA168 ailesine özgü dizilerin analizi	47
4.3.2. miRNA169 ailesine özgü dizilerin analizi	50
4.3.3. miRNA399 ailesine özgü dizilerin analizi	53
4.3.4. miRNA2930 ailesine özgü dizilerin analizi	56
4.3.5. miRNA10982 ailesine özgü dizilerin analizi	56
4.3.6. Tanımlanan miRNA ailelerinin analizi	57
4.4. miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi.....	61
4.4.1. miR168 hedef genlerinin GO ve KEGG analizleri	61
4.4.2. miR169 hedef genlerinin GO ve KEGG analizleri	63
4.4.3. miR399 hedef genlerinin GO ve KEGG analizleri	74
4.4.4. miR2930 hedef genlerinin GO ve KEGG analizleri	75
4.4.5. miR10982 hedef geninin GO ve KEGG analizleri	97
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	98
KAYNAKLAR	104
ÖZGEÇMİŞ	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Türkiye’de süs bitkileri (adet)	19
Çizelge 2.2. Kodlama yapmayan RNA’ların çeşitleri	24
Çizelge 4.1. mirBase veri tabanında bulunan önceden bilinen türlere ait olgun miRNA dizileri.....	39
Çizelge 4.2. Süs bitkilerinde yeni tanımlanan pre-miRNA’ların özellikleri	118
Çizelge 4.3. miR168 dizilerinin hedef genleri	61
Çizelge 4.4. miR169 dizilerinin hedef genleri	63
Çizelge 4.5. miR399 dizilerinin hedef genleri	74
Çizelge 4.6. miR2930 dizilerinin hedef genleri	76
Çizelge 4.7. miR10982 dizilerinin hedef genleri	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bir memeli hücresinde bulunan RNA dizilerinin oranları.....	23
Şekil 2.2. Ökaryotlarda RNAi aracılı gen susturma mekanizmasının şematik gösterimi	26
Şekil 2.3. snoRNA'larda bulunan C/D kutusu ve H/ACA kutusunun yapısal özellikleri	27
Şekil 2.4. Hayvan ve bitki miRNA'sının sentez basamakları.....	30
Şekil 2.5. miRNA ile hedef gen arasındaki dizi eşleşmesi	33
Şekil 4.1. <i>Petunya hybrida</i> bitkisinde tanımlanan phy-miR168 dizisinin ikincil yapısı.....	42
Şekil 4.2. <i>Castanea sativa</i> bitkisinde tanımlanan csa-miR169 dizisinin ikincil yapısı.....	42
Şekil 4.3. <i>Yucca filamentosa</i> bitkisinde tanımlanan yfi-miR169 dizisinin ikincil yapısı.....	43
Şekil 4.4. <i>Opuntia streptacantha</i> bitkisinde tanımlanan opt-miR169 dizisinin ikincil yapısı.....	43
Şekil 4.5. <i>Cichorium intybus</i> bitkisinde tanımlanan cin-miR169 dizisinin ikincil yapısı.....	43
Şekil 4.6. <i>Cynara cardunculus</i> bitkisinde tanımlanan cca-miR169 dizisinin ikincil yapısı.....	44
Şekil 4.7. <i>Petunia hybrida</i> bitkisinde tanımlanan phy-miR399 dizisinin ikincil yapısı.....	44
Şekil 4.8. <i>Asparagus officinalis</i> bitkisinde tanımlanan aof-miR2930 dizisinin ikincil yapısı.....	44
Şekil 4.9. <i>Ginkgo biloba</i> bitkisinde tanımlanan gbi-miR10982 dizisinin ikincil yapısı.	45
Şekil 4.10. miR168 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu	48
Şekil 4.11. miR168 ailesine özgü dizilerin filogenetik analiz sonuçları.....	49

Şekil 4.12. miR169 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu	51
Şekil 4.13. miR169 ailesine özgü dizilerin filogenetik analiz sonuçları.....	52
Şekil 4.14. miR399 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu	54
Şekil 4.15. miR399 ailesine özgü dizilerin filogenetik analiz sonuçları.....	55
Şekil 4.16. miR2930 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu	56
Şekil 4.17. miR10982 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu	56
Şekil 4.18. Tüm miRNA ailelerinin hizalama sonucu 1	58
Şekil 4.19. Tüm miRNA ailelerinin hizalama sonucu 2	59
Şekil 4.20. Tüm miRNA ailelerinin filogenetik analiz sonuçları.....	60
Şekil 4.21. miR168 dizisinin hedef genlerinin GO analizleri	62
Şekil 4.22. miR169 dizilerinin hedef genlerinin GO analizleri	66
Şekil 4.23. Steroid biyosentezi.....	68
Şekil 4.24. Pürin metabolizması	69
Şekil 4.25. Tiyamin (Vitamin B1) metabolizması.....	69
Şekil 4.26. Terpenoid biyosentezi.....	70
Şekil 4.27. Karotenoid biyosentezi	71
Şekil 4.28. PI3K-AKT sinyal yolağı.....	71
Şekil 4.29. Sesquiterpenoid ve triterpenoid biyosentezi.....	72
Şekil 4.30. Relaxin sinyal yolağı	73
Şekil 4.31. Termogenez	73
Şekil 4.32. miR399 dizilerinin hedef genlerinin GO analizleri	75
Şekil 4.33. miR2930 dizilerinin hedef genlerinin GO analizleri	81
Şekil 4.34. Glikoliz/Glukoneogenez	83

Şekil 4.35. Sitrat döngüsü (TCA Döngüsü).....	84
Şekil 4.36. Benzoat yıkımı.....	84
Şekil 4.37. Yağ asidi uzaması.....	85
Şekil 4.38. Yağ asidi yıkımı.....	86
Şekil 4.39. Fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu.....	86
Şekil 4.40. Steroid biyosentezi.....	87
Şekil 4.41. Valin, Lösin ve İzolösin yıkımı.....	88
Şekil 4.42. Geraniyol yıkımı.....	89
Şekil 4.43. N-glikan biyosentezinin çeşitli yolları.....	90
Şekil 4.44. α -Linolenic acid (Vitamin F) metabolizması.....	91
Şekil 4.45. Sfingolipid metabolizması.....	92
Şekil 4.46. Etilbenzen yıkımı.....	92
Şekil 4.47. Piruvat metabolizması.....	93
Şekil 4.48. Metan metabolizması.....	94
Şekil 4.49. Aminoaçil tRNA biyosentezi.....	95
Şekil 4.50. Doymamış yağ asitlerinin biyosentezi.....	96
Şekil 4.51. miR10982 dizilerinin hedef genlerinin GO analizleri.....	97

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

>

Büyük

<

Küçük

%

Yüzde

Kısaltmalar

Açıklama

aRNA

Antisens RNA

aTASR

Antisense sonlanma ilişkili küçük RNA'lar

Bç

Baz çifti

DNA

Deoksiribonükleik Asit

ENCODE

DNA Elementlerinin Ansiklopedisi

fRNA

Fonksiyonel- Functional RNA

GO

Gen Ontolojisi

KEGG

Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi

lincMD1	Uzun Genler Arası Kodlama Yapmayan Kas Farklılaşması
mRNA	Haberci RNA
miRNA	mikro RNA
ncRNA	Non-coding RNA
nt	Nükleotit
PASR	Promotör İlişkili Kısa RNA
PROMPT	Promotör Üst Bölgesindeki Transkript
RE-RNA	Retrotransposon-Türevli RNA
RdRP	RNA Aracılı RNA Polimeraz
RISC	RNA Aracılı Susturma Kompleksi
Rrna	Ribozomal RNA
RT	Ters Transkripsiyon

1. GİRİŞ

Süs bitkileri; farklı metotlar kullanılarak estetik, işlevsel ve ekonomik amaçlarla üretilen, çoğaltılan ve büyütülen bitkilerdir. Peyzaj mimarisi ve görselliğin yanı sıra insanların doğayı özlemi ve günün stresinden arınma isteği gibi ihtiyaçlarını karşılama, süs bitkisi üretimindeki en önemli faktörlerdir. Tarım bitkilerine benzemelerine karşın süs bitkilerinin yetiştirilmesi, bakımı ve kullanımı farklı olabilmektedir. Saksı gibi küçük alanlarda yetiştirilebilme olanağının olması da bu bitkilerin tercih edilme sebeplerindedir. Bu sayede süs bitkileri, kapsam ve üretim açısından oldukça geniş yelpazesi olan bir sektördür. Özellikle artan kentleşme oranı ile birlikte süs bitkileri sektöründe de artış görülmektedir [1].

Süs bitkileri de diğer tüm bitkiler gibi büyüme, gelişme ve çoğalma için optimum şartlara gereksinim duyarlar. Bununla birlikte zaman zaman normal olmayan koşullarda da yaşamlarını sürdürmek zorunda kalabilirler. Bu normal olmayan koşullar, stres olarak adlandırılır ve stres bitkinin morfolojik, fizyolojik ve moleküler süreçlerini olumsuz olarak etkiler. Stres faktörleri de biyotik ve abiyotik stresler olarak ikiye ayrılabilir [2, 3].

Strese karşı dirençte rol oynayan moleküllerin analizi, süs bitkileri gibi bu streslere duyarlı bitkilerin direçli hale getirilmesinde büyük önem taşır. Gelişen NGS (Next Generation Sequencing - Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri) sayesinde canlıların genomları kısa sürede dizilenebilmekte ve kullanılan farklı biyoinformatik araçlar ile elde edilen diziler anlamlandırılmaktadır. Bu teknoloji, omik teknolojilerinin çağını başlatmış ve genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi sistem biyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlayacak farklı molekülleri inceleyen bilim dalları oluşmuştur [4]. DNA dizisinde herhangi bir farklılık olmadan meydana gelen kalıtsal olabilen ya da kalıtsal olmayan değişikliklerin adı olarak tanımlanan Epigenetik ile ilgili araştırmalar da Epigenomik bilim dalı altında yürütülmeye başlanmıştır. Bu dal, diğer omik teknolojilerinden farklı olarak sadece tek bir molekül ya da yapı üzerinde çalışmaz. Yukarıda birkaç tanesi verilen omik teknolojilerinin herbirinin de kendi içinde epigenomları vardır yani epigenomik tüm omik teknolojilerini kapsayan geniş bir çalışma konusuna sahiptir [5]. Histon asetilasyonu/deasetilasyonu, DNA metillenmesi ve transpozonlar, epigenetik mekanizmalar içinde yaygın olarak çalışılan araştırma konularıdır [6].

Bu alanlara ek olarak özellikle son zamanlarda kodlama yapmayan RNA (Non-coding RNA - ncRNA) dizilerinin de farklı canlılardaki etkileri yaygın olarak çalışılmaktadır [7]. Kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNA'lar), herhangi bir protein kodlamamasına karşın fonksiyonu olan dizilerdir. Bu diziler arasında; siRNA (small interfering RNA - küçük interferans RNA), snoRNA (small nucleolar RNA - küçük nükleolar RNA), fRNA (functional RNA - fonksiyonel RNA) ve snmRNA (small non messenger RNA - küçük mesajcı olmayan RNA) dizileri sayılabilir [8]. Bu farklı RNA çeşitlerinin farklı yapısal özellikleri vardır ve genel olarak hepsi gen anlatımının düzenlenmesinde görevlidir [9].

Gen anlatımının post-transkripsiyonel ya da post-translasyonel aşamalarında görev alan yaklaşık 22 nt uzunluğunda olan miRNA (micro RNA - mikro RNA) dizileri de son yıllarda farklı bitki ve hayvan türlerinde yaygın olarak çalışılan kısa ncRNA sınıfında olan dizilerdir. Mesajcı RNA (messenger RNA - mRNA) dizisine tamamlayıcı olarak bağlanır, mRNA dizinin yıkılmasına ve/veya inhibisyonuna neden olarak anlatımı düzenler [10]. Bununla birlikte tam tersi olarak miRNA'ların genlerin promotör dizilerine bağlanarak gen anlatımını arttırdığı da bilinmektedir [11].

Bu tez çalışmasının amacı; *in silico* yöntemler kullanılarak *Petunia hybrida*, *Castanea sativa*, *Yucca filamentosa*, *Opuntia streptacantha*, *Cichorium intybus*, *Cynara cardunculus*, *Asparagus officinalis* ve *Ginkgo biloba* süs bitkilerinde abiyotik ve biyotik stresler ile ilişkili yeni miRNA dizilerinin belirlenmesidir. Bu amaçla, miRBase veri tabanında bulunan farklı bitkilere ait referans miRNA dizileri elde edildi. Elde edilen referans miRNA dizileri, NCBI (National Center for Biotechnology Information – Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) veri tabanında bulunan BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide - Temel Lokal Hizalama Arama Nükleotit) programı kullanılarak her bir süs bitkisine ait EST (Expressed Sequence Tag) veri tabanında karşılaştırıldı. Uygun olan pre-miRNA (precursor-miRNA - öncül miRNA) dizilerinin ikincil yapıları “RNAfold Web Server” programı kullanılarak belirlendi. Tanımlanan yeni miRNA dizileri ile miRBase veri tabanında yer alan ve daha önce farklı bitkilerde tanımlanmış olan diziler arasındaki evrimsel ilişki, hizalama (Clustal Omega) ve filogenetik ağaç analizleri (MEGAX) ile incelendi. Bu miRNA dizilerinin hedef genleri, “RNA Hybrid” programı ile tanımlandı. Hedef genlerin rol oynadığı süreçler ve metabolik yollar, BLAST2GO ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi) programları ile analiz edildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Süs Bitkileri

Süs bitkileri; renk, şekil, koku ve estetik gibi farklı özelliklere sahip olan otsu veya odunsu bitkilerdir. Bu bitkiler, kullanım amaçlarına göre kesme çiçekler, dış mekan süs bitkileri, iç mekan (saksılı) süs bitkileri ve doğal çiçek soğanları olmak üzere dört gruba ayrılabilir [12]. Kesme çiçekler; buket, sepet, çelenk yapımında kullanılan bitkilerdir. Bitkinin çiçek, dal, gonca ve yaprakları taze veya kuru olarak kullanıldığı bu bitkilere; karanfil, gerbera, kesme gül ve kasımpatı gibi uzun saplı çiçekler örnek olarak verilebilir. Dış mekan süs bitkileri de dış mekanda peyzaj uygulamalarında kullanılan bitki türleridir [13]. Peyzaj çalışmalarında kullanıldıkları yere estetik bir görünüm kazandıran bu bitkiler, süs ağaç ve ağaççıklar (oya, erguvan, ıhlamur, manolya, sarı salkım, leylak), mevsimlik tek ve çok yıllık çiçekler (buz çiçeği, hercai menekşe, mine, gazanya, cam güzeli, alyssum, kadife çiçeği) sarmaşıklar, çalılar, yer örtücü olarak kullanılan diğer türler ve süs çimleri olarak sayılabilir. Bir diğer süs bitkisi sınıfı olan iç mekan (saksılı) süs bitkileri de saksı ve/veya kaplarda büyütülen bitki çeşitleridir. Afrika menekşesi, begonya, orkide ve kauçuk gibi birçok bitki bu grupta yer alır. İhraç edilmek üzere toplanan ve bitki doku kültürü koşullarında üretimi yapılan doğal soğanlı, yumrulu ve rizomlu bitki türleri (geofitler) ise doğal çiçek soğanları sınıfında yer alır. Bu bitkilere; lilyum, kardelen, safran, siklamen ve göl soğanı örnek olarak verilebilir ve bu bitkiler ile ilgili yapılacak her türlü işlem için kanuni izinlerin alınması gerekmektedir [14, 15]. Ülkemiz ekonomisinde önemli bir yere sahip olan süs bitkilerinin 2019 ve 2020 yıllarına ait üretim miktarları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, iç mekan ve dış mekan süs bitkileri sınıflarında yer alan *P. hybrida*, *C. sativa*, *Y. filamentosa*, *O. streptacantha*, *C. intybus*, *C. cardunculus*, *A. officinalis* ve *G. biloba* bitkileri incelendi.

Çizelge 2.1. Türkiye’de süs bitkileri (adet) [16]

SÜS BİTKİLERİ	2019	2020	DEĞİŞİM (%)
TOPLAM	1 718 098 240	1 658 597 260	-3,5
KESME ÇİÇEKLER	1 093 333 943	1 009 613 092	-7,7
Karanfil	635 157 850	535 808 090	-15,6
Gerbera	134 481 050	119 438 308	-11,2
Gül (kesme)	98 130 020	93 274 056	-4,9
Kasımpatı (krizantem)	47 677 050	75 547 860	58,5
Fresia	17 463 650	12 420 150	-28,9
Lale	40 290 500	40 690 500	1,0
Solidago (altınbaşak)	17 386 400	24 645 720	41,8
Gypsophilla	18 105 690	19 346 070	6,9
Nergiz	14 832 000	14 134 000	-4,7
Glayöl (gladiol)	6 709 900	3 593 980	-46,4
Lisianthus	12 808 100	17 835 450	39,3
Lilyum (zambak)	9 282 685	6 837 425	-26,3
Sümbül	1 330 500	1 493 000	12,2
Şebboy	6 777 238	6 395 290	-5,6
Anemon (Manisa lalesi)	1 188 000	1 188 000	0,0
İris	1 200 000	240 000	-80,0
Orkide	1 885 930	2 847 579	51,0
Statice	133 000	209 350	57,4
DİĞER KESME ÇİÇEKLER	28 494 380	33 668 264	18,2
DİĞER SÜS BİTKİLERİ	624 764 297	648 984 168	3,9
DIŞ MEKAN SÜS BİTKİLERİ	510 558 039	529 109 699	3,6
ÇİÇEK SOĞANLARI	62 537 229	71 415 654	14,2
İÇ MEKAN SÜS BİTKİLERİ	51 669 029	48 458 815	-6,2

2.2. Petunya (*Petunia hybrida*)

Petunya (*P. hybrida*), *Solanaceae* ailesinin bir üyesidir. Domates, patates, tütün, biber ve patlıcan gibi bu ailenin diğer üyelerinin kromozom sayısı 12 olmasına karşın petunya bitkisinin kromozom sayısı 7’dir [17]. Ticari *P. hybrida* bitkisi, *P. axillaris* ve *P. integrifolia* bitkilerinin çaprazlanması ile elde edilir [18, 19]. Petunya bitkisinde RNAi (RNA interference - RNA interferans) mekanizmasının tanımlanmasıyla birlikte bu bitki yaygın olarak çalışılan bitkilerden biri haline gelmiştir [20, 21, 22, 23]. Antosiyanin biyosentezi sonucunda görülen farklı çiçek renkleri, gelişim, transpozon aktivitesi, mikroorganizmalar ve diğer canlılar ile ilişkiler olmak üzere farklı çalışmalarda petunya bitkisi, model organizma olarak incelenmektedir [22, 24, 25].

2.3. Kestane (*Castanea sativa*)

Kestane (*C. sativa*); tek evcikli, 40 m uzunluğunda ve 150 cm çapında yaprak döken bir ağaçtır [26]. İri yaprakları, sarı renkli çiçekleriyle dikkat çeken, güzel görünüşlü bu ağaç *Castanea* cinsindeki tüm türler gibi $2n=24$ kromozoma sahiptir [27, 28]. Çin, Kore, Türkiye, Güney Avrupa ve Kuzey Amerika ile birlikte Bolivya'da bulunan bu bitki Ülkemizde Karadeniz, Marmara ve Ege bölgelerinde yetişen önemli ağaç türlerinden biridir [29].

2.4. Avize Çiçeği (*Yucca filamentosa*)

Asparagaceae ailesinin bir üyesi olan avize çiçeği (*Y. filamentosa*), tropikal ve yarı tropikal kuru iklimlerde yetişebilen bir bitkidir. Orta ve Kuzey Amerika ile Avrupa'da kültüre alınan bir süs bitkisidir [30]. Bu bitki ile ilgili çalışmalar incelendiğinde bu bitkide C3 bitkilerinin fotosentezi [31], antimikrobiyal aktivite [32] ve biyosensör [33] ile ilgili çalışmaların yapıldığı görülmektedir.

2.5. *Opuntia streptacantha*

Meksika endemiği olan *O. streptacantha*, *Cactaceae* ailesinin bir üyesidir. *O. streptacantha* kromozom sayısı $2n=8x=88$ 'dir [34]. CAM (Crassulacean Acid Metabolism - Crassulaceae Asit Metabolizması) tip fotosentez yapabilir. Bu sayede Meksika'nın yanı sıra birçok ülkenin kurak ya da yarı kurak bölgelerinde yetişebilir. Bu bitki; meyve suyu üretiminde, doğal tatlandırıcılarda, kozmetikte, kimya endüstrisinde ve tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır [35].

2.6. Yabani Hindiba (*Cichorium intybus*)

Asteraceae ailesinin bir üyesi olan yabani hindiba (*C. intybus*), $2n=2x=18$ kromozoma sahiptir [36]. Afrika, Avrupa, Avustralya, Kuzey ve Güney Amerika olmak üzere dünyanın farklı coğrafyalarında yetişebilen bir bitkidir. Tıbbi önemi olan süs bitkilerinden biri olan bu bitki [37, 38], ağır metal kirliliğinde de biyomonitor aracı olarak kullanılmaktadır [39, 40].

2.7. Yabani Enginar (*Cynara cardunculus*)

Yabani enginar (*C. cardunculus*), *Asteraceae* ailesinin bir üyesidir ve $2n=2x=34$ kromozoma sahiptir [41]. Bu bitki, Akdeniz havzasında yer alan iklim koşullarına tamamen adapte olmuştur. Bu iklim koşulları; düşük yağış ile beraber kuru ve sıcak yaz mevsimidir. Kuraklıktan kaçış stratejisi bu koşullarda kolaylıkla büyüebilmektedir. Olgun bir bitki yaklaşık 3 m uzunluğa ve 1.5 m çapa ulaşabilir [42]. Bu bitkinin alternatif bir enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi [43], biyoremediasyondaki rolü [44] ve antioksidan aktivitesi [45] gibi farklı özellikleri de yaygın olarak çalışılmaktadır.

2.8. Kuşkonmaz (*Asparagus officinalis*)

Kuşkonmaz (*A. officinalis*, $2n=2x=20$), *Asparagaceae* ailesinde yer alan bir bitkidir. Birçok farklı ülkede yetiştirilmesine karşın Peru, kuşkonmaz ihracatında lider konumundadır. Besin değerinin yanında içerdiği flavonoidler, saponinler ve birçok vitamin bakımından da tıbbi önemi olan bir bitkidir [46, 47]. Ayrıca, XX/XY cinsiyet sistemine sahip dioik (iki evcikli) bir tür olduğu için cinsiyeti belirleyen kromozomlarla ilgili yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir sistemdir [48].

2.9. Mabet Ağacı (*Ginkgo biloba*)

Sonbaharda altın rengindeki yaprakları ile tanınan mabet ağacı (*G. biloba*), uzun bir yaşam süresine sahip olduğu için yaşayan fosil olarak adlandırılır [49]. Yapraklarında belirlenen sarı renk mutanti ile sadece süs bitkisi olarak farklı bölgelerin peyzajında değil aynı zamanda yaprak pigment sentezinin genetik kontrolü ile ilgili yapılan çalışmalarda da yaygın olarak kullanılır [50]. Modern farmakolojik çalışmalar *G. biloba* bitkisinin; anti-tümör, anti-oksidan, anti-bakteriyel, anti-depresan özellikleri ile birlikte nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de kullanılabilmesini göstermektedir [51].

2.10. Kodlama Yapmayan RNA (Non-coding RNA - ncRNA)

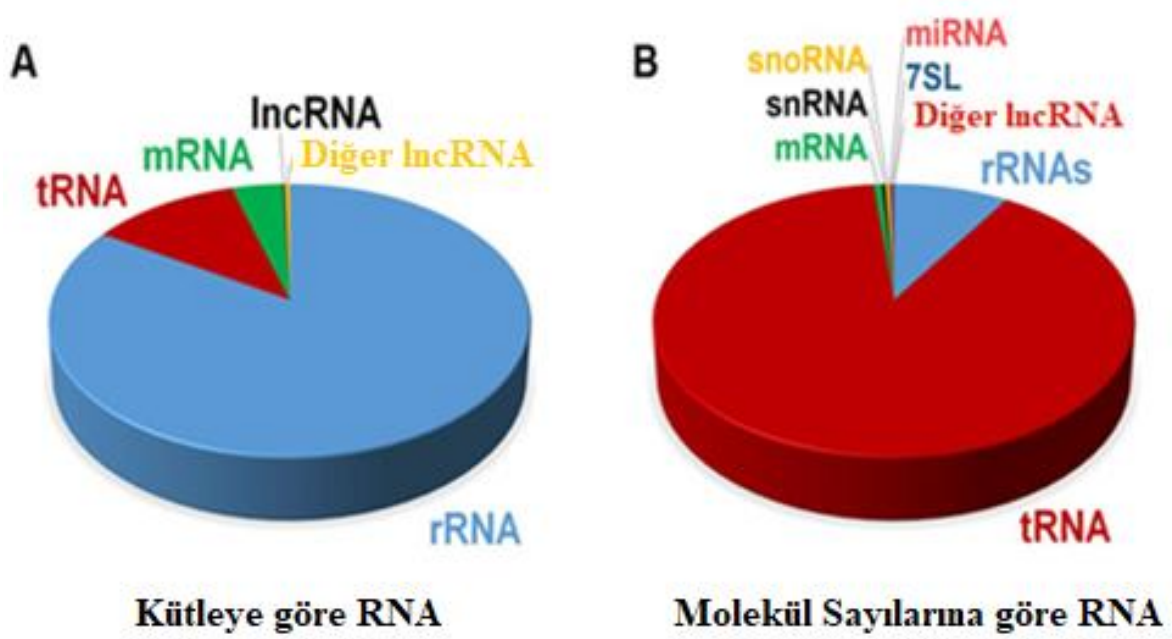
Genetik bilginin depolanmasından ve gelecek nesillere aktarılmasından sorumlu olan DNA molekülü, bu bilginin transkripsiyon ve translasyon ile anlam kazanmasında rol oynayan ise RNA molekülüdür [52].

Gen anlatımı ve gen anlatımının düzenlenmesinde kilit noktada önemli rolleri olan RNA molekülleri iki gruba ayrılabilir. İlk grupta, protein kodlayan genler tarafından kodlanan ve ve genomda %2'den daha az bulunan RNA molekülleri yer alır. İkinci grupta ise kodlama yapamayan RNA'lar bulunur. Bu moleküller de genomun neredeyse tamamını (%98) oluştururlar [53].

Çok hücreli ökaryot genomların büyük bir kısmı protein kodlamayan DNA dizilerinden oluşmaktadır. Uzun bir süre boyunca, bu kodlama yapmayan bölgeler, çöp 'junk' DNA olarak adlandırılmış ama insan genom projesi sonrasında başlatılan en önemli projelerden biri olan ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements - DNA Elementlerinin Ansiklopedisi) projesi ile bu bölgelerin işlevleri aydınlatılmıştır [54]. ENCODE projesi ile genomun neredeyse (%98) tamamına yakın bir bölgenin gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynadığı belirlenmiştir. Bu bölgelerin daha da detaylı analizleri ile 'RNA Dünyası' karşımıza çıkmıştır [55] ve RNA'lar ile yapılan çalışmaların son zamanlarda önem kazandığı görülmektedir [56].

2.10.1. ncRNA dizilerinin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması

Kodlama yapmayan ncRNA'lar, bir protein kodlamayan ama fonksiyonu olan dizilerdir. ncRNA'ların isimlendirilmesinde; tanımlandıkları organizma, büyüklükleri ve yerleşim yerleri temel alınır. Bu RNA çeşitleri arasında; miRNA, siRNA, snoRNA, fRNA ve snmRNA dizileri sayılabilir [57]. Bu farklı RNA çeşitlerinin farklı yapısal özellikleri olsa da genel olarak hepsinin gen anlatımının düzenlenmesinde görevli oldukları ve böylece epigenetik alanında yaygın olarak çalışıldıkları söylenebilir [58]. Şekil 2.1'de memeli somatik hücrelerinde bulunan çeşitli RNA seviyelerinin oranları toplam kütleyle göre (A) ve molekül sayılarına göre (B) verilmiştir. RNA moleküllerinin toplam sayısının her bir hücre için kabaca 10^7 olduğu tahmin edilir. Diğer ncRNA'lar; snRNA, snoRNA ve miRNA olarak sayılabilir. Oldukça büyük kütlelerinden dolayı rRNA, mRNA ve lncRNA diğerlerine kıyasla genomda daha fazla yer kaplar.



Şekil 2.1. Bir memeli hücresinde bulunan RNA dizilerinin oranları [57].

Kütle ve molekül sayılarına göre sınıflandırılan ncRNA'lar uzunluklarına göre de çeşitlere ayrılabilir. Uzunlukları karşılaştırıldığında <200 nt uzunlukta olanlar kısa kodlama yapmayan RNA ve >200 nt uzunluğundakiler uzun kodlama yapmayan RNA olarak adlandırılır [59]. Kodlama yapmayan RNA'ların çeşitleri ve sembolleri Çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Kodlama yapmayan RNA'ların çeşitleri [59]

Çeşit	Alt sınıf	Sembol
Kısa kodlama yapmayan RNA'lar (<200 nt)	“Transfer RNA”	tRNA
	“MicroRNA”	miRNA
	“Ribosomal RNA” (5S, 5.8S)	rRNA
	“Piwi interacting RNA”	piRNA
	“Small interfering RNA”	siRNA
	“Tiny transcription initiation”	tiRNAs
	“Promoter-associated short RNAs”	PASRs
	“Termini-associated short RNAs”	TASRs
	“Antisense termini associated short RNAs”	aTASRs
	“Small nucleolar RNAs”	snoRNAs
	“Transcription start site antisense RNAs”	TSSa-RNAs
	“Small nuclear RNAs”	snRNAs
	“Retrotransposon-derived RNAs”	RE-RNAs
	“3'UTR-derived RNAs”	uaRNAs
	“x-ncRNA”	x-ncRNA
	“Human Y RNA”	hY RNA
	“Unusually small RNAs”	usRNAs
“Small NF90-associated RNAs”	snaRs	
“Vault RNAs”	vtRNAs	
Uzun kodlama yapmayan RNA'lar (>200 nt)	“Ribosomal RNA” (18S and 28S)	rRNAs
	“Long or large intergenic ncRNAs”	lincRNAs
	“Transcribed ultraconserved regions”	T-UCRs
	“Pseudogenes”	Pseudogenes none
	“GAA-repeat containing RNAs”	GRC-RNAs
	“Long intronic ncRNAs”	None
	“Antisense RNAs”	ARNAs
	“Promoter-associated long RNAs”	PALRs
	“Promoter upstream transcripts”	PROMPTs
	“Stable excised intron RNAs”	None
“Long stress-induced non-coding transcripts”	LSINCTs	

2.10.2. ncRNA'ların önemi

Kodlama yapmayan bu diziler, farklı metabolik yollarda rol oynayan genlerin anlatımlarının düzenlenmesinde görev alır [60]. Bununla birlikte kromozom dinamiğinin kontrolünde [61], RNA düzeltiminde [62], makromoleküllerin oluşumunda [63], kanser [64] ve şeker hastalığı [65] gibi birçok hastalık olmak üzere genetik ve epigenetik kökenli mekanizmalar da önemli rollere sahiptir. Son yıllarda epigenetik faktörlerin farklı metabolik yollar üzerindeki etkilerinin daha detaylı anlaşılması ile birlikte önemli epigenetik mekanizmalardan biri olan ncRNA'lar ile yapılan çalışmalarda artış görülmektedir. Bu kadar fazla çalışmaya karşın ncRNA'ların işlevleri hala detaylı olarak bilinmemektedir.

2.11. Küçük İnterferans RNA (Small Interfering RNA - siRNA)

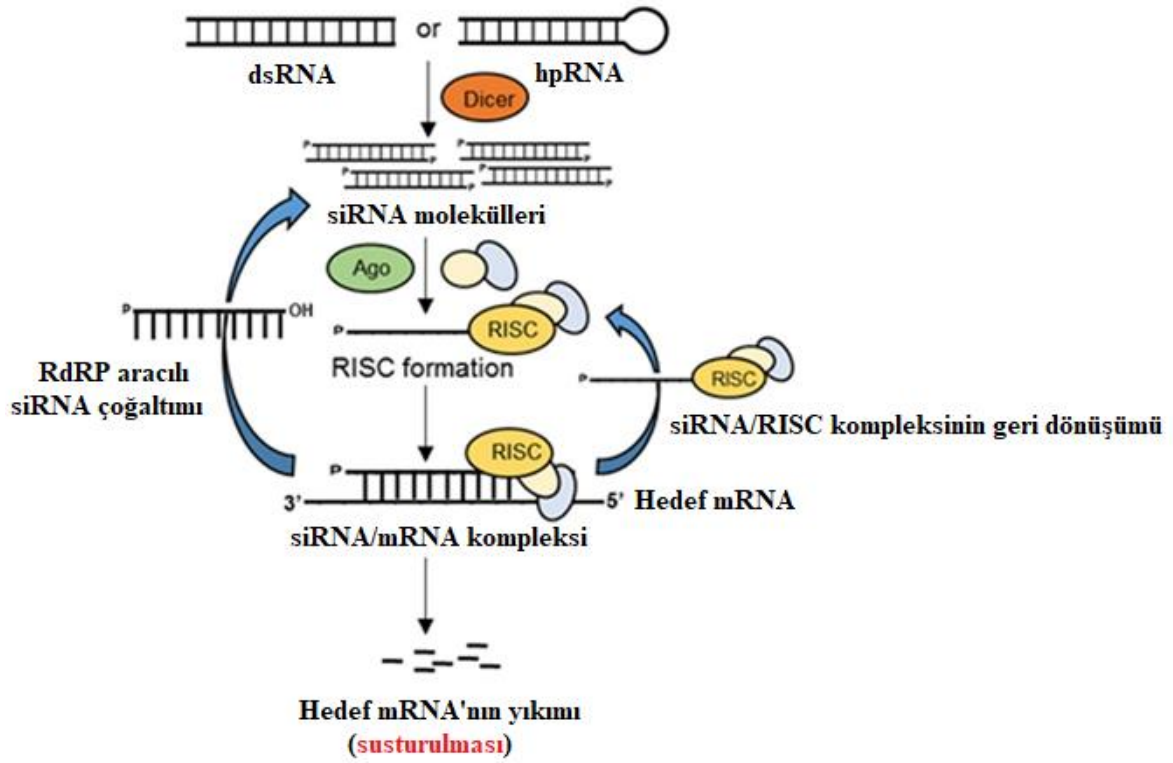
Kodlama yapmayan RNA çeşitlerinden biri siRNA dizileridir. Bu diziler, miRNA'ya benzer şekilde dsRNA'nın parçalanmasında ve tamamlayıcı mRNA'nın susturulmasında rol oynayan RNAi mekanizmalarından biridir.

2.11.1. siRNA'ların genomda tanımlanması

siRNA'lar, "precursor" (öncül) dizileri olan dsRNA'ların (double stranded RNA - çift iplikli RNA) çalışılması ile 1999 yılında keşfedilmiştir. miRNA'dan farklı olarak siRNA'lar, eksojen kaynaklı moleküllerdir. siRNA'lar, 21-23 bç (baz çifti) uzunluğundadır ve hedef mRNA'ya bağlanarak endonükleotik yıkımda görev alır. Memeli hücrelerinde siRNA ile gen susturulması üzerine yapılan çalışmalar sayesinde bu moleküller ile ilgili araştırmalar artmıştır [66]. siRNA yüklü nanopartiküller kullanılarak insanlarda ilk klinik çalışma da gerçekleştirmiştir [67].

2.11.2. siRNA'ların sentezi, gen anlatımının düzenlenmesindeki rolleri ve önemi

In vitro koşullarda sentezlenen siRNA'lar, hücre içine girdikleri zaman RNaz III enzimi (dicer) tarafından tanınır ve küçük parçalar oluşturacak şekilde kesilir. Oluşan bu parçalar, RISC (RNA Induced Silencing Complex - RNA aracılı susturma kompleksi) yapısına katılır. Oluşan siRNA-RISC kompleksi, hedef mRNA'nın bağlanmasını sağlar. Daha sonra RISC kompleksi mRNA'yı tarar ve siRNA'ya tamamlayıcı olan mRNA bölgesini bularak endonükleaz aktivitesi ile mRNA'nın parçalanmasını sağlar [68]. Küçük siRNA molekülleri; dicer aktivitesi ile dsRNA ya da hpRNA (hairpin RNA) moleküllerinden oluşur. Klavuz RNA ipliği, Ago (Argonaute) ve diğer proteinlere bağlanarak RISC kompleksini oluşturur. siRNA-RISC kompleksi daha sonra hedef mRNA'nın tamamlayıcı dizisine bağlanır. Sonuçta hedef mRNA yıkılabilir ya da translasyon inhibe olabilir. siRNA-mRNA kompleksinin bileşenleri, RICS kompleksine yeniden dönüştürülebilir ya da RdRP (RNA aracılı RNA polimeraz - RNA-dependent RNA polymerase) ile siRNA molekülleri oluşabilir (Şekil 2.2).



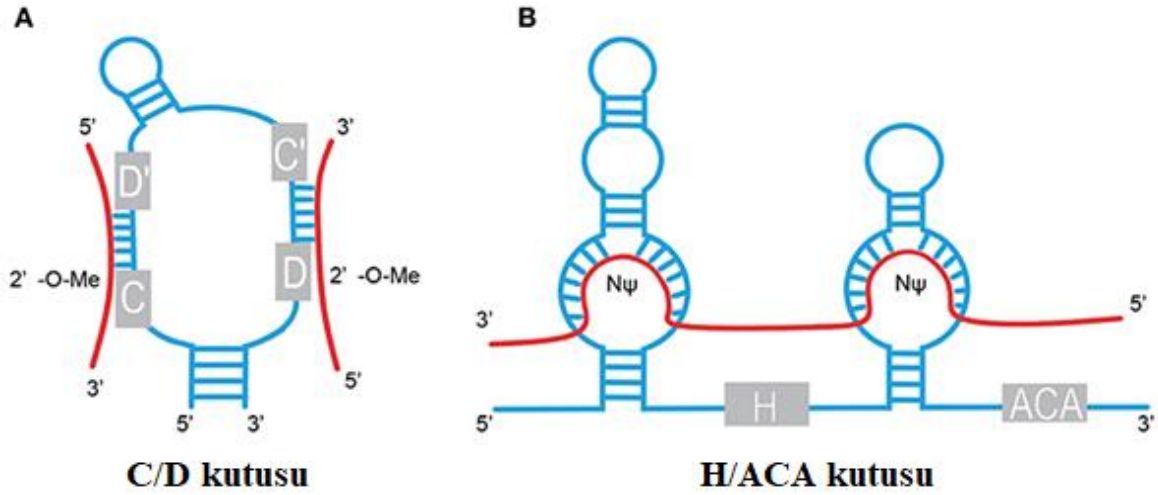
Şekil 2.2. Ökaryotlarda RNAi aracılı gen susturma mekanizmasının şematik gösterimi [68].

siRNA'lar, hedef diziler ile tamamlayıcılık göstererek gen anlatımının susturulmasında rol oynadığı gibi miRNA mekanizmalarının da işlevini engelleyebilir [69]. Bununla birlikte antiviral savunma sisteminde, transpozonla susturmada ve kromozomların yeniden modellenmesinde görev yapan siRNA'lar, kanser gibi tedavisi zor olan hastalıklarda, genom entegrasyonuna gerek duymadığı için ilaç molekülleri ile birlikte de kullanılmaktadır [70].

2.12. Küçük Nükleolar RNA (Small Nucleolar RNA - snoRNA)

snoRNA'lar, rRNA'ların (ribozomal RNA) post-transkripsiyonel modifikasyonlarının düzenlenmesinde görev alır [71]. Bu modifikasyonlar, 2'-O-riboz metilasyon ve pseudoürilasyon'dur [72]. Bu mekanizmalardan sorumlu olan snoRNA'lar, C/D kutusu ve H/ACA kutusu olmak üzere iki korunmuş motife sahiptir.

Bu diziler; C kutusu (RUGAUGA) ve D kutusu (CUGA) olmak üzere iki tane korunmuş dizi elementi içerir (Şekil 2.3A). H/ACA kutusu ise H kutusu (ANANNA), ACA motifi kutusu ve iki pseudoürilasyon paketi olmak üzere evrimsel korunmuş yapısal elementler içerir (Şekil 2.3B).



Şekil 2.3. snoRNA'larda bulunan C/D kutusu ve H/ACA kutusunun yapısal özellikleri [73].

2.12.1. snoRNA sentezi

Omurgalılarda RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen az sayıdaki snoRNA'lar hariç birçok snoRNA, protein kodlamayan genlerden ya da protein kodlayan genlerin intronlarından sentezlenir [74]. İntronik birçok snoRNA'nın biyosentezi; nükleoplazmada gerçekleşen konak genomla birlikte kırılma ve ekzonükleotit yıkımları içerir. İntronik snoRNA'larda; ribonükleoproteinler, snoRNA'ların olgunlaşması için gereklidir ve bu süreç konak genom ile birlikte başlatılır. Bu proteinler, sürecin dengesi ve nükleolar lokalizasyon için kritik öneme sahiptir [75].

2.12.2. snoRNA'nın gen anlatımının düzenlenmesindeki rolü ve önemi

Bu RNA çeşidinin en çok çalışılan fonksiyonlardan biri rRNA'ların modifikasyonu, olgunlaşması ve stabilizasyonudur. rRNA'ların korunmuş ve fonksiyonel bölgelerinde, yüzlerce 2'-O-metilasyon ya da pseudoürilasyon kalıntıları bulunur.

D kutusunun üst bölgesinde bulunan dizi, hedef RNA'yı tanır ve beşinci nükleotidinde 2'-O-metilasyonu gerçekleştirir. Pseudoürilasyon olarak isimlendirilen reaksiyonda, üridin pseudoüridine dönüşür ve reaksiyon H kutusu ve/veya ACA kutusun üst bölgesindeki 14-16 nt bölgesinde gerçekleşir [72].

Gen anlatımının düzenlenmesinde snoRNA'ların önemi özellikle hastalıklar ile ilgili yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [76]. Ayrıca strese cevap ve metabolik dengede de oynadığı roller *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda belirlenmiştir [77]. snoRNA'ların diğer küçük RNA'ların öncülü olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Kavaji ve diğ. [78] yaptıkları çalışmada, insan genomunda bulunan 18-40 nt uzunluğundaki küçük RNA'ları dizilemiş ve kodlama yapmayan RNA'lardan köken alan bağımsız küçük RNA sınıfları bulmuştur. Daha sonra başka bir çalışmada, çeşitli ökaryotik dokularda küçük RNA'ların sistemik analizi derin dizileme yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve evrimsel olarak korunmuş küçük RNA'ların; insan, hayvan (fare, tavuk ve meyve sineği), *Arabidopsis* ve mayadaki snoRNA lokuslarının büyük bir kısmından köken aldığı bildirilmiştir [79].

2.13. Mikro RNA (Micro RNA - miRNA)

miRNA'lar, gen anlatımının düzenlenmesinde post-transkripsiyonel veya post-translasyonel aşamalarda görev alan yaklaşık 22 nt uzunluğunda ncRNA moleküllerinden biridir. mRNA dizisine tamamlayıcı olarak bağlanır, mRNA dizinin yıkılmasına ve/veya inhibisyonuna neden olarak anlatımı düzenler [10]. Bununla birlikte tam tersi olarak miRNA'ların, genlerin promotör dizilerine bağlanarak gen anlatımını arttırdığı da bilinmektedir [11]. miRNA'ların, ökaryot ile virüs genomlarının %1-3'ünü, insanda ise protein kodlayan genlerin %60'dan fazlasını düzenlediği düşünülmektedir [80]. Organizmada miRNA dizilerinin sayısının çok olmaması, bu dizilerin birden fazla mRNA dizisinin düzenlenmesinde görev aldığını düşündürmektedir [10].

2.13.1. miRNA'ların genomda tanımlanması

Model bir organizma olan *C. elegans* üzerinde 1993 yılında yapılan çalışmalarda, larva gelişim zamanlamasını kontrol eden *lin-4* geninin iki kısa RNA dizisi oluşturduğu belirlenmiştir.

Bu dizilerin, *lin-14* geninin anlatımını ve LIN-14 proteinin oluşmasını engellediği rapor edilmiştir. Böylece ilk miRNA dizisi bu model organizmada 1993 yılında tanımlanmıştır [81]. Keşiften itibaren, farklı canlılarda yapılan araştırmalar ile daha detaylı bilgi edinilmeye başlanmıştır. Ama miRNA dizileri ile ilgili mihenk taşı olarak nitelendirilecek çalışma, Fire ve diğ. [82] tarafından yapılan dsRNA dizisinin gen susturma mekanizmasına sahip olduğunun belirlendiği araştırmadır. RNAi olarak adlandırılan bu keşif ile Fire ve Mello, 2006 yılında Fizyoloji veya Tıp alanında Nobel Ödülü almışlardır. Bu diziler daha sonra miRNA olarak isimlendirilmişlerdir [83].

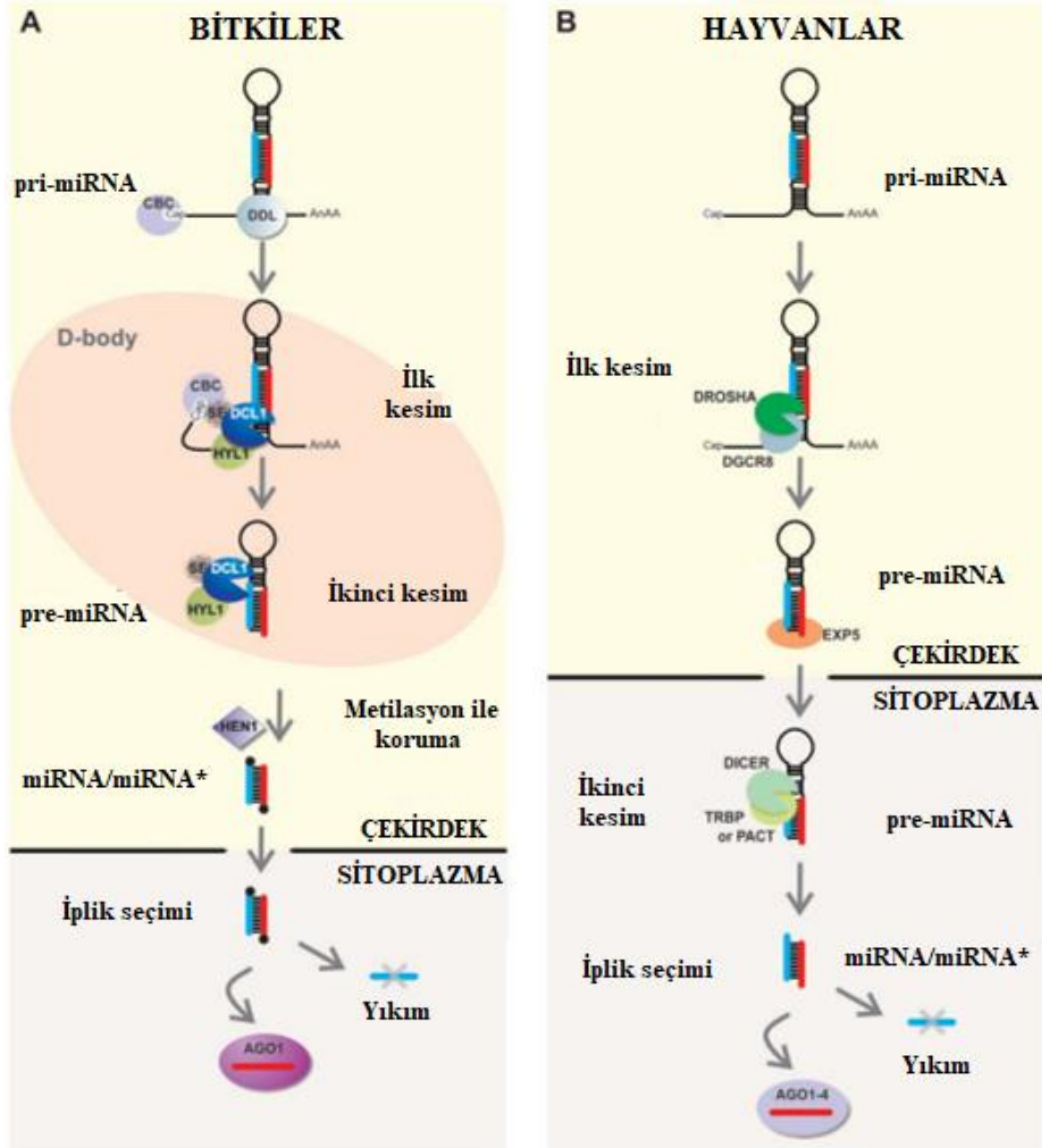
Gelişen NGS ve biyoinformatik araçlarla birlikte başta model organizmalar olmak üzere bitki, hayvan ve insanlarda yeni miRNA dizileri tanımlanmaya devam edilmektedir. Tanımlanan yeni miRNA dizileri ile hastalıkla ilgili genlerin belirlenmesi, biyomarkırların tanımlanması, gen ontoloji (GO) analizleri, evrimsel ilişkiler, gen anlatımı gibi genom ve transkriptom alanında daha detaylı bilgiler elde edilmektedir [80, 83, 84].

2.13.2. miRNA sentezi

Genomda, miRNA genleri genellikle polisistronik birincil transkriptler olarak transkribe edilecek şekilde kümelenmişlerdir. Gen içinde (intragenik) ve genler arasında (intergenik) olarak bulunan miRNA genleri, RNA polimeraz II/III ile transkribe edilir. Birkaç kilobaz (kb) büyüklüğündeki birincil transkript (primiRNA), 5' ucunda şapka ve 3' ucunda poli A kuyruğu içerir. PrimiRNA; insanda Drosha ve DGCR8 proteini ile *Drosophila*'da Pasha olarak isimlendirilen mikroişlemci kompleksi ile kesilir. Bu işlem nükleus içinde gerçekleşir ve sonuçta hairpin (saç tokası) yapısında 60-120 nt uzunluğundaki öncül miRNA (pre-miRNA) dizileri oluşur [85]. Aynı aşama bitkilerde, Dicer-benzeri protein 1 (DCL1) ve HYL1 (çift zincirli RNA bağlanma proteini) ile HEN1 (çift zincirli RNA-bağlanma motifi ve C-terminal metil transferaz domaini içerir) gibi diğer yardımcı faktörlerin birlikte çalışmasıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.4) [86]. Oluşan pre-miRNA, Exportin-5 ve Ran-GTP nüklear por kompleksi ile nükleustan sitoplazmaya taşınır.

Sitoplazmada, sitoplazmik Dicer ile tekrar kesilir ve yaklaşık 22 nt uzunluğunda dsRNA oluşur. Çift zincir denatüre olur ve bir zincirden olgun miRNA meydana gelir [81, 85]. Bir önceki aşamada; insan, hayvan ve bitkilerde görülen bazı farklılıklar burada da vardır.

Bitkilerde, dsRNA nükleusta oluşur ve HEN1 enzimi ile metillenir. Sonra Expotin-5'in ortoloğu olan HASTY ile sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada, helikaz ile zincirler birbirinden ayrılır ve olgun miRNA, gen anlatımını düzenlemek için ilgili bölgeye yönlendirilir [87].



Şekil 2.4. Hayvan ve bitki miRNA'sının sentez basamakları [86].

2.14. Bitki ve Hayvan miRNA'larının Analiz Yöntemleri

Bitki ve hayvanlarda; miRNA'lar, *in siliko* (bilgisayar temelli teknikler veya biyoinformatik yaklaşımlar) ve deneysel yöntemler olmak üzere iki farklı metodla analiz edilebilmektedir.

2.14.1. *In siliko* yöntemler

Gen anlatımının düzenlenmesi, anlamlı gen ürününün oluşabilmesi (polipeptid zinciri ve RNA molekülleri) için oldukça önemli bir basamaktır. miRNA bu düzenlemede rol oynayan önemli faktörlerden biridir [87, 88]. miRNA dizilerinin canlılar arasında korunmuş olması, daha önce tanımlanan miRNA dizilerinin kullanılarak yeni aday dizilerin belirlenmesine olanak tanır. Yeni aday miRNA'ların tanımlanmasının yanı sıra bu miRNA'ların hedef mRNA'ları, bu mRNA'ların etkili olduğu metabolik yollar ve dizi homolojisinden yararlanılarak canlılar arasındaki evrimsel ilişki de belirlenebilir [9, 89]. Bu amaçla gerçekleştirilen *in siliko* analizlerde ortak yöntem aşağıdaki gibi özetlenebilir.

- i. Çalışılacak canlının miRNA dizileri, mirBase veri tabanından [90] ve EST dizileri, NCBI [91] veri tabanından alınır.
- ii. Bu diziler, NCBI veri tabanında bulunan BLAST programı kullanılarak karşılaştırılır.
- iii. Elde edilen sonuçlar arasında 0-4 arasında yanlış eşleşme gösteren dizilerin protein kodlayıp kodlamadıkları BLASTX ile analiz edilir ve protein kodlayan diziler analizden çıkartılır.
- iv. Protein kodlamayan diziler arasında 0-4 arası yanlış eşleşmeye sahip olan diziler kullanılır.
- v. Mfold veri tabanı [92] (RNA-Folding-Form) kullanılarak pre-miRNA ve olgun miRNA dizileri belirlenir. Mfold en yaygın kullanılan programdır. Bu programın yanı sıra pre-miRNA dizilerinin belirlendiği farklı programlar da bulunmaktadır.
- vi. NCBI veri tabanında BLASTn sekmesi kullanılarak hedef genler belirlenir.
- vii. BLAST2GO programı kullanılarak, GO (Gene Ontology) ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) analizleri yapılır [93].

Filogenetik korunmuşluğu bulunan miRNA dizilerinin, dizi homolojisinden yararlanılarak yeni miRNA dizilerinin belirlenmesinde kullanılan biyoinformatiksel yaklaşım, birçok araştırmacının çalışma konusu olmuştur. Çeşitli çalışmalar ile insan, tavşan, fare, sığır, koyun, kertenkele, meyve sineği, zebra balığı, şempanze, lahana, üzüm, yonca, pirinç, mısır, buğday gibi birçok hayvan ve bitki genomunda korunmuş miRNA'lar ile hedef dizileri belirlenmiş ve veri tabanlarına kayıt edilmiştir [94, 95, 96].

2.14.2. Deneysel yöntemler

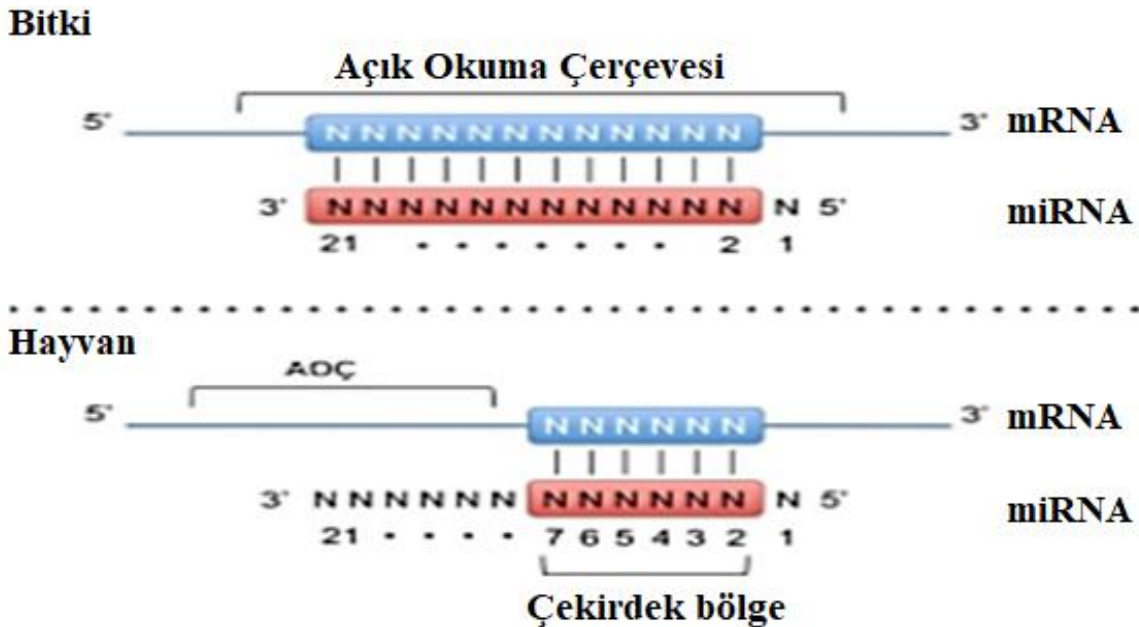
Hatalı (negatif) - hatasız (pozitif) oranlara sahip olması, daha hızlı ve kolay analizi ile asgari seviyede laboratuvar araç-gerecine gereksinim duyması, biyoinformatik metodların yaygın olarak çalışılmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte deneysel yöntemlerle biyoinformatik olarak belirlenen miRNA dizilerinin doğrulanması gerekmektedir [87, 97]. Biyoinformatik yaklaşımlar ve deneysel metodlar karşılaştırıldığında taksonlar arasında korunmuşluk göstermeyen türe özgül miRNA'ların, deneysel yaklaşımlarla daha etkili analiz edildiği gözlenmiştir. Deneysel metodlarda, dizilim temelli yöntemler ile moleküler biyoloji ve genetikte kullanılan PCR ya da real-time PCR gibi yöntemler kullanılır. Deneysel yollarla yeni miRNA dizilerinin belirlenmesinde aşağıdaki basamaklar takip edilir:

- i.** Çalışılmak istenen organizmadan total RNA izolasyonu yapılır.
- ii.** Kısa RNA dizileri jelden saflaştırılır.
- iii.** Bu dizilerin 3' ve 5' uçlarına adaptörler bağlanır.
- iv.** RT (Reverse Transcription - Ters Transkripsiyon) PCR ile cDNA (complementary DNA - tamamlayıcı DNA) sentezi gerçekleştirilir.
- v.** Sentezlenen cDNA'lar arasında küçük RNA (18-26 nt) molekülleri plazmide klonlanır ve bir kütüphane oluşturulur.
- vi.** Bu klonlar tek tek dizilenir. Dizileme işlemi NGS kullanılarak gerçekleştirilir.
- vii.** Elde edilen diziler, biyoinformatik araçlar ile analiz edilerek yeni miRNA'lar belirlenir [98, 99].

2.14.3. miRNA'ların gen anlatımının düzenlenmesindeki rolleri ve önemi

miRNA'lar, RISC aracılığı gen anlatımının düzenlenmesi rolünü gerçekleştirirler. Bu komplekste, miRNA hedef mRNA'ya bağlanarak post-transkripsiyonel düzenlemelerde görev alır. Bu düzenleme işleminin gerçekleşebilmesi için miRNA ile mRNA arasında dizi tamamlayıcılığının olması önemlidir. Yapılan çalışmalarda, hayvanlarda, miRNA'ların 5' ucunda yaklaşık 7 nt'lik 'seed' olarak tanımlanan bölgelerinin (Şekil 2.5), iki molekül arasındaki özgül tanınırlığı sağladığı belirlenmiştir [100]. Bitkilerde, miRNA ile mRNA arasında %100'e yakın bir tamamlayıcılık olması gerekir. Hayvanlarda ise bu durumun tam tersi olarak çoğu miRNA'nın tam tamamlayıcılık göstermeden mRNA'yı hedeflediği bilinmektedir [98]. Bir miRNA'nın birden fazla hedef mRNA dizisi vardır. Sonuç olarak tek bir miRNA, birden fazla geni etkileyebilmektedir [80, 87]. Hayvanlarda ve bitkilerde bulunan miRNA'lar, mRNA'nın;

- i. 3' UTR bölgesi,
- ii. 5'UTR ve/veya ORF (açık okuma çerçevesi)
- iii. 3'UTR, 5'UTR, CDS (Coding Sequence – Kodlama yapan dizi) ve protein kodlamayan bölgelerine bağlanarak işlev görür [88, 101].



Şekil 2.5. miRNA ile hedef gen arasındaki dizi eşleşmesi [100].

Gen anlatımının düzenlenmesinde hem post-transkripsiyonel aşamada hem de post-translasyonel aşamada birçok mekanizma rol oynamaktadır. miRNA dizileri de bu mekanizmalardan biridir ve epigenetik ile ilgili birçok çalışmada, bu dizilerin nasıl etki gösterdiği, hangi metabolik yollardaki genleri etkilediği ve sonuçta hangi genotipik ya da fenotipik etkilere neden olduğu vb. birçok sorunun cevabı aranmaktadır [9, 89].

Bitki, hayvan ve diğer canlılarda gen anlatımının düzenlenmesinde önemli rol oynayan miRNA'lar, genomda tanımlandıkları andan itibaren biyoloji, tarım ve tıp alanları olmak üzere birçok farklı bilimde ilerleme kaydedilmesini sağlamaktadır. Hastalıklar için biyomarkör özelliği gösterebilmeleri de miRNA anlatım çalışmalarını arttırmıştır [10]. Bu çalışmalardan birini Provost [102] gerçekleştirmiş ve miR-146a ile miR-342-3p miRNA'larının artan seviyelerini prion hastalığıyla ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise ileri prostat kanserli hastaları sağlıklı bireylerden ayırmak için miR-141'in kullanıldığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar idrar örneklerindeki miR-126 ve miR-182 oranının, idrar kesesi kanserini belirlemede kullanılabileceğini de rapor etmişlerdir [103]. miRNA'lar, ekonomik önemi olan çiftlik hayvanlarında kullanılan ilaçların analizinde de kullanılmaktadır [104].

Bu tez çalışmasında, farklı süs bitkilerinde bilgisayar destekli yöntemler kullanılarak farklı miRNA aileleri belirlendi. Bu amaçla, referans miRNA dizileri ile yapılan karşılaştırmalarda farklı programlar, her programda uygulanması gereken sıkı kurallara bağlı kalınarak kullanıldı. Tanımlanan miRNA dizileri arasında evrimsel ilişki incelendi. Ayrıca bu dizilerin hedefleri de belirlenerek, bu hedeflerin hangi süreçlerde rol oynadığı analiz edildi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, *in siliko* yöntemler kullanılarak farklı süs bitkilerinde yeni miRNA dizileri tanımlandı. Bu amaçla mirBase veri tabanında bulunan farklı bitkilere ait referans miRNA dizileri elde edildi. Elde edilen referans miRNA dizileri, NCBI veri tabanında bulunan BLASTN programı kullanılarak her bir süs bitkisine ait EST veri tabanı ile karşılaştırıldı. Uygun olan pre-miRNA dizilerinin ikincil yapıları “RNAfold Web Server” programı kullanılarak belirlendi. Tanımlanan yeni miRNA dizileri, miRBase veri tabanında yer alan ve daha önce farklı bitkilerde tanımlanmış olan homolog diziler ile Clustal Omega ve MEGAX programları kullanılarak karşılaştırıldı ve diziler arasındaki evrimsel ilişki incelendi. Bu miRNA dizilerinin hedef genleri, “RNA Hybrid” programı ile tanımlandı. Hedef genlerin, hangi süreç ve/veya yolaklarda görev aldığı BLAST2GO ve KEGG programları ile belirlendi.

3.1. miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi

Referans miRNA veri setleri, mirBase (Versiyon 22, <http://www.mirbase.org>) veri tabanından elde edildi [90]. Bu veri tabanında farklı canlılara ait *in siliko* veya deneysel yöntemlerle belirlenen miRNA dizilerinin öncül ve olgun formlarına ait bilgiler bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, bitkilerin olgun miRNA dizileri kullanıldı. Olgun diziler, öncül dizilere kıyasla daha korunmuş olduğu için olgun miRNA diziler ile analizler gerçekleştirildi [88].

3.2. Blast Analizleri

NCBI programında bulunan BLASTN programı kullanılarak elde edilen referans miRNA dizileri ile süs bitkilerine ait EST dizileri karşılaştırıldı. Bu amaçla, NCBI’da bulunan EST veri tabanında *Petunia hybrida*, *Castanea sativa*, *Yucca filamentosa*, *Opuntia streptacantha*, *Cichorium intybus*, *Cynara cardunculus*, *Asparagus officinalis* ve *Ginkgo biloba* bitkilerine ait tür düzeyinde ya da cins düzeyinde EST dizileri kullanıldı. Analizler, aşağıdaki parametreler kullanılarak gerçekleştirildi.

<i>Veri tabanı (Database)</i>	: <i>Expressed Sequence Tags (EST)</i>
<i>Organizma (Organisms)</i>	: <i>Süs bitkileri</i>
<i>Program Seçeneği (Program Selection)</i>	: <i>Somewhat similiar sequences</i>
<i>Beklenen Eşik Değeri (Expected threshold)</i>	: <i>1000</i>
<i>Hizalanan dizi sayısı (Number of Aligned Sequences):</i>	<i>1000</i>
<i>Kelime Büyüklüğü (Word Size)</i>	: <i>7</i>

Diğer parametreler ise programda belirtildiği şekilde değiştirilmeden kullanıldı [105].

Eşleşen diziler, referans miRNA dizileri ile karşılaştırılarak kontrol edildi. Referans miRNA dizileri ile eşleşen EST dizileri arasında maksimum 7 yanlış eşleşme ve/veya indeller (insersiyon/delesyon) bir sonraki aşama olan eleme sürecinde kullanılmak üzere belirlendi [9].

3.3. Eleme Süreci

In silico analizler ile yeni miRNA'ların tanımlanmasında tüm aşamalarda kullanılan programlar ve bu programlarda kullanılan parametreler büyük önem taşımaktadır. Eleme sürecindeki ilk aşama aynı gen ya da EST dizisine ait tekrarlı dizileri elenmesidir. BLAST analizleri sonucunda aynı miRNA dizisinin eşleştiği birden fazla gen ya da EST dizisi bulunabilmektedir. Bu diziler, aynı gen ya da EST dizisine ait olup sadece kısmi dizi olarak farklı aksesyon numaraları ile NCBI veri tabanında bulunmaktadır. Bu nedenle aslında tek bir dizi olan bu sonuçların aynı miRNA dizisi ile karşılaştırılması aynı dizinin tekrar tekrar analizinin yapılmasına sebep olmakta ve bu durum da değerlendirme sürecini olumsuz etkilemektedir. Bu amaçla, tez çalışmasında bir önceki aşamada belirlenen aynı EST dizisine ait tekrarlı diziler, her bir miRNA dizisine ait 'single tone' oluşturulması için BLASTN programı kullanılarak elendi. Elemelerde BLASTN programındaki parametreler değiştirilmeden analiz gerçekleştirildi [106].

Eleme sürecindeki ikinci önemli aşama ise protein kodlayan miRNA dizilerin elenmesidir. Protein kodlayan dizilerin belirlenmesi için FASTA formatındaki miRNA dizileri NCBI'da bulunan protein veri tabanı ile BLASTX programı kullanılarak karşılaştırıldı [107]. Analiz sonucunda tüm protein kodlayan diziler elendi. Protein veri tabanında bulunan protein dizileri ile karşılaştırıldığında, benzerlik göstermeyen diziler, potansiyel aday miRNA dizileri olarak seçildi.

3.4. pre-miRNA İkincil Yapılarının Oluşturulması

Bir önceki aşamada belirlenen aday miRNA dizilerinin ikincil hairpin sap-ilmek (stem-loop) yapıları, “ViennaRNA Package” (Versiyon 2.4.17) içinde bulunan “RNAfold Web Server” (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) programında [108] içindeki “Minimum Free Energy” algoritması kullanılarak belirlendi [109]. Elde edilen sonuçlar, aşağıdaki kriterler gözönüne alınarak değerlendirildi.

- i. miRNA dizisi, ‘stem-loop’ hairpin yapısında uygun bir pozisyonda bulunabilmeli.
- ii. Olgun miRNA dizisi hairpin yapısının sadece bir kolunda bulunmalı.
- iii. miRNA ile miRNA* dizilerinde herhangi bir loop veya kırık olmamalı.
- iv. MFEI (Minimum Folding Energy Index – Minimum Katlanma Enerji İndeksi) değeri >0.85 ve MFE (Minimum Free Energy - Minimum Serbest Enerji) değeri ≤ -18 kcal mol⁻¹ olmalı.
- v. Olgun miRNA ile miRNA* dizileri arasında Watson-Crick ya da G/U baz çiftinden en az 12 tane olmalı [101, 110].

Elde edilen sonuçların; EST dizisi, referans dizi, EST pozisyonu, MFE değeri, miRNA nt sayısı, AMFE (Adjusted Minimal Folding Free Energy), %GC, %AT ve MFEI değerleri belirlendi. AMFE ve MFEI değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanıldı [111].

$$AMFE = ((MFE/(\text{potansiyel pre-miRNA uzunluğu})) * 100.$$

$$MFEI = (AMFE/(\%GC))$$

3.5. Filogenetik Analizler

Süs bitkilerinde tanımlanan olgun miRNA dizileri ile bu dizilerin mirBase veri tabanında bulunan homolog referans dizileri arasındaki evrimsel ilişkinin belirlenmesi için Clustal Omega programı [112] ile hizalama yapıldı. Daha sonra, hizalanan diziler kullanılarak MEGAX programı ile filogenetik ağaç çizildi [113]. Filogenetik ağaç çiziminde “Neighbour-Joining (NJ)” metodu [114] ve “p distance” modeli kullanıldı [115]. Ayrıca “bootstrap (BS)” analizleri 1000 tekrar ile gerçekleştirildi [116].

3.6. miRNA Hedef Genlerinin Hedeflenmesi

Süs bitkilerinde yeni tanımlanan miRNA dizilerinin potansiyel hedefleri; BLASTN ve “RNA Hybrid” algoritmalarının kombinasyonu kullanılarak belirlendi [106, 113]. Bu amaçla olgun miRNA dizileri, BLASTN programında şu parametreler kullanılarak analiz edildi:

<i>Veri tabanı (Database)</i>	: <i>Nucleotide Collection (nr/nt)</i>
<i>Organizma (Organisms)</i>	: <i>Süs bitkileri</i>
<i>Program Seçeneği (Program Selection)</i>	: <i>Highly similiar sequences (megablast)</i>

Elde edilen mRNA dizileri arasında ‘query coverage’ oranı ≥ 60 olanlar seçildi ve bu dizilerin doğruluğu RNA Hyrbid algoritmasında kullanılarak değerlendirildi. Potansiyel mRNA hedeflerinin belirlenmesinde kullanılan aşağıdaki kriterler kullanılmıştır.

- i. Hedef miRNA ile potansiyel mRNA arasında 4 nt’ten fazla yanlış eşleşme olmamalı.
- ii. Bu 4 yanlış eşleşme, miRNA’ nın 5’ ucundan itibaren 10. ve 11. pozisyonlarda olmamalı.
- iii. miRNA’ nın 5’ ucundan itibaren 1. ve 9. pozisyonlar arasında 1 nt’ den fazla yanlış eşleşme olmamalı.
- iv. Hedef miRNA ile potansiyel mRNA arasında herhangi bir bölgede yan yana 2 nt’ten fazla yanlış eşleşme ve boşluk olmamalı.
- v. miRNA’ nın 5’ ucundan itibaren 2-7 ve/veya 8-13 nt bölgesi için MFE değeri ≤ -20 kcal mol⁻¹ olmalı. Bu kriterler, yanlış pozitif sonuçların elenmesini sağladı [9].

3.7. miRNA Hedef Genlerinin GO ve KEGG Analizleri

Belirlenen hedef genlerin GO analizleri BLAST2GO programı kullanılarak gerçekleştirildi [93, 114, 115]. GO analizleri ile hedef genlerin hangi süreçlerde rol oynadığı belirlendi. Bu süreçler; biyolojik süreç, hücresel bileşen ve moleküler fonksiyon olarak sınıflandırıldı. Daha sonra hedeflerde E-değeri ≤ 0 küçük olan ve uygun enzim komisyon (Enzyme Commission – EC) numaralarına sahip olan diziler, KEGG metabolik yolak veri tabanında haritalandırıldı [116].

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *in silico* yöntemler kullanılarak *Petunia hybrida*, *Castanea sativa*, *Yucca filamentosa*, *Opuntia streptacantha*, *Cichorium intybus*, *Cynara cardunculus*, *Asparagus officinalis* ve *Ginkgo biloba* olmak üzere farklı süs bitkilerinde yeni miRNA dizileri belirlendi. Referans diziler ile süs bitkilerine ait EST veri tabanının karşılaştırmasında NCBI-BLASTN, tanımlanan bu dizilerin eleme sürecinde NCBI-BLASTN ve NCBI-BLASTX programları, ikincil yapılarının belirlenmesinde “RNAfold Web Server” programı, filogenetik analizlerde Clustal Omega ve MEGAX programları, bu miRNA’ların hedef genlerinin belirlenmesinde BLASTN ve “RNA Hybrid” programları, hedef genlerin rol oynadığı süreç ve metabolik yolların belirlenmesinde ise BLAST2GO ve KEGG programları kullanıldı.

4.1. miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi

mirBase veri tabanından, 21 ailede bulunan 74 farklı bitki türüne ait 7474 pre-miRNA ve 9168 olgun miRNA dizisi elde edildi. Bu diziler arasında ökotiledonlara ait 5704 pre-miRNA dizisi ve 6746 olgun miRNA dizisi ile monokotiledonlara ait 1770 pre-miRNA ile 2422 olgun miRNA dizisi bulundu (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. mirBase veri tabanında bulunan önceden bilinen türlere ait olgun miRNA dizileri

	Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Dizi Sayısı
Ökotiledon	<i>Amaranthaceae</i>	<i>Salicornia europaea</i>	31 öncül dizi, 31 olgun dizi
	<i>Araliaceae</i>	<i>Panax ginseng</i>	29 öncül dizi, 32 olgun dizi
	<i>Asteraceae</i>	<i>Cynara cardunculus</i>	48 öncül dizi, 57 olgun dizi
		<i>Helianthus annuus</i>	6 öncül dizi, 7 olgun dizi
		<i>Helianthus argophyllus</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
		<i>Helianthus ciliaris</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
		<i>Helianthus exilis</i>	2 öncül dizi, 2 olgun dizi
		<i>Helianthus paradoxus</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
		<i>Helianthus petiolaris</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
	<i>Brassicaceae</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>	16 öncül dizi, 16 olgun dizi
		<i>Arabidopsis lyrata</i>	205 öncül dizi, 384 olgun dizi
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	326 öncül dizi, 428 olgun dizi
		<i>Brassica napus</i>	90 öncül dizi, 92 olgun dizi
		<i>Brassica oleracea</i>	10 öncül dizi, 11 olgun dizi

(devam) Çizelge 4.1. mirBase veri tabanında bulunan önceden bilinen türlere ait olgun miRNA dizileri

	Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Dizi Sayısı
Ökötiledon	<i>Brassicaceae</i>	<i>Brassica rapa</i>	96 öncül dizi, 157 olgun dizi
		<i>Camelina sativa</i>	91 öncül dizi, 112 olgun dizi
	<i>Caricaceae</i>	<i>Carica papaya</i>	79 öncül dizi, 81 olgun dizi
	<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis melo</i>	120 öncül dizi, 120 olgun dizi
		<i>Cucumis sativus</i>	5 öncül dizi, 5 olgun dizi
	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	30 öncül dizi, 30 olgun dizi
		<i>Manihot esculenta</i>	174 öncül dizi, 175 olgun dizi
		<i>Ricinus communis</i>	63 öncül dizi, 63 olgun dizi
	<i>Fabaceae</i>	<i>Acacia auriculiformis</i>	7 öncül dizi, 7 olgun dizi
		<i>Arachis hypogaea</i>	23 öncül dizi, 32 olgun dizi
		<i>Acacia mangium</i>	3 öncül dizi, 3 olgun dizi
		<i>Glycine max</i>	684 öncül dizi, 756 olgun dizi
		<i>Glycine soja</i>	13 öncül dizi, 13 olgun dizi
		<i>Lotus japonicus</i>	299 öncül dizi, 365 olgun dizi
		<i>Medicago truncatula</i>	672 öncül dizi, 756 olgun dizi
		<i>Phaseolus vulgaris</i>	8 öncül dizi, 10 olgun dizi
	<i>Lamiales</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	18 öncül dizi, 18 olgun dizi
		<i>Avicennia marina</i>	2 öncül dizi, 3 olgun dizi
		<i>Digitalis purpurea</i>	13 öncül dizi, 13 olgun dizi
		<i>Rehmannia glutinosa</i>	32 öncül dizi, 37 olgun dizi
		<i>Salvia miltiorrhiza</i>	1 öncül dizi, 1 olgun dizi
	<i>Linaceae</i>	<i>Salvia sclarea</i>	18 öncül dizi, 18 olgun dizi
		<i>Linum usitatissimum</i>	124 öncül dizi, 124 olgun dizi
	<i>Malvaceae</i>	<i>Gossypium arboreum</i>	1 öncül dizi, 1 olgun dizi
		<i>Gossypium herbaceum</i>	1 öncül dizi, 1 olgun dizi
		<i>Gossypium hirsutum</i>	78 öncül dizi, 80 olgun dizi
		<i>Gossypium raimondii</i>	296 öncül dizi, 296 olgun dizi
		<i>Theobroma cacao</i>	82 öncül dizi, 82 olgun dizi
	<i>Myrtaceae</i>	<i>Eugenia uniflora</i>	39 öncül dizi, 74 olgun dizi
	<i>Paeoniaceae</i>	<i>Paeonia lactiflora</i>	15 öncül dizi, 15 olgun dizi
<i>Ranunculaceae</i>	<i>Aquilegia caerulea</i>	45 öncül dizi, 45 olgun dizi	
<i>Rhizophoraceae</i>	<i>Bruguiera cylindrica</i>	4 öncül dizi, 4 olgun dizi	
	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	4 öncül dizi, 4 olgun dizi	
<i>Rosaceae</i>	<i>Fragaria vesca</i>	118 öncül dizi, 131 olgun dizi	
	<i>Malus domestica</i>	308 öncül dizi, 322 olgun dizi	
	<i>Prunus persica</i>	180 öncül dizi, 214 olgun dizi	
<i>Rutaceae</i>	<i>Citrus clementina</i>	5 öncül dizi, 5 olgun dizi	
	<i>Citrus reticulata</i>	4 öncül dizi, 4 olgun dizi	
	<i>Citrus sinensis</i>	151 öncül dizi, 246 olgun dizi	

(devam) Çizelge 4.1. mirBase veri tabanında bulunan önceden bilinen türlere ait olgun miRNA dizileri

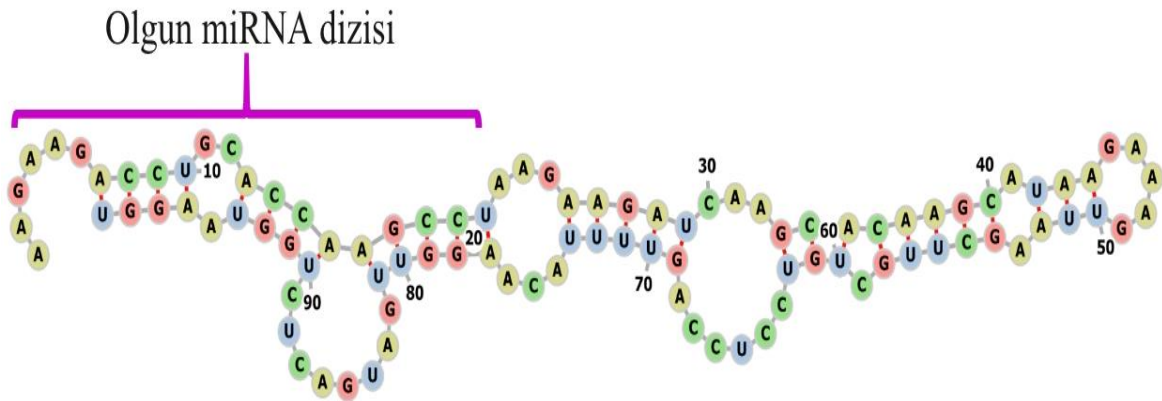
	Aile İsmi	Tür İsmi	miRNA Dizi Sayısı
Ökötiledon		<i>Citrus trifoliata</i>	6 öncül dizi, 6 olgun dizi
	Salicaceae	<i>Populus euphratica</i>	4 öncül dizi, 4 olgun dizi
		<i>Populus trichocarpa</i>	352 öncül dizi, 401 olgun dizi
	Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	162 öncül dizi, 164 olgun dizi
		<i>Solanum lycopersicum</i>	112 öncül dizi, 147 olgun dizi
		<i>Solanum tuberosum</i>	224 öncül dizi, 343 olgun dizi
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	163 öncül dizi, 186 olgun dizi	
Monokotiledon	Monocotyledons	<i>Asparagus officinalis</i>	101 öncül dizi, 101 olgun dizi
		<i>Aegilops tauschii</i>	88 öncül dizi, 173 olgun dizi
		<i>Brachypodium distachyon</i>	317 öncül dizi, 525 olgun dizi
		<i>Elaeis guineensis</i>	6 öncül dizi, 6 olgun dizi
		<i>Festuca arundinacea</i>	15 öncül dizi, 15 olgun dizi
		<i>Hordeum vulgare</i>	69 öncül dizi, 71 olgun dizi
		<i>Oryza sativa</i>	604 öncül dizi, 738 olgun dizi
		<i>Sorghum bicolor</i>	205 öncül dizi, 241 olgun dizi
		<i>Saccharum officinarum</i>	16 öncül dizi, 16 olgun dizi
		<i>Saccharum sp.</i>	19 öncül dizi, 20 olgun dizi
		<i>Triticum aestivum</i>	122 öncül dizi, 125 olgun dizi
		<i>Triticum turgidum</i>	1 öncül dizi, 1 olgun dizi
		<i>Vriesea carinata</i>	33 öncül dizi, 65 olgun dizi
<i>Zea mays</i>	174 öncül dizi, 325 olgun dizi		

4.2. pre-miRNA İkincil Yapılarının Belirlenmesi

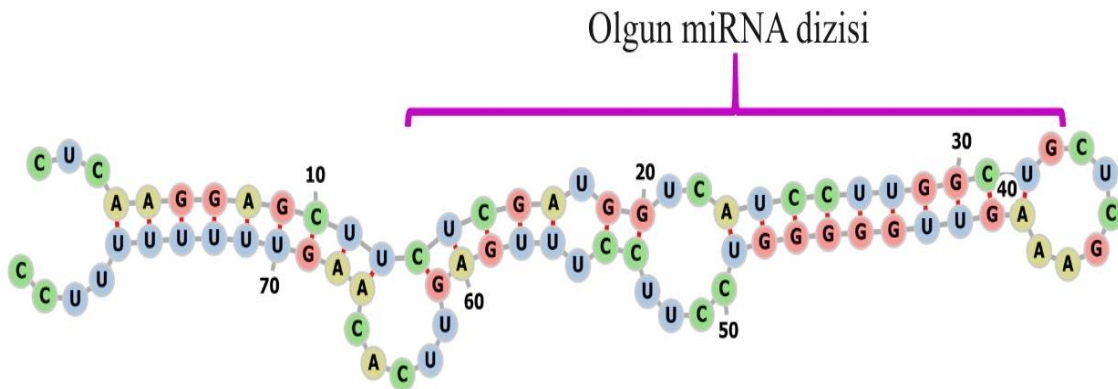
Referans miRNA dizilerinin, *Petunia hybrida*, *Castanea sativa*, *Yucca filamentosa*, *Opuntia streptacantha*, *Cichorium intybus*, *Cynara cardunculus*, *Asparagus officinalis* ve *Ginkgo biloba* süs bitkilerine ait EST veri tabanlarında BLASTN programı (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile karşılaştırılması sonucunda referans dizi ile ≤ 7 yanlış eşleşmeye sahip EST dizileri belirlendi. Elde edilen EST dizileri arasında benzerlik olup olmadığı yeniden BLASTN programı kullanılarak analiz edildi ve tekrarlı EST dizileri silinerek her bir miRNA dizisi için 'single ton' oluşturuldu. Daha sonra bu diziler arasında BLASTX programı kullanılarak protein kodlayanlar belirlendi ve bu diziler silinerek protein kodlamayan diziler ile bir sonraki aşamaya geçildi.

Materyal ve Yöntem kısmında yer alan 3.4. numaralı başlıkta belirtilen kurallar uygulanarak gerçekleştirilen “RNAfold Web Server” programı analizleri sonucunda süs bitkilerinde miR168, miR169, miR399, miR2930 ve miR10982 olmak üzere beş farklı miRNA ailesi belirlendi. Belirlenen miRNA dizileri isimlendirilirken ilgili süs bitkisinin tür adının ilk kelimesinin ilk harfi ile ikinci adının iki harfi alındı.

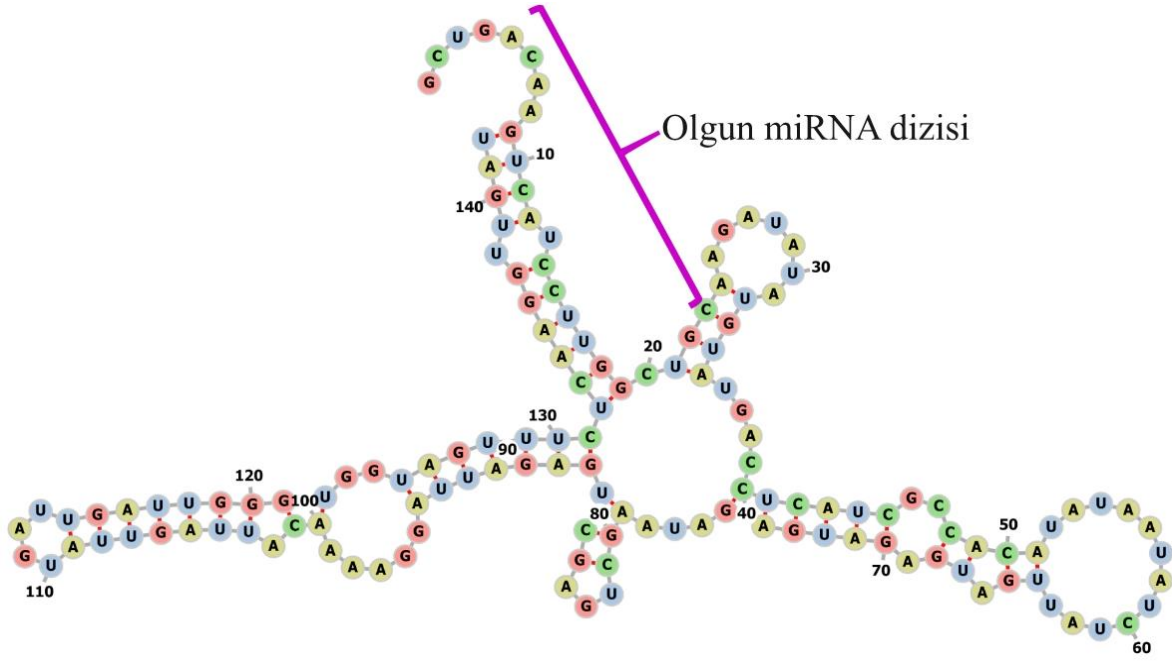
Petunia hybrida (phy-miR168), *Castanea sativa* (csa-miR169), *Yucca filamentosa* (yfi-miR169), *Opuntia streptacantha* (ost-miR169), *Cichorium intybus* (cin-miR169), *Cynara cardunculus* (cca-miR169), *Petunia hybrida* (phy-miR399), *Asparagus officinalis* (aof-miR2930) ve *Ginkgo biloba* (gbi-miR10982) bitkilerinde parantez içinde belirtilen yeni miRNA dizileri belirlendi (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9).



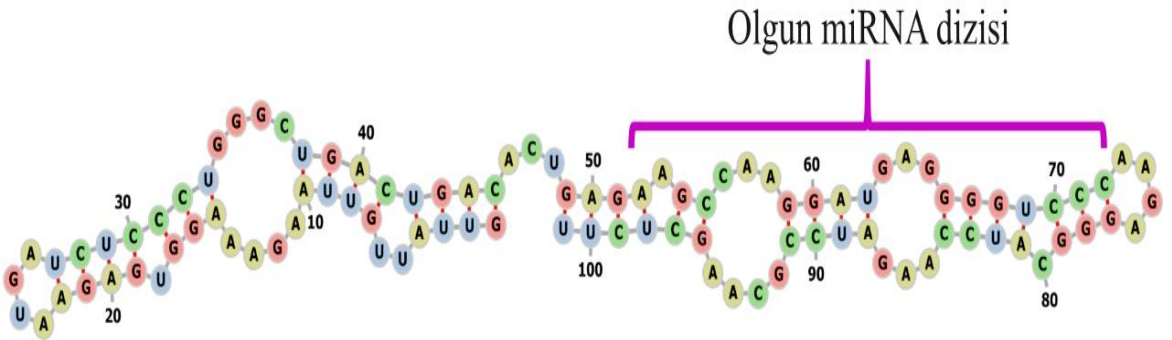
Şekil 4.1. *Petunya hybrida* bitkisinde tanımlanan phy-miR168 dizisinin ikincil yapısı.



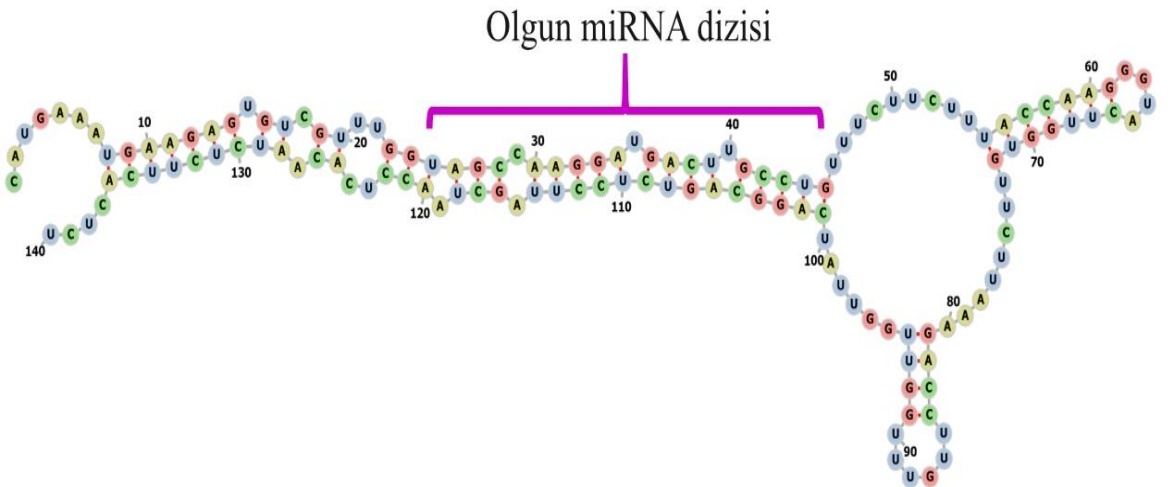
Şekil 4.2. *Castanea sativa* bitkisinde tanımlanan csa-miR169 dizisinin ikincil yapısı.



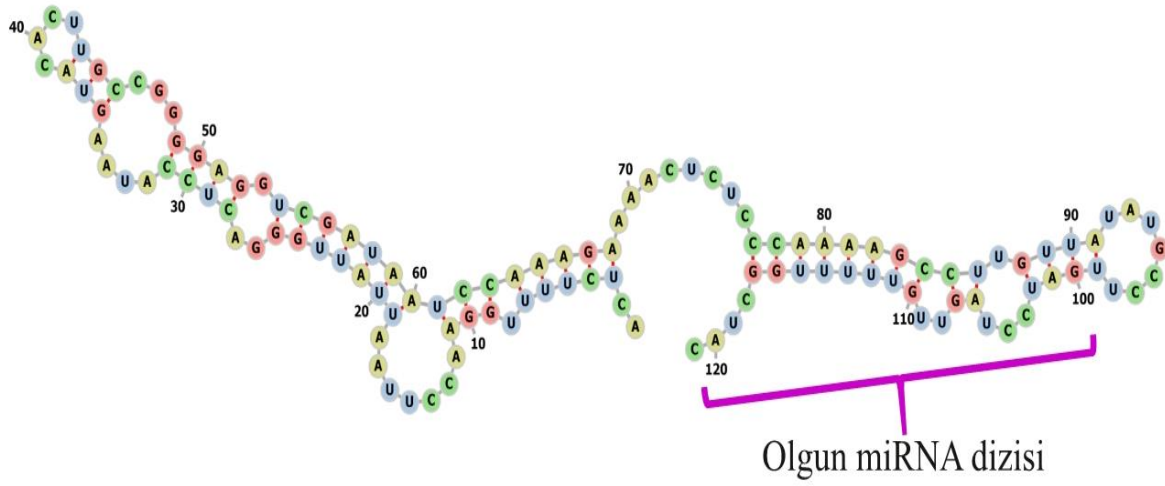
Şekil 4.3. *Yucca filamentosa* bitkisinde tanımlanan yfi-miR169 dizisinin ikincil yapısı.



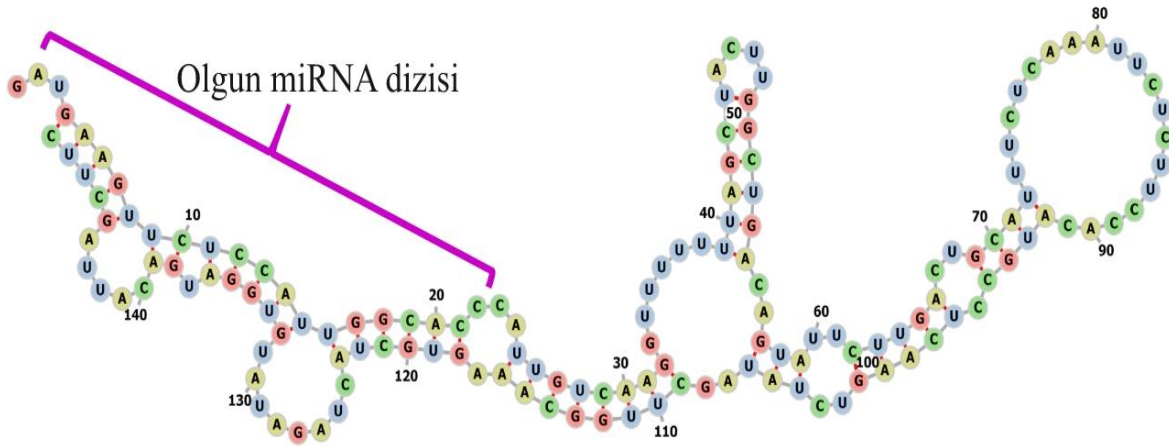
Şekil 4.4. *Opuntia streptacantha* bitkisinde tanımlanan opt-miR169 dizisinin ikincil yapısı.



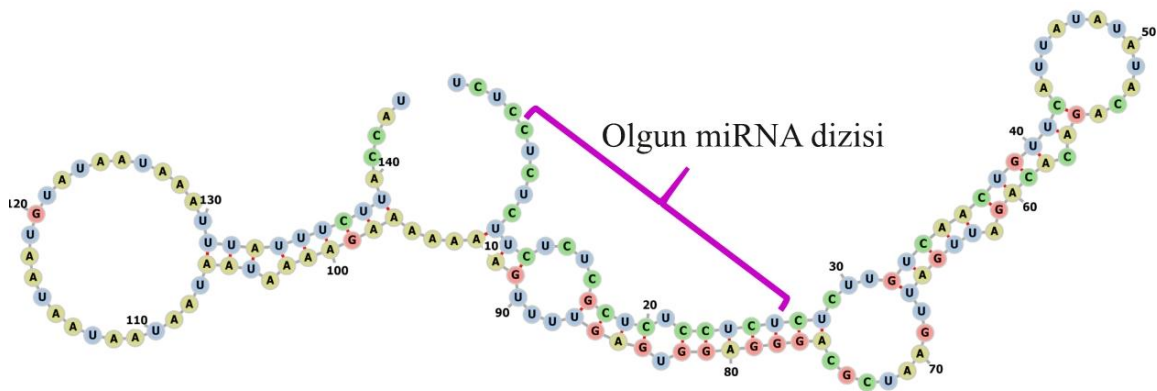
Şekil 4.5. *Cichorium intybus* bitkisinde tanımlanan cin-miR169 dizisinin ikincil yapısı.



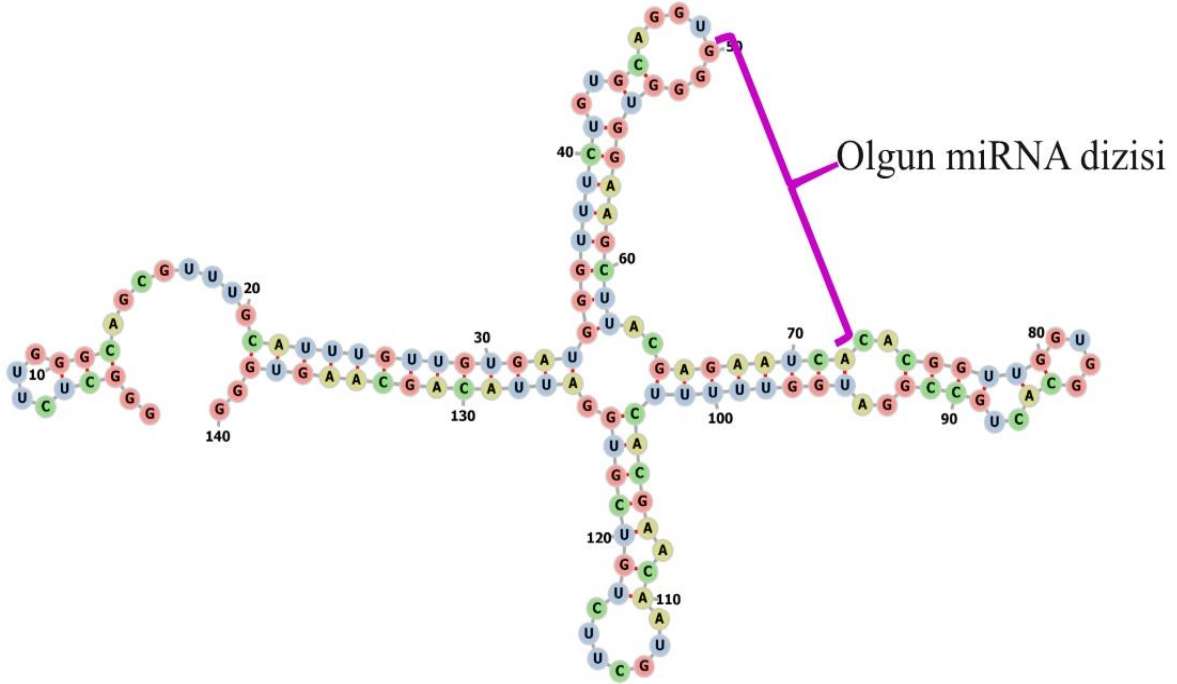
Şekil 4.6. *Cynara cardunculus* bitkisinde tanımlanan cca-miR169 dizisinin ikincil yapısı.



Şekil 4.7. *Petunia hybrida* bitkisinde tanımlanan phy-miR399 dizisinin ikincil yapısı.



Şekil 4.8. *Asparagus officinalis* bitkisinde tanımlanan aof-miR2930 dizisinin ikincil yapısı.



Şekil 4.9. *Ginkgo biloba* bitkisinde tanımlanan gbi-miR10982 dizisinin ikincil yapısı.

Pre-miRNA'ların ikincil yapıları belirlenirken miRNA-miRNA* dizileri arasında en az 12 baz eşleşmesi olanlar analiz edildi. Pre-miRNA uzunluklarının 79 ile 149 nt arasında değiştiği ve bu pre-miRNA dizilerinin ortalama 123 nt olduğu belirlendi. İkincil yapılar oluşturulurken MFE değerinin ≤ -18 kcal mol⁻¹ olması gerektiği ile ilgili kural da göz önüne alındı. Elde edilen pre-miRNA dizilerinde MFE değerlerinin -19,20 ile -47,40 arasında değiştiği ve ortalama değerin -28,73 kcal mol⁻¹ olduğu görüldü. Diğer önemli bir parametre olan MFEI değerlerinin ise 1,71 ile 4,31 arasında 2,52 ortalama ile değiştiği belirlendi. Dizilerin % G + C oranları incelendiğinde bu oranın %40,91 ile %61,90 aralığında ve ortalamasının da %53,15 olduğu bununla birlikte %A + C oranlarının %38,1 ile %59,09 değiştiği ve ortalamasının da %46,84 olduğu görüldü (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Süs bitkilerinde yeni tanımlanan pre-miRNA'ların özellikleri

miRNA	EST dizisi	Referans dizi	Dizi	EST pozisyonu	MFE	miRNA nt sayısı	AMFE	%GC	%AT	MFEI
phy-miR168	DC241724.1	aof-miR168b	AAGAAGACCTGCACCAAGCCT	300...320	-19,20	21	91,43	52,38	47,62	1,75
csa-miR169	HO847379.1	csi-miR169m-5p	CTCGATGGTCATCCTTGGCTG	74...94	-20,50	21	97,62	57,14	42,86	1,71
yfi-miR169	DT600568.1	ppe-miR169f	GCTGACAAGTCATCCTTGGCTG	165...186	-26,10	22	118,64	54,55	45,45	2,18
ost-miR169	HO058895.1	gma-miR169c	AAGCCAAGGATGAGGGGTCCC	472...492	-29,90	21	142,38	61,90	38,10	2,30
cin-miR169	EH710459.1	osa-miR169h	TAGCCAAGGATGACTTGCCTG	95...115	-47,40	21	225,71	52,38	47,62	4,31
cca-miR169	GE603300.1	gma-miR169l-3p	GATCCTAGTTGTTTTGGCTAC	380...401	-21,20	22	96,36	40,91	59,09	2,36
phy-miR399	FN035104.1	mtr-miR399s-5p	GATGAAGTTCTCCATTGGCACC	116...137	-32,90	22	149,55	50,00	50,00	2,99
aof-miR2930	CV288534.1	osa-miR2930	CTCTCTTCTCTCGCTCTCCTCT	5...26	-22,10	22	100,45	54,55	45,45	1,84
gbi-miR10982	EX932357.1	mdm-miR10982a	GGGGTGGGAAGCTTACGAGAATC	50...71	-39,30	22	178,64	54,55	45,45	3,28

*Referans dizileri ile yapılan karşılaştırma sonucunda yeni tanımlanan miRNA dizisindeki yanlış eşleşmeler kırmızı renk ile gösterilmiştir.

4.3. Filogenetik Analizler

Süs bitkilerinde tanımlanan miRNA ailelerine (miR168, miR169, miR399, miR2930 ve miR10982) ait referans dizileri miRBase veri tabanından elde edildi. Bu diziler ile bu tez çalışmasında tanımlanan miRNA dizileri arasındaki evrimsel ilişki hizalama ve filogenetik ağaç analizleri ile incelendi.

4.3.1. miRNA168 ailesine özgü dizilerin analizi

Petunia hybrida bitkisinde tanımlanan phy-miR168 dizisi ile birlikte 26 referans miRNA168 dizisinin hizalama analizi yapıldı. Bu diziler sırasıyla; *Acacia auriculiformis* (aau-miR168), *Aquilegia caerulea* (aqc-miR168), *Oryza sativa* (osa-miR168b), *Vriesea carinata* (vca-miR168b-5p), *Manihot esculenta* (mes-miR168a), *Glycine max* (gma-miR168a), *Medicago truncatula* (mtr-miR168c-5p), *Vigna unguiculata* (vun-miR168), *Linum usitatissimum* (lus-miR168a), *Theobroma cacao* (tcc-miR168), *Malus domestica* (mdm-miR168b), *Prunus persica* (ppe-miR168), *Citrus clementina* (ccl-miR168), *Citrus reticulata* (crt-miR168), *Citrus sinensis* (csi-miR168-5p), *Populus trichocarpa* (ptc-miR168a-5p), *Nicotiana tabacum* (nta-miR168d), *Vitis vinifera* (vvi-miR168), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR168-5p), *Sorghum bicolor* (sbi-miR168), *Saccharum sp.* (ssp-miR168a), *Zea mays* (zma-miR168a-5p), *Lotus japonicus* (lja-miR11168-5p), ***Petunia hybrida* (phy-miR168)**, *Hordeum vulgare* (hvu-miR168-3p), *Fragaria vesca* (fve-miR168-3p) ve *Solanum lycopersicum* (sly-miR168a-3p) olarak sıralanabilir. Ökotiledon ve monokotiledonlarda bulunan farklı ailelere özgü miR168 dizileri ile phy-miR168 dizisinin yüksek oranda benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.10).

```

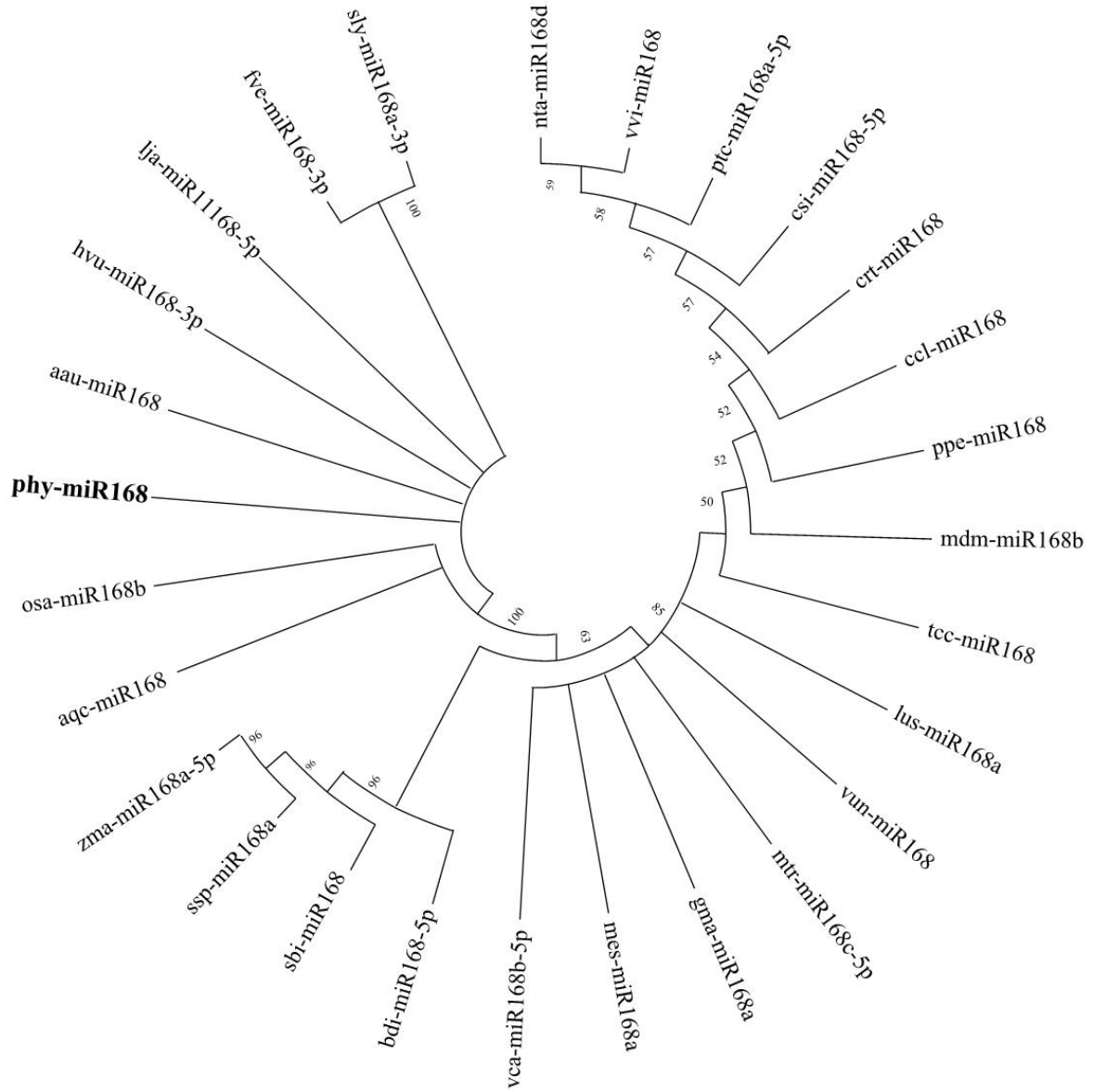
aau-miR168      1 AUUCAGUUGAUGCAAGGCGGGAUC---
aqc-miR168      1 --UGGCUUAGUGCAGCUCGGGGA-----
osa-miR168b     1 --AGGCUUUGGUGCAGCUCGGGAA-----
vca-miR168b-5p  1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
mes-miR168a     1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
gma-miR168a     1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
mtr-miR168c-5p  1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
vun-miR168      1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
lus-miR168a     1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
tcc-miR168      1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
mdm-miR168b     1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
ppe-miR168      1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
ccl-miR168      1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
crt-miR168      1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
csi-miR168-5p  1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
ptc-miR168c-5p  1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
nta-miR168d     1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
vvi-miR168      1 --UCGCUUUGGUGCAGGUCGGGAA-----
bdi-miR168-5p   1 --UCGCUUUGGUGCAGAU CGGGAC-----
sbi-miR168      1 --UCGCUUUGGUGCAGAU CGGGAC-----
ssp-miR168a     1 --UCGCUUUGGUGCAGAU CGGGAC-----
zma-miR168a-5p  1 --UCGCUUUGGUGCAGAU CGGGAC-----
lja-miR11168-5p 1 ---GAACCGUGGCAAUAGAUGACCU CU
phy-miR168    1 -AAGAAGACCUGCACCAAGCCU-----
hvu-miR168-3p   1 GAUCCCGCCUUGCACCAAGUGAAU---
fve-miR168-3p   1 ---CCCGCCUUGC AUCAACUGAAU---
sly-miR168a-3p  1 ---CCUGCCUUGC AUCAACUGAAU---

```

Şekil 4.10. miR168 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu.

Toplamda 27 farklı bitkiden elde edilen 576 nt dizisi analiz edilerek filogenetik ağaç çizildi ve bu dizilerin filogenetik analizleri sonucunda 6 ayrı gruba ayrıldıkları görüldü. İlk grupta *Solanum lycopersicum* ve *Fragaria vesca* bitkilerine ait diziler bulunurken ikinci grupta *Lotus japonicus* bitkisine ait dizilerinin bulunduğu belirlendi.

Üçüncü grupta *Hordeum vulgare*, dördüncü grupta *Acacia auriculiformis* ve beşinci grupta bu çalışmada tanımlanan ***Petunia hybrida* (phy-miR168)** dizilerinin yer aldığı gözlemlendi. Altıncı grupta ise analizi gerçekleştirilen diğer dizilerin bulunduğu belirlendi (Şekil 4.11). ‘Bootstrap’ yüzdeleri, dallanma noktalarında gösterilmiştir.



Şekil 4.11. miR168 ailesine özgü dizilerin filogenetik analiz sonuçları.

4.3.2. miRNA169 ailesine özgü dizilerin analizi

Castanea sativa (csa-miR169), *Yucca filamentosa* (yfi-miR169), *Opuntia streptacantha* (ost-miR169), *Cichorium intybus* (cin-miR169) ve *Cynara cardunculus* (cca-miR169) bitkilerinde tanımlanan miR169 dizileri ile birlikte 21 referans miRNA169 dizisinin hizalama analizi gerçekleştirilerek diziler arasındaki benzerlik incelendi.

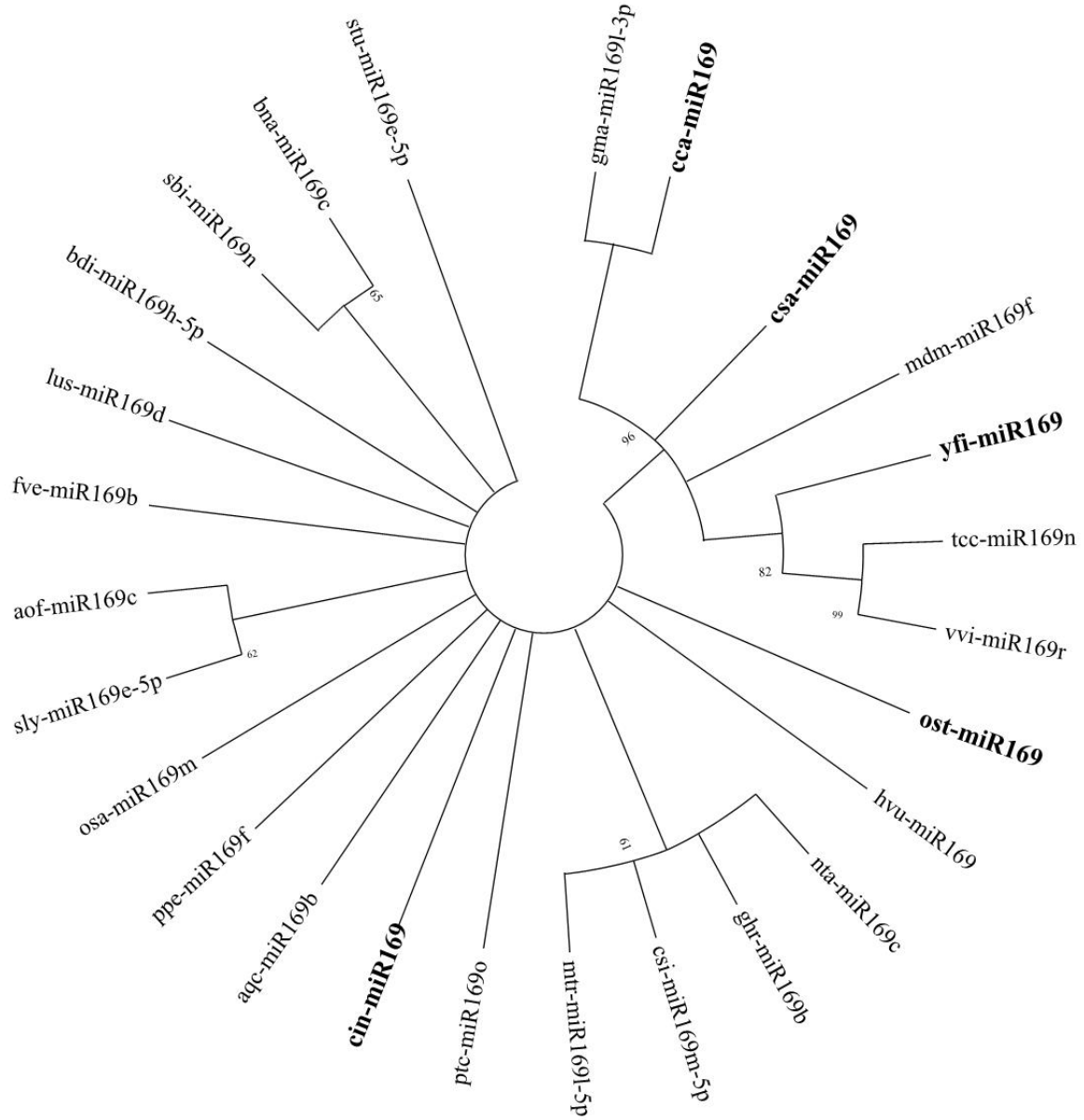
Bu diziler sırasıyla *Malus domestica* (mdm-miR169f), *Cynara cardunculus* (cca-miR169), *Glycine max* (gma-miR169l-3p), *Opuntia streptacantha* (ost-miR169), *Theobroma cacao* (tcc-miR169n), *Vitis vinifera* (vvi-miR169r), *Nicotiana tabacum* (nta-miR169c), *Citrus sinensis* (csi-miR169m-5p), *Medicago truncatula* (mtr-miR169l-5p), *Gossypium hirsutum* (ghr-miR169b), *Linum usitatissimum* (lus-miR169d), *Hordeum vulgare* (hvu-miR169), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169o), *Brassica napus* (bna-miR169c), *Sorghum bicolor* (sbi-miR169n), *Solanum lycopersicum* (sly-miR169e-5p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169h-5p), *Cichorium intybus* (cin-miR169), *Aquilegia caerulea* (aqc-miR169b), *Fragaria vesca* (fve-miR169b), *Prunus persica* (ppe-miR169f), *Solanum tuberosum* (stu-miR169e-5p), *Asparagus officinalis* (aof-miR169c), *Oryza sativa* (osa-miR169m), *Castanea sativa* (csa-miR169) ve *Yucca filamentosa* (yfi-miR169) olarak sıralanabilir. Tanımlanan miRNA dizilerinin referans diziler ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.12).

mdm-miR169f	1	UGAAGAGAAGAGCGUUGUUUGG-----
cca-miR169	1	-----GAUCCUAGUUGUUUUUGGCUAC
gma-miR169l-3p	1	-----CGGGCAAGUUGUUUUUGGCUAC
ost-miR169	1	-----AAGCCAAGGAUGAGGGGUCCC-
tcc-miR169n	1	-----UGAGUCAAGAAUGACUUGCCG--
vvi-miR169r	1	-----UGAGUCAAGGAUGACUUGCCG--
nta-miR169c	1	-----CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA-
csi-miR169m-5p	1	-----CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG-
mtr-miR169l-5p	1	-----CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG-
ghr-miR169b	1	-----CAGCCAAGGAUGAUUUUGCCGG-
lus-miR169d	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCCA-
hvu-miR169	1	-----AAGCCAAGGAUGAGUUGCCUG-
ptc-miR169o	1	-----AAGCCAAGGAUGACUUGCCUG-
bnam-miR169c	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUA-
sbi-miR169n	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUA-
sly-miR169e-5p	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUUU
bdi-miR169h-5p	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUA-
cin-miR169	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG-
aqc-miR169b	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG-
fve-miR169b	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCU--
ppe-miR169f	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUGC
stu-miR169e-5p	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCU--
aof-miR169c	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCU--
osa-miR169m	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG-
csa-miR169	1	-----CUCGAUGGUCAUCCUUGGCUG-
yfi-miR169	1	-----GCUGACAAGUCAUCCUUGGCUG-

Şekil 4.12. miR169 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu.

Bu tez çalışmasında 5 farklı süs bitkisinde tanımlanan miRNA169 dizileri ile birlikte 21 referans miRNA dizisinden elde edilen 549 nt dizisi analiz edilerek filogenetik ağaç çizildi. Bu ağaçta, dizilerin 15 farklı grup oluşturduğu görüldü (Şekil 4.13). Tanımlanan 5 farklı miRNA169 dizisinden *Cichorium intybus* (**cin-miR169**) ve *Opuntia streptacantha* (**ost-miR169**) bitkilerine ait dizilerin ayrı gruplarda bulunduğu belirlendi.

Bununla birlikte *Cynara cardunculus* (**cca-miR169**), *Castanea sativa* (**csa-miR169**) ve *Yucca filamentosa* (**yfi-miR169**) bitkilerinin aynı grupta yer aldığı, *Castanea sativa* (**csa-miR169**) dizisinin ise bu iki diziden önce evrimleşmiş olabileceği görüldü. 'Bootstrap' yüzdeleri, dallanma noktalarında gösterilmiştir.



Şekil 4.13. miR169 ailesine özgü dizilerin filogenetik analiz sonuçları.

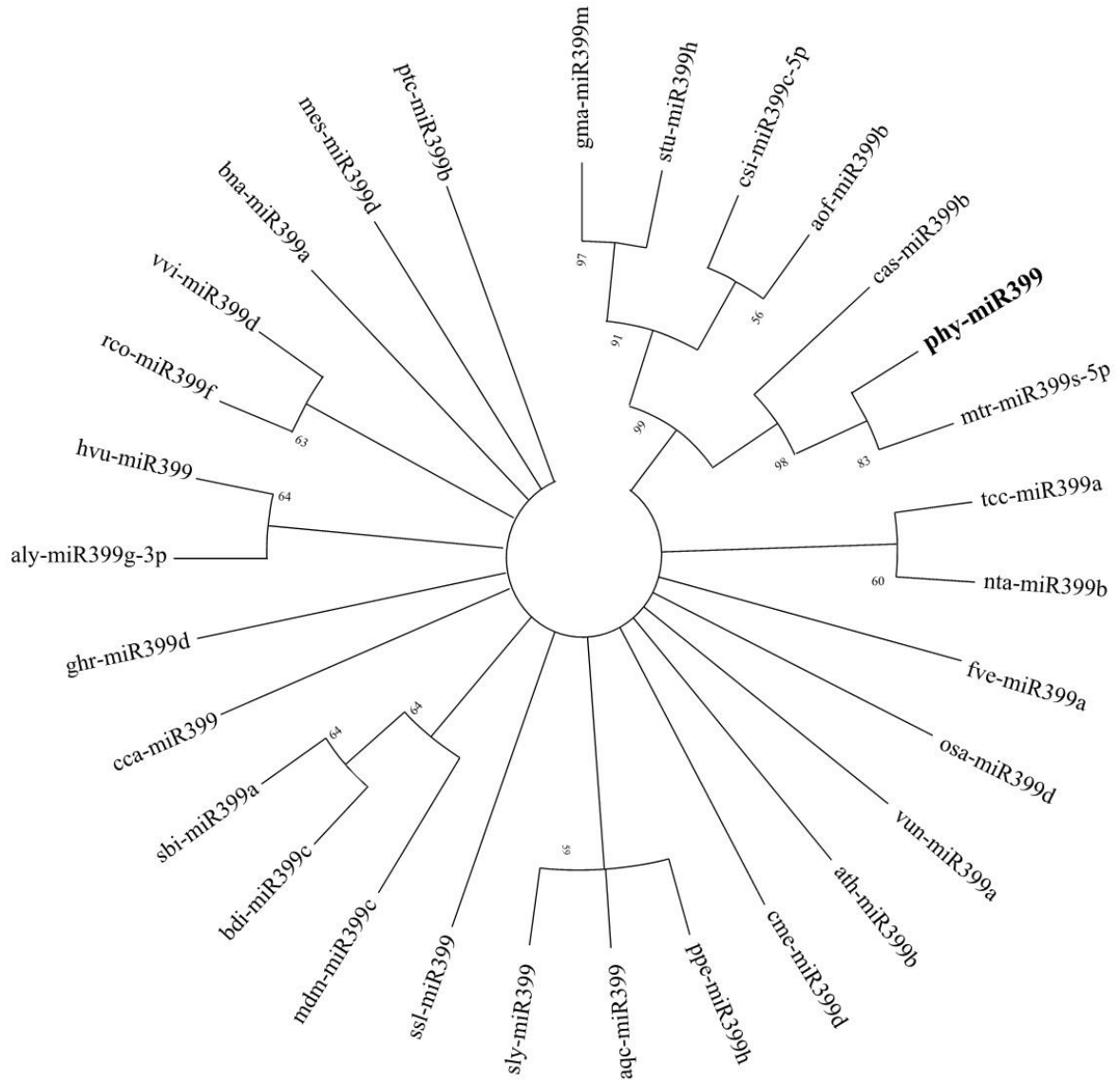
4.3.3. miRNA399 ailesine özgü dizilerin analizi

Petunia hybrida bitkisinde tanımlanan diğer bir miRNA dizisi olan phy-miR399 dizisi ile birlikte 29 referans miRNA399 dizisinin hizalama analizi gerçekleştirildi. Bu diziler sırasıyla; *Ricinus communis* (rco-miR399f), *Vitis vinifera* (vvi-miR399d), *Brassica napus* (bna-miR399a), *Manihot esculenta* (mes-miR399d), *Populus trichocarpa* (ptc-miR399b), *Salvia sclarea* (ssl-miR399), *Arabidopsis lyrata* (aly-miR399g-3p), *Hordeum vulgare* (hvu-miR399), *Nicotiana tabacum* (nta-miR399b), *Prunus persica* (ppe-miR399h), *Aquilegia caerulea* (aqc-miR399), *Solanum lycopersicum* (sly-miR399), *Theobroma cacao* (tcc-miR399a), *Cucumis melo* (cme-miR399d), *Cynara cardunculus* (cca-miR399), *Gossypium hirsutum* (ghr-miR399d), *Arabidopsis thaliana* (ath-miR399b), *Vigna unguiculata* (vun-miR399a), *Fragaria vesca* (fve-miR399a), *Oryza sativa* (osa-miR399d), *Malus domestica* (mdm-miR399c), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR399c), *Sorghum bicolor* (sbi-miR399a), *Glycine max* (gma-miR399m), *Solanum tuberosum* (stu-miR399h), *Camelina sativa* (cas-miR399b), *Medicago truncatula* (mtr-miR399s-5p), *Citrus sinensis* (csi-miR399c-5p), ***Petunia hybrida* (phy-miR399)** ve *Asparagus officinalis* (aof-miR399b) olarak sıralanabilir. Tanımlanan dizinin referans diziler ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.14).

rco-miR399f	1	-UGCCAAAGGAGAUUUGCUCAC
vvi-miR399d	1	-UGCCAAAGGAGAUUUGCUCGU
bna-miR399a	1	-UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG
mes-miR399d	1	-UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG
ptc-miR399b	1	-UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG
ssl-miR399	1	-UGCCAAAGGAGAAUUGCCCGG
aly-miR399g-3p	1	-UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG
hvu-miR399	1	-UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG
nta-miR399b	1	-CGCCAAAGGAGAGCUGCCUG
ppe-miR399h	1	-UGCCAAAGGAGAGUUGCCCUA
aqc-miR399	1	-UGCCAAAGGAGAGUUGCCCUA
sly-miR399	1	-UGCCAAAGGAGAGUUGCCCUA
tcc-miR399a	1	-CGCCAAAGGAGAGUUGCCUG
cme-miR399d	1	-UGCCAAAGGAGAGUUGCCCUU
cca-miR399	1	-UGCCAAAGGAGAUUUGCCUG
ghr-miR399d	1	-UGCCAAAGGAGAUUUGCCUG
ath-miR399b	1	-UGCCAAAGGAGAGUUGCCUG
vun-miR399a	1	-UGCCAAAGGAGAGUUGCCUG
fve-miR399a	1	-UGCCAAAGGAGAGUUGCCUG
osa-miR399d	1	-UGCCAAAGGAGAGUUGCCUG
mdm-miR399c	1	-UGCCAAAGGAGAAUUGCCUG
bdi-miR399c	1	-UGCCAAAGGAGAAUUGCCUG
sbi-miR399a	1	-UGCCAAAGGAGAAUUGCCUG
gma-miR399m	1	-GGGCUCCUCUCUCCUGGCAUG
stu-miR399h	1	-GGGCUACUCUCUAUUGGCAUG
cas-miR399b	1	GGGCAAGAUCACCAUUGGCAGA
mtr-miR399s-5p	1	GGGUGAGUUCUCCAUUGGCAGG
csi-miR399c-5p	1	-GUGCAGUCCUCCUUUGGCGUG
phy-miR399	1	GAUGAAGUUCUCCAUUGGCACC
aof-miR399b	1	-GUGCAACUCUCCUUUGGCACC

Şekil 4.14. miR399 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu.

Petunia hybrida (phy-miR399) ile birlikte 30 farklı bitkiden elde edilen 633 nt dizisi analiz edilerek filogenetik ağaç çizildi ve bu dizilerin filogenetik analizleri sonucunda 17 ayrı gruba ayrıldıkları görüldü. Petunya bitkisinin *Medicago truncatula* bitkisi ile kardeş taksonda bulunduğu belirlendi. Bununla birlikte aynı grupta *Camelina sativa*, *Asparagus officinalis*, *Citrus sinensis*, *Solanum tuberosum* ve *Glycine max* bitkilerinin de yer aldığı gözlemlendi. ‘Bootstrap’ yüzdeleri, dallanma noktalarında gösterilmiştir.



Şekil 4.15. miR399 ailesine özgü dizilerin filogenetik analiz sonuçları.

4.3.4. miRNA2930 ailesine özgü dizilerin analizi

Veri tabanında miR2930 dizisine özgü tek dizi *Oryza sativa* (osa-miR2930) bitkisine ait olduğu için bu dizi ile tanımlanan *Asparagus officinalis* (aof-miR2930) dizisinin hizalama analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.16). Hizalama sonucunda her iki dizi arasında benzerlik olduğu belirlendi. Sadece iki dizi bulunduğu için filogenetik ağaç çizilmedi.

aof-miR2930	1	CUCUCUUCUCUCGCUCCUCU
osa-miR2930	1	UUCUCUUCUCUCGCGCGUGGCC

Şekil 4.16. miR2930 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu.

4.3.5. miRNA10982 ailesine özgü dizilerin analizi

Ginkgo biloba (gbi-miR10982) ile birlikte *Malus domestica* bitkisinde bulunan miR10982 dizi çeşitleri hizalanarak diziler arasındaki benzerlik belirlendi. miRBase veri tabanında farklı numaralar ile kayıt yapılan birçok verinin aynı ya da benzer diziye sahip olduğu bilinmektedir. Şekil 4.17’de de gösterildiği gibi bu bitkide tanımlanan ve 10982a, 10982b, 10982c ve 10982d olarak ayrı numaralandırılan dizilerin aynı olduğu görülmektedir. Bu nedenle dört farklı dizi gibi görülse de bu dizilerin aynı olması nedeniyle bu dört dizi tek bir dizi gibi analiz edildi ve filogenetik ağaç çizilmedi.

gbi-miR10982	1	GGGGUGGAAGCUUACGAGAAUC
mdm-miR10982c	1	CGGAAUGAAGCUUACGAGAAUG
mdm-miR10982a	1	CGGAAUGAAGCUUACGAGAAUG
mdm-miR10982b	1	CGGAAUGAAGCUUACGAGAAUG
mdm-miR10982d	1	CGGAAUGAAGCUUACGAGAAUG

Şekil 4.17. miR10982 ailesine özgü dizilerin hizalama sonucu.

4.3.6. Tanımlanan miRNA ailelerinin analizi

Petunia hybrida (phy-miR168), *Castanea sativa* (csa-miR169), *Yucca filamentosa* (yfi-miR169), *Opuntia streptacantha* (ost-miR169), *Cichorium intybus* (cin-miR169), *Cynara cardunculus* (cca-miR169), *Petunia hybrida* (phy-miR399), *Asparagus officinalis* (aof-miR2930) ve *Ginkgo biloba* (gbi-miR10982) bitkilerinde tanımlanan farklı miRNA ailelerine özgü diziler ile bu miRNA ailelerinin farklı bitki türlerinde bulunan homolog referans dizileri arasında hizalama yapıldı. Analizler sonucunda her bir miRNA ailesinin diğer bitkilerdeki referans dizileri ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.18, Şekil 4.19).



gma-miR399m	1	-----GGGCUCUCUCUCCUGGCAUG-----
stu-miR399h	1	-----GGGCUACUCUCUAUUGGCAUG-----
cas-miR399b	1	-----GGGCAAGAUACCAUUGGCAGA-----
mtr-miR399s-5p	1	-----GGGUGAGUUCUCCAUUGGCAGG-----
csi-miR399c-5p	1	-----GUGCAGUCCUCCUUUGGCGUG-----
phy-miR399	1	-----GAUGAAGUUCUCAUUGGCACC-----
aof-miR399b	1	-----GUGCAACUCUCCUUUGGCACC-----
aof-miR2930	1	-----CUCUCUUCUCUCGCUCUCCUCU--
osa-miR2930	1	-----UUCUCUUCUCUCGCGCGUGGCC--
csa-miR169	1	-----CUCGAUGGUCAUCCUUGGCUG-----
yfi-miR169	1	-----GCUGACAAGUCAUCCUUGGCUG-----
cca-miR169	1	-----GAUCCUAGUUGUUUUUGGCUAC-----
gma-miR169l-3p	1	-----CGGGCAAUUGUUUUUGGCUAC-----
hvu-miR168-3p	1	-----GAUCCCGCCUUGCACCAGUGAAU
fve-miR168-3p	1	-----CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU
sly-miR168a-3p	1	-----CCUGCCUUGCAUCAACUGAAU
mdm-miR169f	1	-----UGAAGAGAAGAGCGUUGUUUGG-----
lja-miR11168-5p	1	GAACCGUGGCAAUAGAUGACCUCU-----
ost-miR169	1	-----AAGCCAAGGAUGAGGGGUCCC-----
tcc-miR169n	1	-----UGAGUCAAGAAUGACUUGCCG-----
vvi-miR169r	1	-----UGAGUCAAGGAUGACUUGCCG-----
nta-miR169c	1	-----CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA-----
csi-miR169m-5p	1	-----CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG-----
mtr-miR169l-5p	1	-----CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG-----
ghr-miR169b	1	-----CAGCCAAGGAUGAUUUUGCCGG-----
lus-miR169d	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCCA-----
hvu-miR169	1	-----AAGCCAAGGAUGAGUUUGCCUG-----
ptc-miR169o	1	-----AAGCCAAGGAUGACUUGCCUG-----
bna-miR169c	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUA-----
sbi-miR169n	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUA-----
sly-miR169e-5p	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUUU-----
bdi-miR169h-5p	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUA-----
cin-miR169	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG-----
aqc-miR169b	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG-----
fve-miR169b	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCU-----
ppe-miR169f	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUGC-----
stu-miR169e-5p	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCU-----
aof-miR169c	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCU-----
osa-miR169m	1	-----UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG-----
phy-miR168	1	-----AAGAAGACCUGCACCAGCCU-----
rco-miR399f	1	-----UGCCAAAGGAGAUUUUGCUCAC-----
vvi-miR399d	1	-----UGCCAAAGGAGAUUUUGCUCGU-----
bna-miR399a	1	-----UGCCAAAGGAGAUUUUGCCCGG-----
mes-miR399d	1	-----UGCCAAAGGAGAUUUUGCCCGG-----
ptc-miR399b	1	-----UGCCAAAGGAGAUUUUGCCCGG-----
ssl-miR399	1	-----UGCCAAAGGAGAAUUUGCCCGG-----
aly-miR399g-3p	1	-----UGCCAAAGGAGAUUUUGCCCGG-----

Şekil 4.18. Tüm miRNA ailelerinin hizalama sonucu 1.

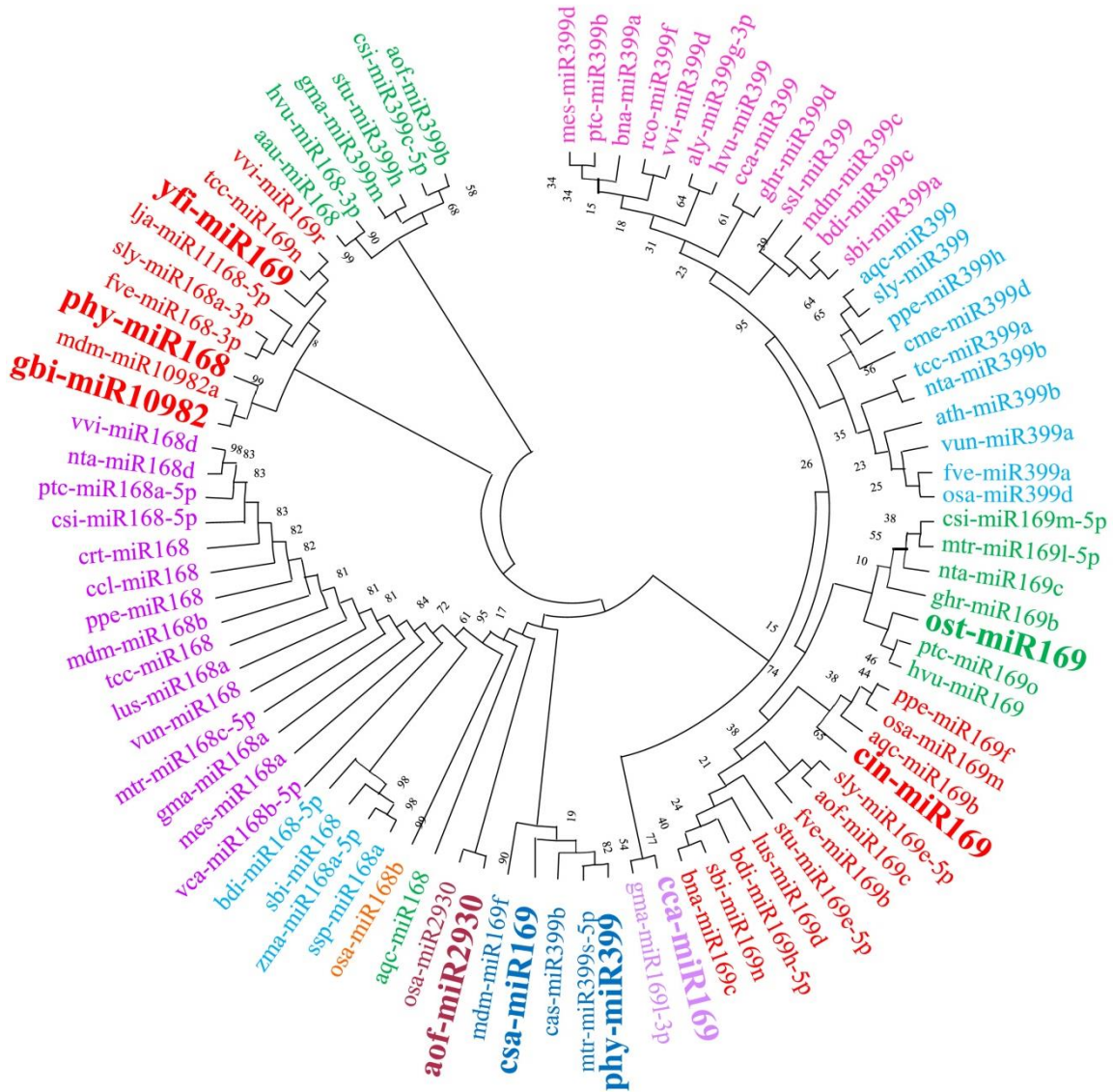
```

hvu-miR399      1 -----UGCCAAAGGAGAUUUGCCCCG-----
nta-miR399b    1 -----CGCCAAAGGAGAGCUGCCCU-----
ppe-miR399h    1 -----UGCCAAAGAAGAGUUUGCCCU-----
aqc-miR399     1 -----UGCCAAAGGAGAGUUUGCCCU-----
sly-miR399     1 -----UGCCAAAGGAGAGUUUGCCCU-----
tcc-miR399a    1 -----CGCCAAAGGAGAGUUUGCCCU-----
cme-miR399d    1 -----UGCCAAAGGAGAGUUUGCCCU-----
cca-miR399     1 -----UGCCAAAGGAGAUUUGCCCCG-----
ghr-miR399d    1 -----UGCCAAAGGAGAUUUGCCCU-----
ath-miR399b    1 -----UGCCAAAGGAGAGUUUGCCCU-----
vun-miR399a    1 -----UGCCAAAGGAGAGUUUGCCCU-----
fve-miR399a    1 -----UGCCAAAGGAGAGUUUGCCCU-----
osa-miR399d    1 -----UGCCAAAGGAGAGUUUGCCCU-----
mdm-miR399c    1 -----UGCCAAAGGAGAAUUGCCCU-----
bdi-miR399c    1 -----UGCCAAAGGAGAAUUGCCCU-----
sbi-miR399a    1 -----UGCCAAAGGAGAAUUGCCCU-----
gbi-miR10982  1 -----GGGGUGGAAGCUUACGAGAAUC-----
mdm-miR10982a  1 -----CGGAAUGAAGCUUACGAGAAUG-----
aau-miR168     1 -----AUUCAGUUGAUGCAAGGCGGGGAUC-----
aqc-miR168     1 -----UGGCUUAGUGCAGCUCGGGGA-----
osa-miR168b    1 -----AGGCUUGGUGCAGCUCGGGGA-----
vca-miR168b-5p 1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
mes-miR168a    1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
gma-miR168a    1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
mtr-miR168c-5p 1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
vun-miR168     1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
lus-miR168a    1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
tcc-miR168     1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
mdm-miR168b    1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
ppe-miR168     1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
ccl-miR168     1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
crt-miR168     1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
csi-miR168-5p  1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
ptc-miR168a-5p 1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
nta-miR168d    1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
vvi-miR168     1 -----UCGCUUGGUGCAGGUCGGGGA-----
bdi-miR168-5p  1 -----UCGCUUGGUGCAGAUCGGGAC-----
sbi-miR168     1 -----UCGCUUGGUGCAGAUCGGGAC-----
ssp-miR168a    1 -----UCGCUUGGUGCAGAUCGGGAC-----
zma-miR168a-5p 1 -----UCGCUUGGUGCAGAUCGGGAC-----

```

Şekil 4.19. Tüm miRNA ailelerinin hizalama sonucu 2.

Çalışmada, 8 farklı süs bitkisinde tanımlanan 5 farklı miRNA ailesine (toplamda 9 miRNA) ve miRBase veri tabanından alınan 78 referans diziyeye ait toplamda 1,846 nt dizisi analiz edilerek filogenetik ağaç çizildi. Bu ağaçta, dizilerin 3 farklı grup oluşturduğu görüldü (Şekil 4.20). Her bir miRNA dizisinin diğer bitkilerde bulunan homolog diziler ile aynı dalda olduğu görüldü. Bununla birlikte yfi-miR169, phy-miR168 ve gbi-miR10982 dizilerinin aynı dalda olduğu belirlendi. Ayrıca csa-miR169 ve phy-miR399 dizilerinin de aynı grupta olduğu belirlendi. 'Bootstrap' yüzdeleri, dallanma noktalarında gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Tüm miRNA ailelerinin filogenetik analiz sonuçları.

4.4. miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi

Süs bitkilerinde miRNA dizilerinin tanımlanması, ikincil yapıların oluşturulması, miRNA dizileri arasında evrimsel ilişkilerin hizalama ve filogenetik ağaç çizilerek incelenmesinden sonra hedef genlerin belirlenmesi aşamasına geçildi. Bu amaçla, tanımlanan miR168, miR169, miR399, miR2930 ve miR10982 dizilerinin tanımlandıkları süs bitkilerindeki hedef genleri bulundu. Hedef genlerin bulunmasından sonra GO analizleri ile hedef genlerin hangi süreçler ile ilişkili olduğu belirlendi. Ayrıca, KEGG analizleri ile de genlerin hangi metabolik yollarda rol oynadıkları belirlendi.

4.4.1. miR168 hedef genlerinin GO ve KEGG analizleri

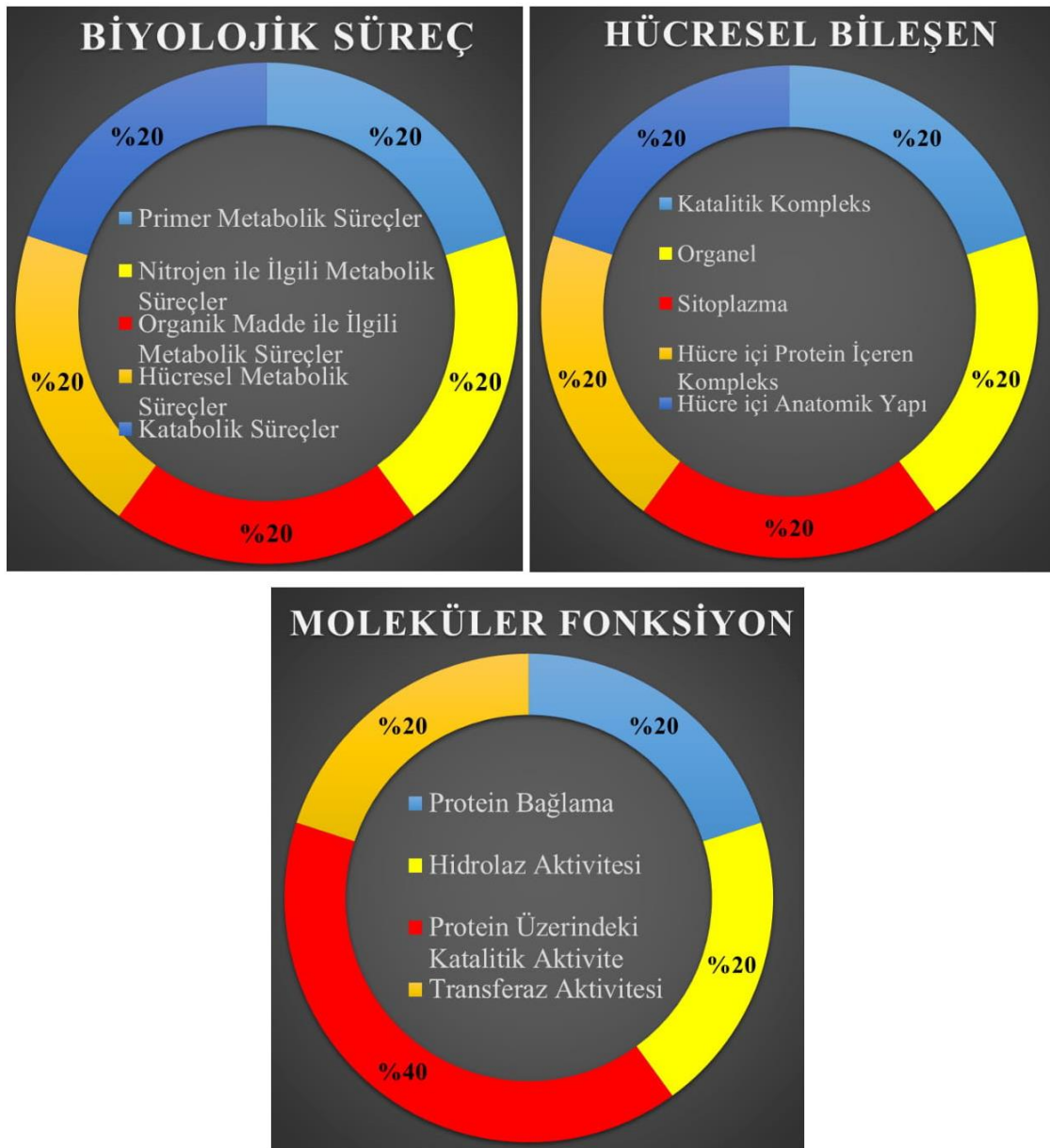
Petunia hybrida bitkisinde tanımlanan phy-miR168 dizisinin hedeflerinin belirlenmesi için yapılan analizlerde bu dizinin, 2 hedef geninin olduğu belirlendi. Bu miRNA dizisinin birden fazla mRNA hedefinin olması farklı metabolik yollarda rol oynayan farklı genlerin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. miR168 dizilerinin hedef genleri

miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA-hybrid sonucu						
phy-miR168	<i>Petunia x hybrida</i> CUL1-B mRNA for cullin 1	LC133272.1	target	5' A C AAAGAG AUUUG G 3'					
			miRNA	3' UCCGA AC CG UCCAGAAGA CA A 5'					
phy-miR168	<i>Petunia x hybrida</i> asparaginyl endopeptidase 1 mRNA	MG720071.1	target	5' A GUCAACCAACG A A G 3'					
			miRNA	3' AGGUU UCCGA AC ACGUC AGAAGA C C A 5'					

Hedef genlerin GO analizlerinde miRNA hedef genlerinin; biyolojik süreç, hücre sel bileşen ve moleküler fonksiyon olmak üzere 3 kategoriye ayrıldığı belirlendi (E değeri \leq 0). Biyolojik süreçler içerisinde primer metabolik süreçler (%20), nitrojen ile ilgili metabolik süreçler (%20), organik madde ile ilgili metabolik süreçler (%20), hücre sel metabolik süreçler (%20) ve katabolik süreçlerin (%20) yer aldığı görüldü.

Hedef genlerin hücresel bileşenler ile ilgili fonksiyonları incelendiğinde ise bu genlerin katalitik kompleks (%20), organel (%20), sitoplazma (%20), hücre içi protein içeren kompleks (%20) ve hücre içi anatomik yapı (%20) ile ilgili yapılarda rol oynadıkları belirlendi. Bu genlerin moleküler fonksiyon ile ilgili olan protein bağlama (%20), hidrolaz aktivitesi (%20), protein üzerindeki katalitik aktivite (%40) ve transferaz aktivitesi (%20) olmak üzere 5 farklı sınıfa ayrıldığı da gözlemlendi (Şekil 4.21). GO analizlerinden sonraki aşama olan KEGG analizleri gerçekleştirildi ama hedef genlerin herhangi bir biyolojik yolak ile ilişkili olmadığı görüldü.



Şekil 4.21. miR168 dizisinin hedef genlerinin GO analizleri.

4.4.2. miR169 hedef genlerinin GO ve KEGG analizleri

Castanea sativa (csa-miR169), *Yucca filamentosa* (yfi-miR169), *Opuntia streptacantha* (ost-miR169), *Cichorium intybus* (cin-miR169) ve *Cynara cardunculus* (cca-miR169) bitkilerinde tanımlanan dizilerin, farklı fonksiyonları olan 17 hedef genin düzenlenmesinde rol oynadıkları belirlendi (Çizelge 4.4). miR168 dizisinde olduğu gibi miR169 dizilerinde de bir miRNA dizisinin birden fazla mRNA dizisinin düzenlenmesi ile ilişkili olduğu görüldü.

Çizelge 4.4. miR169 dizilerinin hedef genleri.

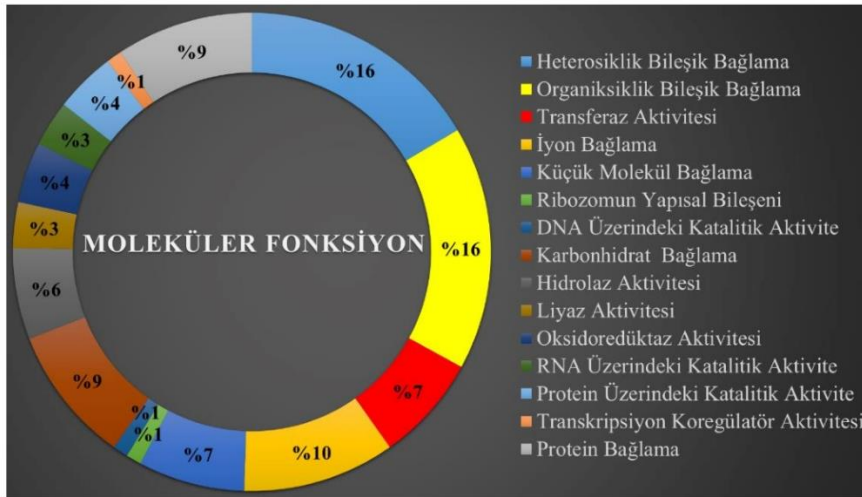
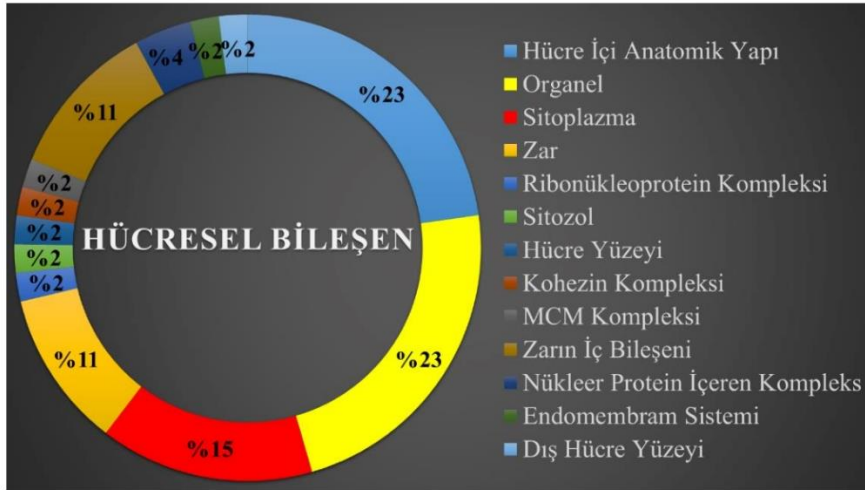
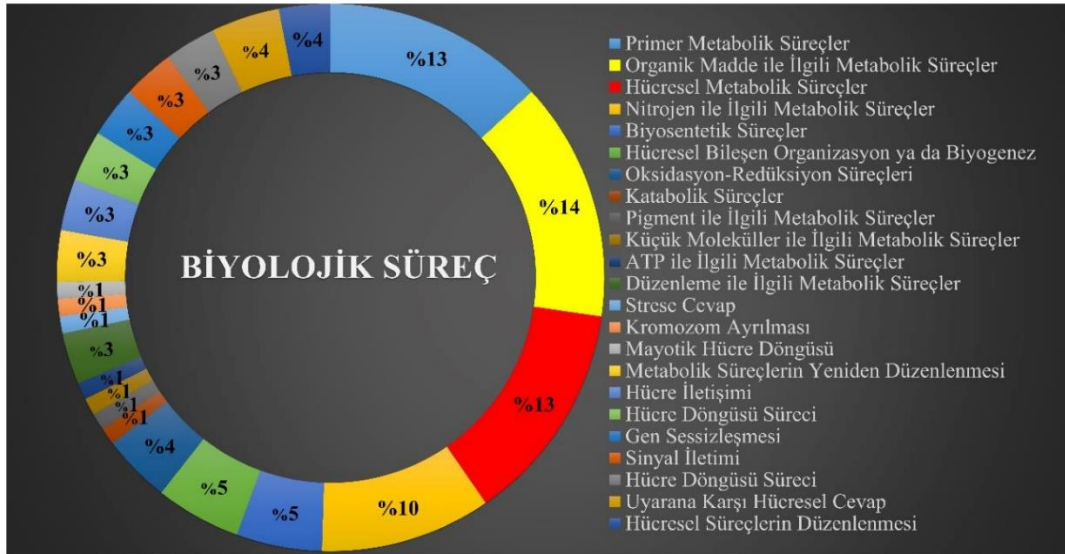
miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA-hybrid sonucu				
csa-miR169	<i>Castanea sativa</i> pseudo-response regulator 5 (PRR5) mRNA	EF694005.1	target 5' A GGCUGAGGGUG UCGGUUCUAC	UU G GCU AUUGAG UGG UAGCUC	G 3'		
	<i>Castanea sativa</i> argonaute 4 mRNA	MF476163.1	target 5' U U CA CAGC CAAGG GUCG GUUCC	GUGGCCAUUGA UACUGGUAGCU	U 3'		
yfi-miR169	<i>Yucca filamentosa</i> tetratricopeptide repeat-like superfamily protein	KM397907.1	target 5' G G A CAGUU AAG GAUGG GUCGG UUC CUACU	AGAA UUGUUAGU AACAGUCG	G 3'		
	<i>Yucca filamentosa</i> AT1G65230-like protein	KM400186.1	target 5' G CGGCCA GUCGGU	AGUAACUGAACACG AGGA UCCU	GUCAUGG GAUUUGUC GC CUGAACAG CG	U A 3' U 5'	
	<i>Yucca filamentosa</i> rhomboid protein Yucsm811	KM823863.1	target 5' A GGCUA UCGGU	CAGUAAGCGAU GGGA UCCU	GGC UGACUU ACUGAA	UGACAUGUUUG GUUAGC CAGUCG	G 3' 5'
	<i>Yucca filamentosa</i> FMN-linked oxidoreductases superfamily protein	KM399261.1	target 5' U CAGCCA GUCGGU	UGAUUU C GGAUG AUUU CCUAC UGAA	CUUUCUCAGAA C G CAGC C GUCG	U 3' A 5'	
	<i>Yucca filamentosa</i> mini chromosome maintenance 5 protein	KM397637.1	target 5' A CAGU GUCG	ACUCAACU CAAGGA GUUCCU	CAUC U UG ACUUG CAGC AC UGAAC GUCG	A 3' A 5'	
	<i>Yucca filamentosa</i> structural chromosomes	KM397469.1	target 5' C CAGCU GUCGG	CC GAGGA UUCCU	GCGCAGCUCAAG GACUUG CUGAAC	AU C G 3' UUA GC AGU CG	5'

(devam) Çizelge 4.4. miR169 dizilerinin hedef genleri.

miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA-hybrid sonucu			
yfi-miR169	<i>Yucca filamentosa</i> RNA polymerase II	KM399102.1	target 5' U A U GG CCA GG UGAU UC GGU CC ACUG	GAGGCGCCGC UGUCAGC ACAGUCG	A 3'	5'
			miRNA 3' G U U A			
yfi-miR169	<i>Yucca filamentosa</i> carbohydrate-binding-like fold protein	KM399316.1	target 5' A UAGUCAAGGAU GUCGGUUCUA	AUUACAA A ACUUG UCAG UGAAC AGUC	G 3'	5'
			miRNA 3' C			
ost-miR169	<i>Opuntia dillenii</i> AT1G30090- galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	KY534479.1	target 5' U A G GGGAUUC U AUCCUUGGU CCCUGGGG A UAGGAACCGA		A 3'	5'
			miRNA 3' G			
ost-miR169	<i>Opuntia dillenii</i> AT1G18270 - ketose-bisphosphate aldolase class-II family protein	KY531992.1	target 5' C G GGGA CCCUA CCCU GGGAGU	AACAUGGAGGUAU U UCC UUGGUU AGG AACCGA	G 3'	5'
			miRNA 3' G			
cin-miR169	<i>Cichorium intybus</i> germacrene A synthase	AF498000.1	target 5' U A G GGGCGAG U GU UCCGUUC A UA	UGGUGAAGAUG CCUUGGCU GGAACCGA	U 3'	5'
			miRNA 3' G G			
cin-miR169	<i>Cichorium intybus</i> - sphingolipid delta(4)-desaturase DES1-like	KY540925.1	target 5' A AAA C AU A 3' CAGG AAG CAUUCUUG GUUA GUCC UUC GUAGGAAC CGAU			5'
			miRNA 3' G A			
cca-miR169	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> 60S ribosomal protein L3-like	XM_025110957 .1	target 5' G G GUGGU AAGGAUGACU CAUCG UUUUUGUUGA	UUCUGAUGAUAAA GGGGU UCCUA	G 3'	5'
			miRNA 3' G			
			target 5' U UU UGGCUGA GCGAU AUCGGUU UGUUG	GGUCUAAGGUUGG AGGAUC UCCUAG	G 3'	5'
			miRNA 3' C UU A			
	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> E3 ubiquitin-protein ligase UPL1-like	XM_025110380 .1	target 5' A UC A A 3' GGCCA GAA AGCUAGGAU UCGGU UUU UUGAUCCUA			5'
			miRNA 3' CA U G			

Belirlenen hedef genlerin GO analizleri (E değeri ≤ 0), BLAST2GO programı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu analizlerde elde edilen biyolojik süreç sınıfında hedef genlerin; primer metabolik süreçler (%13), organik madde ile ilgili metabolik süreçler (%14), hücrel metabolik süreçler (%13), nitrojen ile ilgili metabolik süreçler (%10), biyosentetik süreçler (%5), hücrel bileşen organizasyon ya da biyogenez (%5), oksidasyon-redüksiyon süreçleri (%4), katabolik süreçler (%1), pigment ile ilgili metabolik süreçler (%1), küçük moleküller ile ilgili metabolik süreçler (%1), ATP ile ilgili metabolik süreçler (%1), düzenleme ile ilgili metabolik süreçler (%3), strese cevap (%1), kromozom ayrılması (%1),

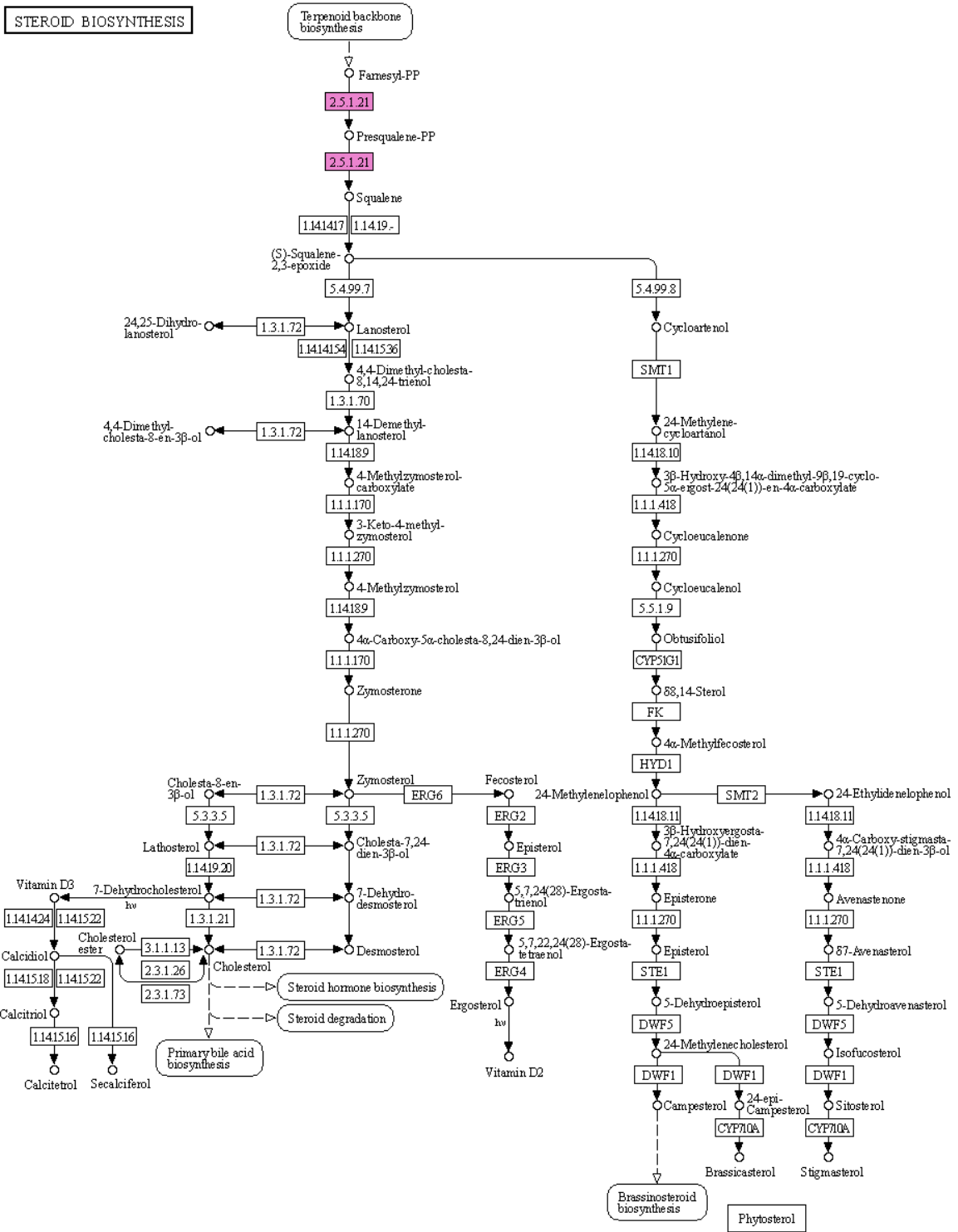
mayotik hücre döngüsü (%1), metabolik süreçlerin yeniden düzenlenmesi (%3), hücre iletişimi (%3), hücre döngüsü süreci (%3), gen sessizleşmesi (%3), sinyal iletimi (%3), hücre döngüsü süreci (%3), uyarana karşı hücresel cevap (%4), hücresel süreçlerin düzenlenmesinde (%3) olmak üzere 23 farklı süreçte yer aldığı belirlendi. Hedef genlerin; hücre içi anatomik yapı (%23), organel (%23), sitoplazma (%15), zar (%11), sitozol (%2), ribonükleoprotein kompleksi (%2), hücre yüzeyi (%2), kohezın kompleksi (%2), MCM kompleksi (%2), zarın iç bileşeni (%11), nükleer protein içeren kompleks (%4), endomembran sistemi (%2), dış hücre yüzeyi (%2) olmak üzere 13 farklı hücresel bileşen ile ilgili olduğu görüldü. Moleküler fonksiyonlar analiz edildiğinde ise hedef genlerin; heterosiklik bileşik bağlama (%16), organiksiklik bileşik bağlama (%16), transferaz aktivitesi (%7), iyon bağlama (%10), küçük molekül bağlama (%7), ribozomun yapısal bileşeni (%1), DNA üzerindeki katalitik aktivite (%1), karbonhidrat bağlama (%9), hidrolaz aktivitesi (%6), liyaz aktivitesi (%3), oksidoredüktaz aktivitesi (%4), RNA üzerindeki katalitik aktivite (%3), protein üzerindeki katalitik aktivite (%4), transkripsiyon koregülatör aktivitesi (%1) ve protein bağlama (%9) olmak üzere 15 farklı işleve sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.22).



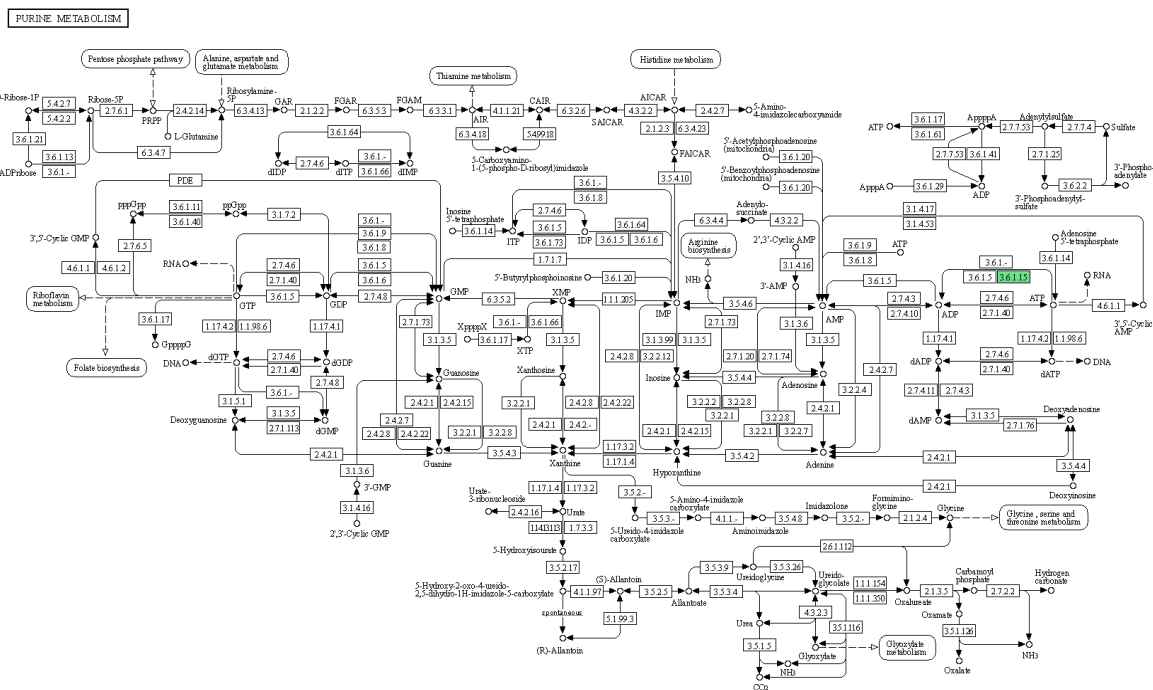
Şekil 4.22. miR169 dizilerinin hedef genlerinin GO analizleri.

GO analizlerinden sonra genler, biyolojik yollarını belirlemek için KEGG veri tabanında BLASTX programı kullanılarak karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlarda EC (Enzyme Commission - Enzim Komisyonu) numaraları belirlendi. Bu enzimlerin; steroid biyosentezi (Şekil 4.23), pürin metabolizması (Şekil 4.24), tiyamin (vitamin B1) metabolizması (Şekil 4.25), terpenoid biyosentezi (Şekil 4.26), karotenoid biyosentezi (Şekil 4.27), PI3K-AKT sinyal yolağı (Şekil 4.28), sesquiterpenoid ve triterpenoid biyosentezi (Şekil 4.29), relaxin sinyal yolağı (Şekil 4.30) ve termogenez (Şekil 4.31) olmak üzere 9 farklı yolda rol oynadığı görüldü.

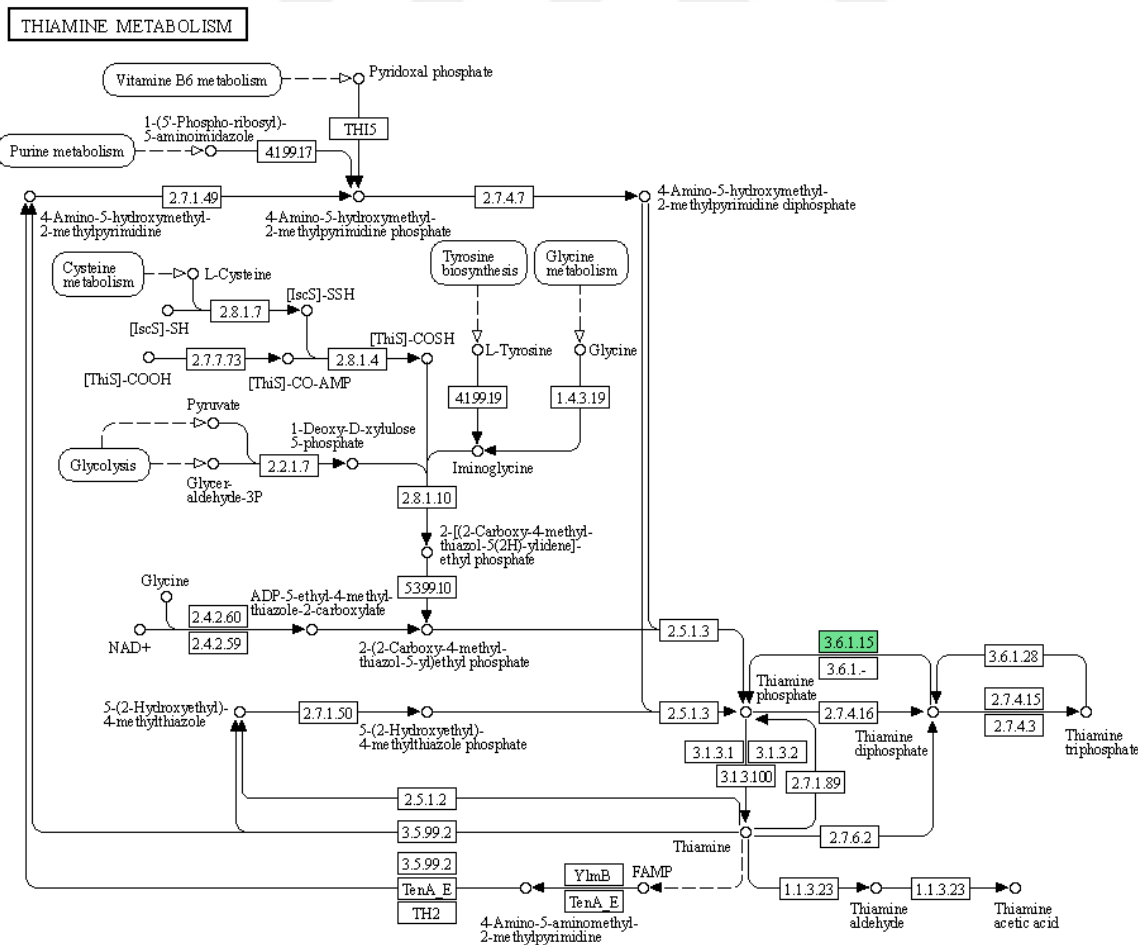




Şekil 4.23. Steroid biyosentezi.

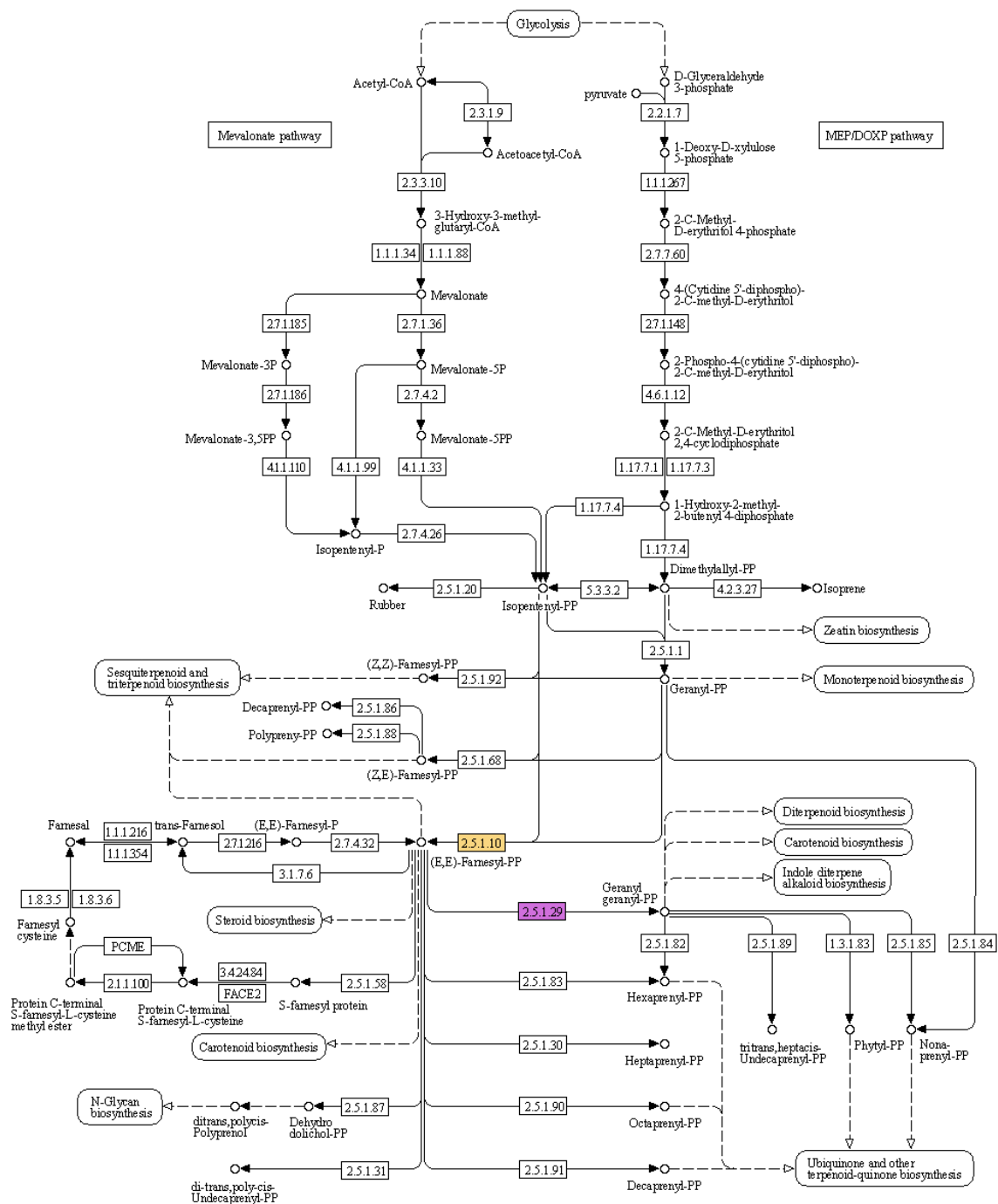


Şekil 4.24. Pürin metabolizması.

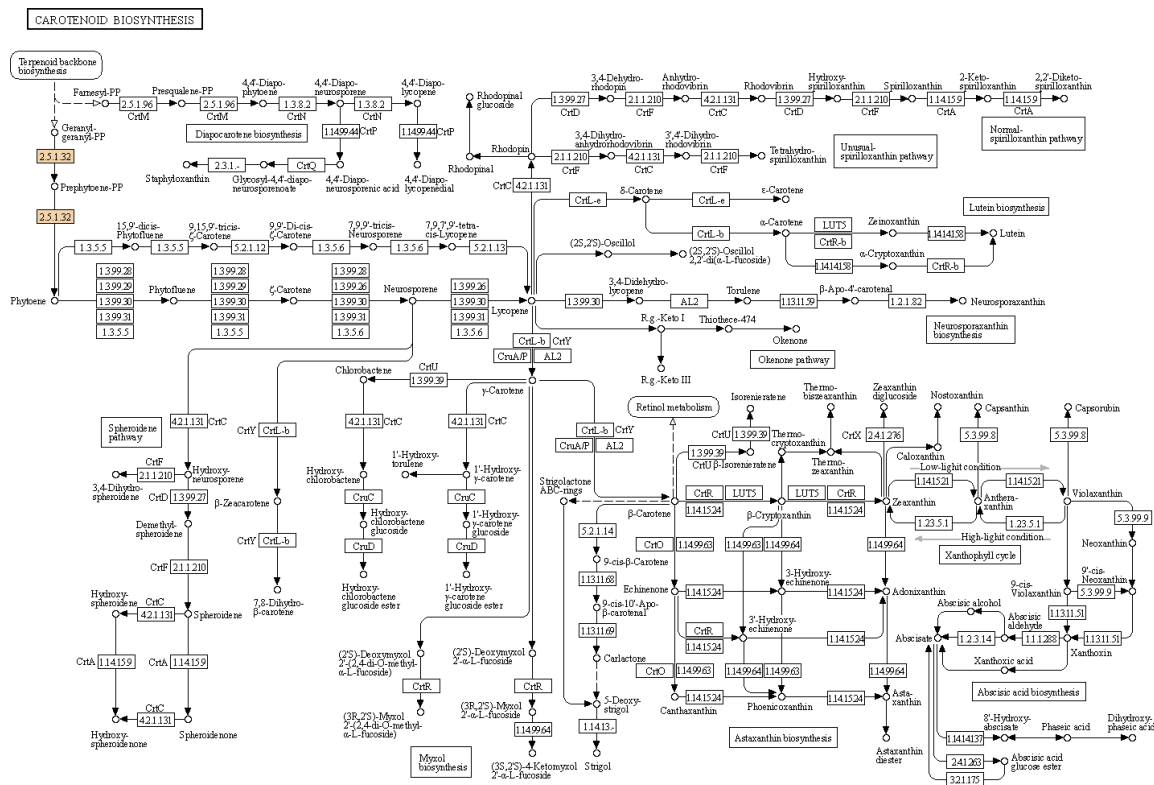


Şekil 4.25. Tiyamin (Vitamin B1) metabolizması.

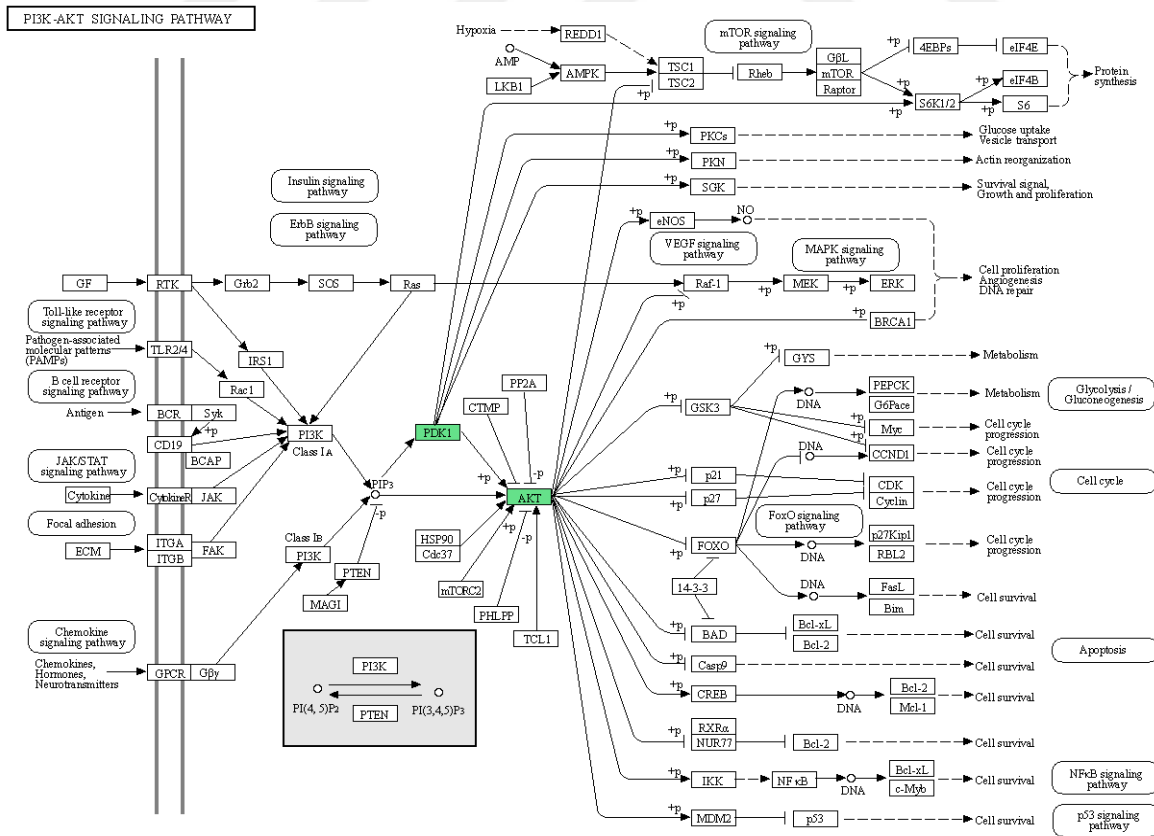
TERPENOID BACKBONE BIOSYNTHESIS



Şekil 4.26. Terpenoid biyosentezi.

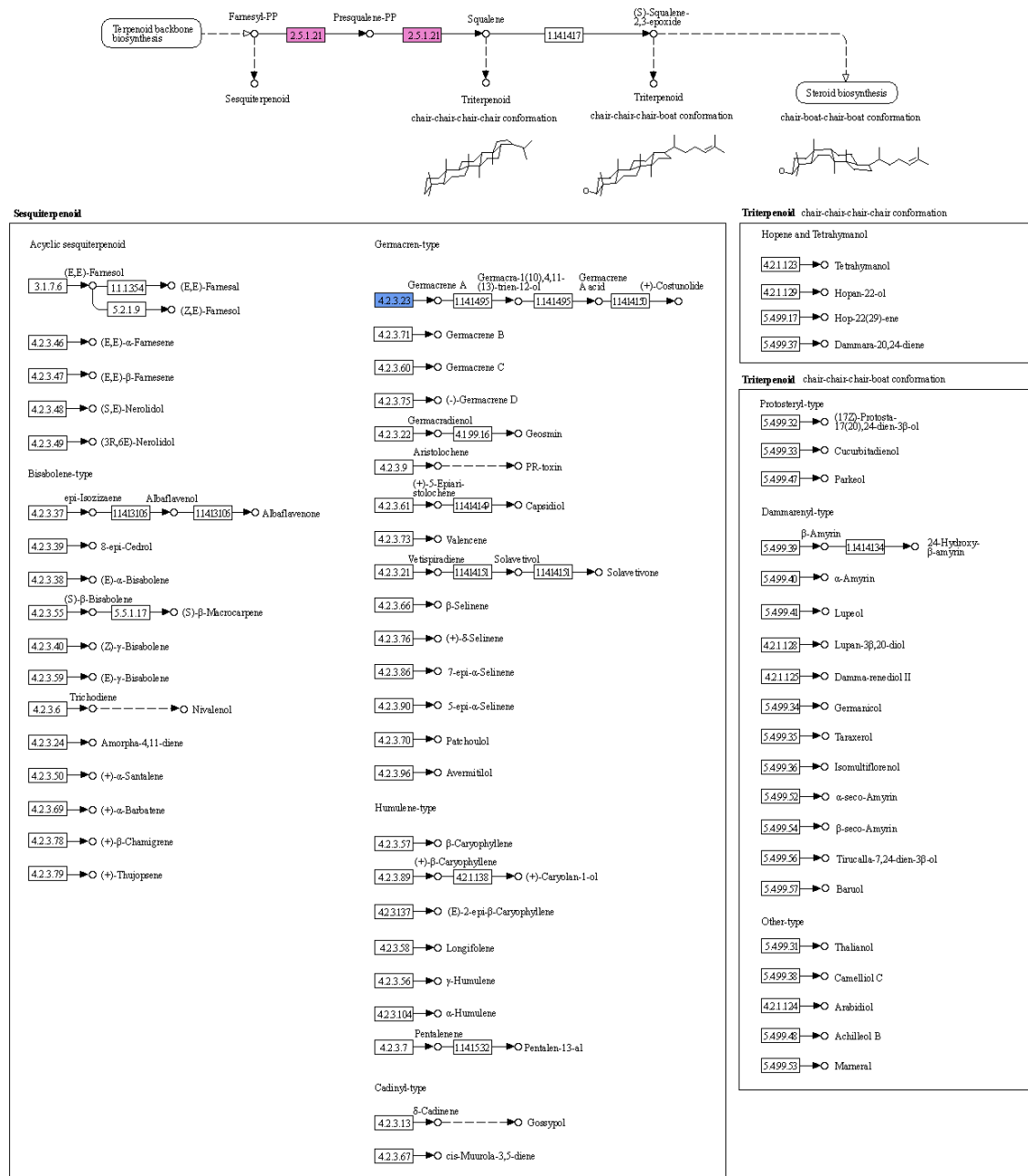


Şekil 4.27. Karotenoid biyosentezi.

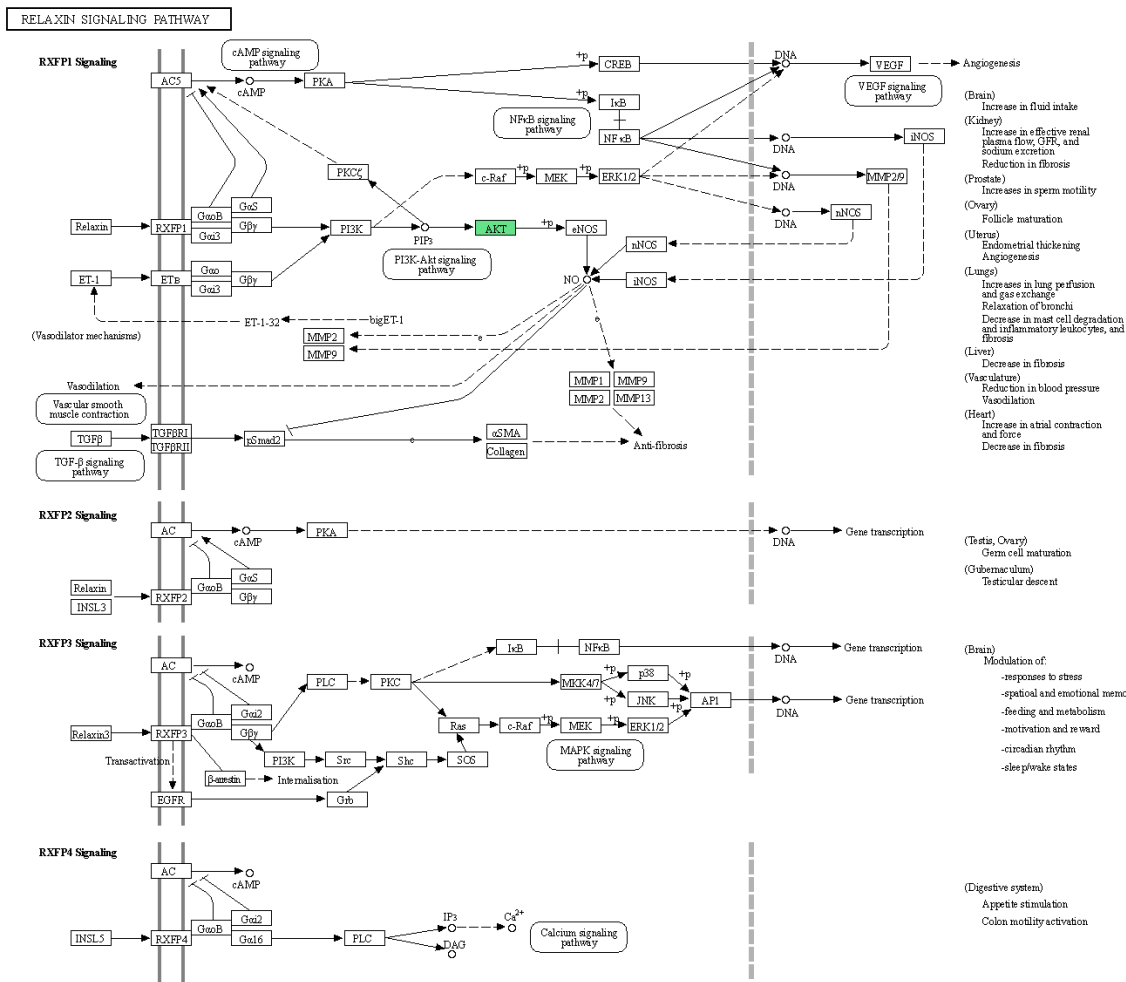


Şekil 4.28. PI3K-AKT sinyal yolağı.

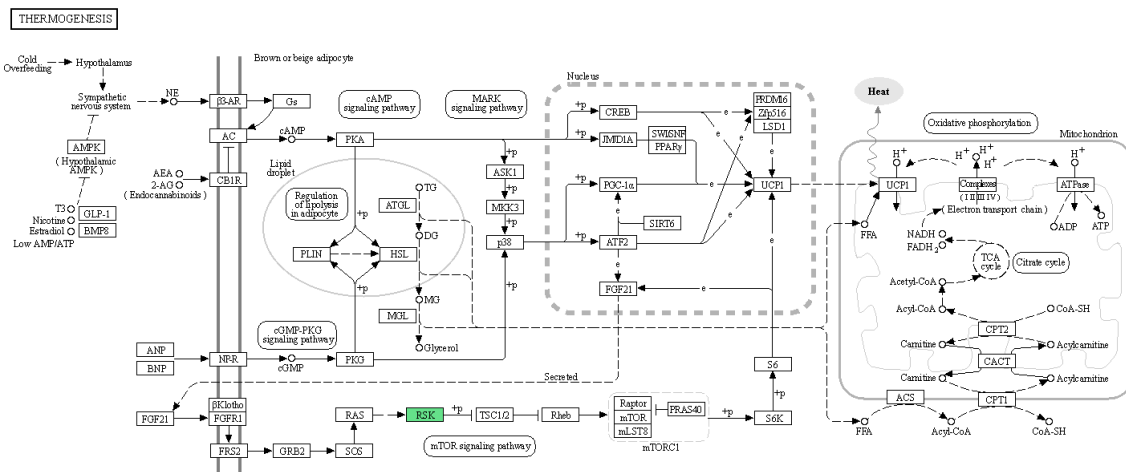
SESQUITERPENOID AND TRITERPENOID BIOSYNTHESIS



Şekil 4.29. Sesquiterpenoid ve triterpenoid biyosentezi.



Şekil 4.30. Relaxin sinyal yolağı.



Şekil 4.31. Termogenez.

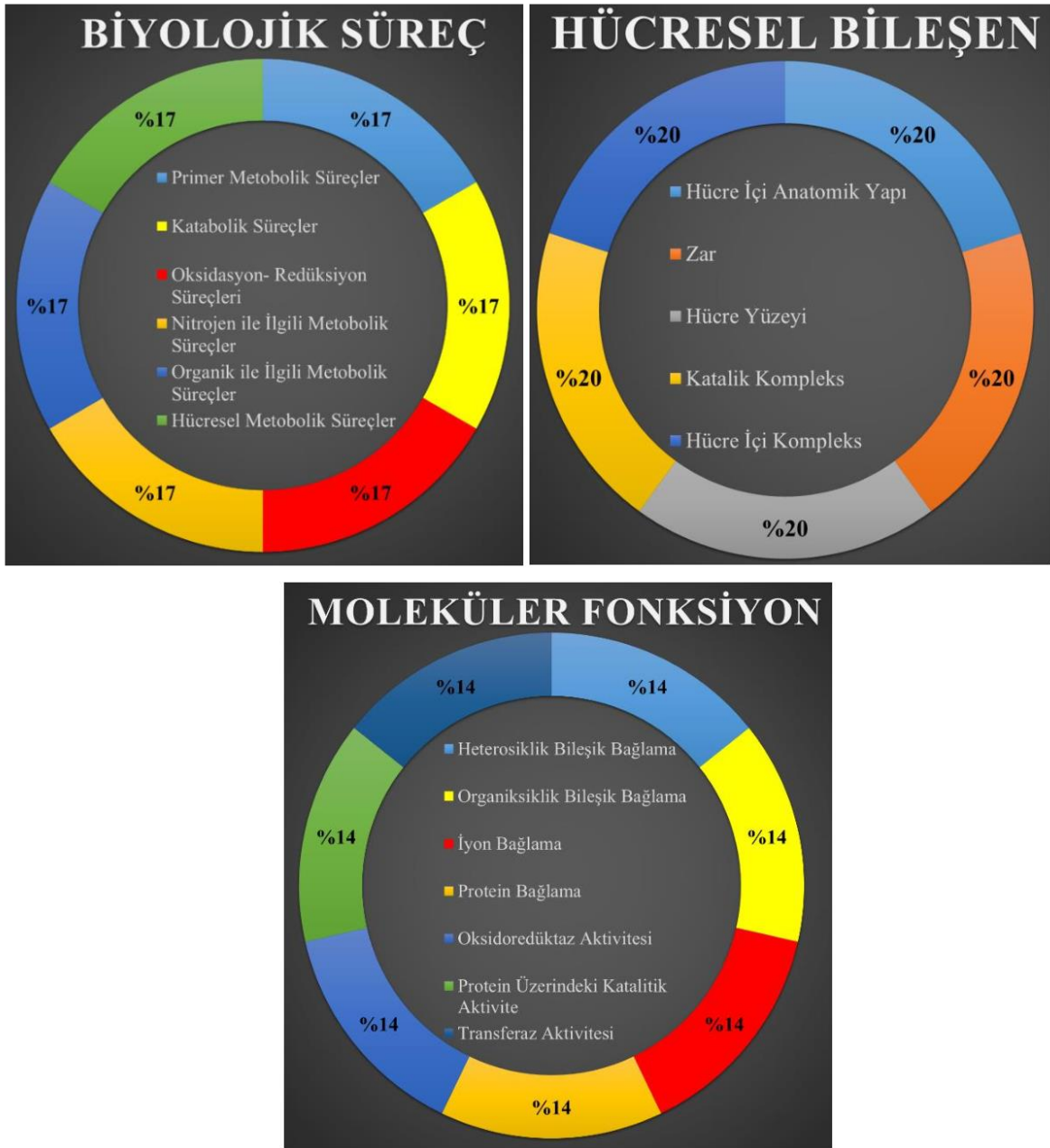
4.4.3. miR399 hedef genlerinin GO ve KEGG analizleri

Süs bitkileri içinde miR168 dizisinde olduğu gibi mir-399 dizisi de sadece *Petunia hybrida* (phy-miR399) bitkisinde tanımlandı. Bununla birlikte her iki miRNA dizisinin ortak bir hedefi de olduğu belirlendi (LC133272.1). miR399 dizisine özgü iki hedef gen, Çizelge 4.5’de gösterildi.

Çizelge 4.5. miR399 dizilerinin hedef genleri.

miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA-hybrid sonucu						
phy-miR399	<i>Petunia x hybrida</i> cultivar Fantasy Red cytochrome P450 77B1 (cyp77B1) mRNA	KM055426.1	target	5' G	AAA	CGCCAUUC	CGG	G 3'	
			miRNA	3' CCACG	AAUGG	GGGGC	UCGUC		
					UUACC	UCUUG	AGUAG		
				3' G	G		A	5'	
phy-miR399	<i>Petunia x hybrida</i> CUL1-B mRNA for cullin 1	LC133272.1	target	5' A	A	CCAUGAAAG	UAUC	A 3'	
			miRNA	3' C	AGA	GCU	UUAUC		
				CACGGUUAC	UCU	UGA	AGUAG		
				3' C	C			5'	

Hedef genlerin GO analizlerinde; genlerin; biyolojik süreçlerden primer metabolik süreçler (%17), katabolik süreçler (%17), oksidasyon- redüksiyon süreçleri (%17), nitrojen ile ilgili metabolik süreçler (%17), organik ile ilgili metabolik süreçler (%17) ve hücrel metabolik süreçler (%17) ile ilişkili olduğu görüldü. Hücrel bileşenler sınıfında ise genlerin; hücre içi anatomik yapı (%20), zar (%20), hücre yüzeyi (%20), katalik kompleks (%20) ve hücre içi kompleks (%20) yapılarının oluşmasında rol oynadığı belirlendi. Ayrıca heterosiklik bileşik bağlama (%14), organiksiklik bileşik bağlama (%14), iyon bağlama (%14), protein bağlama (%14), oksidoredüktaz aktivitesi (%14), protein üzerindeki katalitik aktivite (%14) ve transferaz aktivitesi (%14) olmak üzere 7 farklı moleküler fonksiyonda da görev aldığı gözlemlendi (Şekil 4.32). GO analizlerinden sonraki aşama olan KEGG analizleri gerçekleştirildi ama hedef genlerin herhangi bir biyolojik yolak ile ilişkili olmadığı görüldü.



Şekil 4.32. miR399 dizilerinin hedef genlerinin GO analizleri.

4.4.4. miR2930 hedef genlerinin GO ve KEGG analizleri

Süs bitkileri içinde miR2930 dizisi sadece *Asparagus officinalis* (aof-miR2930) bitkisinde tanımlandı. Çizelge 4.6, aof-miR2930 dizisinin hedeflediği 41 geni göstermektedir.

Çizelge 4.6. miR2930 dizilerinin hedef genleri.

miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA-hybrid sonucu				
aof-miR2930	<i>Asparagus officinalis</i> rac-like GTP-binding protein RAC2	XM_020396 445.1	target 5' A AGAGGAGAG UCUCCUCUC	AGA G GAGAGA AGAGAG CUCUCU UCUCUC	A 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> myosin-6-like (LOC109850692), transcript variant X2	XM_020420 757.1	target 5' G GGAGGAGAG UCUCCUCUC	AGAAA GAGAGGAGAG G CUCUCUUCUC C	U A 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> protein ECERIFERUM 3-like	XM_020414 293.1	target 5' G A AGAG GAGAG UCUC CUCUC	AGA GAGAGAGGAGAG CUCUCUUCUCUC	A 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> protein TIC 40, chloroplastic-like	XM_02039 0187.1	target 5' C GAGGAG CUCCUC	UUGGG A GC GGCGGGA AAG AGAG UCGCUCU UUC UCUC	A 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> transcription factor Pur-alpha 1-like	XM_02038 5713.1	target 5' G A AGAG GAGAGCGAGAG UCUC CUCUCGCUCUC	C GAGAGAG UUCUCUC	U 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> probable disease resistance protein At1g61310	XM_020417 219.1	target 5' G U U AGAGGA G AGUGAGA UCUCCU C UCGCUCU	AAAGUGUGUG GGAGAG G CUUCUC C	U G 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> disease resistance protein At4g27190-like	XM_02041 7216.1	target 5' G U U AGAGGA G AGUGAGA UCUCCU C UCGCUCU	AAAGCGUGUG GGAGAG G CUUCUC C	U G 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> zinc finger CCCH domain-containing protein 45	XM_02041 3547.1	target 5' U GAGGAGAGCGAGA CUCCUCUCGCUCU	GC U GAGGA GAG CUUCU CUC	G 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> poly(A) polymerase I-like	XM_02039 2392.1	target 5' A U U U GG GGA G GUGAGGGA UC CCU C CGCUCUCU	CUUAAUAUU GGGGAG UCUCUC	A 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> rhomboid protein Aspof_RBL15	KM823840 .1	target 5' G AGAGGAGAG UCUCCUCUC	AGA U GAGAGAA GAGA CUCUCUU CUCU	U 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> transcription factor TCP4-like	XM_02041 3053.1	target 5' A AGAGGAGAGCGAGA UCUCCUCUCGCUCU	A U GAGAGAA CUUCUCU	U 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> GPI mannosyltransferase 2 (LOC109833579), transcript variant X2	XM_02040 1298.1	target 5' G GGGGGAGAG UCUCCUCUC	A A A GAGAGAA GAGA CUCUCUU CUCU	A 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> F-box protein At5g39450-like (LOC109837970), transcript variant X2	XM_02040 6367.1	target 5' U GUU AGA UCU	UGAAGAAUAGUUU GGAG CCUC U	U 3'	5'	
	<i>Asparagus officinalis</i> 28S ribosomal protein S9, mitochondrial	XM_020410 124.1	target 5' C AGGGG UCUCC	A G AGAGCGA GAGA UCUCGCU CUCU	UGAUGGAGUU GGAGAG UCUCUC	G 3'	5'

(devam) Çizelge 4.6. miR2930 dizilerinin hedef genleri.

miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA-hybrid sonucu			
aof-miR2930	<i>Asparagus officinalis</i> S-formylglutathione hydrolase-like	XM_0204 12669.1	target 5' G	A	G	A 3'
				AGAGGAGAG	GAGAGA	AGAGAG
			miRNA 3'	UCUCCUCUC	CUCUCU	UCUCUC
				G		5'
	<i>Asparagus officinalis</i> mannan synthase 1-like	XM_0204 19191.1	target 5' A	AGA	GGA	A 3'
				AGAGGAGAG	GAGAGA	AGAGAG
			miRNA 3'	UCUCCUCUC	CUCUCU	UCUCUC
				G		5'
	<i>Asparagus officinalis</i> histidine--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial	XM_0204 19356.1	target 5' C	A	UUUCCGCCGGA	U 3'
				GAGGGGA	CGAGGGA	GGAGA
			miRNA 3' U	CUCCUCU	GCUCUCU	UCUCU
				C		C 5'
<i>Asparagus officinalis</i> early nodulin-like protein 3	XM_0204 21370.1	target 5' U U	UCA	GUUUUAUAAGUU	U 3'	
			G GGGGAGC	GGAGA	GGAGA	
		miRNA 3' U U	C CCUCUCG	UCUCU	UCUCU	
			C		C 5'	
<i>Asparagus officinalis</i> 5'-adenylsulfate reductase-like 4	XM_0203 87603.1	target 5' A	A	AGA	U 3'	
			AGAG	GAGAG	GAGAGAAGAGG	
		miRNA 3'	UCUC	CUCUC	CUCUCUUCUCU	
				G	C 5'	
<i>Asparagus officinalis</i> thylakoid lumenal 16.5 kDa protein, chloroplastic	XM_0203 88574.1	target 5' G	A	UGAAGAA	UA	C 3'
			AG AGG	GGA	GAGAGAAGAGG	
		miRNA 3'	UC UCC	UCU	CUCUCUUCUCU	
				CG	C 5'	
<i>Asparagus officinalis</i> 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1B-like	XM_0203 91211.1	target 5' A	AC	UCAACGAA	UU	A 3'
			GGAGGAGAGU	GGGA	GAAG	AGAG
		miRNA 3'	UCUCCUCUCG	CUCU	CUUC	UCUC
						5'
<i>Asparagus officinalis</i> protein trichome birefringence-like 7	XM_0203 92734.1	target 5' G	UUUU	GC	UAAA	U G 3'
			AGA	GGAGAG	UGAGAGA	AGGG G
		miRNA 3'	UCU	CCUCUC	GCUCUCU	UCUC C
						U 5'
<i>Asparagus officinalis</i> coatomer subunit alpha-1-like	XM_0204 01588.1	target 5' A	AGA	G	G 3'	
			GGGGGAGAG	GAGAGA	AGAGAG	
		miRNA 3'	UCUCCUCUC	CUCUCU	UCUCUC	
				G	5'	
<i>Asparagus officinalis</i> F-box protein At3g56470-like	XM_0204 12595.1	target 5' A	UG		U 3'	
			GGAGGAGAGCGAG	GGAGGAGG		
		miRNA 3'	UCUCCUCUCGCUC	UCUUCUCU		
					C 5'	
<i>Asparagus officinalis</i> protein NSP-INTERACTING KINASE 1-like	XM_0204 19267.1	target 5' G	A	AGA	A 3'	
			AGAG	GAGAG	GAGAGAAGAGA	
		miRNA 3'	UCUC	CUCUC	CUCUCUUCUCU	
				G	C 5'	

(devam) Çizelge 4.6. miR2930 dizilerinin hedef genleri.

miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA-hybrid sonucu
aof-miR2930	<i>Asparagus officinalis</i> heat stress transcription factor A-5	XM_020398 599.1	target 5' G G A G 3' AGAG GAGAG GAGAGAAGAGGG UCUC CUCUC CUCUCUUCUCUC miRNA 3' G 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> protein RFT1 homolog (LOC109839490), transcript variant X9	XM_020407 940.1	target 5' C C A 3' GA GAGAGCGGGAGAAGAGA CU CUCUCGCUCUCUUCUCU miRNA 3' U C C 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> nuclear transcription factor Y subunit C-6	XM_020408 713.1	target 5' G A AA U U 3' AGAGG AGGG AGAGGA GGA UCUCC UCUC UCUCUU CUCU miRNA 3' GC C 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> putative F-box protein At1g65770 (LOC109827110), transcript variant X1	XM_020394 073.1	target 5' A AAAGAAGACAUCC U C U 3' GGAG GAGAGCG GAGAAGAG AG UCUC CUCUCGC CUCUUCUC UC miRNA 3' U 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> calvin cycle protein CP12-3, chloroplastic	XM_020408 663.1	target 5' A C UGA U 3' AGGGGA GCGA GGGAGGAGA UCUCCU UCGCU CUCUUCUCU miRNA 3' C C 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> serine/threonine-protein kinase SAPK3-like	XM_020407 333.1	target 5' G A AGA A 3' AGAG GAGAG GAGAGAAGAGAG UCUC CUCUC CUCUCUUCUCUC miRNA 3' G 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> phosphoenolpyruvate carboxylase 2	XM_020408 324.1	target 5' A GUAAAGAAU U AGUUG A 3' AGAGGA GAG CGAGGGGAGA GAG UCUCCU CUC GCUCUCUUCU CUC miRNA 3' 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> AAA-ATPase At5g57480-like	XM_020409 128.1	target 5' U AGAAGAA A C 3' GGAGGA GAGC AGAGAAGAGGG UCUCCU CUCG UCUCUUCUCUC miRNA 3' C 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> lipid phosphate phosphatase delta-like	XM_020417 210.1	target 5' A A A A 3' AGAG GAGAG GAGAGAAGAGAG UCUC CUCUC CUCUCUUCUCUC miRNA 3' G 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> vesicle-associated membrane protein 711-like	XM_020385 822.1	target 5' G A A 3' AGGG GAGAGUGAGAGAAGAGAG UCUC CUCUCGCUCUCUUCUCUC miRNA 3' 5'
	<i>Asparagus officinalis</i> protein PLASTID MOVEMENT IMPAIRED 1	XM_02038 7069.1	target 5' U AGGGGAGAGCGGG UA A 3' UCUCCUCUCGCUC UCUUCUCU miRNA 3' C 5'

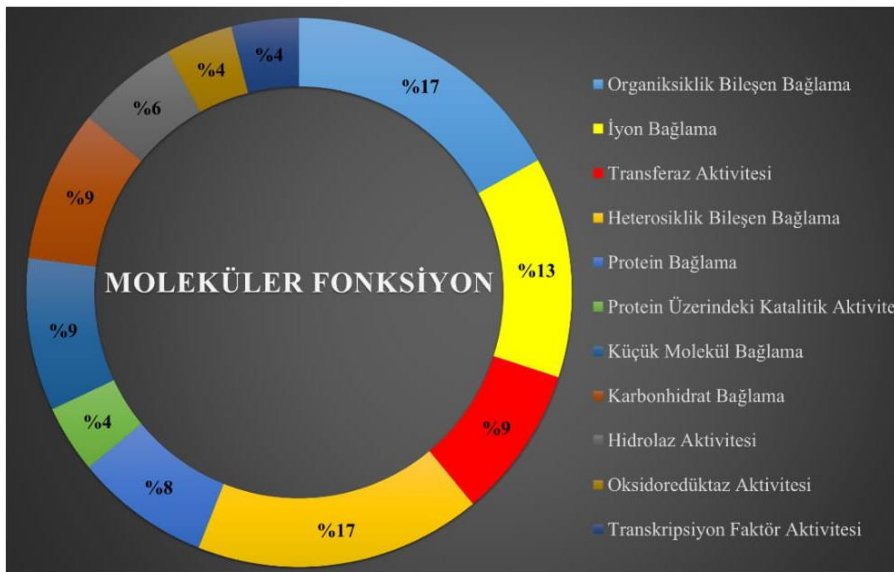
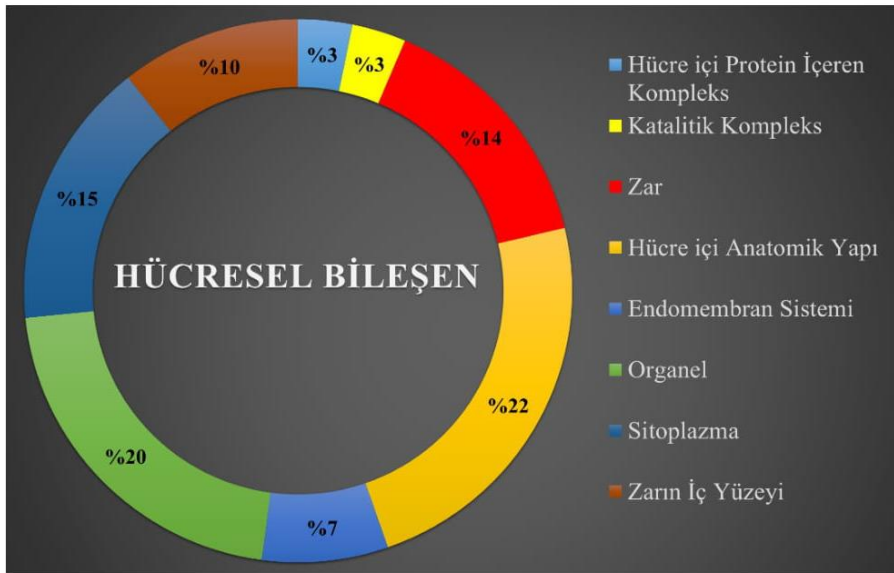
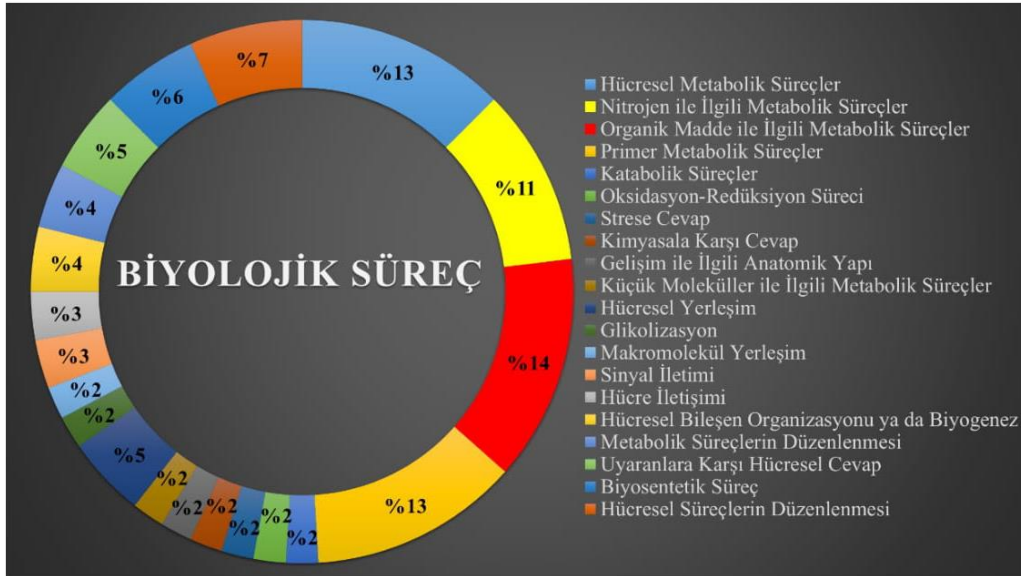
(devam) Çizelge 4.6. miR2930 dizilerinin hedef genleri.

miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA-hybrid sonucu					
aof-miR2930	<i>Asparagus officinalis</i> cell number regulator 13-like (LOC109847658), transcript variant X1	XM_020416888.1	target	5' A	AGAAAGAA	G	A	3'
				GGAGGAGAG	GAGAGA	AGAGAG		
			miRNA	3' UCUCUCUC	CUCUCU	UCUCUC		5'
					G			
	<i>Asparagus officinalis</i> probable serine/threonine protein kinase IREH1	XM_020401571.1	target	5' C	CUG	U	CACC	G 3'
				AGAGG	GGGGC	AGGGGAG	AGAG	
			miRNA	3' UCUCUC	UCUCG	UCUCUUC	UCUC	5'
						C		
	<i>Asparagus officinalis</i> F-box protein At5g67140	XM_020389069.1	target	5' U	GU	CAGUCGAUGGCCGGG	A	3'
				GGAGGAGAGCG	GGAG	GAGAGAG		
			miRNA	3' UCUCUCUCGC	UCUC	UUCUCUC		5'
	<i>Asparagus officinalis</i> putative protein TPRXL (LOC109843289)	XM_020412221.1	target	5' G	GC	C	G	3'
				GGAGGAGAGCGAGG	GAAAG	AGAG		
			miRNA	3' UCUCUCUCGCUCU	CUUC	UCUC		5'
	<i>Asparagus officinalis</i> probable BOI-related E3 ubiquitin-protein ligase 3	XM_020405129.1	target	5' A	A	AAAUA	A	G 3'
				GGAGGAG AG	GAGA	AGGGGAG		
			miRNA	3' UCUCUC UC	CUCU	UUCUCUC		5'
					G	C		

Genlerin; hücrel metabolik süreçler (%13), nitrojen ile ilgili metabolik süreçler (%11), organik madde ile ilgili metabolik süreçler (%14), primer metabolik süreçler (%13), katabolik süreçler (%2), oksidasyon-redüksiyon süreci (%2), strese cevap (%2), kimyasala karşı cevap (%2), gelişim ile ilgili anatomik yapı (%2), küçük moleküller ile ilgili metabolik süreçler (%2), hücrel yerleşim (%5), glikolizasyon (%2), makromolekül yerleşim (%2), sinyal iletimi (%3), hücre iletişimi (%3), hücrel bileşen organizasyonu ya da biyogenez (%4), metabolik süreçlerin düzenlenmesi (%4), uyarılara karşı hücrel cevap (%5), biyosentetik süreç (%6) ve hücrel süreçlerin düzenlenmesi (%7) gibi farklı biyolojik süreçlerde rol oynadıkları görüldü. Bununla birlikte genlerin hücre içi protein içeren kompleks (%3), katalitik kompleks (%3), zar (%14), hücre içi anatomik yapı (%22), endomembran sistemi (%7), organel (%20), sitoplazma (%15) ve zarın iç yüzeyi (%10) olmak üzere 8 farklı hücrel bileşen ile ilişkili olduğu belirlendi.

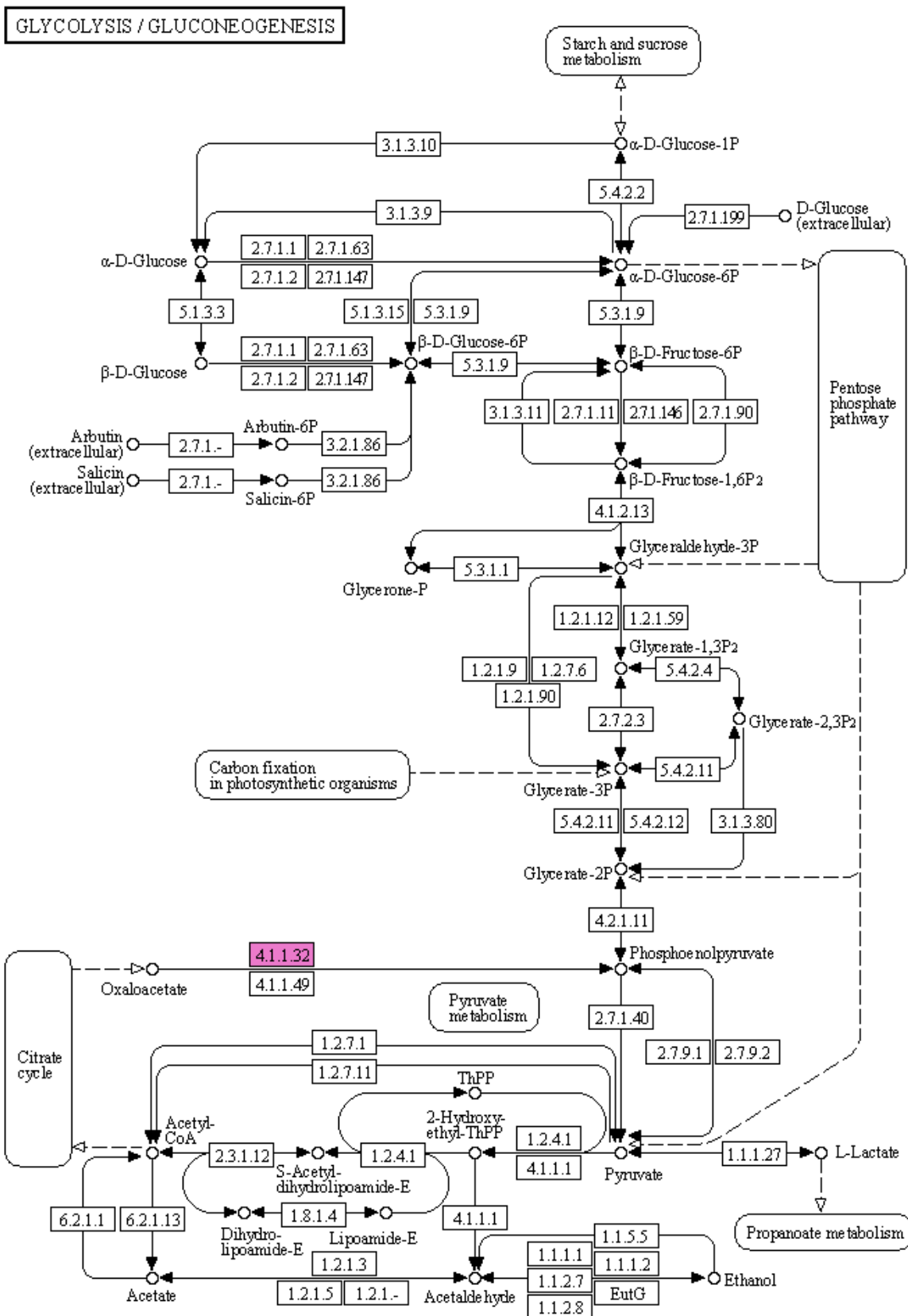
Moleküler fonksiyonların ise organiksiklik bileşen bağlama (%17), iyon bağlama (%13), transferaz aktivitesi (%9), heterosiklik bileşen bağlama (%17), protein bağlama (%8), protein üzerindeki katalitik aktivite (%4), küçük molekül bağlama (%9), karbonhidrat bağlama (%9), hidrolaz aktivitesi (%6), oksidoredüktaz aktivitesi (%4) ve transkripsiyon faktör aktivitesi (%4) olarak sıralandığı gözlemlendi (Şekil 4.33).



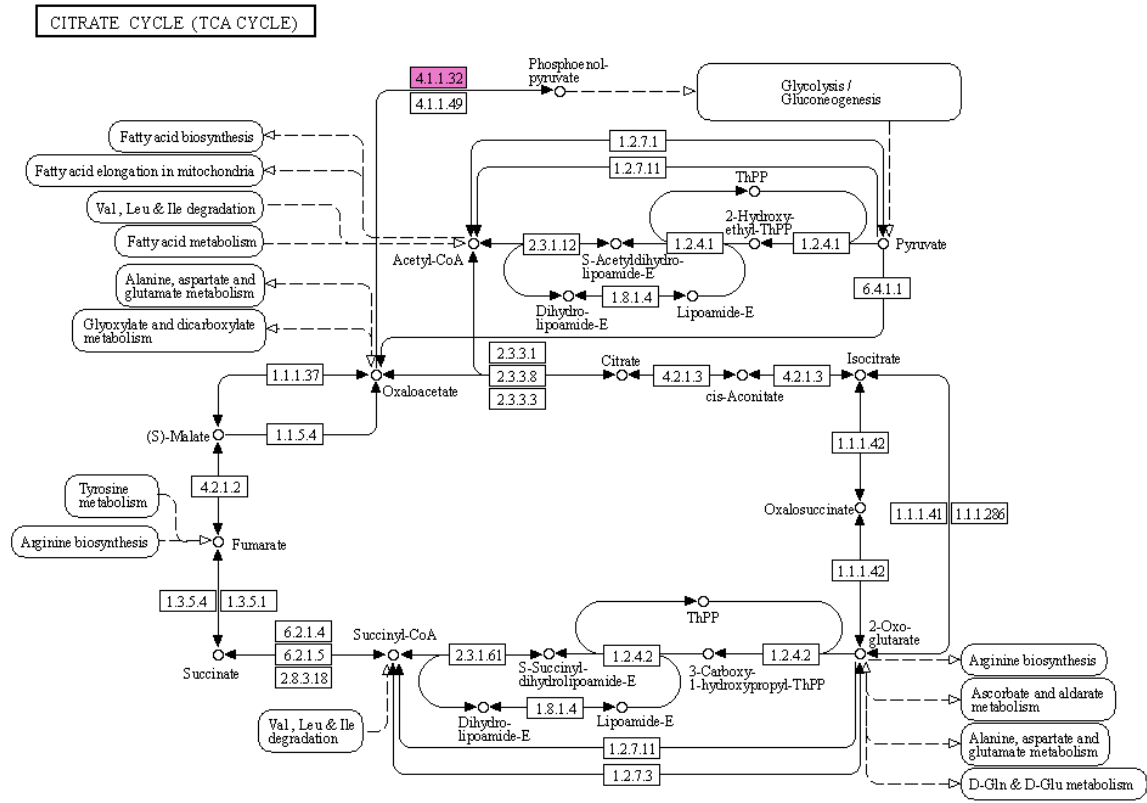


Şekil 4.33. miR2930 dizilerinin hedef genlerinin GO analizleri.

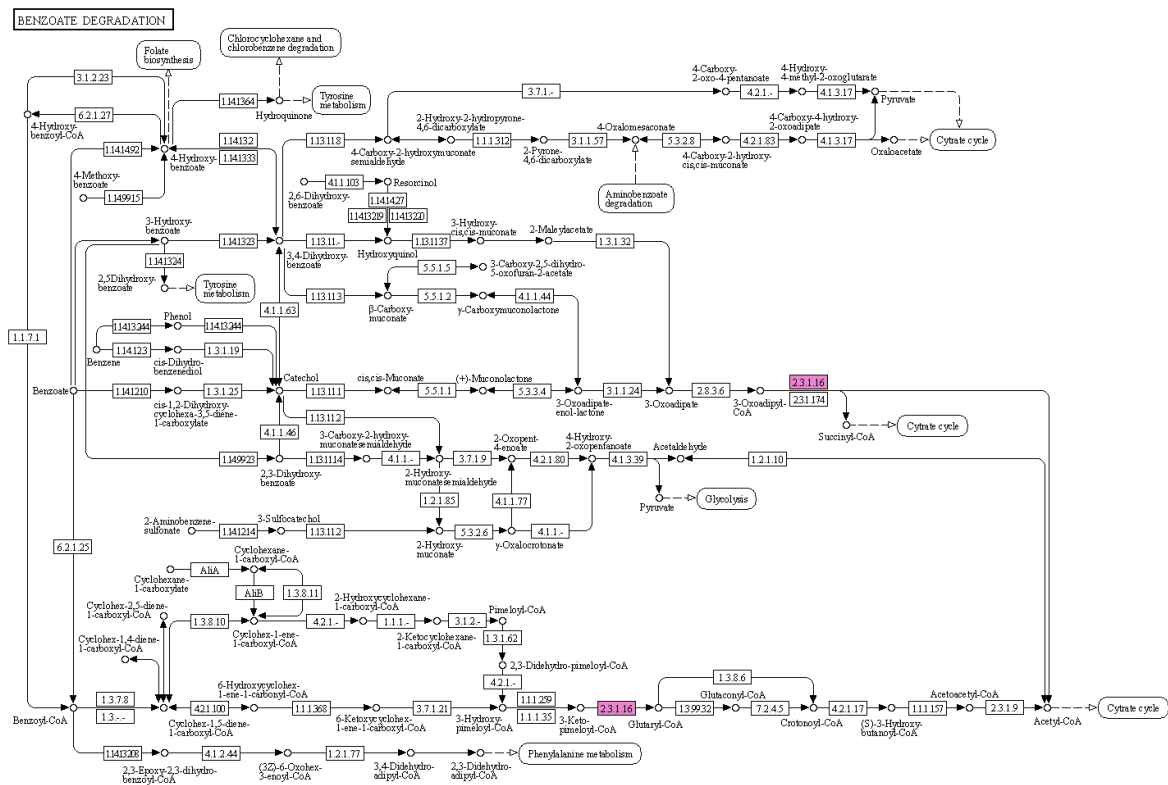
GO analizlerinden sonra gerçekleştirilen KEGG analizleri ile miR2930 hedef genlerinin rol oynadığı metabolik yollar belirlendi. Bu genlerin 17 yolak ile ilişkili olduğu görüldü. Bu yollar; glikoliz/glukoneogenez (Şekil 4.34), sitrat döngüsü (TCA Döngüsü) (Şekil 4.35), benzoat yıkımı (Şekil 4.36), yağ asidi uzaması (Şekil 4.37), yağ asidi yıkımı (Şekil 4.38), fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu (Şekil 4.39), steroid biyosentezi (Şekil 4.40), valin, lösin ve izolösin yıkımı (Şekil 4.41), geraniyol yıkımı (Şekil 4.42), N-glikan biyosentezinin çeşitli yolları (Şekil 4.43), α -linolenic acid (Vitamin F) metabolizması (Şekil 4.44), sfingolipid metabolizması (Şekil 4.45), etilbenzen yıkımı (Şekil 4.46), piruvat metabolizması (Şekil 4.47), metan metabolizması (Şekil 4.48), aminoaçil tRNA biyosentezi (Şekil 4.49) ve doymamış yağ asitlerinin biyosentezi (Şekil 4.50) olarak sayılabilir.



Şekil 4.34. Glikoliz/Glukoneogenez

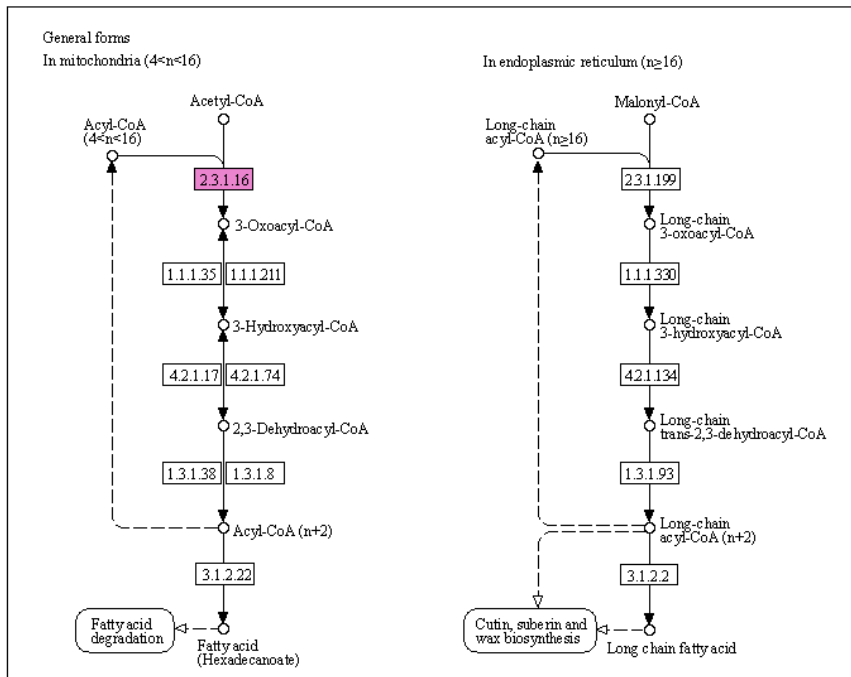
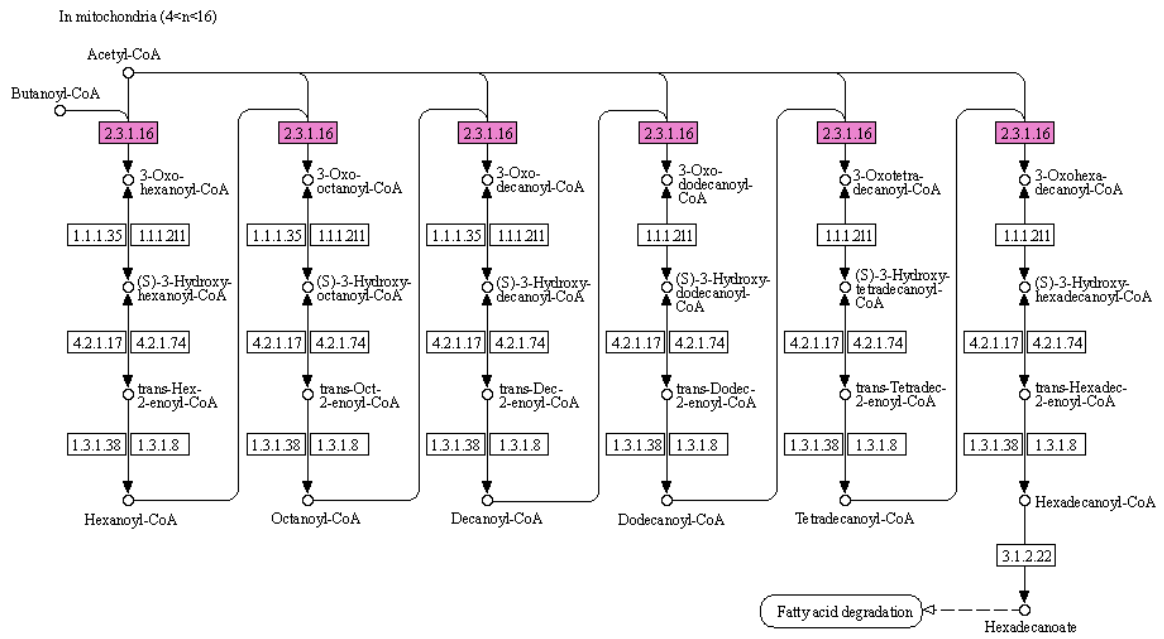


Şekil 4.35. Sitrat döngüsü (TCA Döngüsü).



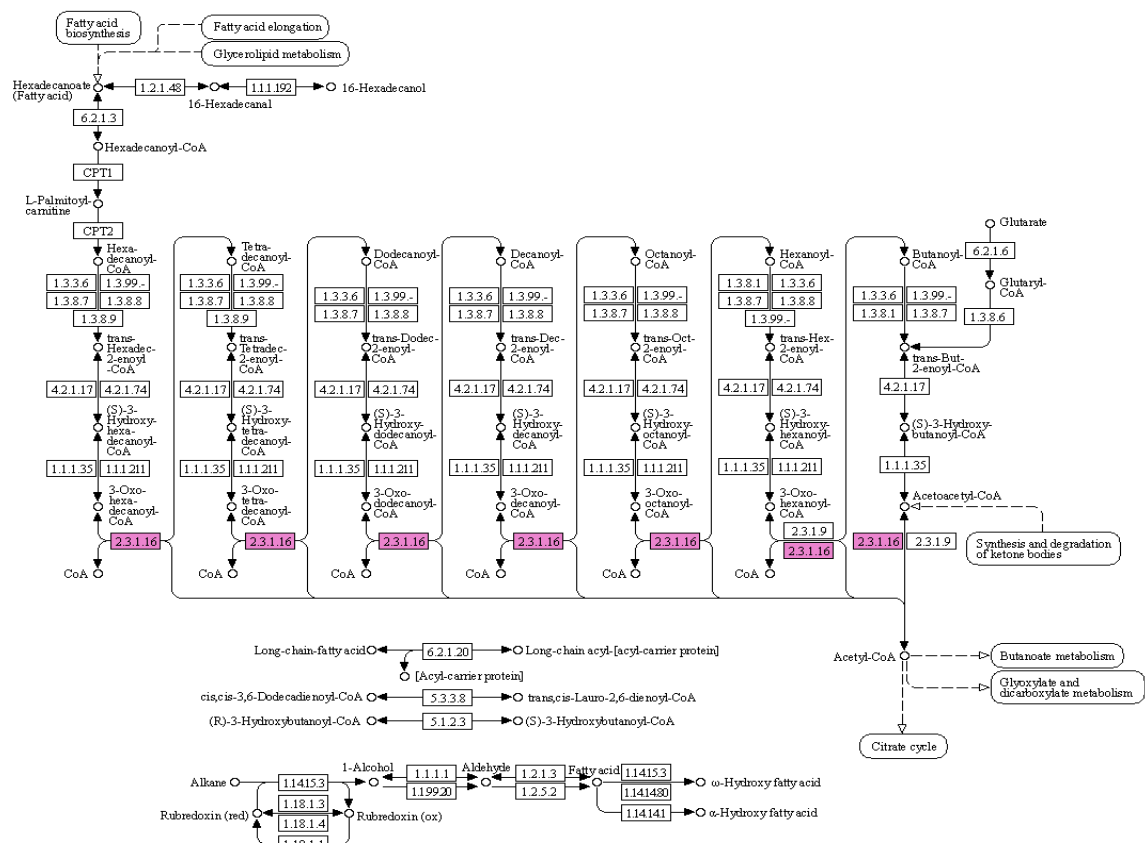
Şekil 4.36. Benzoat yıkımı.

FATTY ACID ELONGATION



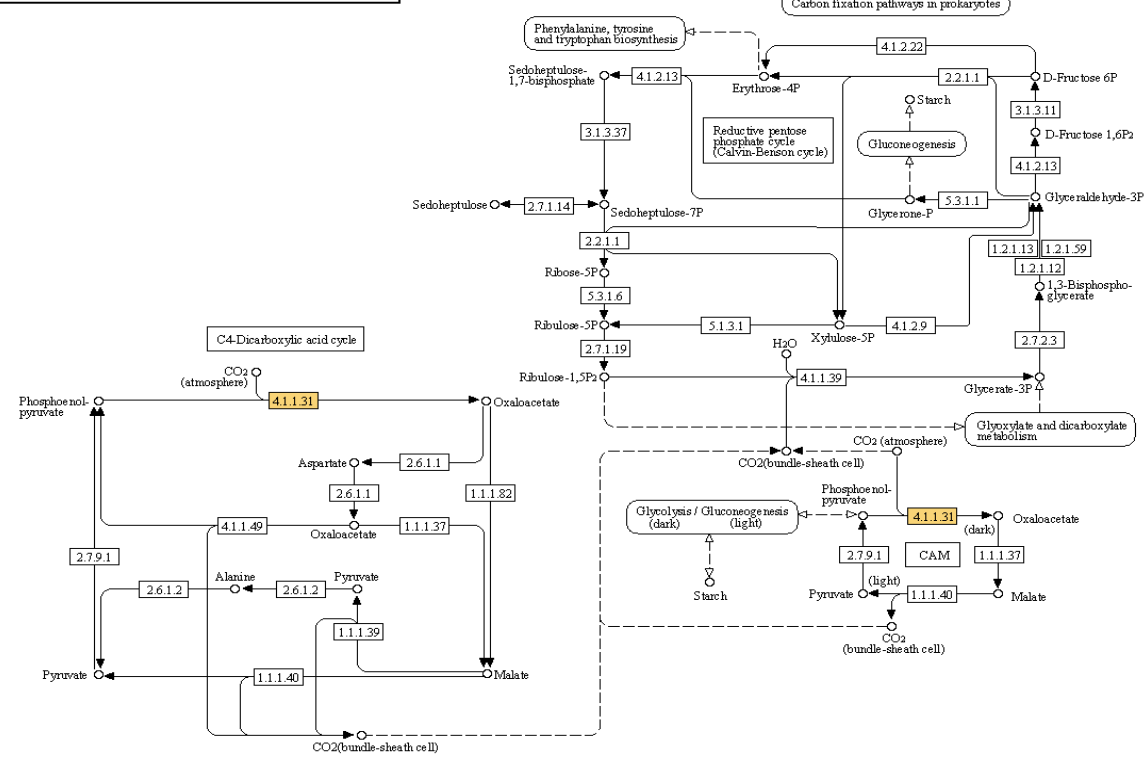
Şekil 4.37. Yağ asidi uzaması.

FATTY ACID DEGRADATION



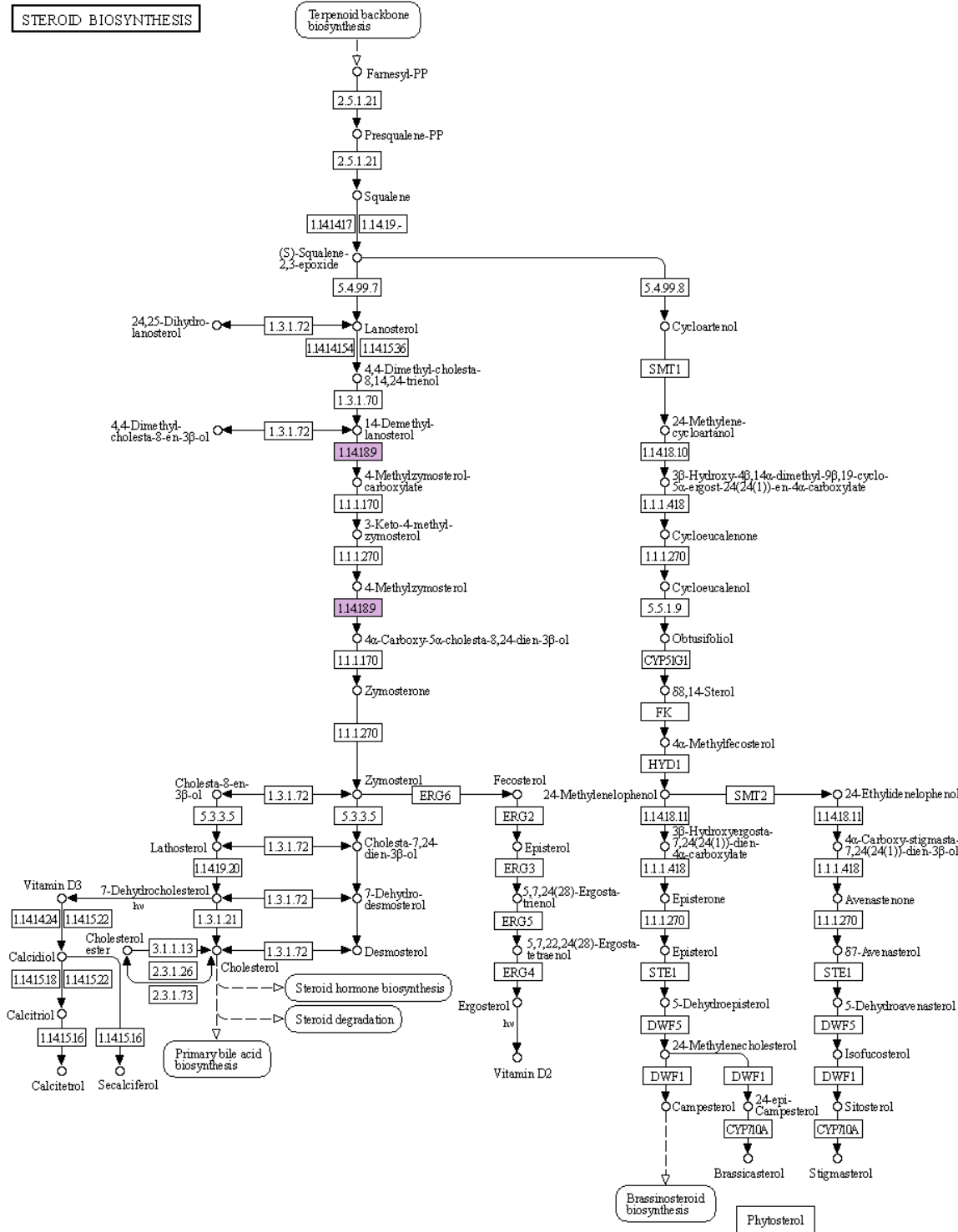
Şekil 4.38. Yağ asidi yıkımı.

CARBON FIXATION IN PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS

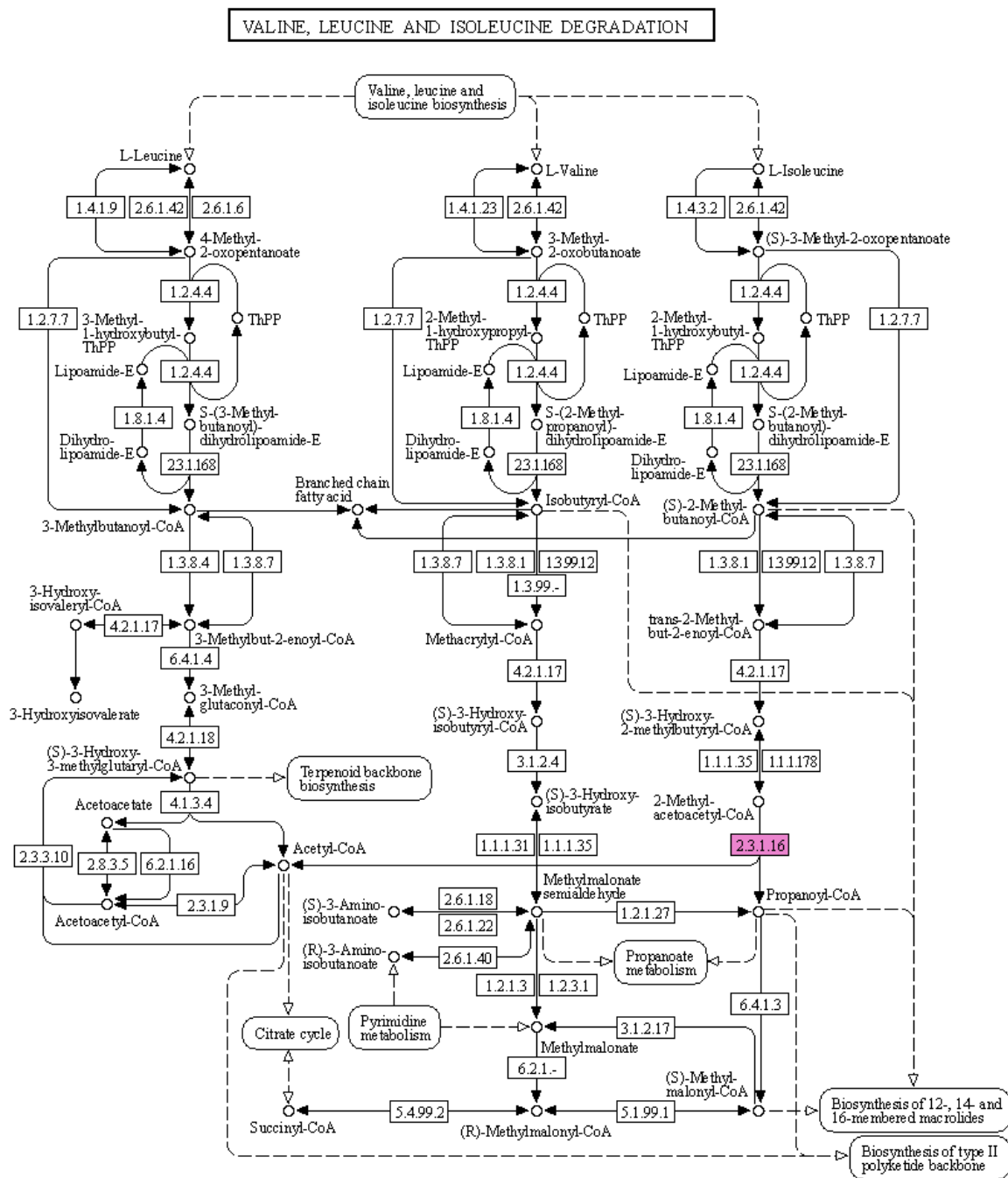


Şekil 4.39. Fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu.

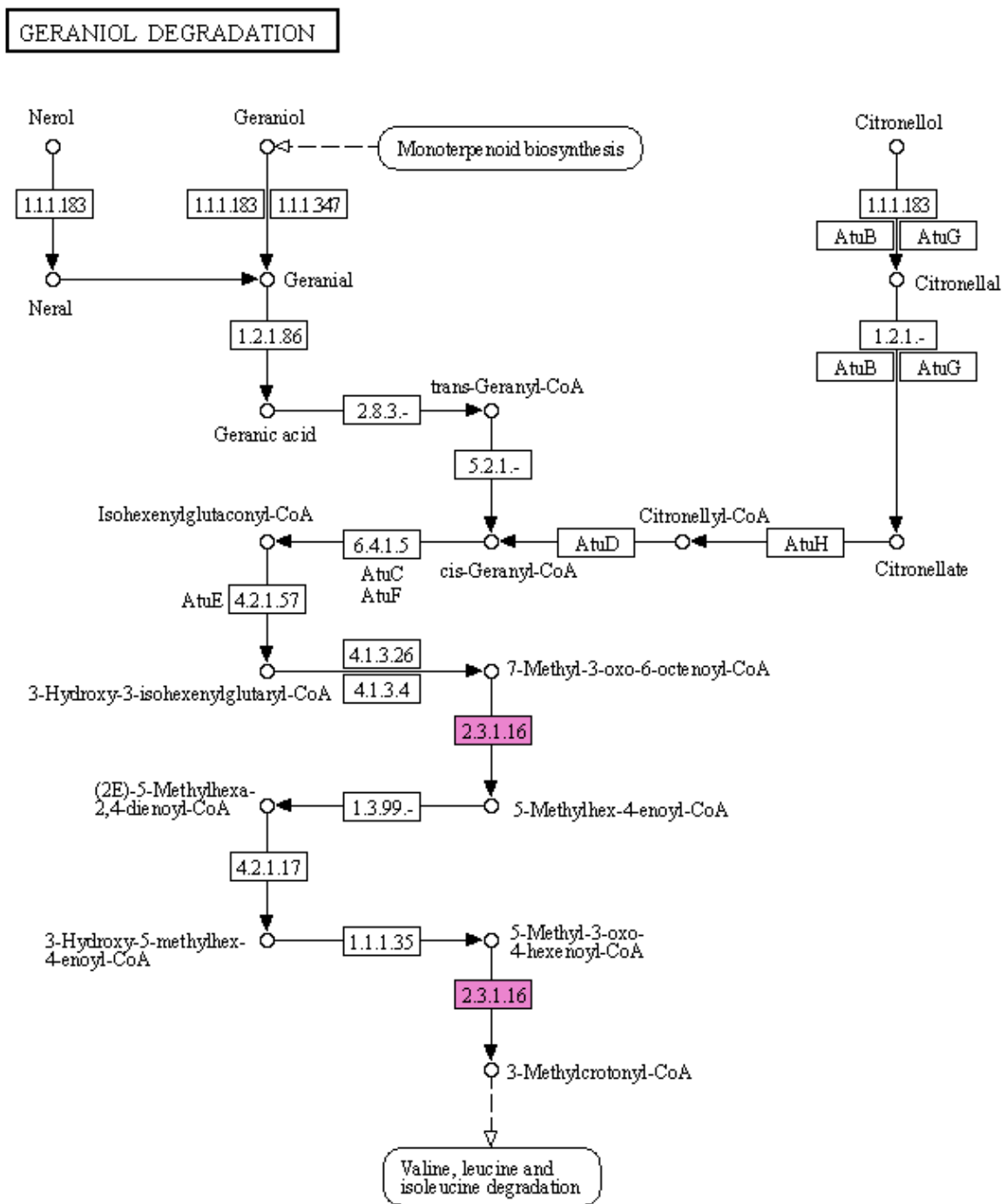
STEROID BIOSYNTHESIS



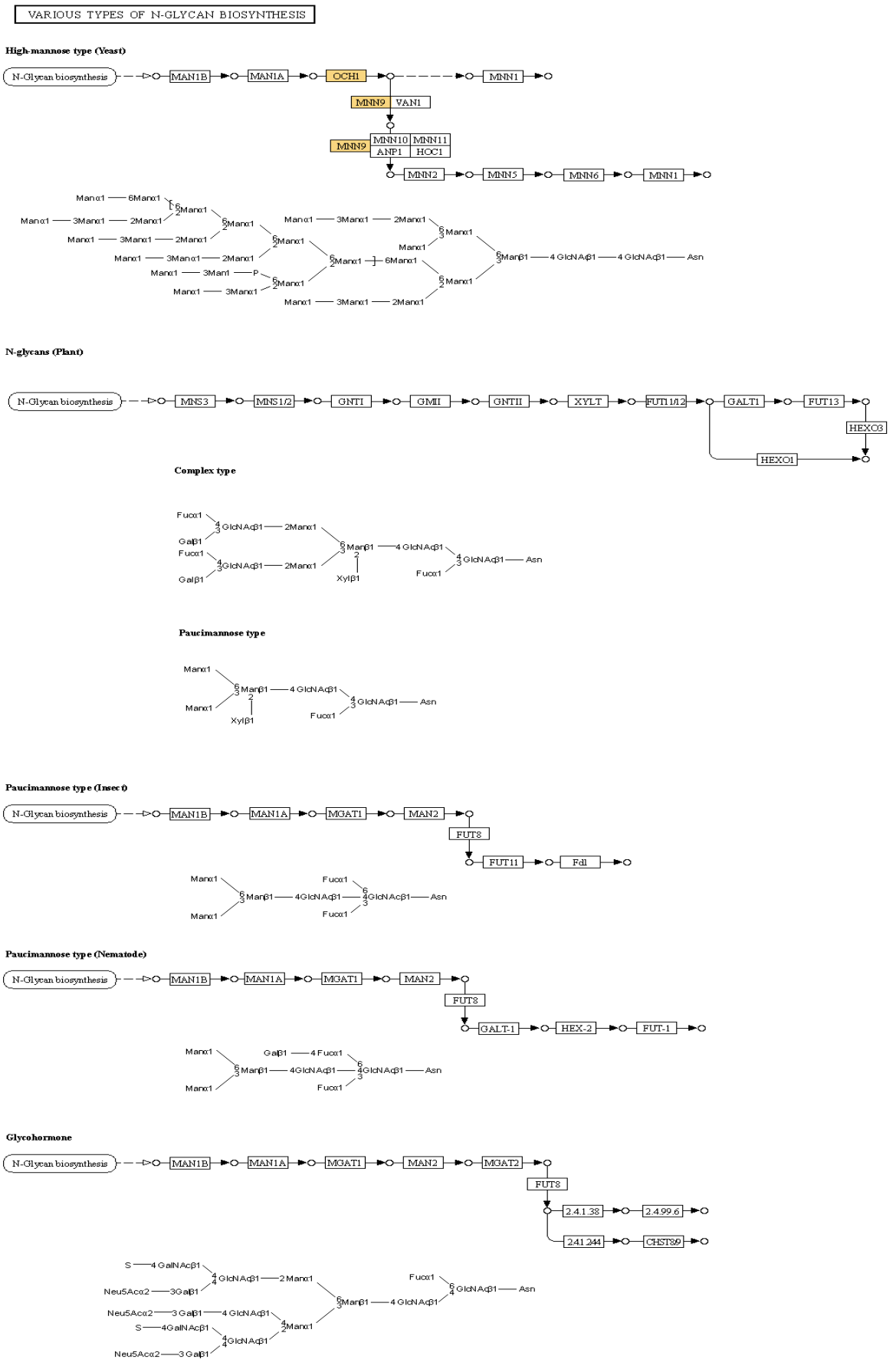
Şekil 4.40. Steroid biyosentezi.



Şekil 4.41. Valin, Lösin ve İzölösin yıkımı.

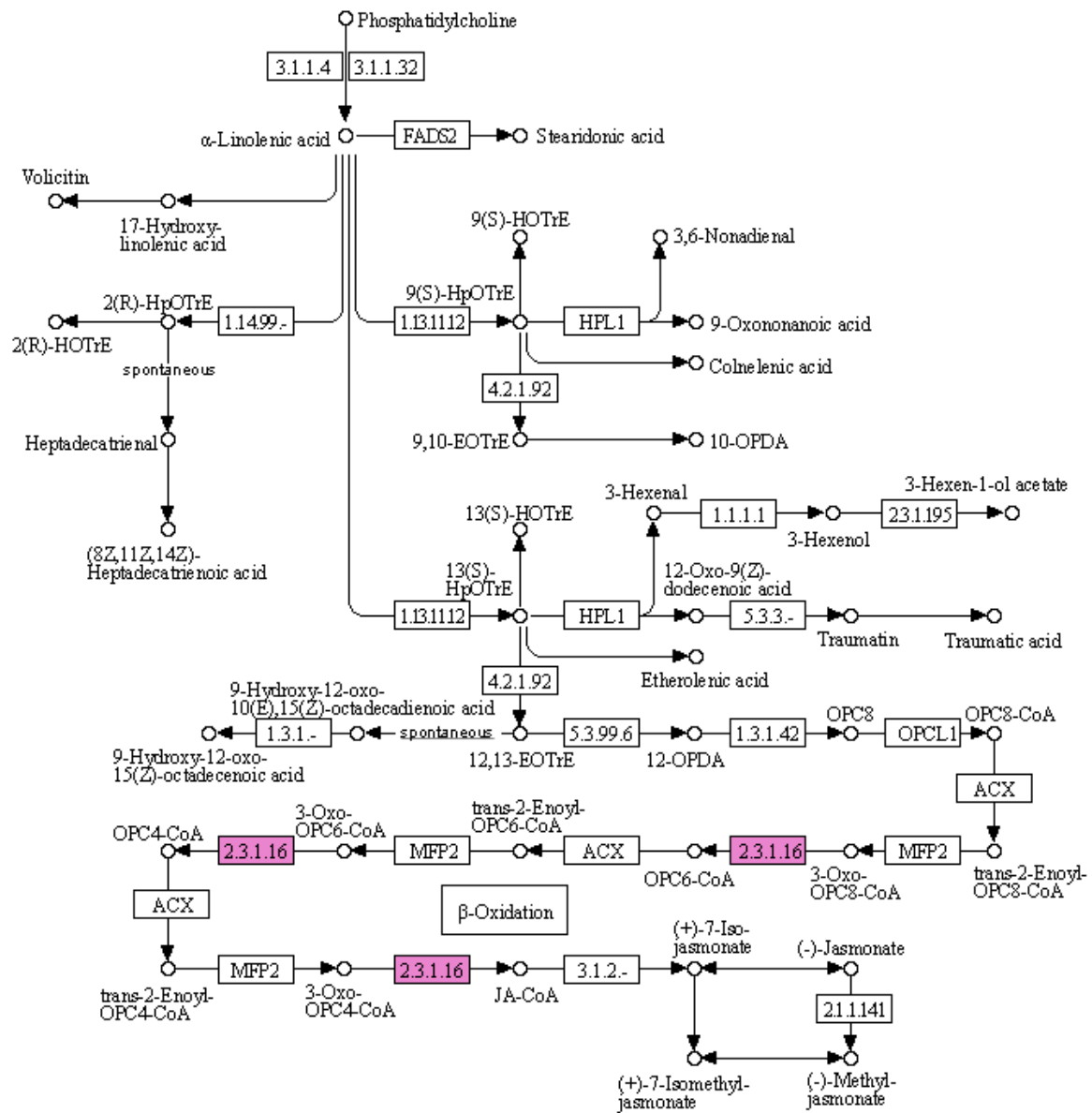


Şekil 4.42. Geraniyol yıkımı.



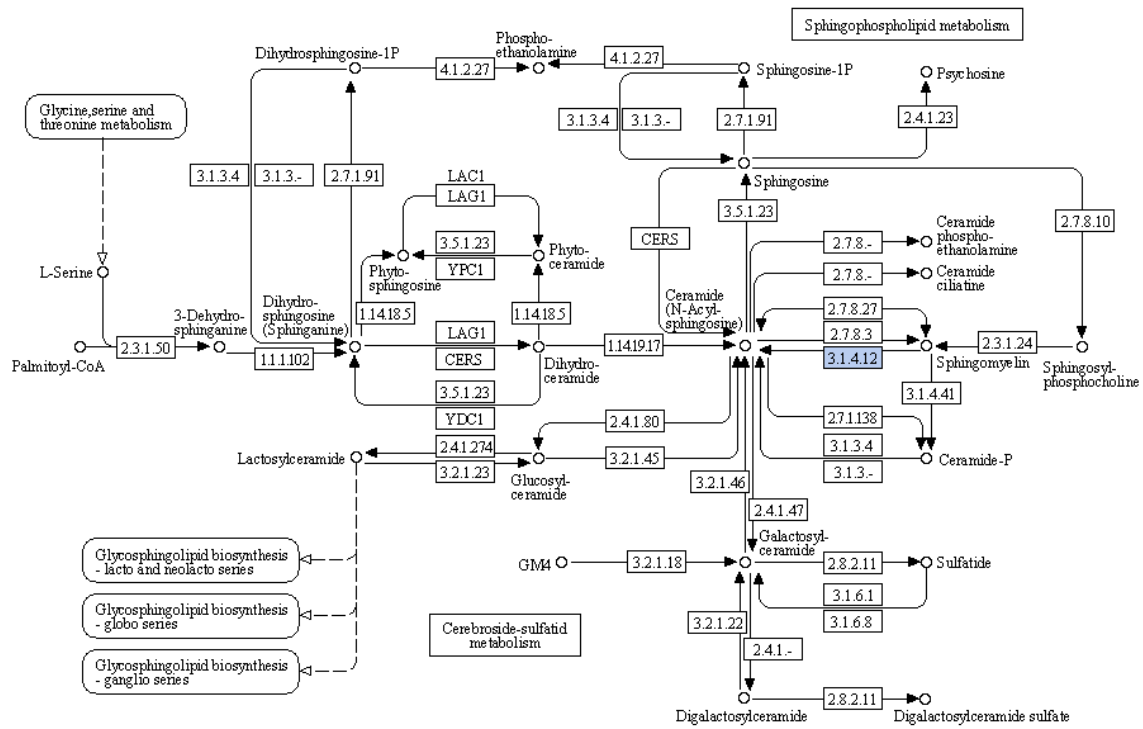
Şekil 4.43. N-glikan biyosentezinin çeşitli yolları.

α-LINOLENIC ACID METABOLISM



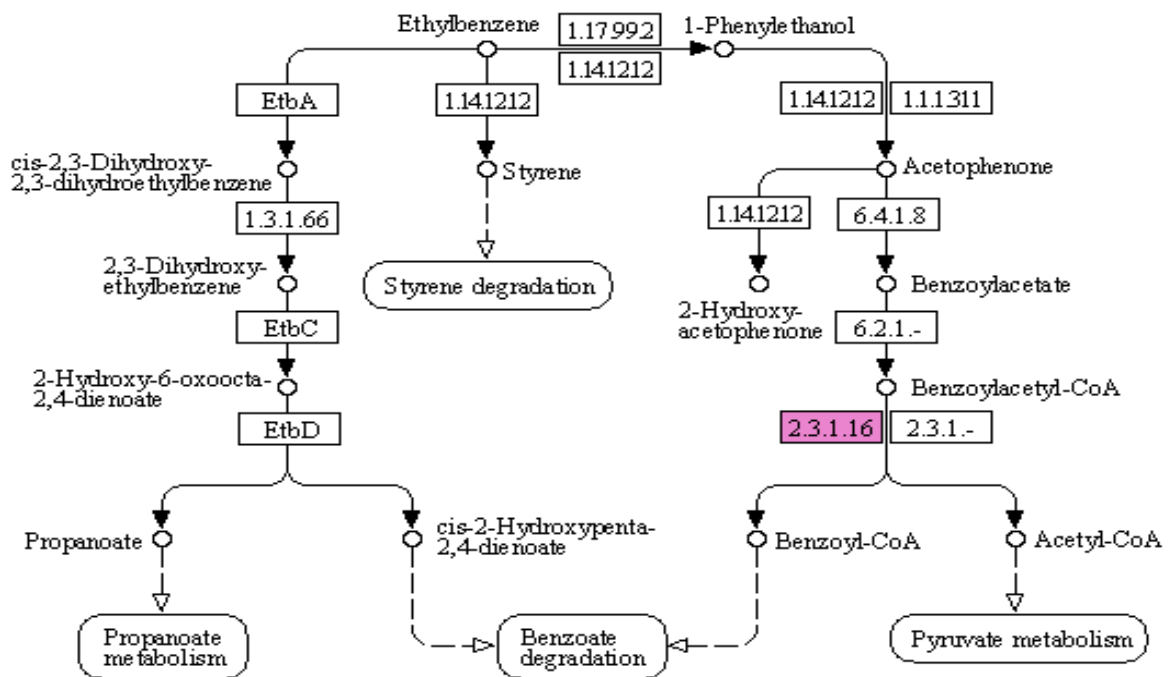
Şekil 4.44. α-Linolenic acid (Vitamin F) metabolizması.

SPHINGOLIPID METABOLISM

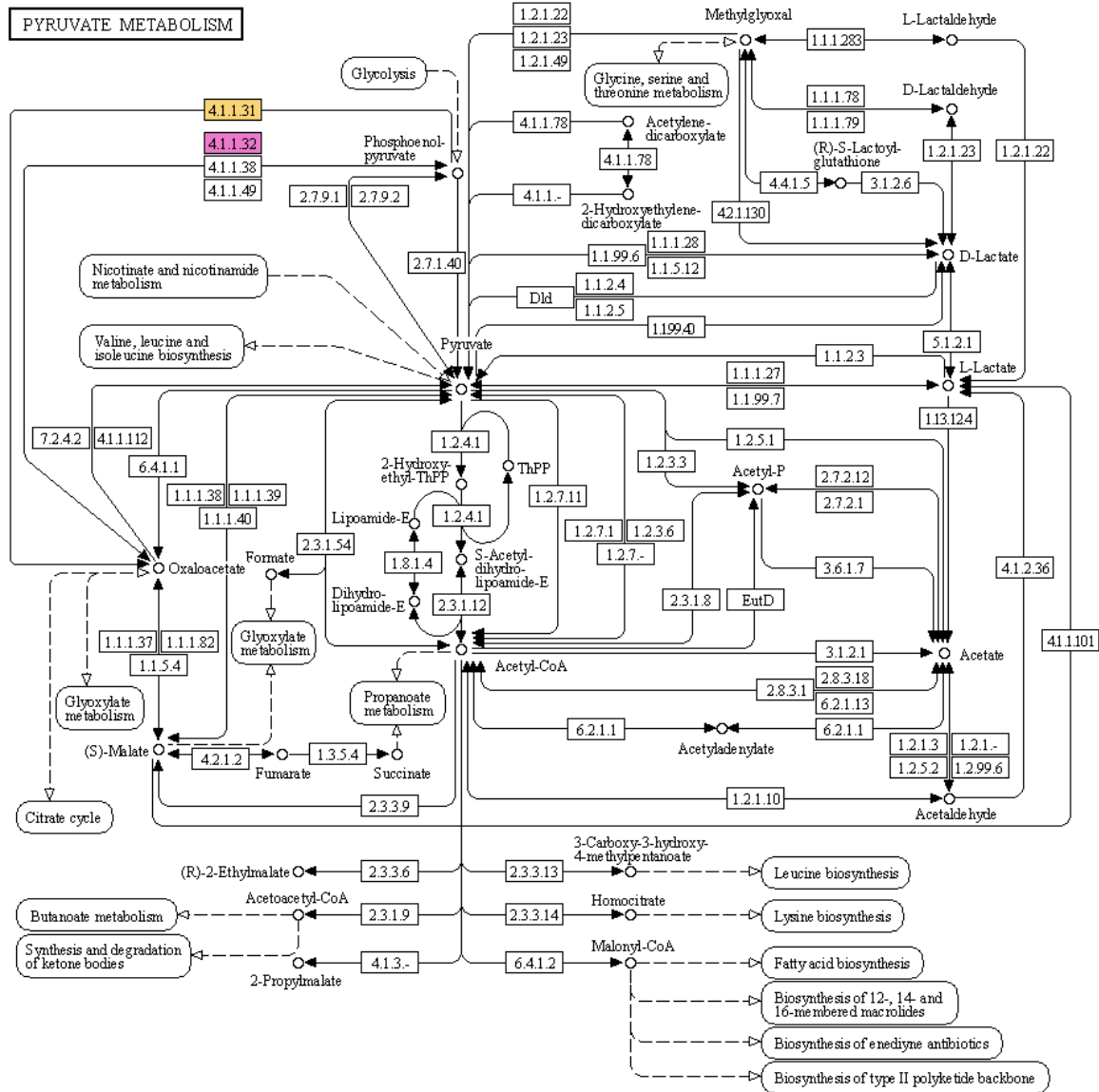


Şekil 4.45. Sfingolipid metabolizması.

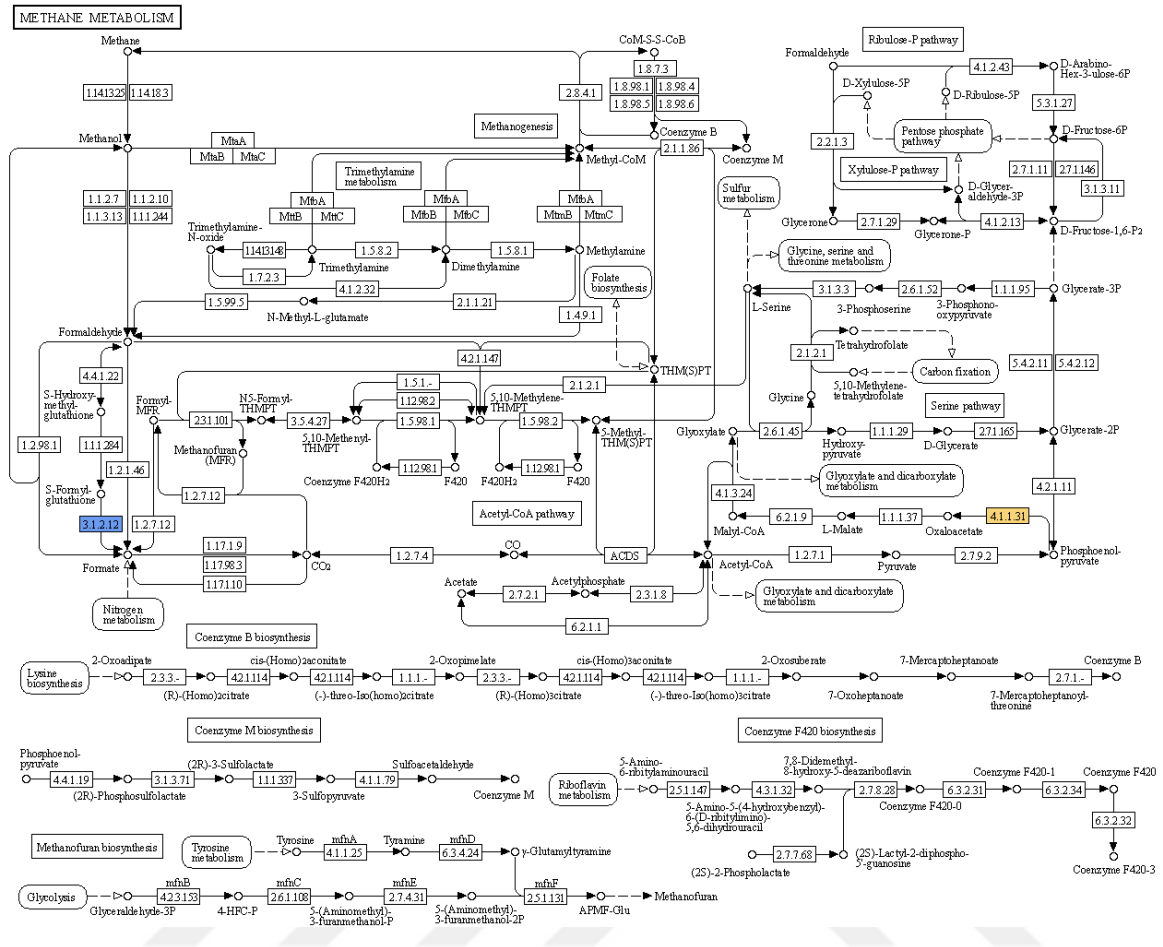
ETHYLBENZENE DEGRADATION



Şekil 4.46. Etilbenzen yıkımı.

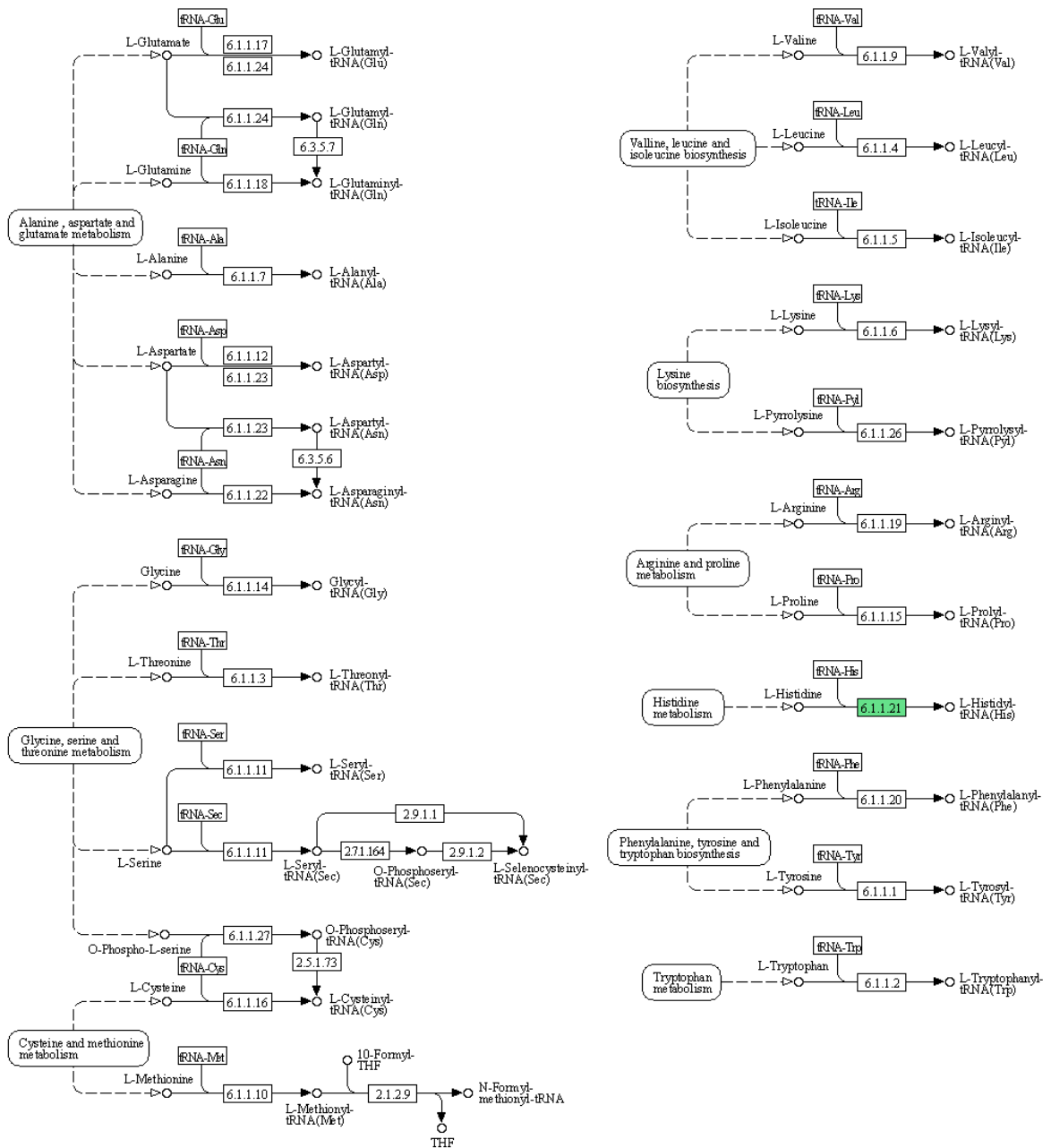


Şekil 4.47. Piruvat metabolizması.



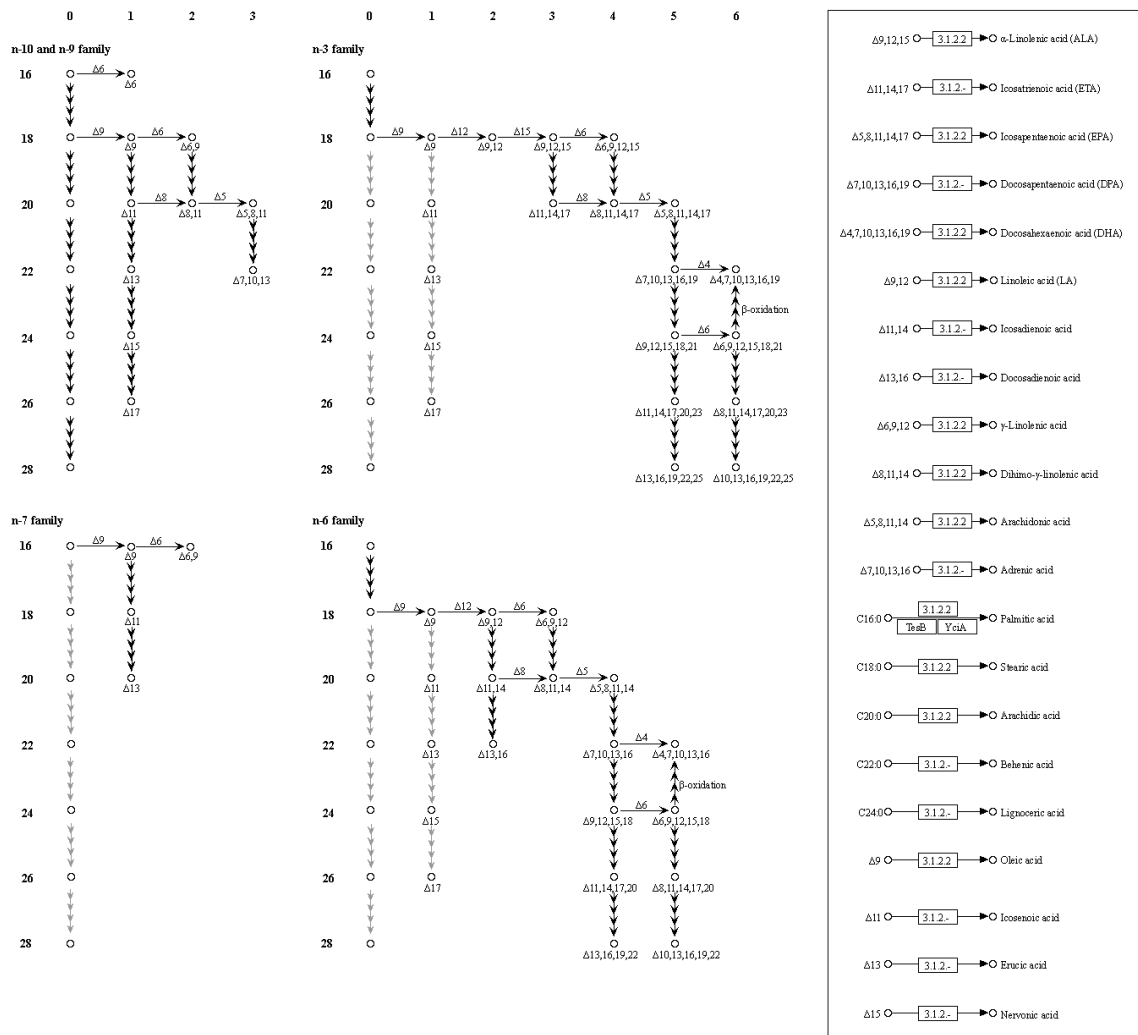
Şekil 4.48. Metan metabolizması.

AMINOACYL-tRNA BIOSYNTHESIS



Şekil 4.49. Aminoasil tRNA biyosentezi.

BIOSYNTHESIS OF UNSATURATED FATTY ACIDS



Şekil 4.50. Doymamış yağ asitlerinin biyosentezi.

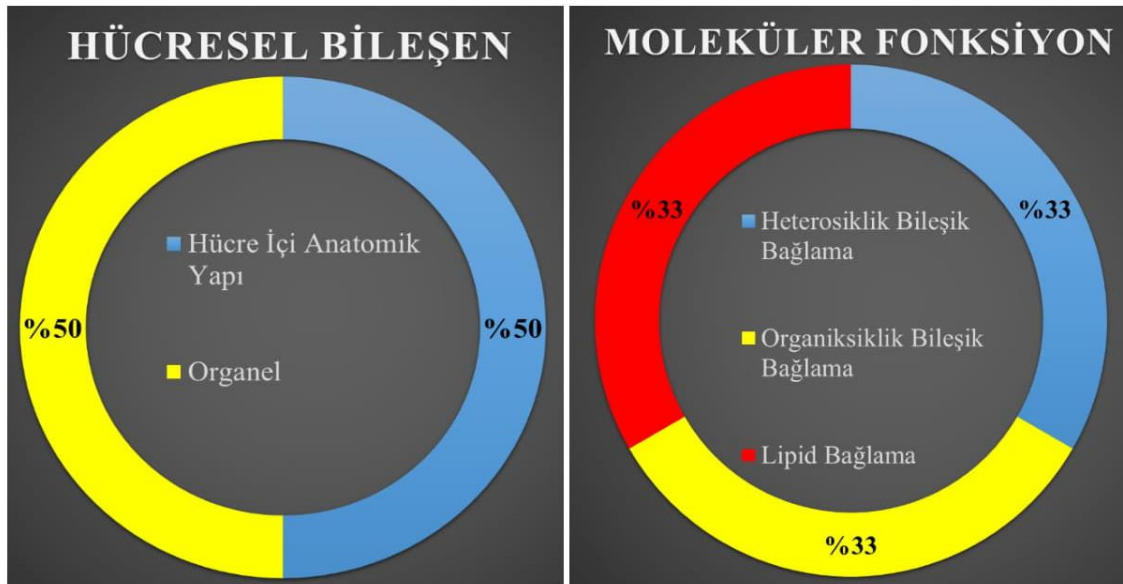
4.4.5. miR10982 hedef geninin GO ve KEGG analizleri

Ginkgo biloba (gbi-miR10982) bitkisinde miR10982 dizisi tanımlandı. Bu dizinin hedef geni Çizelge 4.7’de gösterildi.

Çizelge 4.7. miR10982 dizilerinin hedef genleri.

miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA-hybrid sonucu
gbi-miRNA10982	<i>Ginkgo biloba</i> class III homeodomain-leucine zipper protein C3HDZ3	DQ385527.1	target 5' U GACUCCUAAC CAUUAGAUCU C 3'
			miRNA 3' A

Hedefin GO analizlerinde genin herhangi bir biyolojik süreçte rol oynamadığı görüldü. Bu genin, hücre içi anatomik yapı (%50) ve organel (%50) olmak üzere 2 hücresel bileşen ile ilgili olduğu belirlendi. Moleküler fonksiyonların ise heterosiklik bileşik bağlama (%33), organiklik bileşik bağlama (%33) ve lipid bağlama (%33) olduğu belirlendi (Şekil 4.51). GO analizlerinden sonraki aşama olan KEGG analizleri gerçekleştirildi ama hedef genlerin herhangi bir biyolojik yolak ile ilişkili olmadığı görüldü.



Şekil 4.51. miR10982 dizilerinin hedef genlerinin GO analizleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, farklı programlar kullanılarak *Petunia hybrida* (phy-miR168 ve phy-miR399), *Castanea sativa* (csa-miR169), *Yucca filamentosa* (yfi-miR169), *Opuntia streptacantha* (osa-miR169), *Cichorium intybus* (cin-miR169), *Cynara cardunculus* (cca-miR169), *Asparagus officinalis* (aof-miR2930) ve *Ginkgo biloba* (gbi-miR10982) olmak üzere 8 farklı süs bitkisinde 9 farklı yeni miRNA dizisi ilk defa tanımlandı. Olgun miRNA dizilerinin ikincil yapıları analiz edildi. Bu miRNA dizileri ile homolog olan farklı bitkilerde bulunan referans diziler hizalanarak filogenetik ağaçlar çizildi ve diziler arasındaki evrimsel ilişki incelendi. Daha sonra bu dizilerin hedefleri belirlendi. GO analizleri ile hedeflerin rol oynadığı biyolojik süreç, hücresel bileşen ve moleküler fonksiyonlar tanımlandı. KEGG analizleri ile de hedeflerin hangi metabolik yollarda rol oynadığı belirlendi.

Süs bitkilerinde tanımlanan pre-miRNA dizilerindeki miRNA ve miRNA* arasında en az 12-17 nt'in Watson-Crick ya da G/U bç eşleşmesi yaptığı gözlemlendi. Benzer şekilde Barozai [117], peygamber süpürgesi (*Artemisia annua* L.) bitkisinde yaptığı çalışmada, miRNA-miRNA* dizileri arasında en az 12 nt eşleşmesini bildirmiştir. Tanımlanan olgun miRNA dizilerinin ise 21-22 nt uzunluğunda olduğu görüldü. Farklı çalışmalarda da olgun miRNA dizilerinin de 19 ile 24 nt arasında olduğu rapor edilmiştir [118, 119]. Bununla birlikte tanımlanan dizilerde %GC içeriğinin %53.15'lik bir ortalama ile %40.91 - %61.90 arasında değiştiği görüldü. Bu %GC oranının, birçok çalışmadan daha yüksek çıktığı belirlendi. Bu çalışmalardan birinde soğan bitkisinde (*Allium cepa* L.) *in silico* analizler ile miRNA dizilerinin belirlenmiş ve %22.14 - 55.50 olmak üzere daha düşük oranda %GC içeriği bildirilmiştir [120]. Farklı bir çalışmada ise Kaur ve diğ. [121] mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde yeni miRNA dizilerini tanımlamış ve %AT değerlerinin %15.52 - %70.66 arasında olduğunu belirlemiştir. Bu tez çalışmasında ise %46.84 ortalama ile %38.1 - %59.09 arasında %AT değerleri bulundu. Ayrıca miRNA dizilerinin ortalama MFE değerlerinin $-19.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ile $-47.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ arasında ve ortalama $-28.73 \text{ kcal mol}^{-1}$ olduğu görüldü. Elde edilen bu ortalamanın daha önce kereviz bitkisinde yapılan sonuca benzer olduğu ($-31.12 \text{ kcal mol}^{-1}$) belirlendi.

Bununla birlikte havuçtan (*Daucus carota* L.) (-23.58 ve -24.83 kcal mol⁻¹) ve susamdan (*Sesamum indicum* L.) (-24.27 kcal mol⁻¹) daha yüksek ve mısır (*Zea mays* L.) bitkisinden daha az (-50.1 ve 100.1 kcal mol⁻¹) olduğu da gözlemlendi [9, 122, 123]. Zhang ve diğ. [111], miRNA dizilerinin diğer RNA çeşitlerinden ayrılmasında MFEI değerinin önemli olduğunu ve bu değer tRNA (0.64), rRNA (0.59) ve mRNA (0.65) değerlerinden daha yüksek olması gerektiğini rapor etmiştir. Süs bitkilerinde tanımlanan miRNA dizilerinin MFEI değerlerinin de 1.71 ile 4.31 arasında ve ortalama 2.52 olduğu görüldü. Bu durum, süs bitkilerinde yeni tanımlanan miRNA'ların yüksek doğrulukla tanımlandığını göstermektedir.

Yeni tanımlanan miRNA dizileri ile miRBase veri tabanından alınan referans diziler olmak üzere toplam 87 farklı miRNA'ya ait 1,846 nt dizi Clustal Omega programı kullanılarak hizalandı ve MEGAX programı kullanılarak filogenetik ağaç çizildi. Bu analizler ile yeni tanımlanan miRNA'ların referans dizilere oldukça benzediği görüldü. Bu sonucu destekler nitelikte bitki miRNA dizileri arasındaki evrimsel ilişki farklı çalışmalarda da belirlenmiştir [124, 125, 126, 127, 128].

Bitkilerde bulunan miRNA dizileri genellikle hedef mRNA dizilerini belirli bölgelerden keserek o diziyi etkiler [129]. miRNA dizileri transkripsiyonun yanı sıra translasyon aşamasında da gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynar [130]. Bu nedenle, miRNA ve hedef gen arasında mükemmel ya da mükemmel yakın eşleşme olması önemlidir [131, 132]. Her iki dizi arasında tamamlayıcılığın belirlenmesi için BLAST kullanışlı bir biyoinformatik araçtır. Bu çalışmada da miRNA ve hedef genler arasındaki tamamlayıcılığın belirlenmesi için öncelikle bu diziler arasında BLAST sonrasında "RNA Hybrid" analizleri yapıldı ve toplamda 9 miRNA dizisinin farklı fonksiyonlardaki 62 özgün hedef geni bulundu. Bilinen birçok miRNA hedef geni, mRNA dizileri ile tamamlayıcılık özelliği kullanılarak tanımlanmıştır. Bu bitkilere; 30 hedef genin tanımlandığı börülce (*Vigna unguiculata*) [133], 37 hedef genin tanımlandığı çay (*Camellia sinensis*) [134], 735 hedef genin tanımlandığı lotus (*Lotus japonicus*) [135], 80 hedef genin tanımlandığı hint keneviri (*Cannabis sativa* L.) [136] ve 21 hedef genin tanımlandığı karpuz (*Citrullus lanatus*) bitkisi örnek olarak verilebilir [137].

Bitkilerde *in silico* analizler, potansiyel miRNA dizilerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan metotlardır [138; 139]. *In silico* analizler ve deneysel yöntemler kullanılarak tanımlanan miRNA dizilerinin büyüme [122], gelişim [140] ve strese cevap [141] gibi farklı metabolik yollarda rol oynadığı rapor edilmiştir. Tez çalışmasında, farklı süs bitkisinde tanımlanan miR168, miR169, miR399, miR2930 ve miR10982 dizilerinin de başta strese cevap olmak üzere farklı biyolojik süreçlerde, hücresel bileşenlerde ve moleküler fonksiyonlarda rol oynadığı görüldü. Ayrıca miRNA'ların KEGG analizleri sonucunda farklı metabolik yollarda da rol oynadıkları belirlendi. Benzer şekilde, Zhu ve Luo [142] yaptıkları çalışmada, miRNA hedef genlerinin stres ile ilişkili transkripsiyonel faktörlerden, transmembran taşınımından, sinyal iletiminden ve transkripsiyon düzenlenmesinden sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir. Farklı bir çalışmada ise Prabu ve Mandal [143] hedef genlerin, transkripsiyon faktörleri ve strese karşı cevapta hücre bütünlüğünün korunmasında rol oynadığını bildirmişlerdir.

miRNA168 dizileri, bitkilerde abiyotik ve biyotik strese karşı cevapta en yaygın çalışılan dizilerdir [144, 145]. Olgun miR168 dizileri, bitkiler arasında oldukça korunmuştur [146]. Bu tez çalışmasında da *Petunia hybrida* bitkisinde miR168 bitkisi tanımlandı ve farklı metabolik yollarda rol oynadığı belirlendi. *Arabidopsis* bitkisinde bulunan homolog dizisi de Siré ve diğ. [147] tarafından çalışılmıştır. Bu bitkide miR168 anlatımının gündüz arttığı ve karanlıkta azaldığı bildirilmiştir. Yu ve diğ. [144] ile Ludman ve Fatyol [148] ise viral enfeksiyonlara karşı dirençte miR168 dizilerinin rollerini tütün (*Nicotiana benthamiana*) ve *Malus hupehensis* bitkilerindekini incelemişlerdir.

miR169 ailesi, birçok bitki çeşidinde bulunan büyük ve korunmuş bir miRNA ailesidir [149]. miR169'un strese cevap [150] ve adaptasyon [151] gibi farklı metabolizmalarda rol oynadığına ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada da *Castanea sativa* (csa-miR169), *Yucca filamentosa* (yfi-miR169), *Opuntia streptacantha* (osa-miR169), *Cichorium intybus* (cin-miR169) ve *Cynara cardunculus* (cca-miR169) süs bitkilerinde miR169 dizileri tanımlanmıştır. Bu dizilerin strese cevap başta olmak üzere farklı biyolojik süreçlerde, hücresel bileşenlerde ve moleküler fonksiyonlarda rol oynadıkları görüldü. Luan ve diğ. [152] de zma-miR169 anlatımının mısır (*Zea mays* L.) yapraklarında abiyotik strese cevapta rol oynadığını belirlemiştir. Süs bitkilerinden olan ekinezyada (*Echinacea purpurea* L.) yapılan çalışmada ise miR169 dizisinin anlatımının kuraklık stresinde arttığı rapor edilmiştir [153].

Ayrıca, absisik asit uygulamasında miR169 anlatımının arttığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır [154]. Liang ve diğ. [155] ise hıyar yeşil benekli mozaik virüsü ile ilgili yaptıkları çalışmada, bu virüs ile enfeksiyon sonucunda miR169'un anlatımının değiştiğini belirlemiştir. Ayrıca Naqvi ve diğ. [156], domates bitkisinde görülen yaprak kıvrıklığı virüsü ile ilgili yaptığı çalışmada, miR169 dizisinin anlatımının azaldığını bildirmiştir. Bitkilerde miR169 anlatımının artması ile çeltik bitkisinde görülen çeltik yanıklık hastalığına karşı duyarlılığın arttığı [157] buna karşın domateste kurşuni küf hastalığına karşı direncin arttığı rapor edilmiştir [158, 159].

Bitkilerin yaşam döngüsünde fosfor (P), en etkili makro besin elementlerinden biridir. Fosfor eksikliğinde bitkinin büyümesi engellenir ve buna bağlı olarak da verim düşer. Bitkilerde P eksikliğine karşı oluşan strese cevapta rol alan ilk miRNA (miR399) *Arabidopsis* bitkisinde tanımlanmıştır [160, 161]. Hackenberg ve diğ. [162], P eksikliği altında yetiştirilen arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkilerinde miR399 ailesine ait 10 miRNA dizisinin anlatımının arttığını bildirmiştir. Zhu ve diğ. [163], çin tırpan ağacında (*Cunninghamia lanceolata*) miR399 dizisini analiz etmişler ve bu bitki ile *Arabidopsis* bitkisindeki miR399 dizilerinin korunmuş olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde bu tez çalışmasında da *Petunia hybrida* bitkisinde belirlenen phy-miRNA399 dizisinin de referans dizileri ile benzerlik gösterdiği belirlendi. Bunun sebebi miRNA399 dizisinin monokot ve dikotlarda bulunan en eski ve korunmuş dizilerden biri olmasıdır [164]. Ayrıca miR399 dizilerinin P eksikliğinin yanı sıra potasyum (K), sodyum (Na) ve kalsiyum (Ca) eksikliklerinde de rol oynadığı [165] farklı çalışmalarda rapor edilmiştir.

Tez çalışmasında belirlenen diğer miRNA ise *Asparagus officinalis* bitkisinde tanımlanan aof-miR2930 dizisidir. Bu dizinin hedefleri incelendiğinde oldukça fazla sayıda ve farklı rollerde hedeflerin bulunduğu belirlendi. Bu hedeflere bağlı gerçekleştirilen GO ve KEGG analizlerinde de bu hedeflerin rolleri ve hangi yollarda rol oynadığı daha detaylı analiz edildi. Bu bitkide daha önce Chen ve diğ. [166] tarafından da analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, 26 aileye özgü olan 154 korunmuş miRNA tanımlanmıştır. Bu miRNA dizileri arasında 39'unun bu bitkiye özgün olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 40 hedefinde tanımlandığı bu çalışmada, hedeflerin gelişim ve metabolik süreçlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Diğer tanımlanan miRNA dizilerinde olduğu gibi *Ginkgo biloba* bitkisinde de ilk defa gbi-miR10982 dizisi belirlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda, bu bitkinin erkek ve dişi yapraklarında sırasıyla 82 ve 78 aileye özgü 202 ve 201 bilinen miRNA dizisi analiz edilmiştir [167]. Başka bir araştırmada ise Wu ve diğ. [168], *Ginkgo biloba* bitkisinin yapraklarındaki renk mutasyonunda, miRNA'ların işlevleri ile ilgili bilgi edinmek için Illumina dizilemesi yapmışlardır. Dizileme sonucunda bilinen 426 ve yeni 265 miRNA dizisi tanımlanmıştır. Li ve diğ. [169] ise tanımladıkları miRNA dizilerinin glutasyon metabolizması, bitki sirkadiyen ritim ve fenilalalin metabolizması ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında da gbi-miR10982 hedef genlerinin glikoliz/glukoneogenez, sitrat döngüsü (TCA Döngüsü), benzoat yıkımı, yağ asidi uzaması gibi farklı yollarda rol oynadığı belirlendi.

miRNA dizilerinin ve hedeflerinin belirlenmesi gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynayan karmaşık yapının ve sistem biyolojisinin belirlenmesinde önemlidir [170, 171]. Son yıllarda bitkilerin strese karşı cevabında rol oynayan miRNA dizilerinin ve onların hedef genlerinin rolleri yaygın bir şekilde çalışılmaktadır. Zakeel ve diğ. [137], karpuz (*Citrullus lanatus*) bitkisinde inozitol-3-fosfat sentaz aktivitesi, metal iyon bağlama ve oksidoredüktaz aktivitesi gibi birçok metabolik süreçle ilgili 19 protein kodlayan 21 potansiyel mRNA hedefi belirlemiştir. Mohanty ve diğ. [172] ise *Aegle marmelos* bitkisi ile yaptıkları çalışmada, miRNA'ları tanımlamak için RNA dizilime yapmışlar ve elde ettikleri dizileri bilgisayar ortamında biyoinformatik yaklaşımlar ile incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda 20 miRNA ailesi içerisinde 223 korunmuş miRNA dizisi ve 6 yeni miRNA için 395 hedef gen belirlenmiştir. Biyotik ve abiyotik streslerin, dokuya özgü bir çok miRNA'nın anlatımın arttırdığı ya da azalttığı da görülmektedir [173]. Bu dizilerin anlatımının artması ya da azalması strese karşı bitkinin direncini de etkilemektedir.

Gelişen NGS ile genomlar kolaylıkla dizilenebilmekte ve elde edilen dizilerin işlevleri biyoinformatik yollarla GO ve KEGG analizleri yapılarak anlaşılabilir. İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte bu proje sonrasında elde edilen ama işlevleri bilinmeyen dizilerin detaylı analizleri için ENCODE [54], HapMap [174], 1000 Genom [175] ve Kanser Genom Projesi [176] gibi birçok proje de aynı anda farklı araştırma grupları tarafından başlatılmış ve gelişen NGS ile kısa zamanda büyük veriler elde edilmiştir.

Bu projeler içerisinde yer alan ENCODE projesinde herhangi bir işlevi olmadığı düşünülen ve çöp DNA olarak adlandırılan genom bölgelerinin özellikle gen anlatımının düzenlenmesindeki rolleri yaygın olarak çalışılmaktadır.

Gen anlatımının düzenlenmesi ile ilgili epigenetik kavramının ortaya çıkmasıyla beraber epigenetikte rol oynayan önemli mekanizmalar birer birer aydınlatılmaya başlanmıştır. Bu mekanizmalardan biri de ncRNA'lardır. Kısa ve uzun kodlama yapmayan RNA'lar olarak ikiye ayrılan bu diziler gen anlatımının düzenlenmesinde post-transkripsiyonel ve/veya post-translasyonel aşamalarda rol oynar. Özellikle farklı hastalıklardaki etkilerinin çalışılmasına karşın bitki biyoteknolojisi ve hayvan biyoteknolojisi gibi farklı alanlarda da bu dizilerin etkileri araştırılmaktadır. Bu tez çalışması, peyzaj bitkileri olarak da adlandırılan, tıbbi önemi olan ve bununla beraber her geçen yıl pazar payı da artan süs bitkilerinde miRNA dizilerinin araştırıldığı ilk detaylı çalışmadır. Elde edilen sonuçların süs bitkileri ile ilgili yapılan moleküler ve biyoinformatik çalışmalara katkı sağlayarak strese dayanıklı ve farklı renk, koku gibi özelliklere sahip bitkilerin üretimine katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ünlü, İ. H. (2014). *Şanlıurfa Kent Dokusuna Uygun Karasal İklim Koşullarına Dayanıklı Çok Yıllık Süs Bitkilerinin Belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, 2014), 104.
2. Reddy, A. R., Chaitanya, K. V. and Vivekanandan, M. (2004). Drought-Induced Responses of Photosynthesis and Antioxidant Metabolism in Higher Plants. *Journal of Plant Physiology*, 161, 1189-1202.
3. Shao, H-B., Chu, L-Y., Jaleel, C.A. and Zhao, C-X. (2008). Water-Deficit Stress-Induced Anatomical Changes in Higher Plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 215-225.
4. Ulrich-Merzenich, G., Panek, D., Zeitler, H., Wagner, H. and Vetter, H. (2009). New Perspectives for Synergy Research With the “Omic”-Technologies. *Phytomedicine*, 16(6-7), 495-508.
5. Romanick, S. and Ferguson, B. S. (2019). Introduction to Nutritional Epigenomics. Ferguson, B. S. (ed.). *Nutritional Epigenomics*, Academic Press.
6. Elvir, L., Duclot, F., Wang, Z. and Kabbaj, M. (2019). Epigenetic Regulation of Motivated Behaviors By Histone Deacetylase Inhibitors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 105, 305-317.
7. Talebizadeh, Z., Shah, A. and DiTacchio, L. (2019). The Potential Role of a Retrotransposed Gene and a Long Noncoding RNA in Regulating an X-Linked Chromatin Gene (KDM5C): Novel Epigenetic Mechanism in Autism. *Autism Research*, 12(7), 1007-1021.
8. Palazzo, A. F. and Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: What is Functional and What is Junk?. *Frontiers in Genetics*, 6, 2.
9. Marakli, S. (2018). Identification and Functional Analyses of New Sesame Mirnas (*Sesamum indicum* L.) and Their Targets. *Molecular Biology Reports*, 45, 2145-2155.
10. Pritchard, C. C., Cheng, H. H. and Tewari, M. (2012). MicroRNA Profiling: Approaches and Considerations. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 358-369.
11. Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J. A. (2007). Switching From Repression to Activation: microRNAs can up-regulate Translation. *Science*, 318(5858), 1931-1934.
12. Titiz, S., Çakıroğlu, N., Birişçi Yıldırım, T. ve Çakmak, S. (2000). *Süs Bitkileri Üretim ve Ticaretindeki Gelişmeler*. TMMOB, Tarımsal Kongre I. Cilt. S: 709-740.
13. Yazıcı, K. (2015). *Tokat İli Ekolojik Koşullarında Dış Mekan Süs Bitkileri Sektör Analizi ve Uygun Üretim Alanlarının CBS ile Belirlenmesi*. (Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, 2015), 178.

14. Zencirkıran, M., Seyidođlu, N. ve Atanur, G. (2010). *Bursa Kenti Peyzaj ve Süs Bitkileri Sektörünün Genel Durumu ve Dış Mekan Süs Bitkileri Kullanım Tercihleri*. IV. Süs Bitkileri Kongresi Bildiriler, 359-364, Mersin.
15. Karagüzel, O., Korkut, B., kan, B., elikel, G. ve Titiz . (2010). *Türkiye'de Süs Bitkileri retiminin Bugünkü durumu, Geliřtirme Olanakları ve Hedefleri*. Ziraat Mühendisliđi, 7, 11-15. http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/e915db6326b6fb6_ek.pdf.
16. İnternet: URL: http://tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?alt_id=1001. Son Erişim Tarihi: 04.01.2021.
17. Srkinen, T., Bohs, L., Olmstead, R. G. and Knapp, S. (2013). A Phylogenetic Framework for Evolutionary Study of the Nightshades (Solanaceae): A Dated 1000-tip Tree. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 214.
18. Stehmann, J. R., Lorenz-Lemke, A. P., Freitas, L. B., Semir, J., Gerats, T. and Strommer, J. (2009). *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*. Gerats, T. and Strommer, J. (eds.), Springer Verlag, New York. ISBN 978-0-387-84796-2.
19. Segatto, A. L. A., Ramos-Fregonezi, A. M. C., Bonatto, S. L. and Freitas, L. B. (2014). Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. *American Journal of Botany*, 101, 119-127.
20. Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990). Introduction of Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans. *Plant Cell*, 2, 279-289.
21. Van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. M. and Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid Genes in *Petunia*: Addition of A Limited Number of Gene Copies May Lead to A Suppression of Gene Expression. *Plant Cell*, 2, 291-299.
22. Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., Bao, M., Bapaume, L., Barry, C. S. et al. (2016). Insight into the Evolution of the Solanaceae from the Parental Genomes of *Petunia hybrida*. *Nature Plants*, 2(6), 1-9.
23. Wei, Q., Wen, S., Lan, C., Yu, Y. and Chen, G. (2020). Genome-Wide Identification and Expression Profile Analysis of the NF-Y Transcription Factor Gene Family in *Petunia hybrida*. *Plants*, 9(3), 336.
24. Phadungsawat, B., Watanabe, K., Mizuno, S., Kanekatsu, M. and Suzuki, S. (2020). Expression of CCD4 Gene Involved in Carotenoid Degradation in Yellow-Flowered *Petunia* × *hybrida*. *Scientia Horticulturae*, 261, 108916.
25. Xiang, T., Xu, Z., Zhu, X., Lin, Y., Li, J. And Long, F. (2020). The Induction of Polyploid Hairy Roots in *Petunia hybrida* Using Root Transformation of *Agrobacterium rhizogenes* K599 and Colchicine. *International Journal of Agriculture and Biology*, 24(4), 651-654.

26. Fernandez-Lopez, J. and Alia, R. (2003). EUFORGEN Technical Guidelines for Genetic Conservation and Use for Chestnut (*Castanea sativa*)- Source: EUFORGEN-NH (EUFORGEN- Noble Hardwoods), EUR (Regional Office for Europe). 6.
27. Jaynes, R. A. (1963). Biparental Determination of Nut Characters in *Castanea*. *Journal of Heredity*, 54, 84-88.
28. Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D. and Ferrara, L. (2000). Antibacterial and Allelopathic Activity of Extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, 71, 110-116.
29. İnternet: URL: https://geka.gov.tr/uploads/pages_v/aydin-ili-kestane-yatirim-raporu-basili_1992017142633.pdf. Son Erişim Tarihi: 04.01.2021.
30. Plock, A., Beyer, G., Hiller, K., Gründemann, E., Krause, E., Nimtz, M. and Wray, V. (2001). Application of MS and NMR to the Structure Elucidation of Complex Sugar Moieties of Natural Products: Exemplified by the Steroidal Saponin from *Yucca filamentosa* L. *Phytochemistry*, 57(3), 489-496.
31. Heyduk, K., Burrell, N., Lalani, F. and Leebens-Mack, J. (2016). Gas Exchange and Leaf Anatomy of a C3–CAM Hybrid, *Yucca gloriosa* (Asparagaceae). *Journal of Experimental Botany*, 67(5), 1369-1379.
32. Bononi, M., Guglielmi, G., Rocchi, P. and Tateo, F. (2013). First Data on the Antimicrobial Activity of *Yucca filamentosa* L. Bark Exxtacts. *Italian Journal of Food Science*, 25, 238-241.
33. Yue, H., He, J., Xiao, D. and Choi, M. M. (2013). Biosensor for Determination of Hydrogen Peroxide Based on *Yucca filamentosa* membrane. *Analytical Methods*, 5, 5437-5443.
34. Yuasa, H., Shimizu, H., Kashiwai, S. and Kondo, N. (1973). Chromosome Numbers and Their Bearing on the Geographic Distribution in the Subfamily Opuntioideae (Cactaceae). *Reports of the Institute of Breeding Research*, 4, 1-10.
35. Zourgui, M. N., Hfaiedh, M., Brahmi, D., Affi, W., Gharsallah, N., Zourgui, L. and Amri, M. (2020). Phytochemical Screening, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Opuntia streptacantha* Fruit Skin. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(5), 2721-2733.
36. Srivastava, S., Singh, N., Srivastava, G. and Sharma, A. (2017). MiRNA Mediated Gene Regulatory Network Analysis of *Cichorium intybus* (chicory). *Agri Gene*, 3, 37-45.
37. Abbas, Z. K., Saggi, S., Sakeran, M. I., Zidan, N., Rehman, H. and Ansari, A. A. (2015). Phytochemical, Antioxidant and Mineral Composition of Hydroalcoholic Extract of Chicory (*Cichorium intybus* L.) Leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 322-326.
38. Al-Snafi, A. E. (2016). Medical importance of *Cichorium intybus* - A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(3), 41-56.

39. Cordon, G., Iriel, A., Cirelli, A. F., & Lagorio, M. G. (2018). Arsenic effects on some photophysical parameters of *Cichorium intybus* under different radiation and water irrigation regimes. *Chemosphere*, 204, 398-404.
40. Jokar, M., Mirghaffari, N., Soleimani, M. and Jabbari, M. (2019). Preparation and Characterization of Novel Bio Ion Exchanger from Medicinal Herb Waste (Chicory) for the Removal of Pb^{2+} and Cd^{2+} from Aqueous Solutions. *Journal of Water Process Engineering*, 28, 88-99.
41. Marie, D. and Brown, S. C. (1993). A Cytometric Exercise in Plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78(1-2), 41-51.
42. Fernández, J., Curt, M. D. and Aguado, P. L. (2006). Industrial Applications of *Cynara cardunculus* L. for Energy and Other Uses. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 222-229.
43. Gominho, J., Curt, M. D., Lourenco, A., Fernández, J. and Pereira, H. (2018). *Cynara cardunculus* L. as a Biomass and Multi-Purpose Crop: A Review of 30 Years of Research. *Biomass and Bioenergy*, 109, 257-275.
44. Arena, C., Figlioli, F., Sorrentino, M. C., Izzo, L. G., Capozzi, F., Giordano, S. and Spagnuolo, V. (2017). Ultrastructural, Protein and Photosynthetic Alterations Induced by Pb and Cd in *Cynara cardunculus* L., and Its Potential for Phytoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 83-89.
45. Dallel, W., Nakbi, H., Djelassi, I., Hammami, S., Mastouri, M. and Mighri, Z. (2020). Phytochemical Composition, Antioxidant, Antibacterial and Allelopathic Activities of Various Solvent Extracts of *Cynara cardunculus* Stalks. *Ethiopian Pharmaceutical Journal*, 36(1), 1-10.
46. Schwarz, J. and Mathijs, E. (2017). Globalization and the Sustainable Exploitation of Scarce Groundwater in Coastal Peru. *Journal of Cleaner Production*, 147, 231-241.
47. Guo, Q., Wang, N., Liu, H., Li, Z., Lu, L. and Wang, C. (2020). The Bioactive Compounds and Biological Functions of *Asparagus officinalis* L.—A review. *Journal of Functional Foods*, 65, 103727.
48. Harkess, A., Mercati, F., Shan, H. Y., Sunseri, F., Falavigna, A. and Leebens-Mack, J. (2015). Sex-Biased Gene Expression in Dioecious Garden Asparagus (*Asparagus officinalis*). *New Phytologist*, 207(3), 883-892.
49. Šmarda, P., Veselý, P., Šmerda, J., Bureš, P., Knápek, O. and Chytrá, M. (2016). Polyploidy in a 'Living Fossil' *Ginkgo biloba*. *New Phytologist*, 212, 11-14.
50. Liu, X., Yu, W., Wang, G., Cao, F., Cai, J. and Wang, H., 2016. Comparative Proteomic and Physiological Analysis Reveals the Variation Mechanisms of Leaf Coloration and Carbon Fixation in a Xantha Mutant of *Ginkgo biloba* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1794.

51. Fang, J., Wang, Z., Wang, P. and Wang, M. (2020). Extraction, Structure and Bioactivities of the Polysaccharides from *Ginkgo biloba*: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1897-1905.
52. Maydanovych, O. and Beal, P. A. (2006). Breaking the Central Dogma by RNA Editing. *Chemical Reviews*, 106(8), 3397-3411.
53. Ponting C. P. and Belgard T. G. (2010). Transcribed Dark Matter: Meaning or Myth?. *Human Molecular Genetics*, 19, R162-R168.
54. ENCODE Project Consortium. (2004). The ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) project. *Science*, 306(5696), 636-640.
55. Eddy, S. R. (2001). Non-Coding RNA Genes and the Modern RNA World. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), 919-929.
56. Ameruoso, A., Gambill, L., Liu, B., Kcam, M. C. V. and Chappell, J. (2019). Brave New 'RNA' world—Advances in RNA Tools and Their Application For Understanding and Engineering Biological Systems. *Current Opinion in Systems Biology*, 14, 32-40.
57. Palazzo, A. F. and Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: What is Functional and What is Junk?. *Frontiers in Genetics*, 6, 2.
58. Marakli, S. (2018). Identification and Functional Analyses of New Sesame Mirnas (*Sesamum indicum* L.) and Their Targets. *Molecular Biology Reports*, 45, 2145-2155.
59. Gibb, E. A., Brown C. J. and Lam W. L. (2011). The Functional Role of Long Non-Coding RNA in Human Carcinomas. *Molecular Cancer*, 10, 38.
60. Li, Z., Zhao, W., Wang, M. and Zhou, X. (2019). The Role of Long Noncoding RNAs in Gene Expression Regulation. Vlachakis, D. (ed.). *Gene Expression Profiling in Cancer*, IntechOpen.
61. Li, Z., Zhao, W., Wang, M. and Zhou, X. (2019). The Role of Long Noncoding RNAs in Gene Expression Regulation. Vlachakis, D. (ed.). *Gene Expression Profiling in Cancer*, IntechOpen.
62. Nigita, G., Marceca, G. P., Tomasello, L., Distefano, R., Calore, F., Veneziano, D. and Croce, C. M. (2019). ncRNA Editing: Functional Characterization and Computational Resources. Lai, X., Gupta, S. K., Vera J. (eds.). *Computational Biology of Non-Coding RNA*, Humama Press.
63. Pradas-Juni, M., Hansmeier, N. R., Link, J. C., Schmidt, E., Larsen, B. D., Klemm, P. and Kiefer, C. A. (2020). A MAFG-lncRNA Axis Links Systemic Nutrient Abundance to Hepatic Glucose Metabolism. *Nature Communications*, 11(1), 1-17.
64. Wang, C., Ding, Q., Plant, P., Basheer, M., Yang, C., Tawedrous, E. and Yousef, G. M. (2019). Droplet Digital PCR Improves Urinary Exosomal miRNA Detection Compared to Real-Time PCR. *Clinical Biochemistry*, 67, 54-59.

65. Ma, Q., Wang, L., Yang, Y., Su, Y., Wang, T., Hou, Q. and Yao, H. (2020). Association Between lncRNA and GSK3 β Gene in Type 2 Diabetes Mellitus. *Clinica Chimica Acta*, 501, 66-18.
66. Syed, A., Iftikhar, R., Arif, M., Mahmood, A., Khan, S., Rizwan, M. and Munir, A. (2019). Computational Approach to Design Potential siRNA for CDKN2A Gene Silencing in Melanoma Through RNA Interference. *Gene Reports*, 17, 100469.
67. Davis, M. E., Zuckermann, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Yen, Y., Heidel, J. D. and Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in Humans From Systemically Administered siRNA Via Targeted Nanoparticles. *Nature*, 464, 1067-1070.
68. Majumdar, R., Rajasekaran, K. and Cary, J. W. (2017). RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations. *Frontiers in Plant Science*, 8, 200.
69. Egorova, A. A., Maretina, M. A. and Kiselev, A. V. (2019). VEGFA Gene Silencing in CXCR4-expressing Cells Via siRNA delivery by Means of Targeted Peptide Carrier. Kumar, L. D. (ed.). *RNA Interference and Cancer Therapy*, Humana Press.
70. Subhan, M. A. and Torchilin, V. P. (2019). Efficient Nanocarriers of siRNA Therapeutics for Cancer Treatment. *Translational Research*, 214, 62-91.
71. Bratkovič, T. and Rogelj, B. (2014). The Many Faces of Small Nucleolar RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(6), 438-443.
72. Bachellerie, J. P., Cavaillé, J. and Hüttenhofer, A. (2002). The Expanding snoRNA World. *Biochimie*, 84(8), 775-790.
73. Liang, J., Wen, J., Huang, Z., Chen, X. P., Zhang, B. X. and Chu, L. (2019). Small Nucleolar RNAs: Insight Into Their Function in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9, 587.
74. Reichow, S. L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A. R. and Varani, G. (2007). The Structure and Function of Small Nucleolar Ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research*, 35(5), 1452-1464.
75. Matera, A. G., Terns, R. M. and Terns, M. P. (2007). Non-coding RNAs: Lessons From the Small Nuclear and Small Nucleolar RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 209-220.
76. Zimta, A. A., Tigu, A. B., Braicu, C., Stefan, C., Ionescu, C. and Berindan-Neagoe, I. (2020). An Emerging Class of Long Non-coding RNA With Oncogenic Role Arises From the snoRNA Host Genes. *Frontiers in Oncology*, 10, 389.
77. Belli, V., Matrone, N., Sagliocchi, S., Incarnato, R., Conte, A., Pizzo, E. and Furia, M. (2019). A Dynamic Link Between H/ACA snoRNP Components and Cytoplasmic Stress Granules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1866(12), 118529.

78. Kawaji, H. and Hayashizaki, Y. (2008). Exploration of Small RNAs. *PLoS Genetics*, 4(1), e22.
79. Taft, R. J., Glazov, E. A., Lassmann, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P. and Mattick, J. S. (2009). Small RNAs Derived From snoRNAs. *RNA*, 15(7), 1233-1240.
80. Ghosh, Z., Chakrabarti, J. and Mallick, B. (2007). miRNomics the Bioinformatics of microRNA Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(1), 6-11.
81. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *Lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
82. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S. and Mello, C. (1998). Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
83. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858.
84. Barros-Viegas, A. T., Carmona, V., Ferreira, E., Guedes, J., Cardoso, A. M., Cunha, P. and Cardoso, A. L. (2020). miRNA-31 Improves Cognition and Abolishes Amyloid-B Pathology By Targeting APP and BACE1 in an Animal Model Of Alzheimer's Disease. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 19, 1219-1236.
85. Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116, 281-297.
86. Bologna, N., Schapire, A. and Palatnik, J. (2012). Processing of Plant microRNA Precursors. *Briefings in Functional Genomics*. 12(1), 37-45.
87. Unver, T. and Budak, H. (2009). Conserved microRNAs and Their Targets in Model Grass Species *Brachypodium distachyon*. *Planta*, 230, 659-669.
88. Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P. and Anderson, T. A. (2006). Conservation and Divergence of Plant microRNA genes. *The Plant Journal*. 46(2), 243-259.
89. Qu, A., Sun, M., Xu, L., Hao, C., Wu, X., Xu, C. and Kuang, H. (2019). Quantitative Zeptomolar Imaging of miRNA Cancer Markers with Nanoparticle Assemblies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(9), 3391-3400.
90. Kozomara, A., Birgaoanu, M. and Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA Sequences to Function. *Nucleic Acids Research*, 47, D155-D162.
91. İnternet: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Son Erişim Tarihi: 04.01.2021.
92. Zuker, M. (2003). Mfold Web Server for nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406-3415.

93. Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M. (2005). Blast2GO: A Universal Tool for Annotation, Visualization and Analysis in Functional Genomics Research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676.
94. Bedi, K., Paulsen, M. T., Wilson, T. E. and Ljungman, M. (2020). Characterization of Novel Primary miRNA Transcription Units in Human Cells Using Bru-Seq Nascent RNA Sequencing. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(1), lqz014.
95. Inoue, K., Ogonuki, N., Kamimura, S., Inoue, H., Matoba, S., Hirose, M. and Watanabe, N. (2020). Loss of H3K27me3 Imprinting in the Sfbmt2 miRNA Cluster Causes Enlargement Of Cloned Mouse Placentas. *Nature Communications*, 11(1), 1-12.
96. Pandey, M., Bansal, S. and Chawla, G. (2020). Molecular Approaches for Analysis of Drosophila microRNAs. Mishra, M. (ed.). *Fundamental Approaches to Screen Abnormalities in Drosophila*, Springer, New York, NY.
97. Chen, K. and Rajewsky, N. (2007). The Evolution of Gene Regulation by Transcription Factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics*, 8, 93-103.
98. Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C. et al. (2003). A Uniform System for microRNA Annotation. *RNA*, 9(3), 277-279.
99. Wei, S., Chen, G., Jia, X., Mao, X., Chen, T., Mao, D. and Xiong, W. (2020). Exponential Amplification Reaction and Triplex DNA Mediated Aggregation of Gold Nanoparticles for Sensitive Colorimetric Detection of microRNA. *Analytica Chimica Acta*, 1095, 179-184.
100. Hou, J. and Zhao, D. (2013). microRNA Regulation in Renal Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 13078-1309.
101. Meyers, B. C., Axtell, M. J., Bartel, B., Bartel, D. P., Baulcombe, D., Bowman, J. L. and Zhu, J. K. (2008). Criteria for Annotation of Plant microRNAs. *The Plant Cell*, 20(12), 3186-3190.
102. Provost, P. (2010). MicroRNAs as a Molecular Basis For Mental Retardation, Alzheimer's and Prion Diseases. *Brain Research*, 1338, 58-66.
103. Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D. and Wang, K. (2011). Extracellular microRNA: a New Source of Biomarkers. *Mutation Research*, 717, 85-90.
104. Becker, C., Riedmaier, I., Reiter, M., Tichopad, A., Pfaffl, M. W. and Meyer, H. H. (2011). Changes in the miRNA Profile Under the Influence of Anabolic Steroids in Bovine Liver. *Analyst*, 136(6), 1204-1209.
105. Zhang, B. H., Pan, X. P., Wang, Q. L., George, P. C. and Anderson, T. A. (2005) Identification and Characterization of New Plant microRNAs Using EST analysis. *Cell Research*, 15(5), 336-360.
106. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.

107. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
108. Lorenz, R., Bernhart, S. H., Zu Siederdisen, C. H., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F. and Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 26.
109. Zuker, M. and Stiegler, P. (1981). Optimal Computer Folding of Large RNA Sequences Using Thermodynamics and Auxiliary Information. *Nucleic Acids Research*, 9, 133-148.
110. Barozai, M. Y. K., Din, M. and Baloch, I. A. (2013). Structural and Functional Based Identification of the Bean (*Phaseolus*) microRNAs and Their Targets From Expressed Sequence Tags. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 14, 11-18.
111. Zhang, B. H., Pan, X. P., Cox, S. B., Cobb, G. P. and Anderson, T. A. (2006). Evidence that miRNAs are Different from Other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 246-254.
112. İnternet: URL: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>. Son Erişim Tarihi: 04.01.2021.
113. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
114. Saitou, N. and Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
115. Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
116. Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
113. Kruger, J. and Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: microRNA Target Prediction Easy, Fast and Flexible. *Nucleic Acids Research*, 34, 451-454.
114. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M. et al. (2000). Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. *Nature Genetics*, 25(1), 25-29.
115. Conesa, A. and Götz, S. (2008). Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, doi:10.1155/2008/619832.
116. Kanehisa, M. and Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30.

117. Barozai, M. Y. K. (2013). Identification of microRNAs and Their Targets in *Artemisia annua* L. *Pakistan Journal of Botany*, 45, 461-465.
118. Alptekin, B. and Budak, H. (2017). Wheat miRNA Ancestors: Evident by Transcriptome Analysis of A, B, and D Genome Donors. *Functional & Integrative Genomics*, 17(2-3), 171-187.
119. Marakli, S. (2020). *In Silico* Determination of Transposon-Derived miRNAs and Targets in *Aegilops species*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(10), 3098-3109.
120. Kohnehrouz, B. B., Bastami, M. and Nayeri, S. (2018). *In Silico* Identification of Novel microRNAs and Targets Using EST Analysis in *Allium cepa* L. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 10, 771-780.
121. Kaur, K., Duhan, N., Singh, J., Kaur, G. and Vikal, Y. (2020). Computational Identification of Maize miRNA and Their Gene Targets Involved in Biotic and Abiotic Stresses. *Journal of Biosciences*, 45(1), 1-17.
122. Aydinoglu, F. and Lucas, S. J. (2019). Identification and Expression Profiles of Putative Leaf Growth Related microRNAs in Maize (*Zea mays* L.) hybrid ADA313. *Gene*, 690, 57-67.
123. Bhan, B., Koul, A., Sharma, D., Manzoor, M. M., Kaul, S., Gupta, S. and Dhar, M. K. (2019). Identification and Expression Profiling of miRNAs in Two Color Variants of Carrot (*Daucus carota* L.) using deep sequencing. *PLoS One*, 14(3), e0212746.
124. Sabana, A. A., Antony, G., Rahul, C. U. and Rajesh, M. K. (2018). *In Silico* Identification of microRNAs and Their Targets Associated with Coconut Embryogenic Calli. *Agri Gene*, 7, 59-65.
125. Hussain, K., Mungikar, K., Kulkarni, A. and Kamble, A. (2018). Identification, Characterization and Expression Analysis of Pigeonpea miRNAs in response to *Fusarium* wilt. *Gene*, 653, 57-64.
126. Devi, K. J., Saha, P., Chakraborty, S., Rajwanski, R. (2018). Computational Identification and Functional Annotation of microRNAs and Their Targets in Three Species of Kiwifruit (*Actinidia* spp.). *Indian Journal of Plant Physiology*, 23, 179-191.
127. Galdino, J. H., Eguiluz, M., Guzman, F. and Margis, R. (2019). Novel and Conserved miRNAs Among Brazilian Pine and Other Gymnosperms. *Frontiers in Genetics*, 10, 222.
128. Gramzow, L. and Theißen, G. (2019). Plant miRNA Conservation and Evolution. de Folter S. (eds.). *Plant MicroRNAs. Methods in Molecular Biology*, vol 1932. Humana Press, New York, NY.
129. Song, X., Li, Y., Cao, X. and Qi, Y. (2019). MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant–Environment Interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 489-525.

130. Von Born, P., Bernardo-Faura, M. and Rubio-Somoza, I. (2018). An Artificial miRNA System Reveals that Relative Contribution of Translational Inhibition to miRNA-Mediated Regulation Depends on Environmental and Developmental Factors in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 13(2), e0192984.
131. Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669-687.
132. Zhao, M., Meyers, B. C., Cai, C., Xu, W. and Ma, J. (2015). Evolutionary Patterns and Coevolutionary Consequences of MIRNA Genes and microRNA Targets Triggered by Multiple Mechanisms of Genomic Duplications in Soybean. *The Plant Cell*, 27(3), 546-562.
133. Lu, Y. and Yang, X. (2010). Computational Identification of Novel microRNAs and Their Targets in *Vigna unguiculata*. *Comparative and Functional Genomics*, 2010, 1-17.
134. Das, A. and Mondal, T. K. (2010). Computational Identification of Conserved microRNAs and Their Targets in tea (*Camellia sinensis*). *American Journal of Plant Sciences*, 2, 77-86.
135. Hu, J., Zhang, H. and Ding, Y. (2013). Identification of Conserved microRNAs and Their Targets in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Biotechnology*, 164(4), 520-524.
136. Das, A., Chaudhury, S., Kalita, M. C. and Mondal, T. K. (2015). *In Silico* Identification, characterization and expression analysis of miRNAs in *Cannabis sativa* L. *Plant Gene*, 2, 17-24.
137. Zakeel, M. C. M., Safeena, M. I. S. and Komathy, T. (2019). *In Silico* Identification of microRNAs and Their Target Genes in Watermelon (*Citrullus lanatus*). *Scientia Horticulturae*, 252, 55-60.
138. Hajieghrari, B., Farrokhi, N., Goliaei, B. and Kavousi, K. (2018). *In Silico* Identification of Conserved miRNAs from *Physcomitrella patens* ESTs and Their Target Characterization. *Current Bioinformatics*, 14(1), 33-42.
139. Jike, W., Sablok, G., Bertorelle, G., Li, M. and Varotto, C. (2018). *In Silico* Identification and Characterization of a Diverse Subset of Conserved microRNAs in Bioenergy Crop *Arundo donax* L. *Scientific Reports*, 8(1), 16667.
140. Zhao, L., Chen, C., Wang, Y., Shen, J. and Ding, Z. (2019). Conserved microRNA Act Boldly During Sprout Development and Quality Formation in Pingyang Tezaocha (*Camellia sinensis*). *Frontiers in Genetics*, 10, 237.
141. Sanz-Carbonell, A., Marques, M. C., Bustamante, A., Fares, M. A., Rodrigo, G. and Gomez, G. (2019). Inferring the Regulatory Network of the miRNA-Mediated Response to Biotic and Abiotic Stress in Melon. *BMC Plant Biology*, 19(1), 78.
142. Zhu, Q-W. and Luo, Y-P. (2013). Identification of miRNAs and Their Targets in Tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Zhejiang University Science B*, 14, 916-923.

143. Prabu, G. and Mandal, A. (2010). Computational Identification of miRNAs and Their Target Genes From Expressed Sequence Tags of Tea (*Camellia sinensis*). *Genomics Proteomics & Bioinformatics*, 8(2), 113-121.
144. Yu, X., Hou, Y., Chen, W., Wang, S., Wang, P. and Qu, S. (2017). *Malus hupehensis* miR168 Targets to ARGONAUTE1 and Contributes to the Resistance Against *Botryosphaeria dothidea* Infection by Altering Defense Responses. *Plant and Cell Physiology*, 58(9), 1541-1557.
145. Liu, X., Tan, C., Cheng, X., Zhao, X., Li, T. and Jiang, J. (2020). miR168 Targets Argonaute1A Mediated miRNAs Regulation Pathways in Response to Potassium Deficiency Stress in Tomato. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-17.
146. Vaucheret, H. (2006). Post-Transcriptional Small RNA Pathways in Plants: Mechanisms and Regulations. *Genes & Development*, 20, 759-771.
147. Siré, C., Moreno, A. B., Garcia-Chapa, M., López-Moya, J. J. and San Segundo, B. (2009). Diurnal Oscillation in the Accumulation of *Arabidopsis* microRNAs, miR167, miR168, miR171 and miR398. *FEBS Letters*, 583(6), 1039-1044.
148. Ludman, M. and Fátýol, K. (2021). Targeted Inactivation of the AGO1 Homeologues of *Nicotiana benthamiana* Reveals Their Distinct Roles in Development and Antiviral Defence. *New Phytologist*, 229: 1289-1297.
149. Li, Y., Fu, Y., Ji, L., Wu, C. and Zheng, C. (2010). Characterization and Expression analysis of the *Arabidopsis* mir169 family. *Plant Science*, 178(3), 271-280.
150. Rao, S., Balyan, S., Jha, S. and Mathur, S. (2020). Novel Insights into Expansion and Functional Diversification of MIR169 Family in Tomato. *Planta*, 251(2), 55.
151. Wu, W., Wu, Y., Hu, D., Zhou, Y., Hu, Y., Chen, Y. and Chen, M. (2020). PncStress: A Manually Curated Database of Experimentally Validated Stress-Responsive Non-Coding RNAs in Plants. *Database*, doi: 10.1093/database/baaa001.
152. Luan, M., Xu, M., Lu, Y., Zhang, L., Fan, Y. and Wang, L. (2015). Expression of zma-miR169 miRNAs and Their Target ZmNF-YA Genes in Response to Abiotic Stress in Maize Leaves. *Gene*, 555(2), 178-185.
153. Moradi, K. and Khalili, F. (2018). Assessment of Pattern Expression of miR172 and miR169 in Response to Drought Stress in *Echinacea purpurea* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 507-512.
154. Khraiwesh, B., Zhu, J.K. and Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in Biotic and Abiotic Stress Responses of Plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137-148.
155. Liang, C., Liu, H., Hao, J., Li, J. and Luo, L. (2019). Expression Profiling and Regulatory Network of Cucumber microRNAs and Their Putative Target Genes in Response to Cucumber Green Mottle Mosaic Virus Infection. *Archives of Virology*, 164(4), 1121-1134.

156. Naqvi, A. R., Haq, Q. M., Mukherjee, S. K. (2010). MicroRNA Profiling of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (toLCDV) Infected Tomato Leaves Indicates that Deregulation of mir159/319 and mir172 might be Linked with Leaf Curl Disease. *Virology Journal*, 7, 281.
157. Li, Y., Zhao, S. L., Li, J. L., Hu, X. H., Wang, H. et al. (2017b). OsamiR169 Negatively Regulates Rice Immunity Against the Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front in Plant Science*, 8, 2.
158. Gu, M., Xu, K., Chen, A., Zhu, Y., Tang, G. and Xu, G. (2010). Expression Analysis Suggests Potential Roles of microRNAs for Phosphate and Arbuscular Mycorrhizal Signaling in *Solanum lycopersicum*. *Physiologia Plantarum*, 138(2), 226-237.
159. Li, S., Li, K., Ju, Z., Cao, D., Fu, D. et al. (2016). Genomewide Analysis of Tomato NF-Y Factors and Their Role in Fruit Ripening. *BMC Genomics*, 17, 36.
160. Fujii, H., Chiou, T. J., Lin, S. I., Aung, K. and Zhu, J. K. (2005). A miRNA Involved in Phosphate-Starvation Response in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 15, 2038-2043.
161. Chiou, T. J., Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Chiang, S. F. and Su, C. L. (2006). Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18, 412-421.
162. Hackenberg, M., Shi, B. J., Gustafson, P., Langridge, P. (2013). Characterization of Phosphorus-Regulated miR399 and miR827 and Their Isomirs in Barley Under Phosphorus Sufficient and Phosphorus-Deficient Conditions. *BMC Plant Biology*, 13, 214.
163. Zhu, F. R., Qiu, Z. B., Zhang, Y. M., Zhang, X. R. and Wang, W. L. (2020). Characterization and Functional Analysis of microRNA399 in *Cunninghamia lanceolata*. *Biologia Plantarum*, 64, 193-199.
164. Cuperus, J. T., Fahlgren, N., Carrington, J. C. (2011). Evolution and Functional Diversification of miRNA Genes. *The Plant Cell*, 23, 431-442.
165. Hu, B., Wang, W., Deng, K., Li, H., Zhang, Z., Zhang, L. and Chu, C. (2015). MicroRNA399 is Involved in Multiple Nutrient Starvation Responses in Rice. *Frontiers in Plant Science*, 6, 188.
166. Chen, J., Zheng, Y., Qin, L., Wang, Y., Chen, L. et al. (2016). Identification of miRNAs and Their Targets Through High-Throughput Sequencing and Degradome Analysis in Male and female *Asparagus officinalis*. *BMC Plant Biology*, 16(1), 80.
167. Wang, L., Zhao, J., Zhang, M., Li, W., Luo, K. et al. (2015). Identification and Characterization of microRNA Expression in *Ginkgo biloba* L. leaves. *Tree Genetics & Genomes*, 11(4), 76.
168. Wu, Y., Li, X., Wang, T., Guo, J., Cao, F. and Wang, G. (2020). *Ginkgo biloba* microRNA Profiling Reveals New Insight into Leaf Color Mutation. *Scientia Horticulturae*, 265, 109189.

169. Li, W., He, Z., Yang, S., Ye, Y., Jiang, H. and Wang, L. (2019). Construction and Analysis of A Library of miRNA in Gold-Coloured Mutant Leaves of *Ginkgo biloba* L. *Folia Horticulturae*, 31(1), 81-92.
170. Jung, I., Kang, H., Kim, J. U., Chang, H., Kim, S. and Jung, W. (2018). The mRNA and miRNA Transcriptomic Landscape of *Panax ginseng* Under the High Ambient Temperature. *BMC Systems Biology*, 12(S2), 27.
171. Zaporozhchenko, I. A., Rykova, E. Y. and Laktionov, P. P. (2020). The Fundamentals of miRNA Biology: Structure, Biogenesis, and Regulatory Functions. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 46(1), 1-13.
172. Mohanty, P., Ayachit, G., Mohanty, J. N., Pandya, H., Mankad, A. U. and Das, J. (2020). Documentation of Conserved and Novel miRNAs Participated in Plant Secondary Metabolic Pathways of Sanctified *Aegle marmelos*. *Gene Reports*, 100943.
173. Vakilian, K. A. (2020). Machine Learning Improves Our Knowledge About miRNA Functions Towards Plant Abiotic Stresses. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10.
174. The International HapMap Project Consortium. (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426, 789-796.
175. Siva, N. (2008). 1000 Genomes project. *Nature Biotechnology*, 26, 256.
176. Collins, F. S. and Barker, A. D. (2007). Mapping the Cancer Genome. *Scientific American*, 296(3), 50-57.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Servet BOZKURT
 Uyuğu : Türkiye Cumhuriyeti
 Doğum tarihi ve yeri : 05.05.1989 - Bitlis
 Medeni hali : Bekar
 e-posta : servetbarca@gmail.com



Eğitim Derecesi

Okul/Program

Mezuniyet Yılı

Önlisans	Celal Bayar Üniversitesi	2010
Lisans	Çukurova Üniversitesi	2016
Yüksek Lisans	Amasya Üniversitesi	2021

İş Deneyimi

Çalıştığı yer

Görevi

2011-	Türkiye Futbol Federasyonu	Profesyonel Lig Hakemi
2012-	Amasya Üniversitesi	Memur

Yabancı Dili

İngilizce

Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

1. Bozkurt, S ve Maraklı, S. (2020). Bazı süs bitkilerinde miRNA'ların tanımlanması ve hedeflerinin belirlenmesi. *9. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 18-20 Aralık 2020, Türkiye.

Eğitim Amaçlı Katıldığı Program ve Ülkeler;

1. Erasmus Programı çerçevesinde Finlandiya, İsviçre, İspanya, Portekiz (iki defa) katıldı.
2. Süs bitkilerinin Kuzey Afrika'daki yayılımını yerinde görmek üzere Fas'ta bulundu.