

**Mutualist kök simbiyozu olan endofitik arbüsküler  
mikorhiza *P. indica*'nın mikro-RNAlarının ilk kez  
saptanması**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 113Z038**

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Mahinur S. Akkaya

Araştırmacılar:

Kübra NARCI  
Burak DEMİRALAY  
Hasan OĞUL  
Fatih ÖLMEZ

Danışman:

Prof. Dr. Semra DEMİR

Bursiyerler:

Ayşe ANDAÇ  
Zemran MUSTAFA

AĞUSTOS 2014  
ANKARA

## ÖNSÖZ

Mutualist kök simbiyozu (ortakyaşar) olan *P. indica*'nın genom ve transkriptom analizi daha önce Zuccaro ve meslektaşları tarafından 2011'de rapor edilmiştir. 25 Mb genom uzunluğuna sahip *P. indica*'nın genomunun sekanslanması, canlı ve ölü arpa kökü üzerindeki kolonizasyonunu sağlayan transkriptom çıktılarının global karakterizasyonu mantarın yaşam döngüsüyle ilişkili genomik adaptasyonlarını bulmakta önemli rol oynamaktadır (Zuccaro ve ark., 2011).

Şimdiye kadar rapor edilen bilgilerde, *P. indica*'nın mikroRNA'larının (miRNA) araştırılmasına yönelik bir çalışma bulunamamıştır; fakat diğer bazı arbusküler mikorhiza mantarları ile bitki arasındaki simbiyoz ilişkide yer alan mikroRNA'lar çalışılmış ve simbiyoz ilişkinin oluşmasında önemli rolleri olduğu görülmüştür (Emanuel ve ark., 2011). Bu nedenle amacımız *P. indica*'nın mikroRNA'larının ya da mikroRNA benzer kısa RNA sekanslarının (milRNA) bulunmasına odaklanmıştır. Proje amacına ulaşmıştır; bu bitiş raporunda bulunan sekanslar sunulmuştur.

Proje TÜBİTAK tarafından 1002 hızlı destek programı kapsamında, 113Z038 nolu proje olarak desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	2
İÇİNDEKİLER .....	3
Tablolar Listesi .....	5
Özet .....	7
Abstract .....	8
1. Giriş .....	11
1.1 Genel Bilgiler .....	12
1.2 Kökde kolonileşme tipi .....	12
1.3 <i>P. indica</i> bitki ilişkisinde hormonların rolü .....	13
1.4 Transkriptom analizi .....	13
1.5 miRNA .....	14
1.6 RNAi .....	15
2. Gereç ve Yöntemler .....	15
2.1 Arpa ( <i>Hordeum vulgare</i> ) .....	15
2.2 Patojen ırkları .....	16
2.3 <i>P. indica</i> .....	16
2.3.1 <i>P. indica</i> büyüme koşulları .....	16
2.3.2 <i>P. indica</i> inokülasyonu .....	18
2.4 Patojen inokülasyonları .....	18
2.4.1 Bitki örnekleri, büyüme ve patojen enfeksiyon koşulları .....	18
2.4.2 Trypan mavisi boyaması .....	19
2.5 <i>Fusarium culmorum</i> kültürü .....	19
2.6 Küçük/Kısa RNA sekans analizi .....	20
2.7 Biyoenformatik analizler .....	20
3. Bulgular ve Tartışma .....	22
3.1 Arpa köklerinde mikorhiza oluşumunun saptanması .....	22
3.2 <i>P. indica</i> 'nın etkisinin arpada külleme hastalığına etkisi .....	23
3.3 <i>P. indica</i> 'nın etkisinin arpada küf hastalığına neden olan farklı Bgh ırkları ile incelenmesi .....	25
3.4 Bgh hif gelişimi .....	25
3.5 Arpa örneklerinin <i>P. indica</i> ve <i>F. culmorum</i> ile inokülasyonu .....	26

3.6 Hastalık baskılanmasının niceliksel karakterizasyonu.....	27
3.7 <i>P. indica</i> etkisinin killi toprakta saptanması.....	29
3.8 <i>P. indica</i> aday miRNA'ları.....	30
3.8.1 Küçük RNA'ların tanımlanması.....	30
3.8.2 miRNA tahmini.....	32
3.8.3 miRNA'ların nükleotit analizi.....	33
3.8.4 Olası aday miRNA seçilimi.....	34
3.8.5 Bitkideki hedef gen tahminleri psRNATarget tahminleri.....	35
4. Sonuç.....	44
Kaynaklar: .....	45

## Tablolar Listesi

2.1	Kaefer ortam maddeleri .....	17
2.2	Deneysel plan .....	18
2.3	Patates dekstroaz agar ortamı .....	19
2.4	Spezieller Nahrstoffarmer agar içeriği.....	20
3.1	Arpaların bitki boyu, sap solma uzunluğu, urmş yaprak sayısı, bitki ağırlığı, ve “Rot Crown Index” lmleri .....	28
3.2	Toplam okumanın niteliği ve niceliği .....	30
3.3	Bilinen küçük RNA tiplerinin dağılım sayıları .....	31
3.4	Organizma başına temiz okuma sayısı, tahmin edilen miRNA ve “hairpin” sa- toka yapı sayısı .....	32
3.5	Sadece <i>P. indica</i> 'da bulunan 500 ve üzeri okumalar elde edilmiş ve hedef gen analizi için “psRNATarget tool” da kullanılan aday 12 yeni miRNA.....	34
3.6	PsRNATarget aracı tarafından tahmin edilen isabet sayıları .....	35
3.7	Temiz okuma sayısı, tahmin edilen miRNA ve sa-toka yapı sayısı.....	35
3.8	Seçilmiş eşsiz miRNA sekansları.....	36
3.9	Seçilmiş bilinen miRNA sekansları ve onların en iyi homologları.....	37
3.10	Eşsiz miRNA'ların bitki genomların hedef bölge tahmini.....	37
3.11	Bilinen miRNA'ların bitki genomların hedef bölge tahmini.....	38
3.12	Hedef gen analiz sonuçları “psRNATarget tool”. Hedef genlerin “accession” numaraları ve genlerdeki homolog sekanlar.....	39
3.13	Bitkideki olası hedef genler.....	42

## Şekiller Listesi

2.1	Labratuvarımızda çeşitli buğday ve arpa hatlarında <i>P. indica</i> mikorhiza oluşumunun trypan mavisi görüntüleri .....	16
3.1	Arpa, Bülbül, köklerinin tryphan blue ile boyanması .....	23
3.2	Arpa köklerin <i>P. Indica</i> ile inokülasyonun ardından üfleme yoluyla Bgh-121 ile hastalık bulaştırılması .....	24
3.3	Arpa köklerinin <i>P. Indica</i> ile inoküle edildikten sonra, yaprakların üzerine üfleme yoluyla <i>P.mildew</i> 'un değişik suşları bulaştırılması.....	25
3.4	Arpa köklerinin <i>P. indica</i> ile inoküle edildikten sonra, yaprakların üzerine üfleme yoluyla Bgh B121 suşu bulaştırıldıktan 3 gün sonra mikroskop altında 10X büyütülmedeki görüntüler.....	26
3.5	<i>Fusarium culmorum</i> ve <i>Piriformospora Indica</i> Chlamyospore ile inoküle edilmiş arpa örneklerinde ekimden 20 gün sonraki resimleri.....	27
3.6	Arpa Michigan çeşidi killi toprakta <i>P. indica</i> ile inoküle edilmiş ve <i>P. indica</i> ile inoküle edilmemiş bitkiler .....	29
3.7	<i>P. indica</i> okuma uzunluğu dağılımlarını gösteren grafik .....	30
3.8	<i>P. indica</i> küçük RNA tanımlamalarının oranı .....	32
3.9	<i>P. indica</i> 'ya ait tahmini yeni miRNA'larda ilk nükleotidin eğilimini gösteren grafik	33
3.10	<i>P. indica</i> 'ya ait tahmini yeni miRNA'larda pozisyon baz eğilimini gösteren grafik	33
3.11	Tablo 3.8'da sunulan "novel" miRNA öncülerinin "hairpin" yapıları.	36

## Özet

Tarımda yaşanan kayıpların büyük bir bölümü elverişsiz iklim koşulları yüzünden oluşan abiyotik ve biyotik stres, haşereler ve bitki hastalıklarına neden olan patojen kaynaklıdır. Çevre üzerinde birçok zararlı etkisi olsa da bu kayıpları önlemek ve bitkinin verimliliğini artırmak, aşırı kimyasal kullanımına dayanmaktadır. Bitkilerde biyotik ve abiyotik strese karşı toleransı 80%'lere varan düzeylerde faydaya dayalı ilişki gösteren endofitik arbusküler mikorhiza mantarlar gibi mikroorganizmalar da sağlayabilmektedir. Böylece kimyasal kullanımın görece azalması çevreye verilen zararı da azaltılabilmektedir. Arpa ve *Arabidopsis thaliana*'da yapılan çalışmalarda, bir endofitik arbusküler mikorhiza olan *Piriformospora indica*'nın konağına, büyüme destekleyici aktivite sağladığı, tuz stresinde bitkinin tolerans düzeyini arttırdığı ve belirli yaprak ve kök patojenlerine karşı bitkinin dayanıklılığını artırabildiği rapor edilmiştir (Waller ve ark., 2005). Ayrıca bu mantar bitkinin büyümesine ve tohum üretimine yardım etmesiyle birlikte, nitrat ve fosfat alımını da harekete geçirmektedir (Camehl ve ark., 2011).

*Piriformospora indica* birçok bitki çeşidinin kökünde kolonileşebilen, bitkinin büyümesinde, belirli çevresel stres (abiyotik) koşullarına uyumda ve bazı patojenlere (biyotik stres) karşı direnç sağlamakta etkili olan endofitik bir mantar çeşididir. *P. indica* başlangıçta Hint Thar çölünde çalılarının kök yüzeyinde tespit edilmiştir; fakat özellikle tahıl bitkileri de dahil olmak üzere tek ve iki çenekli bitkilerin de köklerinde kolonileştiği ortaya çıkmış, yeni tanımlanmış bir organizmadır (Achatz ve ark., 2010). *P. indica*'nın çeşitli streslere karşı biyolojik savaşta yoğun olarak kullanılma potansiyeline ek olarak kolay kültüre alınabilmesi ve geniş bir konakçı grubu olması nedeniyle de bitki ve mikrop ilişkisini çalışılmasına olanak sağlayan bir model organizma olarak düşünülmektedir. Ayrıca bitki üretme sistemlerinin geliştirilebilmesi için yeni bir araç olarak kullanılacağı savunulmaktadır (Varma ve ark., 1999).

Mutualist kök simbiyozu (ortak-yaşar) olan *P. indica*'nın genom ve transkriptom analizi daha önce Zuccaro ve meslektaşları tarafından 2011'de rapor edilmiştir. 25 Mb'lık genom uzunluğuna sahip *P. indica*'nın genomunun sekanslanması, canlı ve ölü arpa kökü üzerindeki kolonizasyonunu sağlayan transkriptom çıktılarının global karakterizasyonu, mantarın yaşam döngüsüyle ilişkili genomik adaptasyonlarını bulmakta önemli rol oynamaktadır (Zuccaro ve ark., 2011).

Şimdiye kadar rapor edilen bilgilerde, *P. indica*'nın mikroRNA'larının araştırılmasına yönelik bir çalışma bulunamamıştır; fakat diğer arbusküler mikorhiza mantarları ile bitki arasındaki

simbiyoz ilişkide yer alan mikroRNA'lar çalışılmış ve simbiyoz ilişkinin oluşmasında önemli rolleri olduğu görülmüştür (Emanuel ve ark., 2011).

Projemizin amacı, özellikle de tahıllarda yaşanan ürün kayıplarının bir kısmını kapatabilecek üstün nitelikte olan bu mantarın mikro-RNA'larının (miRNA) saptanmasıdır. Bulunan miRNA'lar sonraki çalışmalarda buğday ve/veya arpa gibi tahıllarda biyotik strese karşı fayda sağlama amaçlı rolleri taranabilir. Aday mikro-RNA'ların bulunmuş olması organizmanın MıRNA jenerasyon mekanizmasının anlaşılması sağlayabilir bu sayede de uygulamaya yönelik stratejiler belirlemede yararlı olabilir.

Henüz literatürde *P. indica*'ya ait kısa RNA okumalarının sunulduğu bir makaleye rastlanmamıştır. Çalışmalarımızın sonuçları makale olarak hazırlanmaktadır. İlk kez yapılan bir çalışma olacağı için ilgi gösterilecek bir yayın olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** *Piriformospora indica*, ortak-yaşar organizma, bitki-fungus ilişkisi, mikroRNA.



## Abstract

The major portion of the losses in agriculture is caused by biotic and abiotic stress conditions due to unfavorable climate conditions, insects and plant diseases. Despite many harmful effects, excessive chemicals are used in order to prevent these losses and increase the yield of the plants. Biotic and abiotic stress tolerance in plants can be provided up to levels of 80% by the mutualistic relationship between arbuscular mycorrhizal fungi endophytic microorganisms and plant. Thus, it leads to decrease in the damage of environment by decreasing the usage of chemicals. Studies which are done with barley and *Arabidopsis thaliana* reported that *Piriformospora indica* which is an endophytic arbuscular mycorrhiza provides its host growth promoting activity, increased tolerance to salt stress and increased resistance to certain root or leaf pathogens (Waller et al., 2005). In addition, this fungus helps the plant for growth and seed production, also it promotes the intake of nitrate and phosphate (Camehl et al, 2011).

*Piriformospora indica* is a type of endophytic fungus which can colonize at the roots of many plant species and it promotes plant growth, leads adaptation to specific stress conditions and increases resistance to certain pathogens. This endophyte is a newly defined organism which was first discovered on the root surface of shrubs in Indian Thar desert; but it appeared that it colonizes on the roots of monocotyledonous and dicotyledonous plants, particularly in major cereal plants (Achatz et al., 2010). It is a model organism for studying plant-microbe relationship due to its ease of culture and broad range of host species and also it is a new tool for the development of plant production systems (Varma et al., 1999).

The genome and transcriptome analysis of mutualistic root symbiont *P. indica* have been reported previously by Zuccaro and his colleagues in 2011. The global characterization of the transcriptome responses of colonization on living and dead barley roots and the sequencing of the *P. indica* which has a 25 Mb genome provide information about genomic adaptations of this fungus associated with its life cycle (Zuccaro et al., 2011).

So far, there is no reported information about microRNAs of *P. indica*; but microRNAs which play roles in a very few number of studies on the other arbuscular mycorrhizal fungus, it was determined that some miRNAs regulate the formation of symbiosis relationship with plants (Emanuel ve ark., 2011).

The aim of our project is the detection of microRNAs in the fungus, of which there may be some having roles in preventing yield losses particularly in crops. Among the candidate miRNAs there may be some providing tolerance in biotic stress conditions to wheat and/or barley. Since the study will be the first report of candidate miRNAs of *P. indica*, we expect its impact will be a significant one.

**Keywords:** *Piriformospora indica*, mutualistic organism, plant-fungus interaction, microRNA.

## 1. Giriş

Proje simbiyotik bir mikorhiza olan *P. indica*'nın olgun (mature) mikroRNA ya da siRNA'larının sekanslanmasını amaçlanmıştır. miRNA ve siRNA'ların *P. indica*'nın bitki ile olan simbiyotik ilişkisinde önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir. Sekans analizi sonucunda elde edilen aday miRNA'ların, simbiyotik ilişkiyi yönlendiren ve kontrol edenlerinin bulunmasına yönelik bilgi üretilmiştir. Literatürde henüz bu organizmanın miRNA ve siRNA'larına dair bir bilgi mevcut olmadığı için, proje eksik olan bilgiyi tamamlayan orijinal sonuçların elde edildiği bir çalışma olmuştur.

MikroRNA'ların ökaryotik organizmalarda (miRNA'lar) gen anlatımını/ekspresyonunu düzenleyici moleküller olarak tanımlandığı ve bir çok biyolojik süreçte rol aldıkları gösterilmiştir (Gu ve ark., 2010). MikroRNA'lar hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunan küçük, endojen, kodlayıcı olmayan RNA'lardan oluşmaktadır (Jones-Rhoades ve ark., 2006). Olgun miRNA'lar genellikle 19-24 nükleotit uzunluğundadır ve hedef mesaj-RNA'larına (mRNA) bağlandıktan sonra kesen veya hedef mRNA translasyonunu baskılayan negatif post-transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası) düzenleyicilerdir (Jones-Rhoades ve ark., 2006). Son yıllarda, bir çok bitki miRNA'sı izole edilip belirlenmiş ve fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir. miRNA'ların bitki doku farklılaşmasında, gelişme ve büyümesinde, biyotik ve abiyotik streslere karşı tepkilerde rol aldıkları belirlenmiştir (Wang ve ark., 2007). Şimdiye kadar bitki ve nitrojen fikse eden bakteri arasındaki simbiyoz ilişkide ve arbüsküler mikorhiza oluşturan funguslarla bitkilerin arasındaki simbiyoz ilişkide rol alan miRNA'ların rolünün aydınlatılması için yapılan çalışmalar çok sınırlıdır (Emanuel ve ark., 2011). *P. indica* ile bitki arasındaki ilişkide rol alan miRNA'lar ise henüz bilinmemektedir. Projede olası mikro-RNA'lar ya da siRNA'lar, kısa RNA sekans analizi ile bilinen *P. indica*'nın genom sekansı referans alınarak saptanmıştır.

*P. indica*'nın miRNA'ları hem kendi genlerinin regülasyonunu hem de bitki içinde bitkiye ait genlerin regülasyonlarını belirliyor olabilirler. Bitki-patojen, ya da bitki-simbiyotik organizma ilişkisi alanında mikroorganizmanın mikroRNA'larının bitkinin hangi genlerini kontrol ettiği ile ilişkili çalışmalar çok az ve olası bulunan hedef genler ise bir kaç tanedir. Oysa bitkinin miRNA'larının hastalık dayanıklılığındaki rolleri ile ilgili çalışma sayısı daha çoktur.

*P. indica* clamidosporları olası miRNA'larına ait sekans bilgileri küçük/kısa (small RNA sequencing) RNA sekans analizi yöntemi ile elde edildikten sonra biyoformatik analizler yapmıştır, olgun mikroRNA'ları kodlayan genler ve bitkideki olası hedef genler saptanmıştır.

## 1.1 Genel Bilgiler

*Piriformospora indica* (*P. indica*) birçok bitki çeşidinin kökünde kolonileşen, bitkinin büyümesinde, belirli “abiotic” stres koşullarına uyumda ve bazı patojenlere karşı direnç sağlamakta etkili olan endofitik bir mantar çeşitidir. Bu endofit mantar, ilk kez Hint Thar çölünde çalıkların kök yüzeyinde tespit edilmiştir; fakat özellikle tahıl bitkileri de dahil olmak üzere tek ve iki çenekli bitkilerin de köklerinde kolonileşebildiği sonra gösterilmiştir (Achatz ve ark., 2010). Kolay kültüre alınabildiğinden ve geniş bir konakçı olduğundan dolayı *P. indica*, bitki ve mikrop ilişkisinin çalışılmasını sağlayan bir model organizma olarak düşünülebilir ve ayrıca bitki üretme sistemlerinin geliştirilebilmesi için yeni bir araçtır (Varma ve ark.,1999).

## 1.2 Kökte kolonileşme tipi

*P. indica* ilk önce hifleriyle birlikte köklerle temas kurup “appresoria” oluşmaktadır. Daha sonra kök tüylerinin korteks hücrelerinde inter- ve intraselülerli kolonileşme başlamaktadır; uzama ve meristem bölgesinde ise çok az kolonileşme görülmüştür (Varma ve ark.,1999). Bu kolonileşme biçimi *P. indica*'yı sadece interselülerli büyüyen ve çoğunlukla kökün korteks katmanının derinlerinde kolonileşen diğer arbüsküler mikorhizal mantarlardan ayırmaktadır (Deshmukh ve ark, 2006). Bir diğer farklılık ise *P. indica*'nın etkili bir şekilde kolonileşmesi konak hücrelerinin ölümüne bağlı olmasıdır; fakat kolonileşme sırasında bu mantarın diğer biyotrofik organizmalar gibi konağın plazma membranına girdiği ve konağın köküyle nekrotrof veya saprofit ilişki kurduğu görülmemiştir (Varma ve ark.,1999). Kolonileşmesinin konak hücrelerinin ölümüne bağlı olduğu arpadaki negatif hücre ölümü regülatörü olan BAX INHIBITOR-1'in baskılamasıyla gösterilmiştir (Schäfer ve ark, 2009). Kökteki ekstraselüler kolonileşme, inokülasyondan 1-2 gün sonra başlamaktadır. Bitki ve fungus arasındaki etkileşim ilerledikçe, yaklaşık 7 gün sonra kolonileşme artmakta ve kökün çevresi bu fungus tarafından kaplanmaktadır. Aynı zamanda inter- ve intra-selüler hifler kök korteks hücrelerinde çoğalır (Imany ve ark,2011).

*P. indica* hiflerine, kök endodermisin ötesinde, gövde veya yapraklarda rastlanmamıştır. Bu gözlem yapraktaki *P. indica tef* (transkripsiyon elongasyon factor) genine özel primerlerle yapılan real time PCR (RT-PCR) sonuçlarıyla doğrulanmıştır (Waller ve ark., 2005). Kolonileşme, kök ve korteksle sınırlı olduğu için yaprak patojenlerinde nasıl direnç sağladığı

ile ilgili çalışmalar yapılmıştır ve sistemik sinyallerle (sistemik kazanılmış dayanıklılık ve indüklenen sistemik direnç) direnç sağladığı sonucuna ulaşılmıştır (Stein ve ark., 2008).

### 1.3 *P. indica* bitki ilişkisinde hormonların rolü

Birçok bitki hormonlarının *P. indica*'nın bitkinin büyümesini desteklemesinde ve fungusun kolonileşmesinde görev aldığı gösterilmiştir. Örneğin, jasmonik asitin *P. indica*'nın *Arabidopsis thaliana*'nın köklerinde kolonileşmesinde ve külemeye karşı direnç sağlamasında yardımcı olduğu bulunmuştur (Stein ve ark., 2008). Ayrıca, bilindiği üzere gibberellin hormonu, sinyalleri, bitki ile fungusun ilişki kurmasında gereklidir; gibberelin sentezinin mutant olduğu arpalarda, normal arpalara göre *P. indica* kolonileşmesinin az olduğu görülmüştür (Schäfer ve ark., 2009). *P. indica* bulaştırılması sonucunda etilen "responsive" genlerinin aktif hale geldiği, *Arabidopsis thaliana*'da normale göre daha fazla kolonileşme olduğu görülmüştür, bu yüzden etilenin de *P. indica*'nın bitkiye sağladığı büyümede etkili olduğu düşünülmektedir. Fitohormon olan oksin ve sitokinin de *P. indica*'nın konağına sağladığı yararlar da etkili olduğu görülmüştür (Vadassery ve ark., 2008). Böylece bitki hormon düzeylerinin yanı sıra, sinyal mekanizmalarının da fungus tarafından ayarlandığı düşünülmüştür.

### 1.4 Transkriptom analizi

*P. indica*, 25 Mb uzunluğunda bir kaç tekrarlayan DNA dizileri ile çoğunun genlerden oluştuğu küçük bir genomu sahiptir (Zuccaro ve ark., 2011). *P. indica*'nın yaşam döngüsü ve konağına sağladığı direnç mekanizması hakkında bilgi edinebilmek için transkriptom analizleri yapılmıştır. Yaşam döngüsü ile ilgili olan genler *P. indica*'dan farklı olan Basidiomycota ve Ascomycota funguslarının genomuyla karşılaştırmalı transkriptom analizleriyle bulunmuştur. Direnç mekanizması için ise genellikle arpa ve *Arabidopsis thaliana* kullanılmıştır.

Ascomycota ve Basidiomycota ile yapılan karşılaştırmalı transkriptom analizi sonucunda *P. indica*'nın hem biyotropizm, hem de saprotropizmle ilişkili genomik adaptasyonları olduğu saptanmıştır. Biyotropi doğrultusunda, *P. indica*, konağına hasar vermekte diğer biyotrof funguslara göre sınırlı bir potansiyele sahiptir. Sitolojik çalışmalar biyotrofik evrenin

saprotropik evreyle devam ettiğini göstermektedir. Saprotropik evrede karşılıklı yarar sağlayan hücre ölümüne bağlı kolonileşme görülmüştür (Zuccaro ve ark., 2011).

*P. indica* kolonileşmesinin olduğu arpa kökleriyle yapılan transkriptom analizlerinin sonucunda arpanın bir yaprak patojeni olan *Blumeria graminis f. sp. hordei*'ye (*B. graminis*) karşı direnci artırmasında rol alan genler belirlenmiştir. İndüklenen sistemik dirençte yer alan genlerin belirlenmesi için *P. indica*'nın, bitkinin kökünde kolonileştiği ve kontrol örneklerde, *B. graminis*'le enfekte edilen arpa yapraklarının enfekte edilmesinden 12, 24 ve 96 saat sonra yapılan transkriptom analizleri karşılaştırılmıştır. 12 saat sonunda *P. indica* kolonilerinin olduğu örneklerle koloni oluşmayan transkriptom sonuçları karşılaştırıldığında 1,339 anlatımı artan ve 639 anlatımı azalan transkriptler, 24 saat sonunda 350 artan- ve 286 azalan transkriptler, 96 saat sonunda ise 81 artan- ve 86 azalan anlatım transkriptler saptanmıştır. *B. graminis* artan- ve azalan anlatım transkriptlerinin fonksiyonel gen kategorileri bulunmuştur. Bu analize göre 3 ayrı saatte saptanan, artan anlatım transkriptlerin hepsi savunma mekanizmasında ve protein katlanmasında yer almaktadır. Azalan anlatım transkriptler ise fotosentez ve karbon fiksasyonunda yer almaktadırlar. Sadece 12 saat sonunda yapılan karşılaştırmada artan anlatım transkriptler farklılık göstermektedir ve apoptozla intraselüler protein taşımada görev almaktadırlar (Molitor ve ark, 2011). *P. indica* ile arpa yapraklarında savunma mekanizmasında yer alan genlerin daha erken ve hızlı ekspresyon sağladığı (*B. graminis* enfekte olmuş arpa) bulunmuştur (Molitor ve ark, 2011).

## 1.5 miRNA

MikroRNA'lar (miRNA'lar) gen anlatımını/ekspresyonunu düzenleyici moleküller olarak tanımlanmış ve bir çok biyolojik süreçte rol aldıkları gösterilmiştir (Gu ve ark., 2010). MikroRNA'lar hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunan küçük, endojen kodlayıcı olmayan RNA'lardan oluşmaktadır (Jones-Rhoades ve ark, 2006). Olgun miRNA'lar genellikle 19-24 nükleotit uzunluğundadır ve hedef mRNA'lara bağlanıp kesen, translasyonunu baskılayan negatif post-transkripsiyonel düzenleyicilerdir (Jones-Rhoades ve ark., 2006). Son yıllarda, bir çok bitki miRNA'sı izole edilip belirlenmiş ve fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir. Bunların bitki doku farklılaşmasında, gelişme ve büyümesinde, biyotik ve abiyotik streslere karşı verdiği tepkilerde rol aldıkları belirlenmiştir (Wang ve ark., 2007).

Şimdiye kadar bitki ve arbüsküler mikorhiza oluşturan funguslarla bitkilerin arasındaki simbiyoz ilişkide rol alan miRNA'lar sınırlı da olsa çalışılmıştır (örneğin, *Medicago truncatula* non-mycorrhizal and mycorrhizal roots). Bu miRNA'ların simbiyoz ilişkisinin gelişmesinde öncülük ettiği görülmüştür (Emanuel ve ark., 2011). *P. indica* ile bitki arasındaki ilişkide rol alan ve bitkinin mesajlarını susturan miRNA'lar ise henüz çalışılmamıştır. Benzer bir organizma olan *Medicago truncatula*'da miRNA'ların varlığının gösterilmiş olması bizim projemizde de *P. indica* miRNA sekanslarını bulunacağını destekleyen bir bulgu olmuştur. Hatta yine *Medicago truncatula*'da simbiyotik ilişkide rolü olduğu saptanan miRNAlar rapor edilmiştir, bu bulgu ise *P. indica*'da da benzer işlevi olan miRNAların bulunabileceğinin iyi bir göstergesi olduğu için projede *P. indica*'da kısa RNA sekans analizi yapılmış ve aday miRNA'lar saptanmıştır.

## 1.6 RNAi

RNAi ökaryotlarda bulunan post-transkripsiyonel / transkripsiyonel gen susturma mekanizmasında yer almaktadır (Li ve ark, 2010). RNAi çalışmalarında kullanılan ilk model organizma bir ipliksi mantar olan *Neurospora crassa*'dır ve bu mantar ile yapılan çalışmalarda siRNA'lar ve miRNA'ların genom savunmasında ve gen regülasyonunda rol aldığı görülmüştür (Dang ve ark, 2011). RNAi, incelenen tüm ipliksi mantarlarda büyük ölçüde muhafaza edilmiştir ancak farklı işlevleri vardır (Dang ve ark, 2011), ipliksi mantarlardan biri olan *P. indica* içinde durumun aynı olduğu bu projede, kısa miRNA benzeri sekansların bulunması ile desteklenmiştir. *P. indica*'nın olgun miRNA üretecek mekanizmaya sahip olduğu da proje sonuçlarımızla desteklenmiş gözükmektedir, sonuçlarımız miRNA jenerasyon mekanizmasının diğer organizmalardan farklı olduğunu düşündürmektedir.

## 2. Gereç ve Yöntemler

### 2.1 Arpa (*Hordeum vulgare*)

Michigan ve Bülbül çeşitleri üzerinde uygulamalar yapılmıştır. Her ikisi de bilinen bir çok külleme hastalığı yapan (powdery mildew) *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* ırklarına duyarlıdır, yani hastalık oluşumu bir çok farklı ırk ile mümkündür.

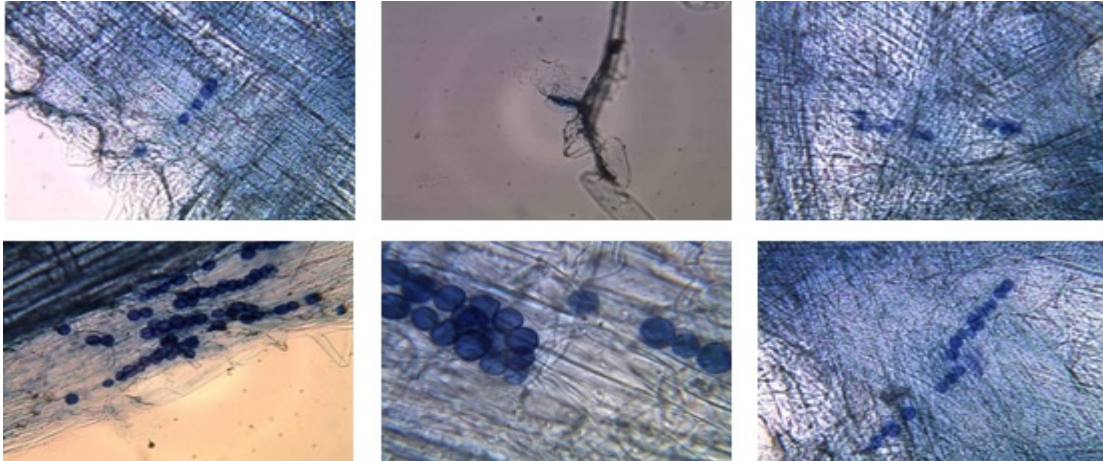
## 2.2 Patojen ırkları

**Külleme;** *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*: Bgh-121, Bgh-4, Bgh-21, Bgh-91, Bg-95, Bgh-97, Bgh-103, Bgh-120.

**Kök çürüklüğü;** *Fusarium culmorum*

## 2.3 *P. indica*

RNA izolasyonu yapılacak olan örnekler, *P. indica* clamidospor'larını devamlı olarak büyüten bir şirketten alınmıştır. Elde edilen RNA'dan miRNA ve kısa RNA sekans okumaları yaptırılmıştır. Proje başvurusu sırasında sunduğumuz üzere, laboratuvarımızda da, *P. indica*'nın buğday ve arpa bulaştırması çalışması başarılı olmuştur; yani mikorhiza oluşumu sağlanmıştır (Bakınız Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Laboratuvarımızda gerçekleştirilen çeşitli buğday ve arpa hatlarında *P. indica* bulaştırılması sonucu mikorhiza oluşumunun trypan mavisi ile boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri.

### 2.3.1 *P. indica* büyüme koşulları

Stok kültürü 15 g/L agar ile takviye edilmiş Kaefer ortamı içeren yatıkta tutuldu. Yatık 10 gün boyunca 30 °C'de bekletilip, daha sonra 40 °C'de saklanarak aşılındı. Aşlama için, *P. indica* ilk olarak Kaefer ortamında bir petri kabında büyütüldü (Tablo 2.1), ve daha sonra steril kabinin içinde sterilize mantar delici ile agar diskleri 8 mm delinerek tohum kültürü ortamına aktarıldı. Tohum kültürü, 14 gün süre ile, 200 rpm'de döner bir karıştırıcı üzerinde 30 °C'de, 100 mL patates dekstrozu sıvı besi yeri içeren 500 mL'lik bir şişe içinde büyütüldü. Alternatif olarak, patates ekstresi yerine, agarsız Kaefer ortamı da maksimum *P. indica* spor sayısını optimize etmek için denendi.



**Tablo 2.1.** Kaefer ortam maddeleri.

Bileşen	Derişim
Glikoz	20.0 g/L
Pepton	2.0 g/L
Maya özü	1.0 g/L
Kasamino asit	1.0 g/L
Vitamin stok çözeltisi	1.0 mL
Stoktan Makroelementler	50 mL
Stoktan Mikroelementler	2.5 mL
Agar	10 g/L
CaCl <sub>2</sub> , 0.1 M	1.0 mL
FeCl <sub>3</sub> , 0.1 M	1.0 mL
pH:6.5	
<b>Makroelementler Stok Çözeltisi (majör elementler)</b>	
NaNO <sub>3</sub>	120.0 g/L
KCl	10.4 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10.4 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.4 g/L
<b>Mikroelementler Stok Çözeltisi (eser elementler)</b>	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.0 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.0 g/L
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	5.0 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.0 g/L
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.6 g/L
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.6 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>27</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.1 g/L
Na <sub>2</sub> EDTA	50.0 g/L
<b>Vitamin Stok Çözeltisi (%)</b>	
Biotin	0.05
Nikotinamid	0.5
Piridoksal fosfat	0.1
Amino benzoik asit	0.1
Riboflavin	0.25

Maksimum spor sayısını elde etmek için değişen miktarlarda patates özü ortamı denendi. Patates küçük parçalar halinde kesilip farklı miktarlarda ortama; sonuç olarak *P. indica* 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L, 250 g/L ve son olarak 300 g/L gibi farklı miktarlarda patates özü içeren ortamlarda büyütüldü.

Farklı ortam koşullarında *P. indica* büyüdükten sonra 80–100 mL besiyerine, 1 mL Tween eklenip vortekslenip, karıştırıcı-öğütücü ile yerlerinden söküdü. Sonra, sporlar 'heamocytometer' ile 1mm<sup>2</sup> alana 10 µL hücre uygulanarak ölçüldü. Büyüme ortamının ve derişiminin etkisi, sporlar heamocytometer'da sayılarak test edildi.

Her iki besi yeri kültürü, patates özütü ya da Keafer ortamı koşulları arasında belirleyici bir fark bulunmadı. *P. indica* (passage) petri değiştirilerek steril kabinin içinde sterilize mantar delici ile elde edilmiş 8 mm agar diskleri üzerinde büyütülerek saklandı.

### 2.3.2 *P. indica* inokülasyonu

Arpa tohumları yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra 1 mM CaSO<sub>4</sub> içeren filter kağıdı arasına konularak 3 gün karanlıkta çimlendirildi. Çimlenen tohumlar saksılara transfer edilmeden önce bir kısmı süspansiyon şeklinde olan *P. indica* miselyumu ve sporları karışımı ile bir kısmı ise kontrol grubu olarak suyla inokule edildi. İnokülasyonlar 2.5 g *P. indica* miselyum ve sporları 20 mL süspansiyon kültürünün içinde her biri 3 bitki filizi içeren saksılara aktararak yapıldı. Daha sonra bitkiler 16 saat ışık, 22 °C sıcaklık ve 60% nem; 8 saat karanlık, 18 °C sıcaklıkta ve 70% nem şeklinde bitki büyütme dolabında 10-15 gün boyunca büyütüldü (Molitor ve ark., 2011).

## 2.4 Patojen inokülasyonları

### 2.4.1 Bitki örnekleri, büyüme ve patojen enfeksiyon koşulları

*P. indica* ile birlikte çimlendirilmiş olan tohumlar yukarıda belirtildiği gibi (Kısım 2.4.2) büyütüldü. Sonrasında *P. indica*'nın biyotik stres etkisini incelemek için hastalık yapan iki farklı patojen kullanıldı (Tablo 2.2). "Trypan blue" boyaması *P. indica* inokülasyonlarının düzeyini saptamak için de kullanıldı.

**Tablo 2.2.** Deneysel plan.

10-15 günlük bitkiler	Tür	<i>P. indica</i>	Patojen ve ırkları	İnceleme
Bülbül	Arpa	+	Bgh121	Örnek
Bülbül	Arpa	-	Bgh121	Kontrol
Bülbül	Arpa	+	Bgh4	Örnek
Bülbül	Arpa	-	Bgh4	Kontrol
Bülbül	Arpa	+	Bgh91	Örnek
Bülbül	Arpa	-	Bgh91	Kontrol
Bülbü	Arpa	+	Bgh95	Örnek
Bülbül	Arpa	-	Bgh95	Kontrol
Bülbül	Arpa	+	Bgh97	Örnek
Bülbül	Arpa	-	Bgh97	Kontrol
Bülbül	Arpa	+	Bgh103	Örnek
Bülbül	Arpa	-	Bgh103	Kontrol
Bülbül	Arpa	+	Bgh120	Örnek
Bülbül	Arpa	-	Bgh120	Kontrol
Bülbül	Arpa	+	Bgh21	Örnek
Bülbül	Arpa	-	Bgh21	Kontrol
Michigan	Arpa	+	<i>Fusarium culmorum</i>	Örnek
Michigan	Arpa	-	<i>Fusarium culmorum</i>	Kontrol

Bgh: *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

## 2.4.2 Trypan mavisi boyaması

*P. indica* ve *Blumeria graminis* bulaşması yapılmış arpa örnekleri üzerinde boyama işlemi Koch and Slusarenko,1990'da belirtildiği gibi yapılmıştır. Kök (*P. indica*) veya yapraklar (ve *Blumeria graminis* 2 dakika alkolik lactophenol trypan mavisi (20 mL etanol, 10 mL fenol, 10 mL su, 10 mL of laktik asit [%83], ve 10 mg trypan blue) içinde kaynatılıp, kloral hidrat çözeltisi (2.5 g/mL su) ile yaklaşık bir gün boyunca oda sıcaklığında yıkandı. Görüntüleme ışık mikroskobunda gerçekleştirildi.

## 2.5 *Fusarium culmorum* kültürü

*F. culmorum* izolatu orijinal olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ), Bitki Koruma Bölümünün mantar stoklarından temin edilmiştir. Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamında büyütülen *F. culmorum* (Tablo 2.3) petri kaplarına ekildikten sonra, 22 °C' de iki hafta boyunca bekletilmiştir.

**Tablo 2.3.** Patates dekstroz agar ortamı.

Bileşen	Miktar
Soyulmuş ve dilimlenmiş patates	200 g
Dekstroz	20 g
Agar	20 g
Distile Su	1000 mL'ye tamamlanır

*Fusarium culmorum* spor süspansiyonunu elde etmek için, fungus SNA besi yerinde (Spezieller Nährstoffarmer agar; Tablo 2.4) 10 gün 24 °C'de, geliştirme kabini içinde inkübe edilmiştir. Daha sonra kültür üzerine steril saf su eklenerek, hafifçe kazıma yoluyla sporların suya geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyon 4 katlı steril tülbent yardımıyla süzülmüş, thoma lamı yardımıyla yoğunluğu  $10^6$  spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen seyrelti hemen 2 ml'lik hacimlere ayrılmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Bulaştırma yapılmadan hemen önce soğutucudan çıkarılan süspansiyonlar yine soğuk zincir bozulmadan iklim odasına taşınmış ve böylelikle bitkiye bulaştırmadan önce sporların çimlenmesi ve aktivite kaybı önlenmiştir. *P. indica* bulaştırılan arpalar on gün bakımları yapıldıktan sonra yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanmış olan *F. culmorum* ile inoküle edilmiştir. *P. indica*'nın etkisi için analizler patojen bulaştırılmasından 10 gün sonra yapılmıştır.

**Tablo 2.4** Spezieller N hrstoffarmer agar içeriği.

Bileşen	Miktar
Sukroz	0.2 g
Glukoz	0.2 g
KNO <sub>3</sub>	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
NaCl	0.5 g
Agar	12 g
Distile Su	1000 mL'ye tamamlanır

## 2.6 K  uk/Kısa RNA sekans analizi

RNA *P. indica* "chlamydospore" larından trizol rutin RNA saflaŐtırma yöntemi kullanılarak elde edilmiş ve  rnekler BGI'a kurubuz içinde gönderilmiştir. Derin dizilim analizi Beijing Genomik Enstitüsünde (BGI, Shenzhen, China) Illumina genom sekans analizör (Illumina, SanDiego, CA,USA) kullanılarak yapılmıştır. Total RNA izolatları, uzunluklarına göre ayrıŐtırılmalarından sonra k  uk RNA sekansları (15-30 nükleotit) izole edilmiş ve 5' ve 3' adaptörleri sRNA'lara baĐlatılmıŐ ve ile sekanslamaya hazır çift sarmal DNA elde etmek üzerlerine RT-PZR (eŐ zamanlı - polimerizasyon zincir reaksiyonu) yapılmıştır. PZR  r nleri yüksek teknoloji Solexa sekanslama stratejisi ile sıranıp daha sonra, düşük kaliteli etiketler, primer ve adaptor dizileri çıkarıldıktan sonra aday miRNA'lar bulunmuştur (Small RNA v1.5 Sample Preparation Guide, Illumina).

## 2.7 Biyoformatik analizler

Kısa oligonükleotid hizalama programı SOAP (R. Li, Li, Kristiansen, & Wang, 2008) ile nihai temiz okumalar, ilgili genomun içinde haritalanmıştır. K  uk RNA'ları, rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA gibi kendi tipine göre açıklamalar koymak için NCBI genbank veritabanındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ve Rfam veritabanındaki (<http://rfam.xfam.org/>) ve BGI'nin kendi birikimleri kullanılmıştır. Hg18 veritabanındaki (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html>) tekrar birikim ile eşleşen k  uk RNA'lar, tekrar-ilgili k  uk RNA olarak tanımlanmıştır. K  uk RNA dizileri genomik bölgelere hizalandırılmıŐ ve homolog k  uk RNA'ların bilinen türlerin i indee tanımlanması için, miRBase veritabanındaki veriler (<http://www.mirbase.org/>) kullanılmıştır.

Daha sonra bir miRNA tahmin algoritması olan MIREAP (BGI) genomu hedeflenen small RNA dizilerine uygulandı. Bu algoritma, miRNA'ları RNA dizilerini derin sekanslama tarafından oluşturulan bir RNA kütüphanesinden, hem bilinen hem yeni miRNA'ları tanımlamak için kullanılmıştır. miRNA'ların yapısı onlara karşılık gelen saç-tokası yapısının minimal serbest enerji hesaplaması (MFE) ile tahmin edilir. Bu miRNA'lar yeni miRNA olarak atanmıştır.

### 2.7.1 Referans genom DNA verisi

*Piriformospora indica* DSM 11827 tüm genom sekansı, (Bioproject: PRJEA76339). Sekanslama MWG (Almanya) tarafından yapıldı.

### 2.7.2 miRNA'ların küme analizi

Bilinen ve "novel" (eşsiz) miRNA dizilerin derlemesi: Bilinen miRNA verilerinden benzer sekansları tanımlamak ve yeni sekansları bilinen miRNA benzerleri ile zenginleştirmek için kümeleştirilmiştir. Bu işlem için Narci et al, 2014 tarafından yayımlanan son makalede açıklanan boru hattı-kullanılmıştır. Makalede anlatılan tekniklerden, sekansını belirlemek için Smith-Waterman algoritması (Smith & Waterman, 1981) ve küme analizi için SOTA (*Self-Organizing Three Algorithm*)(Dopazo, Wang, de la Fraga, Zhu, & Carazo, 1997; Javier Herrero, Valencia, & Joaquin, 2001) kullanılmıştır. Kullanılacak yöntemler veri setlerinin aralığına ve Dunn Endeks hesaplamalarına (DI) (Dunn, 1973) göre kararlaştırılmıştır. Önceden tanımlanmış küme sayıları, veri setlerinin büyüklüğüne göre düzenlenmiştir ve aynı boyuttaki kümeler her veri kümesi için hedeflenmiştir. Küme analizden sonra, fazlalık yeni miRNA dizileri, kolay bir kullanım için, veri kümesinden çıkarılmıştır. Ayrıca, bilinen miRNA setleri ile zenginleştirilmiş kümeler ayrıştırılmış kalan kümeler, en azından bir homoloji miRNA sekansı ile zenginleştirilmiştir, ve aynı anda bu kümelerin kendi sekanslarına homolog olduğu görülmüştür.

### 2.7.3 miRNA'ların hedef analizi

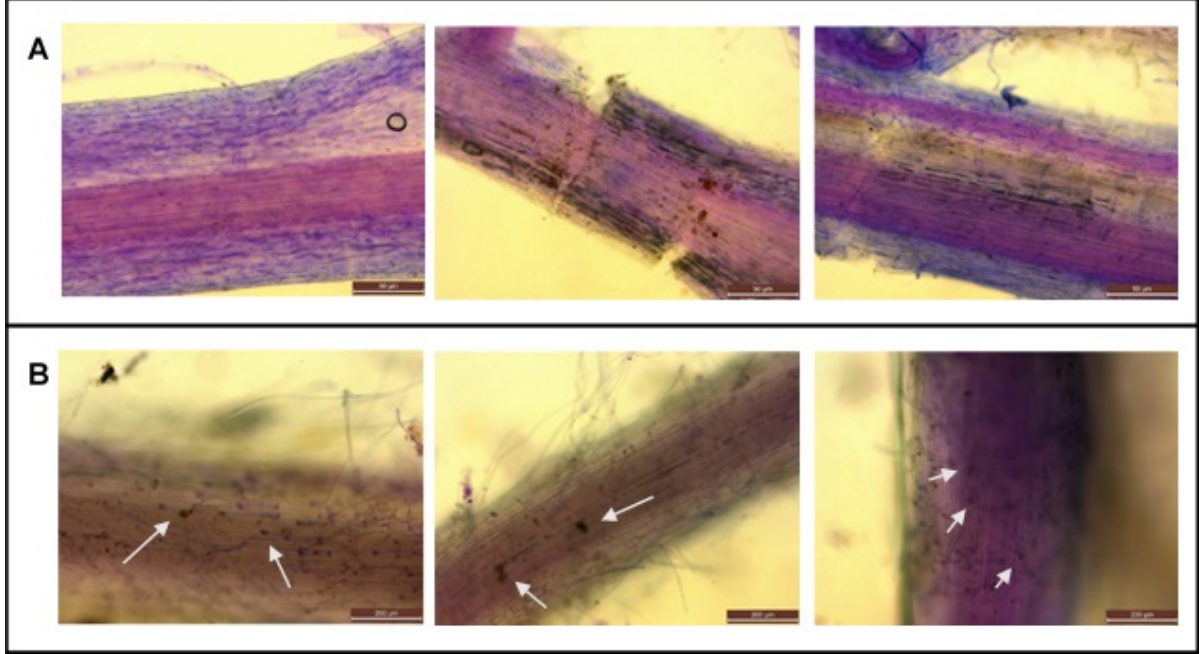
psRNATarget (Dai & Zhao, 2011) belirli bir küçük RNA sekansının bitki genomlarında olası hedef yerlerini bulmak için kullanılan bir web uygulamasıdır. Aracı algoritma Smith-Waterman algoritmasının değiştirilmiş bir versiyonu olan dinamik programlama yolunu kullanır. Temelde, miRNA'ya eşleşen hedef sekanslarını tarar. Bu aracın, bitki genomlarını içeren çok geniş bir veritabanı vardır. psRNATarget sadece bitki-miRNA ilişkileri için tasarlanmış, memeli miRNA'ların baz eşleşmesi bitkilerden daha farklı olduğunu dikkate aldığımızda, değerli bir araçtır (B. Bartel & Bartel, 2003; Pratt & MacRae, 2009). Aracın iki önemli işlevi vardır. Birincisi küçük RNA ve hedef sitesi arasında ters tamamlayıcı eşleştirmesini ve ikincisi saç tokası yapısının açılması için gereken eşleşmemiş enerjiyi (UPE) hesaplaması. Bilinen ve yeni miRNA veri setleri analizimizde psRNATarget aracı ile analiz edilip, sonuçlar metin dosyalarında toplandı.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1 Arpa köklerinde mikorhiza oluşumunun saptanması

*Piriformospora indica* chlamydospore (Klamidospor) mikorhiza oluşumu inoküle edilmiş arpa Arpa (*Hordeum vulgare* L.) köklerinde 10. günün sonunda tryphan blue boyaması ile saptanmıştır (Şekil 3.1 B). *P. indica* ile inoküle edilmemiş arpa köklerinde böyle bir oluşum gözlemlenmedi (Şekil 3.1 A).

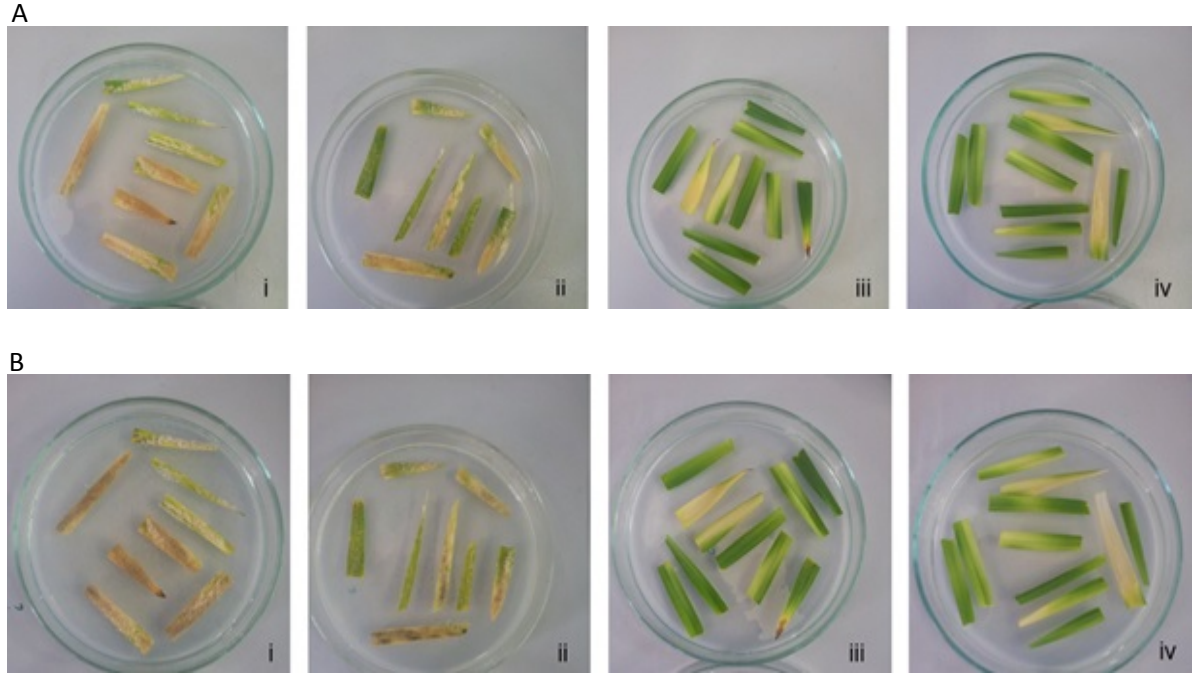
Boyama için örnekler saksıdan rastgele beş bitki köküyle beraber topraktan çıkartılıp seçilmiştir. Örnek bitkilerin kökündeki oluşumlar saksıdaki bütün bitkilerde aynı olduğu varsayılarak, saksıdaki bitkiler (15-30 bitki) diğer deneylerde kullanılmıştır.



**Şekil 3.1.** Arpa, Bülbül, köklerinin tryphan blue ile boyanması, (A) Kontrol örnekler, (B) *P. indica* ile inoküle edilmiş örnekler. *P. indica* inokülasyonu çimlendirme/ekim sırasında, boyama ise çimlenmeyi izleyen 10. günde yapıldı. Mikorhiza oluşumları beyaz oklarla gösterilmiştir. Görüntüler 10X boyutunda alınmıştır (Leica DM4000B microscope / DFC 280 camera).

### 3.2 *P. indica*'nın etkisinin arpada külleme hastalığına etkisi

Arpa (*Hordeum vulgare L.*) Bülbül çeşidi köklerinin *Piriformospora Indica* chlamyospore ile inoküle edildikten sonra, yapraklar su agarı üzerine alınmış ve *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh), Bgh-121 ırkıyla bulaştırılmıştır. *P. indica*'nın olası koruyucu ya da hastalık oluşumunu azaltıcı etkisinin olup olmadığı Bgh bulaştırıldıktan 10 ve 13 gün sonra incelenmiştir. Aşağıda görüldüğü üzere (Şekil 3.2 A ve B), *P. indica* uygulaması yapılmış olan örneklerle yapılmamış olan kontrol örnekler üzerinde belirgin bir farklılık oluşmamıştır.



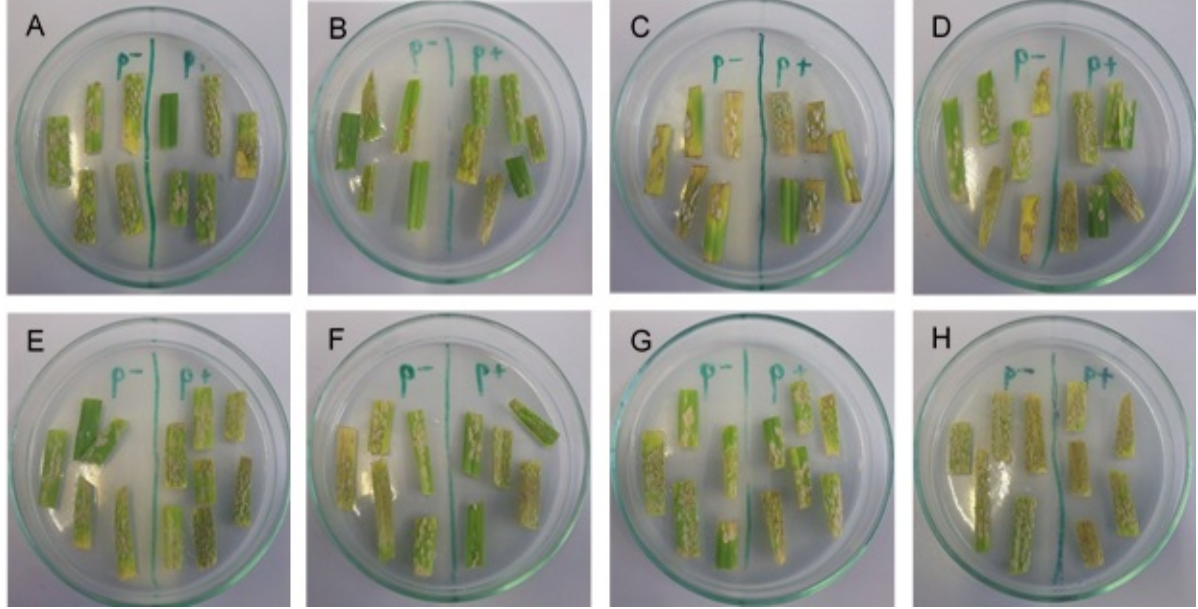
**Şekil 3.2.** Arpa köklerin *P. Indica* ile inokülasyonunun ardından üfleme yoluyla Bgh-121 ile hastalık bulaştırılması (i) + *P. indica*, + Bgh-121; (ii) - *P. indica*, + Bgh-B121; (iii) +*P. indica*, - Bgh-121; (iv) - *P. indica*, - Bgh-121. **A.** Resimler Bgh-121 bulaştırıldıktan 10 gün ve **B.** 13 gün sonra çekildi.

Bu deneylerde *P. indica*'nın kılleme hastalığına karşı etkinliği test edilmiş, ancak sonuçlar beklenilenin dışında olmuştur. *P. indica* ile inoküle edilmiş bitki yapraklarının üzerinde daha fazla Bgh-121 büyüdüğü saptanmıştır. Bu deney Bgh'in diğer ırklarında da aynı sonuçları gösterecek mi diye elimizde bulunan 8 ırk ile ayrı ayrı tekrarlanmıştır (Şekil 3.3).



### 3.3 *P. indica*'nın etkisinin arpada küf hastalığına neden olan farklı Bgh ırkları ile incelenmesi

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Bülbül çeşiti kökleri *Piriformospora Indica* "Chlamyospore" ile inoküle edildikten sonra su-agarı üstünde yapraklar Bgh ırklarıyla üfleme yoluyla bulaştırıldı.

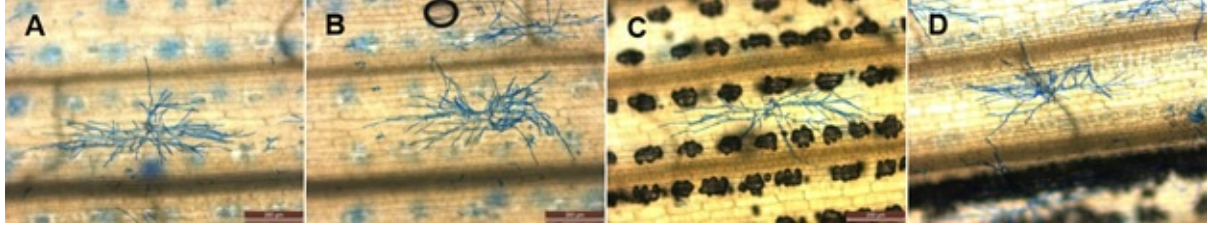


**Şekil 3.3.** Arpa (Bülbül) köklerinin *P. Indica* ile inoküle edildikten sonra, yaprakların üzerine üfleme yoluyla *P.mildew*'un değişik ırkları bulaştırıldı (A) B4 ırkı, (B) B21 ırkı, (C) B91 ırkı, (D) B95 ırkı, (E) B97 ırkı, (F) B103 ırkı, (G) B120 ırkı, (H) B121 ırkı. Resimler küf üflenmesinden 10 gün sonra çekildi. *P. Indica* inokülasyonu tohumların ekildiği gün yapıldı. Yapraklar ekimden 10 gün sonra kesilip su-agarına yerleştirilip aynı gün küf bulaştırılması yapıldı.

Bir önceki deneyde bulduğumuz bulgularla örtüşen bulgular elde edildi. Arpa köklerinin *P. indica* ile inokülasyonun ardından su-agarı üstünde büyüyen bitki yapraklarının üzerinde değişik ırkların hepsinde daha fazla büyüme gözlemlendi. Bununla beraber, hastalık gelişimi Bgh hif uzunlukları gözlemlenerek tekrar incelendi.

### 3.4 Bgh hif gelişimi

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Bülbül ırkı kökleri *Piriformospora Indica* "Chlamyospore" ile inoküle edildikten sonra su-agarı üstünde yaprakları Bgh-121 ırkının oluşturduğu hif gelişimi, patojen bulaşmasından 3 gün sonra mikroskop altında incelendi (Şekil 3.4)



**Şekil 3.4.** Arpa (Bülbül) köklerinin *P. indica* ile inoküle edildikten sonra, yaprakların üzerine üfleme yoluyla Bgh-121 ırkı bulaştırıldıktan 3 gün sonra trypan blue boyaması (Leica DM4000B microscope / DFC 280 camera). Görüntüler 10X büyütülerek alınmıştır. (A ve B) *P. Indica* ile inoküle edilmemiş bitkiler, (C ve D) *P. Indica* ile inoküle edilmiş bitkiler.

*P. Indica* inokülasyonu tohumların ekildiği gün yapılmıştır. Yapraklar 10. günde kesilip su-agarına konulup üstüne Bgh-121 üflemesi yapıp ışıklı ve nemli bitki büyütme dolabına yerleştirildi. Hastalığın bulaştırılmasından 3 gün sonra yapraklar mikroskop altında Trypan Mavi yöntemi ile boyandıktan sonra mikroskop altında 10X büyütülmede gözlemlendi.

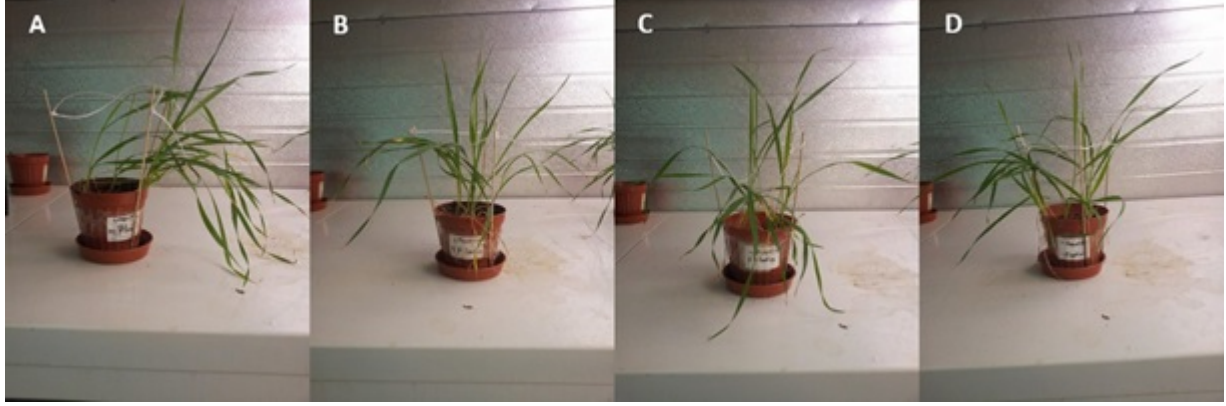
Alınan görüntüler neticesinde, *P. Indica* ile inoküle edilmiş ve *P. Indica* ile inoküle edilmemiş bitki yaprakların üstünde Bgh hif uzunlukları ve miktarında kayda değer bir değişim gözlemlenmedi.

Deneylerde beklenildiği gibi *P. indica*'nın külleme hastalığı oluşturan biyotrofik patojene karşı etkisiz kalmasının nedeni; yaprakların kesilmiş olmasından kaynaklanmış olabileceği gibi, bir başka neden ise mikorhizanın yeterli düzeyde oluşmamasından kaynaklanmış olabilir. Diğer yandan, proje danışmanı, mikorhiza uzmanı Sayın Prof. Dr. Semra Demir'e göre biyotrofik patojenlere karşı *P. indica*'nın hastalık oluşumunu önleme ya da azaltmada etkisiz olduğuna dair edindiği tecrübesi doğrultusunda gözlemlerimiz açıklanabilir. Sayın Demir'in önerisi doğrultusunda, arpada kök çürüklüğü hastalığına neden olan nekrotrofik bir mantar olan *Fusarium culmorum* ile testler yapılmıştır (Kısım 3.6). *P. indica*'nın sarı pas hastalığına olan etkisi ise, hastalık ajanının biyotrofik bir patojen olması nedeni ile çalışılmamıştır.

### 3.5 Arpa örneklerinin *P. indica* ve *F. culmorum* ile inokülasyonu

Arpa köklerinde mikorhiza oluşumu saptanmış örneklerde (10. gün, Şekil 3.5), *F. culmorum* bulaştırılması yapıldı. *F. culmorum* inokülasyonunun yapılmasından 10 gün (ekimden 20 gün) sonra bitkilerin resimleri çekildi. *P. indica* ve *F. culmorum* ile inoküle edilmiş bitkilerde (Şekil 3.5 B), sadece *F. culmorum* ile inoküle edilmiş olanlarla kıyaslandığında, yaprakların daha az sarardığı (hastalık semptomu) ve bitkilerin daha dik oldukları gözlemlenmiştir. *F.*

*culmorum* ile inoküle edilmemiş bitkilerde hiç yaprak sararması gözlemlenmedi (Şekil 3.5 C, D). Sadece *P. indica* ile inoküle edilmiş bitkiler (Şekil 3.5C) hiç uygulama yapılmamış olanlarla kıyaslandığında yaprak gelişimin daha sağlıklı olduğu gözlemlendi.



**Şekil 3.5.** *Piriformospora Indica* Chlamydozpor (Klamidospor) ile inoküle edilmiş arpa örneklerinde çimlenmeden sonra 10. ünde *F. culmorum* bulaştırılmış bunu takip eden 10 gün sonra görüntüler alınmıştır. **A:** +*P. indica* - *F. culmorum* **B:** +*P. indica* + *F. culmorum*; **C:** + *P. indica* - *F. culmorum*; **D:** - *P. indica* - *F. culmorum*.

Nekrotrofik bir patojen olan *F. culmorum*'dan kaynaklanan hastalık belirtilerinin, *P. indica* uygulanmış bitkilerde baskılandığı, ancak tümüyle ortadan kalkmadığı görüldü. Ayrıca *P. indica* uygulanmış ancak hastalık bulaştırılmamış bitkiler, *P. indica* uygulaması ve patojen bulaştırılması yapılmamış olan kontrol örneklerle karşılaştırıldığında, yapraklarının daha dik ve sağlıklı geliştiği gözlemlenmiştir. *P. indica*'nın nekrotrofik olan *F. culmorum*'a karşı hastalık semptomlarını baskıladığı sonucuna varılmıştır. Bunun üzerine hastalıktaki azalma niceliksel olarak incelenmiştir.

### 3.6 Hastalık baskılanmasının niceliksel karakterizasyonu

Arpalara *P. indica* inokülasyonu ve *F. culmorum* bulaştırılması yapıldıktan sonra (hastalandırılmanın 10. gününde) bitkiler kökleriyle beraber saksıdan çıkartılıp, kökteki topraklar suyla temizlendikten sonra ölçümler yapıldı. Bitki uzunluğu en uzun yaprağın ucundan toprağın üstünde kalan kısma (yeşilden beyaza dönmeye başladığı kısım) kadar ölçüldü. *F. culmorum* ile hastalanmış bitkilerde hastalık belirtisi olarak sap kısmında solma görülmüştür. Bu solmanın meydana geldiği yapraklarda solmanın uzunluğu ölçüldü. Bazı yapraklar hastalıktan kaynaklanan ya da kaynaklanmayan nedenlerden dolayı tamamı soldu. Örnek bitkilerde kaç yaprağın soldu kaydedildi. Ağırlıkları bitkiler topraktan su ile arındırılıp kurutulduktan sonra hasas tartıda tartıldı (Pioneer Ohaus PA4102). 'Rot Crown Index' ise

$$RCI = \left[ \frac{\text{Sap solma uzunlu\u011fu}}{\text{Bitki uzunlu\u011fu}} \right] \times (\text{\u00c7\u00fcr\u00fcm\u00fc\u015f yaprak sayısı})$$

form\u00fcl\u00fc ile hesaplandı.

**Tablo 3.1** Arpaların bitki boyu, sap solma uzunlu\u011fu, \u00c7\u00fcr\u00fcm\u00fc\u015f yaprak sayısı, bitki a\u011fırlığı, ve “Rot Crown Index” \u00f6l\u00e7\u00fcm\u00fcleri.

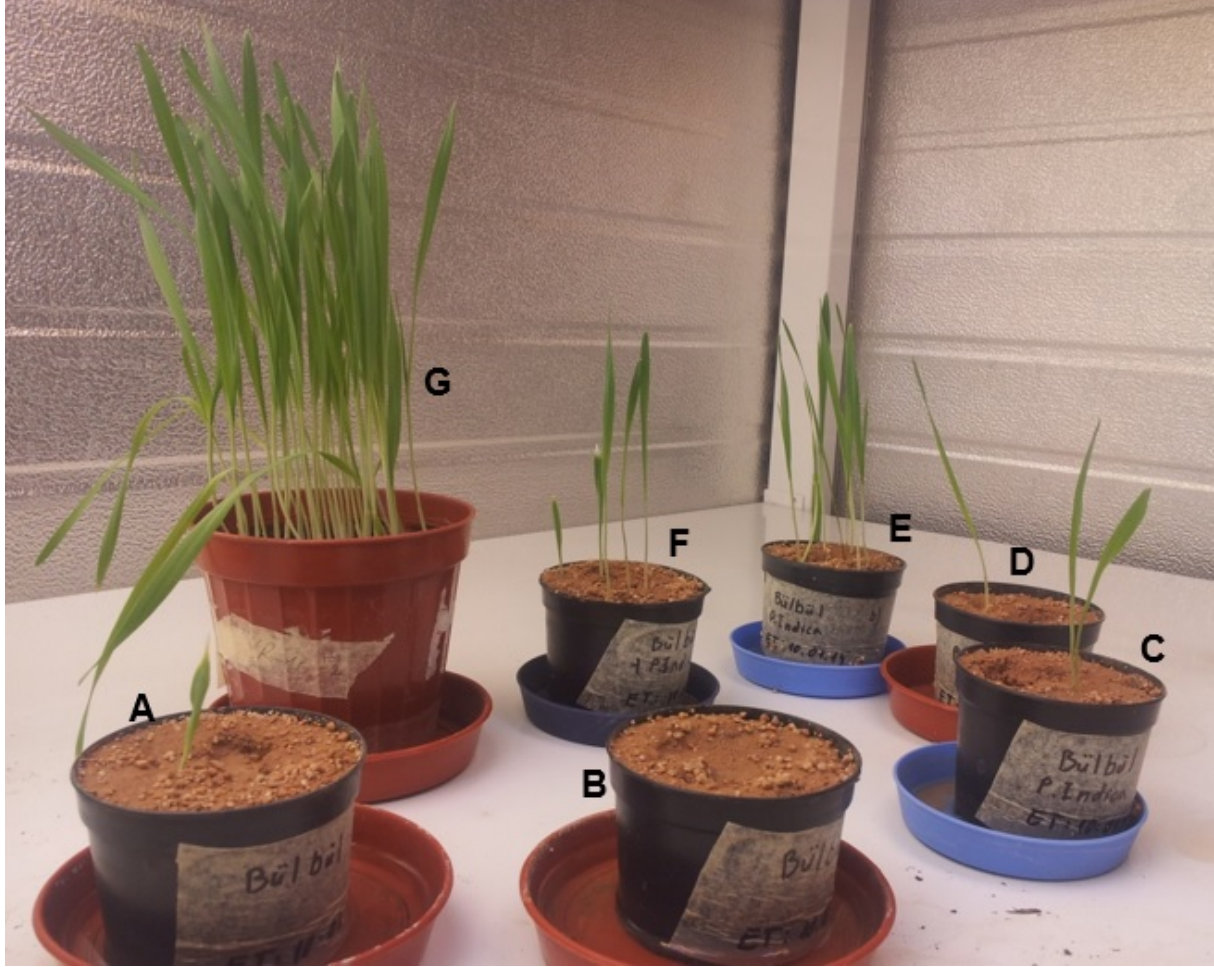
Hat/Genotype	Uygulama	Bitki no:	Bitki uzunlu\u011fu (cm)	Ortalama uzunluk	Sap solma uzunlu\u011fu (cm)	Ortalama sap solma uzunlu\u011fu	\u00c7\u00fcr\u00fcm\u00fc\u015f yaprak sayısı	Ortalama \u00c7\u00fcr\u00fcm\u00fc\u015f yaprak sayısı	Bitki a\u011fırlığı (g)	Ortalama a\u011fırlık	'Crown Rot index'	
<i>H. vulgare</i>	<i>F.culmorum</i>	<i>P.Indica</i>	1	46,5	46,9	5	1,3	2,4	1,65	2,116	0,21505376	
			2	41,5		0			2,01		0	
			3	45		1,5			1,92		0,06666667	
			4	47		0			2,06		0	
			5	54,5		0			2,94		0	
		Kontrol	1	43	38,992	4	2,1	3,2	1,81	2,634	0,27906977	
			2	45,5		0			2,98		0	
			3	42		2			0,94		0,28571429	
			4	59		4,5			3		4,35	0,22881356
			5	5,46		0			1		3,09	0
	Kontrol	<i>P.Indica</i>	1	42,5	51,5	0	0	0,6	2,05	2,9	0	
			2	55		0			1		3,53	0
			3	52		0			0		3,24	0
			4	52		0			0		3,01	0
			5	56		0			0		2,67	0
		Kontrol	1	41	47,4	0	0	1,6	2,27	2,594	0	
			2	47		0			3		1,6	0
			3	51		0			2		3,08	0
			4	44,5		0			0		2,71	0
			5	53,5		0			3		3,31	0

Patojen bulaştırılmasını takip eden 10 g\u00fcn sonra, bitkiler k\u00f6k\u00fcyle beraber saksıdan \u00e7ıkarılıp, \u00f6l\u00e7\u00fcm\u00fcler yapıldı. D\u00f6rt ayrı saksıda: 1) - *P. indica* + *F. culmorum*; 2) + *P. indica* + *F. culmorum*; 3) - *P. indica* + *F. culmorum*; 4) - *P. indica* - *F. culmorum* ile inok\u00fcle edildi. Her saksıdan rastgele 5 \u00f6rnek bitki alındı. Tabloda farklı saksılarda b\u00fcy\u00fcyen bitkilerin boyu ve ortalaması, sap solma uzunlu\u011fu ve ortalaması, \u00c7\u00fcr\u00fcm\u00fc\u015f yaprak sayısı ve ortalaması, bitkilerin a\u011fırlığı ve ortalaması ve 'Rot crown index' \u00f6l\u00e7\u00fcm\u00fcleri olu\u015fturuldu.

*F. culmorum* bulaştırılmış bitkilerde, bulaştırma yapılmamış olan bitkilere g\u00f6re uzunluk ve a\u011fırlıkta bir d\u00fc\u015f\u00fc\u015f ve \u00c7\u00fcr\u00fcm\u00fc\u015f yaprak sayısında artış g\u00f6zlemlendi. Hastalık bulaştırılmamış bitkilerde sap solması g\u00f6r\u00fcnmezken, *F. culmorum* ile inok\u00fcle edilmiş bitkilerde, *P. indica* uygulanmış ve *F. culmorum* ile hastalık bulaştırılmış olan bitkilere oranla daha fazla sap solması meydana geldi. Sonu\u00e7 olarak *F. culmorum* k\u00f6k \u00e7\u00fcr\u00fckl\u00fc\u011f\u00fc hastalık semptomlarını *P. indica*'nın azalttığı g\u00f6r\u00fcl\u00fcd\u00fc. Sadece *P. indica* ile inok\u00fcle edilmiş bitkiler ise *P. indica* uygulaması yapılmamış olan bitki \u00f6rnekleri ile kıyaslanınca daha uzun, daha a\u011fır, daha az sararmış yaprak sayısı g\u00f6zlemlendi. Elde edilen bu verilerle, *P. indica*'nın, bitkinin daha sa\u011flıklı geli\u015fmesi i\u00e7in yardımcı oldu\u011fu ve *F. culmorum*'un yarattığı k\u00f6k \u00e7\u00fcr\u00fckl\u00fc\u011f\u00fc hastalığı semptomlarını azalttığı do\u011frulanmıştır.

### 3.7 *P. indica* etkisinin killi toprakta saptanması

Mikorhiza oluşumunun killi toprakta daha çok olduğuna dair bazı sonuçlar olduğu için killi toprağın etkisi incelenmiştir. Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Michigan çeşidi köklerinin killi toprakta *Piriformospora Indica* "Chlamydo-spore" ile inokülasyonu sonrasında gelişimi incelenmiştir (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.** Arpa Michigan çeşidi killi toprakta *P. indica* ile inoküle edilmemiş (A), (B) ve (D) ve *P. indica* ile inoküle edilmiş bitkiler (C), (E) ve (F) *P. Indica* ile inoküle edilmiş bitkiler, (G) normal toprakta *P. Indica* ile inoküle edilmiş bitkiler. Resim bütün bitkilerin ekimden 10 gün sonraki uzunluğunu göstermektedir.

Normal toprak koşullarında yetişen tohumların (3.6G) daha kolay çimlenmeleri mümkün olduğu için, killi toprakta geç çimlenmeden kaynaklanan gelişim farkı gözlenmiştir (Şeki 3.6 A, B ve D). Ancak *P. indica*'nın tohumlara uygulandığı bitkilerdeki gelişimin, killi toprağa ekilmiş ancak *P. indika* işle bulaştırılmamış olan örneklerle kıyaslandığında (Şekil 3.6 C, E ve F) organizmanın bitkinin gelişimine etkisinin belirgin bir şekilde yarar sağladığı yaprak uzunluğu arasındaki farktan anlaşılmaktadır. Killi toprak gibi zorlu şartlarda ekimi yapılan

tahıllarda killi toprağın mikorhiza oluşumuna toprağın özelliğinden kaynaklanan nedenlerle sporların daha iyi ya da daha uzun süre tutunuk kalması nedeniyle bitki verimliliğini arttırıcı bir rol oynağıdığı düşünölmektedir. Dolasıyla, killi topraklarda tarım yapılan yerlerde bitkilerin verimliliğini artırmak için kullanılabileceğı görölmüşür.

*P. indica*'nın arpa gelişimini olumlu yönde etkilediğı ve verimliliğı arttırdığı, ayrıca nekrotrofik olan patojenlere karşı da hastalık oluşumunu azalttığı gözlenmiştir.

### 3.8 *P. indica* aday miRNA'ları

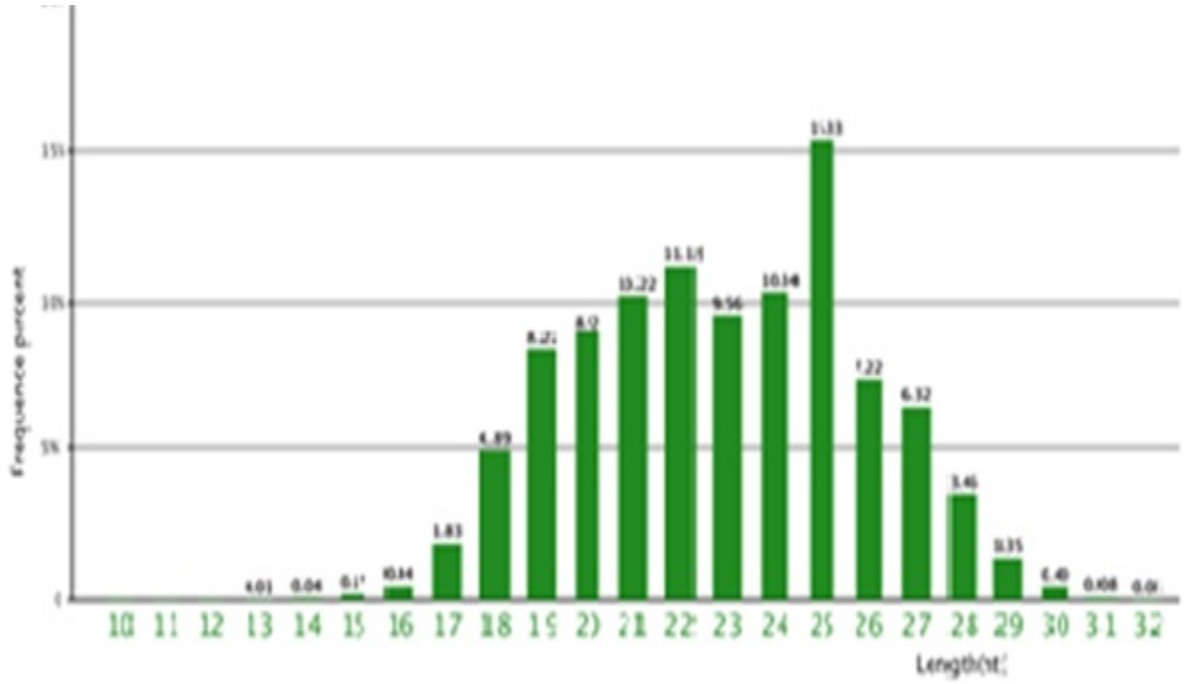
#### 3.8.1 Küçük RNA'ların tanımlanması

Tablo 3.2'de gösterildiğı üzere derin yüksek veri sekanslama Pi için toplamda 11 milyon okuma gösterdi. Toplam okumalardan 18 nt'den düşük küçük okumalar, 3 've 5' adaptörleri, poli A sekansları ve ve boş düşük kaliteli okumalar filtrelendi. Kalanlar açıklama için hazır temiz okumalardı. Bu sekanslar arasından 2 milyon – 5 milyon arasında sekans, eşsiz ve temiz sekanslardı.

**Tablo 3.2.** Toplam okumanın niteliğı ve niceliğı.

	Toplam Okuma	18 nt'ten küçük	3' adaptör	5' adaptör	Temiz Okumalar	Eşsiz temiz okumalar
<i>P. indica</i>	11744418	289475	19992	19548	11299452	2095999

Şekil 3.7'de eşsiz temiz okumaların uzunluk dağılımları gösterilmiştir. Uzunluk dağılımları, okuma numaralarının küçük RNA'ların uzunluğuna kıyasla hesaplanmıştır. Dağılımlar genellikle 13-32 nükleotit arasındadır. miRNA dağıtımları 20-24 arasındaki nükleotidlerden anlaşılabilir. Küçük RNA uzunluğu, açıklamayı karar vermek için çok önemlidir. Şekil 3.7 olası miRNA'ların uzunluk dağıtım grafiklerini temsil eder. *P.indica* olası miRNA uzunluğun dağılımı tam bir çan eğrisi değildir. Bu sonuç organizmaların işlevleri çok farklı olduğu için olmuş olabilir. Zorunlu parazitler olan Bgh ve Pst'ye göre, Pi karşılıklılıkı yaşayan (mutualizm gösteren) bir mantardır. Pi ve küçük RNA mekanizmasının simbiyotik yaşamı çok yeni ve bilinmeyen bir olgudur.

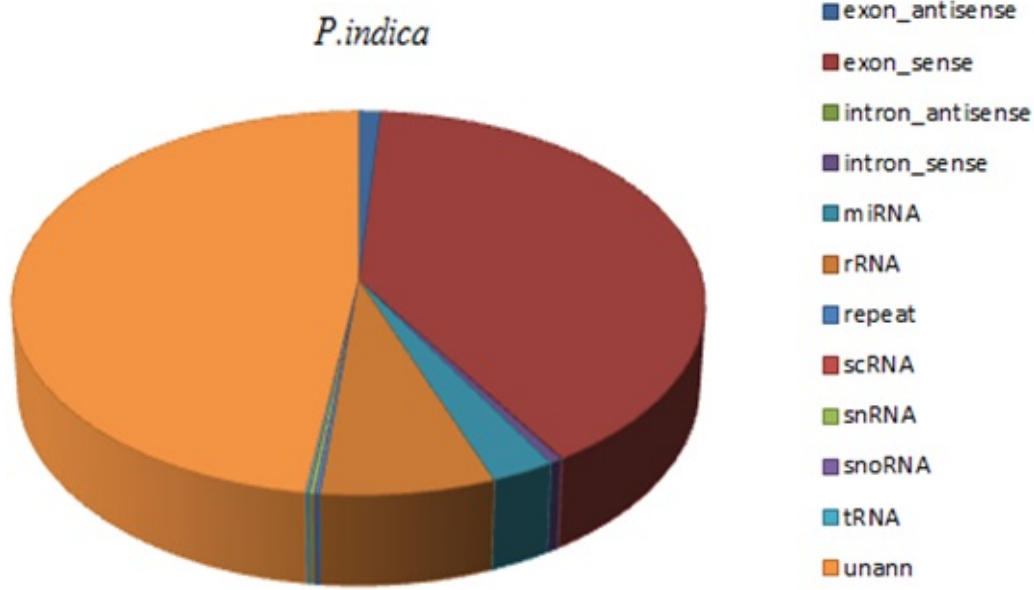


**Şekil 3.7.** *P. indica* okuma uzunluğu dağılımlarını gösteren grafik.

Temiz eşsiz okumalar, sRNA'lar bilinen miRNA'lar, rRNA'lar, tRNA'lar, snRNA'lar, snoRNA'lar, tekrar-ilişkili RNA'lar, intronlar ve eksonlara haritalanmıştır. Bilinen sRNA'lar anote edilmiş eşsiz küçük RNA'ların sayısı Tablo 3.3'de gösterilmektedir. Şekil 3.7'de organizmaların küçük RNA açıklamaları için dairesel grafik gösterilmiştir. İncelenmiş olası aday miRNA RNA sekansları Tablo 3.12 ve 3.13'de sunulmuştur, karılığın olan bitki hedef genleri ile birlikte).

**Tablo 3.3.** Bilinen küçük RNA tiplerinin dağılım sayıları.

Annotation	<i>P. indica</i>
exon_antisense	23829
exon_sense	837215
intron_antisense	1722
intron_sense	10869
miRNA	55336
rRNA	152198
repeat	4476
scRNA	13
snRNA	4650
snoRNA	482
tRNA	2971
unannotated	1002238



**Şekil 3.8.** *P. indica* küçük RNA tanımlamalarının oranı.

### 3.8.2 miRNA tahmini

*P. indica*'nın genom sekansları, karşılık gelen yöntem bölümünde tarif edildiği gibi, yeni miRNA tahminleri için kullanıldı. MIREAP algoritması "hairpin" (saç-tokası) ikinci yapıların tahminleri için kullanıldı. Genom analizinde 61 *P. indica* miRNA öncülleri tanımlandı. Tahmin edilen hairpin yapıları arasında bazıları yalnızca 3' çıkıntılar veya 5' çıkıntılar üretirken bazıları her iki taraftan da çıkıntılar üretti (Tablo 3.4). Eğer miRNA öncüllerinin eğer her iki ucunda da iki nükleotit "overhang" varsa bu örnekler daha yüksek olasılıkla miRNA adaylarıdır. "Minimum free energy" (Mfe) değerleri hairpin yapısının kararlılığını göstermektedir; düşük değerler bu yapıların daha kararlı olduğuna işaret eder.

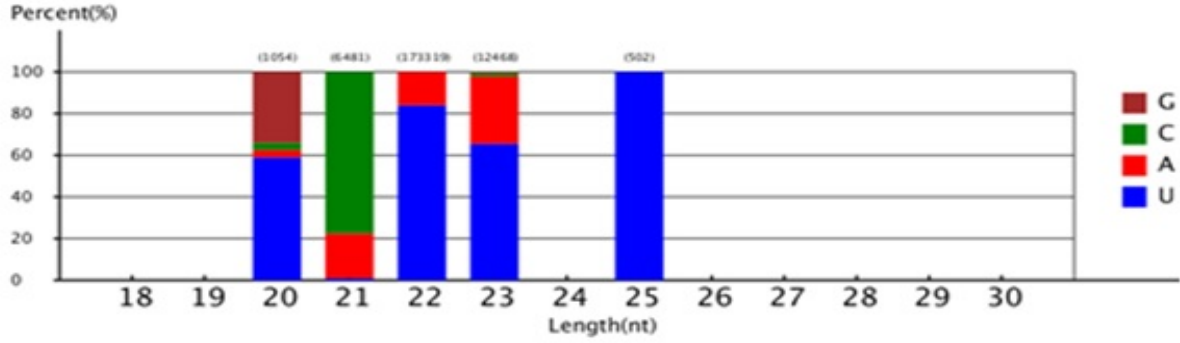
**Tablo 3.4.** Temiz okuma sayısı, tahmin edilen miRNA ve "hairpin" (saç-toka) yapı sayısı.

Fungi	miRNA precursors	5' miRNA	3' miRNA	5' and 3' miRNA	Mfe range
<i>P. indica</i>	61	38	36	13	-21.8 to -149.12



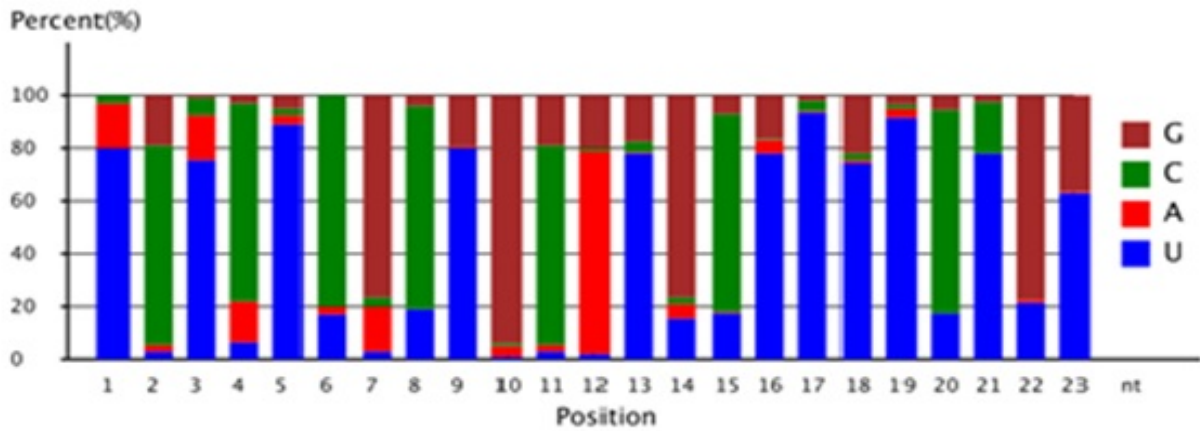
### 3.8.3 miRNA'ların nükleotit analizi

Belirli uzunluktaki tahmin edilen yeni miRNA'ların birinci pozisyondaki nükleotitler de analiz edildi (Şekil 3.9). Birinci nükleotitde miRNA'ların urasile baskın bir eğilimi söz konusudur. miRNA'ların tipik bir özelliği olan genellikle 5' ucunda U ile başlaması, gözlemi onaylamaktadır.



Şekil 3.9. *P. indica*'ya ait tahmini yeni miRNA'larda ilk nükleotidin eğilimini gösteren grafik.

Her bir pozisyonda görünen dört nükleotitin yüzdesi de ayrıca incelenmiştir (Şekil 3.10). Genel olarak, beş pozisyon: 1., 6., 8., 16., ve 18. nükleotitlerde U'ya en çok eğilim göstermiştir. miRNA'ların 2. ve 8. nükleotilerin çöktüren bölge çekirdek bölgesi olarak adlandırılır, ve hedef bölgeleri ile mükemmel eşleşir. Böylece, 1. ve 8. nükleotidler çekirdek bölgesinin sınırlarındadır, 6. nükleotit çekirdek bölgesinin içindedir, ve 16. ve 18. nükleotit miRNA'ların 5' ucuna yakındırlar. Bu pozisyonlarda U'ya eğilim miRNA düzenlemesinde katkıda bulunuyor olabilir (Zhang, Stellwag, & Pan, 2009). Ancak *P. indica*'da bu durum biraz farklıdır, bu da bize *P. indica*'da miRNA jenarasyon mekanizmasının farklı olduğunu düşündürmektedir.



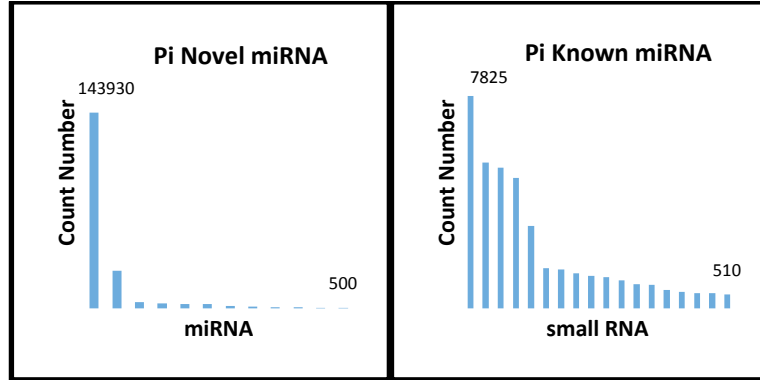
Şekil 3.10. *P. indica*'ya ait tahmini yeni miRNA'larda pozisyon baz eğilimini gösteren grafik.

### 3.8.4 Olası aday miRNA seçilimi

Sekans analizlerinde bazı bayez okumalar sıklıkla görünmektedir. Okumadan kaynaklanan gürültünün ortadan kaldırılması için, tahmini miRNA sekanları miRBase'deki miRNA katalog sekanslarına homoloji gösterenler bulunarak saptanmıştır (Tablo 3.5, Şekil 3.10).

**Tablo 3.5.** Sadece *P. indica*'da bulunan 500 ve üzeri okumalar elde edilmiş ve hedef gen analizi için "psRNATarget tool" da kullanılan aday 12 yeni miRNA.

miRNA adı	Dizilim	Okuma sayısı
P.indica-m0004_5p	TCTCTCGCTGCATGCTTTTCTG	143930
P.indica-m0005_3p	TTTGAATTTCTTGACTIONGATGCA	1146
P.indica-m0008_5p	CAAAGCATGGCGTTGTTGCCG	1682
P.indica-m0023_5p	TTCGGAGCTGGGCATGTCGTCTT	3539
P.indica-m0028_5p	AGGGATCTGTATTATACGCCTAT	806
P.indica-m0030_3p	TCATCCGTACTIONGCGCTCGCT	617
P.indica-m0038_3p	AGAATTATGGGGGTTGTGTTCT	27648
P.indica-m0044_5p	CACTCCTGGATGTAGATGTGT	3283
P.indica-m0046_5p	AGATGTATGAAGGCGTGGCGTT	3195
P.indica-m0050_5p	TGCTACCGTGGACGGACGAGCTG	4576
P.indica-m0052_3p	TCTAACGTATAGTTGTGTTGCTGG	502
P.indica-m0053_5p	AGCGGGCTAGCTATACGACC	500



**Şekil 3.10.** Sadece *P. indica*'da bulunmuş yeni miRNA ve küçük RNAların dağılımı. Sadece 500 ve üstü tekrar okumaları içerenler grafitte sunulmuştur.

### 3.8.5. Bitkideki hedef gen tahminleri psRNATarget tahminleri

İlgili material kısmında görüldüğü üzere seçilen miRNA adayları psRNATarget aracının veribankasındaki veriler kullanılarak ile analiz edilmiştir (Tablo 3.6, 3.7; Hedef genleri bulunan tüm miRNAlar ve bitkilerdeki eşleşen homolog gen bölgeleri ve genler Tablo 3.12 ve 3.13'de sunulmuştur). miRNA adayları bitki genomlarının çeşitli bölgelerine hedeflenmiştir. Sonuçlar dikkatle incelendiğinde, bir miRNA'nın birden fazla hedef bölge hedeflenişi ve tersi tanımlanmıştır. Ayrıca, bazı hedefler kodlama için "anote" edilmemiş ya da kodlayıcı genin fonksyonu bilinmemektedir. Sonuç olarak, sadece en iyi miRNA adaylarını inceleyen bir sıralama algoritması, bitki savunma sistemi ile ilgili proteinleri filtreleyerek, yazılmıştır. Bu işlemler verilerden gerekli olmayan ve "anote" edilmemiş isabetleri (hits) çıkarmak için gerekli olmuştur. Ayrıca, bu şekilde arama alanını daraltarak, hedef gen sayısını makul bir sayıya ulaştırdık. Bunun için PERL kodu ile program yazılmıştır. Hedefleri sıralamak için kullanılan anahtar kelimeler Tablo 3.7'de sunulmuştur. Toplamda 6079 miRNA için analiz yapılmış, bunların 510 isabet bitki savunma mekanizmasıyla ilgili olduğu bulundu.

Tablo 3.7 analiz edilmiş miRNA'ların sayılarını, bitki savunma proteinleri ve eşsiz miRNA sıralama kriterilerini kullanan psRNATarget aracı tarafından hedef tahminlerini, ve hedef bölgelerini göstermektedir.

**Tablo 3.6.** psRNATarget aracı ile tahmin edilen isabet sayıları.

P. indica	Eşsiz miRNA	Bilinen miRNA	Toplam
İsabet sayısı	2130	3949	<b>6079</b>

Eşsiz (Novel)

**Tablo 3.7.** psRNATarget aracının, bitki savunma ile ilgili proteinler tarafından sıralanan, tahminleri.

P. indica	Analiz edilmiş miRNA	İsabet sayısı	Eşsiz miRNA	Eşsiz Hedef Girişi Target
Eşsiz miRNA	12	111	12	111
Bilinen miRNA	18	203	16	156

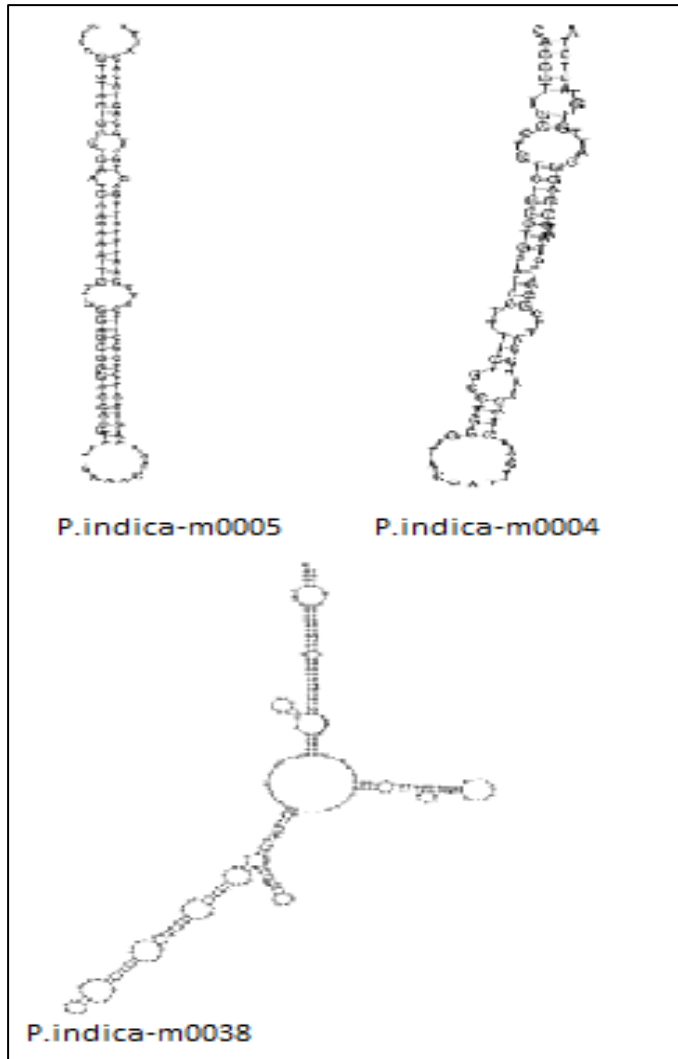
Taramalar için anahtar proteinler. Ribosomal protein, Malate dehydrogenase, Folylpolylglutamate synthetase, Serine carboxypeptidase, Chalcone synthase, Lipoxygenase, ATPase, Geranylgeranyl hydrogenase, Prokaryal protein, Immunoglobulin lambda-like polypeptide, Acetyltransferase, Zinc finger protein, Proline-rich ,Heat shock protein, Plasma membrane, Glutathione, Ribulose bisphosphate carboxylase, Myosin heavy chain, Kinase, Sugar transferase, Fusicoccadiene synthase, Preprotein translocase secA subunit, LysR family protein, E3 ubiquitin ligase, Fatty acid metabolism, Oxidase, Protease, Cer5, Reverse transcriptase, YibE family protein precursor, Avra10, TE1a, Calcium, Senescence, Ig lambda chain, Jasmonate, Condensin subunit ScpA, Glycosyl transferase, HOX family protein, Fibroin, Porphobilinogen deaminase, Protogenin precursor, Beta-fructofuranosidase, Auxin, Trev, Transcription, PEX14, Acid phosphatase, Dnase, ABC transporter permease, Potassium transporter, Thiamine biosynthetic enzyme., Apolipoprotein B, MIPC synthase, EIF, Monosaccharide transporter, Integrase, PEARLI, Pol polyprotein, Peptidase M1 family protein, Chalcone synthase, Aggregation promoting factor related surface protein, Secretion protein HlyD precursor, RND efflux system outer membrane lipoprotein NodT/Caleosin, ACC synthase, Crossover junction endodeoxyribonuclease RuvC, TE4, PHD domain containing, peptidase U7 family precursor, Phosphoribosylformylglycinamide

Eşsiz miRNA'lar ve eşsiz hedef bölgeleri de maksimum beklenti değeri ve hedef erişilebilirliğine göre sıralanır (UPE). Sonunda, 3 aday miRNA sekansları seçildi. Yeni miRNA öngörülen "hairpin" yapıları Tablo 3.8'de ve Şekil 3.11'de ve seçilmiş bilinen küçük RNA'lar miRBase veritabanındaki en iyi homologlarıyla berilikte ise Tablo 3.9'da sunulmuştur.

**Table 1.8.** Seçilmiş eşsiz miRNA sekansları.

miRNA adı	Sekans	MFE kcal/mol	U*	Sayı**
P.indica-m0005_3p	TTTGAATTTCTTGACTGATGCA	-52.30	22	1146
P.indica-m0038_3p	AGAATTATGGGGGTTGTGTCT	-94.40	22	27648
P.indica-m0004_5p	TCTCTCGCTGCATGCTTTTCTG	-26.80	22	143930

\*miRNAuzunluğu,\*\* miRNA okuma sayıları



**Şekil 3.11.** Tablo 3.8'da sunulan "novel" miRNA öncülerinin "hairpin" yapıları.





**Tablo 3.12.** Hedef gen analiz sonuçları “psRNATarget tool”. Hedef genlerin “accession” numaraları ve genlerdeki homolog sekanlar.

miRNA adı	“Accession”	“Expectation”	“UPE”	“miRNA aligned fragment”
P.indica-m0038_3p Hedef homolog miRNA dizisi	GR180102	3	18.98	AGAAUUAUGGGGUUGUGUU AGUACAACCCCUAUAGUUCA
P.indica-m0050_5p Hedef homolog miRNA dizisi	DT730802	3	20.054	UGCUACCGUGGACGGACGAG CUCCUCCUUCACGGUAGCG
P.indica-m0004_5p Hedef homolog miRNA dizisi	AT3G62850.1	2.5	17.033	UCUUCGCUUGACGUUUUC GGAAAGCAUGCAGUGAAAGA
P.indica-m0005_3p Hedef homolog miRNA dizisi	AT1G16140.1	3	15.208	UUUGAAUUUCUUGACUGAUG UAUUAGUCAAGGACUUCAAA
P.indica-m0030_3p Hedef homolog miRNA dizisi	AT3G46280.1	3	20.385	UCAUCCGUACUUGCGUCGCU GGCGGCGGUAGUACGGGAUGA
P.indica-m0030_3p Hedef homolog miRNA dizisi	AT5G59630.1	3	20.028	UCAUCCGUACUUGCGUCGCU AGCGACGCAACAUGGAUGG
P.indica-m0050_5p Hedef homolog miRNA dizisi	AT5G39560.1	3	21.993	UGCUACCGUGGACGGACGAGCUG UACUUCGUACAUCACGGUAGCG
P.indica-m0005_3p Hedef homolog miRNA dizisi	NP169126	3	15.208	UUUGAAUUUCUUGACUGAUG UAUUAGUCAAGGACUUCAAA
P.indica-m0005_3p Hedef homolog miRNA dizisi	TC366728	3	14.09	UUUGAAUUUCUUGACUGAUGC GAUCAGCCAAGAGAUUCAAG
P.indica-m0005_3p Hedef homolog miRNA dizisi	TC377822	3	13.555	UUUGAAUUUCUUGACUGAUGC GAUCAGCCAAGAGAUUCAAG
P.indica-m0030_3p Hedef homolog miRNA dizisi	TC369252	3	17.952	UCAUCCGUACUUGCGUCGCU AGCGACGCAACAUGGAUGG
P.indica-m0030_3p Hedef homolog miRNA dizisi	TC376178	3	17.952	UCAUCCGUACUUGCGUCGCU AGCGACGCAACAUGGAUGG
P.indica-m0005_3p Hedef homolog miRNA dizisi	TC8224	2.5	16.555	UUUGAAUUUCUUGACUGAUG CACAGUCAAGAAGUUUAAAG
P.indica-m0028_5p Hedef homolog miRNA dizisi	GT812986	2.5	23.105	AGGGAUUCGUUUUACGCCUA UUGGCGUAUAGAGCAGAUUCCU
P.indica-m0044_5p Hedef homolog miRNA dizisi	GT830879	3	16.779	CACUCCUGGAUGAUGAUGUG GUAUCUAUUAUUCAGGAGUG
P.indica-m0004_5p Hedef homolog miRNA dizisi	CN727393	2.5	18.893	UCUCUCGUCGCAUGCUUUUCU AGAAAGGUAUGGAGUGAGAGA
P.indica-m0004_5p Hedef homolog miRNA dizisi	GT073611	3	11.172	UCUCUCGUCGCAUGCUUUUCU AAGAAAGCAUGUAACGAGAGA
P.indica-m0028_5p Hedef homolog miRNA dizisi	TC212880	3	15.075	AGGGAUUCGUUUUACGCCUA UGGGAGUAUUUACAGAUUCUU
P.indica-m0038_3p Hedef homolog miRNA dizisi	TC169934	2.5	8.856	AGAAUUUUGGGGUUGUGUUUCU AGAACAACAACUUUUAUUUCU
P.indica-m0004_5p Hedef homolog miRNA dizisi	EX288142	3	23.072	UCUCUCGUCGCAUGCUUUUCU AGAGAUGCAUGAAGCGGGAGA
P.indica-m0028_5p Hedef homolog miRNA dizisi	EX280711	3	20.939	AGGGAUUCGUUUUACGCCUA AGCGUAUAAAACAGAUUUUCU
P.indica-m0028_5p Hedef homolog miRNA dizisi	TC5272	3	18.621	AGGGAUUCGUUUUACGCCUA AGCGUAUAAAACAGAUUUUCU
P.indica-m0023_5p Hedef homolog miRNA dizisi	TC12674	3	19.736	UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUCUU AAGGCGACAUGCCAGACUUUGAA
P.indica-m0023_5p Hedef homolog miRNA dizisi	TC14625	3	19.736	UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUCUU AAGGCGACAUGCCAGACUUUGAA
P.indica-m0023_5p Hedef homolog miRNA dizisi	TC29267	3	19.736	UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUCUU AAGGCGACAUGCCAGACUUUGAA
P.indica-m0023_5p Hedef homolog miRNA dizisi	DY280399	3	19.736	UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUCUU AAGGCGACAUGCCAGACUUUGAA
P.indica-m0038_3p Hedef homolog miRNA dizisi	TC34284	2.5	16.62	AGAAUUAUGGGGUUGUGUU AAUAAAACCCCUAUAAUUUU
P.indica-m0050_5p Hedef homolog miRNA dizisi	TC20808	3	24.22	UGCUACCGUGGACGGACGAGCUG CAAGUCGCCUGUCCGCGGUAGCA
P.indica-m0023_5p Hedef homolog miRNA dizisi	CV887182	3	16.465	UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUCUU AAGACGACAUGCCAGACUUUGAA
P.indica-m0028_5p Hedef homolog miRNA dizisi	SGN-U613044	3	13.404	AGGGAUUCGUUUUACGCCUA GGCCUUAUAAAACAGAUUUUCU
P.indica-m0028_5p Hedef homolog miRNA dizisi	TC21255	3	13.404	AGGGAUUCGUUUUACGCCUA GGCCUUAUAAAACAGAUUUUCU
P.indica-m0023_5p Hedef homolog miRNA dizisi	TC229	3	22.799	UUCGGAGCUGGGCAUGUCGCU GCGACAUUAACAGCUUCGGA
P.indica-m0038_3p	TC407	3	11.308	AGAAUUAUGGGGUUGUGUUUCU

Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0005_3p	TC491274	3	14.911	AUAAUACCAUCCUCAUAAUUUU UUUGAAUUUCUUGACUGAUGC GCAUUGGUCAAGGAAUUAAAA UCAUCCGUACUUGCGUCGCU AGUGGUGCAUGUAUGGAUGA AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU ACAACACAACUCUUAUAAUUGU UGCUACCGUGGACGGACGAG CUCGUCUGUCUACGGCAGCG AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AUGAUACAACUCCAUAUUUCC UUUGAAUUUCUUGACUGAUG CAUGACUCAAGAAUUUCAAA UCUCUCGUCGCAUGCUUUUCU AGAAUAGCAUGCGCGGGGGU AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AAGAUACAACUCUUAUAAUUCU AGGGAUUCUGUAUUUACGCCUUAU AUUGGCGUAUGAUGAUCUCA AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AGAAUACAGCCCCAGUAAUUUU CACUCCUGGAGUAGAUUGU ACAUGUCAACUCCAGGAGUG UCUCUCGUCGCAUGCUUUUCU AGAGAAACAUGAAGCGAGAGA CAAAGCAUGGCGUUGUUGCG UGUAAUAACGCCUUGUUUUUG UUUGAAUUUCUUGACUGAUGCA UACAUUAAUCAAGAAAGUCAAA UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUC GUCGCAUGCCCCGUUCCGAU AGAAUUUAGGGGUUGUGUU UACACAACAUUAAUAAUUCU CACUCCUGGAGUA-GAUGUGU ACACAUCUUAUCCAGGAGUG UUUGAAUUUCUUGACUGAUGC GUUUCAGACGAGAAGUUAAG UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUCU GAAUUGACAGGCCUGGCCGAG UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUG GUGCCAUGCCCAGCUUUGAA UCUCUCGUCGCAUGCUUUUCUG CAGAGGAGCAUGCAGUGAGAAA AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AGGACAUGACCCUUAUAAUUCU AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AGGACAUGACCCUUAUAAUUCU AAGACACAACCCUUAUAAUUCU UCAUCCGUACUUGCGUCGCU AGCGAUGCAGGUGUGGUGG UCAUCCGUACUUGCGUCGCU GGCGACGCACGUACGCAUGA AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AGGACAUGACCCUUAUAAUUCU AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AGGACAUGACCCUUAUAAUUCU AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AAGACACAACCCUUAUAAUUCU AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU GGGACGCAUCCAUAAUUUU AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU GGAGCACCACCCAAUAAUUUU UCUCUCGUCGCAUGCUUUUCUG CAGAGGAGCAUGCAGUGAGAAA UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUG ACGACAUGCCCCGGCAGCG AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AGGACAUGACCCUUAUAAUUCU AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AGGACAUGACCCUUAUAAUUCU AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU AAGACACAACCCUUAUAAUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0030_3p	TC488313	3	15.619	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	TC438870	3	12.833	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0050_5p	TC438618	3	22.652	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	DT463208	3	6.207	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0005_3p	GE484550	2	14.835	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0004_5p	BI959323	3	21.44	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	BY857664	2.5	22.685	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0028_5p	TC61250	3	16.875	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	TC79163	3	22.03	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0044_5p	TC81105	3	16.1	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0004_5p	DB934309	2.5	15.431	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0008_5p	Medtr4g069800.1	3	24.839	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0005_3p	GSMUA_Achr7T1869	3	11.01	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0023_5p	GSMUA_Achr2T1431	3	19.864	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	GSMUA_Achr6T1692	3	19.462	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0044_5p	GSMUA_Achr8T2757	3	19.375	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0005_3p	AM848952	3	16.983	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0023_5p	AM830031	3	19.266	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0023_5p	SGN-U383116	3	18.385	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0004_5p	LOC_Os11g40430.1 1	3	18.583	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	LOC_Os11g04460.1 1	2.5	17.264	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	LOC_Os12g04220.1 1	2.5	14.703	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	LOC_Os03g42020.1 1	1.5	20.066	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0030_3p	NP13028898	3	17.302	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0030_3p	CB965425	3	19.512	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	TC484813	2.5	14.703	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	TC546014	2.5	17.264	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	TC484843	1.5	20.066	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	CT854931	2.5	14.527	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	TC552643	3	15.418	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0004_5p	LOC_Os11g40430.1	3	18.583	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0023_5p	LOC_Os12g18150.1	2	15.858	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	LOC_Os12g04220.1	2.5	14.703	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	LOC_Os11g04460.1	2.5	17.264	
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	LOC_Os03g42020.1	1.5	20.066	
Hedef homolog miRNA dizisi				



P.indica-m0044_5p	TC58452	3	24.952	CACUCCUGGAUGUAGAUGUG
Hedef homolog miRNA dizisi				CUUUUCUACAGCCGGGAGUG
P.indica-m0046_5p	HO262803	3	24.664	AGAUGUAUGAAGGCGUGGGCGU
Hedef homolog miRNA dizisi				GCGCCCGCGCCUUGGUACAU
P.indica-m0005_3p	TC7017	3	10.814	UUUGAAUUUCUUGACUGAUGCA
Hedef homolog miRNA dizisi				UUCAUAAGUCAAGAAACUCAAG
P.indica-m0005_3p	PDK_30s1088101g00	3	19.541	UUUGAAUUUCUUGACUGAUG
Hedef homolog miRNA dizisi				CAUCAGACAAGAAAGUUAAA
P.indica-m0004_5p	TC128708	2.5	17.244	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				AGAAAAGCAUGGAGAGAGAGA
P.indica-m0004_5p	TC148436	2.5	12.707	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				AGAAAAGCAUGGAGAGAGAGA
P.indica-m0004_5p	TC146446	3	13.476	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				AGAAGUGCAUGCAGAGAGAGA
P.indica-m0004_5p	TC128653	3	12.495	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				AGAAGUGCAUGCAGAGAGAGA
P.indica-m0004_5p	TC148318	3	14.167	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				AGAAGUGCAUGCAGAGAGAGA
P.indica-m0005_3p	GO370809	2.5	12.287	UUUGAAUUUCUUGACUGAUG
Hedef homolog miRNA dizisi				UAUCAGUUGAGGAGUUCAA
P.indica-m0005_3p	GW724948	3	19.145	UUUGAAUUUCUUGACUGAUG
Hedef homolog miRNA dizisi				GUUAGAGGCAAGAAUUCGAA
P.indica-m0038_3p	TC147381	3	14.13	AGAAUUUAGGGGUUGUGUUC
Hedef homolog miRNA dizisi				GAACAAAUAUCCCAUGAUUUU
P.indica-m0004_5p	TC143937	2	23.293	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				GGAAGAGCAUGCAUUGAGAGA
P.indica-m0004_5p	TC187051	3	20.992	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				AGAGGAGCAUGCAGAGGGAGA
P.indica-m0038_3p	CV236055	3	16.286	AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				AAAACAUGAUCCCAUUUUCU
P.indica-m0053_5p	DB884751	2.5	24.116	AGCGGGCCUAGCUAUACGAC
Hedef homolog miRNA dizisi				GUCGUUUGGCUUGGCGUCGCG
P.indica-m0005_3p	TC21139	2.5	23.026	UUUGAAUUUCUUGACUGAUGCA
Hedef homolog miRNA dizisi				UCUGUUGGUCUAGAAAUCAA
P.indica-m0038_3p	FN745504	3	7.289	AGAAUUUAGGGGUUGUGUUC
Hedef homolog miRNA dizisi				AAUACAUCUUUAUAAUUUU
P.indica-m0005_3p	CA175875	3	22.174	UUUGAAUUUCUUGACUGAUGCA
Hedef homolog miRNA dizisi				UGCAUUGGUGAGGAAGUCAA
P.indica-m0005_3p	CA173789	2.5	21.502	UUUGAAUUUCUUGACUGAUG
Hedef homolog miRNA dizisi				GUUACAGUCAUGAAGUUCAA
P.indica-m0005_3p	TC126909	2.5	14.569	UUUGAAUUUCUUGACUGAUG
Hedef homolog miRNA dizisi				AAUUGUCAAGAGGUUCAA
P.indica-m0004_5p	TC3328	3	13.45	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				GGAAGCAUCUUGCGAGAGG
P.indica-m0005_3p	Solyc05g056370.2.1	2.5	16.032	UUUGAAUUUCUUGACUGAUG
Hedef homolog miRNA dizisi				UAUCGGUUAAGAGAUUUAAA
P.indica-m0038_3p	Solyc01g087960.1.1	2.5	7.693	AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				GGAACACAACUCCC-UAAUUCU
P.indica-m0038_3p	Solyc07g008320.2.1	3	21.054	AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				GAUACAACCUGAUAAUUUU
P.indica-m0044_5p	Solyc10g086580.1.1	3	12.466	CACUCCUGGAUGUAGAUGUGU
Hedef homolog miRNA dizisi				ACAUGUCAACUCCAGGAGUG
P.indica-m0053_5p	Solyc09g011990.1.1	3	23.509	AGCGGGCCUAGCUAUACGACC
Hedef homolog miRNA dizisi				GGUCUUAAAGCUAGGCUUGCU
P.indica-m0008_5p	SGN-U322443	3	14.716	CAAAGCAUGGCGUUGUUGCGG
Hedef homolog miRNA dizisi				CCGGAACAACUCCGUGUUUUG
P.indica-m0038_3p	SGN-U318594	3	11.18	AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				UGCACAACCCUUUAAUUCU
P.indica-m0044_5p	AI899703	3	15.402	CACUCCUGGAUGUAGAUGUGU
Hedef homolog miRNA dizisi				ACAUGUCAACUCCAGGAGUG
P.indica-m0044_5p	TC226900	3	16.038	CACUCCUGGAUGUAGAUGUGU
Hedef homolog miRNA dizisi				ACAUGUCAACUCCAGGAGUG
P.indica-m0023_5p	TC1499	3	22.081	UUCGGAGCUGGGCAUGUCGUC
Hedef homolog miRNA dizisi				GACGACAAGCCACCUCGCAU
P.indica-m0004_5p	TC2363	3	15.591	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				CUGGGAAGUAUGCAACGGGAGA
P.indica-m0038_3p	EY155694	2.5	5.167	AGAAUUUAGGGGUUGUGUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				ACAAAACAUCUUUAAUUCU
P.indica-m0004_5p	TC420177	3	22.927	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				CGAAAGAGCAAGCGGCGAGAGA
P.indica-m0004_5p	CA608140	3	15.085	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				CGAAAGAGCAAGCGGCGAGAGA
P.indica-m0004_5p	CA621711	3	24.937	UCUCUCGCGUGCAUGCUUUUCU

Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0004_5p	TC416953	3	22.537	CGAAAGAGCAAGCGGCGAGAGA UCUCUCGCUGCAUGCUUUUCUG
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	CV781846	2.5	6.527	CGAAAGAGCAAGCGGCGAGAGA AGAAUUAUGGGGUUGUGUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	TC7344	2.5	3.467	ACAGCACAACCCCAUAAUUA AGAAUUAUGGGGUUGUGUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0044_5p	TC154059	3	20.354	AAAGCAAACUCCCAUAGUUCU CACUCCUGGAUGUAGAUUG
Hedef homolog miRNA dizisi P.indica-m0038_3p	TC495039	2.5	19.611	CACGGCUGCAUUUAGGAGUG AGAAUUAUGGGGUUGUGUUCU
Hedef homolog miRNA dizisi				AAGAUACAACUCUUAUAAUUCU

**Tablo 3.13.** Bitkideki olası hedef genler.

miRNA adı	Bitki Hedef Gen	Organizma
P.indica-m0005_3p	1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase/ zinc ion binding protein	Musa acuminata
P.indica-m0005_3p	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Picea
P.indica-m0044_5p	60 kDa jasmonate-induced protein	Panicum virgatum
P.indica-m0030_3p	Acid phosphatase	Oryza sativa
P.indica-m0005_3p	Ankyrin protein kinase-like	Brachypodium distachyon
P.indica-m0028_5p	ATPase 11, plasma membrane-type	Carica papaya
P.indica-m0023_5p	ATPase subunit 4	Nicotiana tabacum
P.indica-m0008_5p	ATP-dependent Clp protease proteolytic protein	Medicago truncatula
P.indica-m0028_5p	autoinhibited H+ ATPase	coffea canephora
P.indica-m0005_3p	Auxin resistant 1	Arabidopsis thaliana
P.indica-m0005_3p	Auxin resistant 1	Arabidopsis thaliana
P.indica-m0038_3p	Auxin-repressed protein like-protein	Populus trichocarpa
P.indica-m0028_5p	Auxin-responsive protein IAA18	Brassica napus
P.indica-m0023_5p	C2H2 zinc finger protein	Oryza sativa
P.indica-m0038_3p	Calcium-dependent protein kinase	Brassica napus
P.indica-m0038_3p	Calcium-dependent protein kinase SK5	Vigna unguiculata
P.indica-m0038_3p	calcium-transporting ATPase	Oryza sativa
P.indica-m0038_3p	calcium-transporting ATPase	Oryza sativa
P.indica-m0038_3p	calcium-transporting ATPase	Oryza sativa
P.indica-m0038_3p	Calcium-transporting ATPase 1	Solanum Lycopersicon
P.indica-m0038_3p	Calcium-transporting ATPase 1	Hordeum vulgare
P.indica-m0038_3p	Calcium-transporting ATPase 1, chloroplastic	Musa acuminata
P.indica-m0038_3p	calcium-transporting ATPase 2	Oryza sativa
P.indica-m0038_3p	calcium-transporting ATPase 4	Oryza sativa
P.indica-m0038_3p	calcium-transporting ATPase 4	Oryza sativa
P.indica-m0023_5p	Chalcone synthase E	Musa acuminata
P.indica-m0038_3p	CTR1-like protein kinase	Gossypium
P.indica-m0038_3p	Eph-like receptor tyrosine kinase 6	Quercus
P.indica-m0050_5p	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	Arabidopsis thaliana
P.indica-m0005_3p	GCK-like kinase MIK	Saccharus officinarum
P.indica-m0038_3p	GCN5-related N-acetyltransferase-like	Festuca pratensis
P.indica-m0004_5p	Glutathione S-transferase	Carica papaya
P.indica-m0004_5p	Glutathione S-transferase family protein	Selaginella moellendorffii
P.indica-m0038_3p	Glutathione S-transferase GST 42	Mimulus guttatus
P.indica-m0004_5p	Glutathione S-transferase Z1	Triphysaria
P.indica-m0004_5p	Glutathione-S-transferase	Picea
P.indica-m0004_5p	Glutathione-S-transferase	Picea
P.indica-m0004_5p	Glutathione-S-transferase	Picea
P.indica-m0004_5p	Glutathione-S-transferase	Picea
P.indica-m0004_5p	Glutathione-S-transferase	Picea
P.indica-m0004_5p	Glutathione-S-transferase-like protein	Populus trichocarpa
P.indica-m0030_3p	glycine-rich protein	Arabidopsis thaliana
P.indica-m0004_5p	Heat shock protein 70	Brassica napus
P.indica-m0005_3p	Heat shock protein 70	Nicotiana tabacum
P.indica-m0046_5p	Heat shock protein 70	Panicum virgatum
P.indica-m0038_3p	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	Solanum Lycopersicon
P.indica-m0038_3p	Matrix metalloprotease	Oryza sativa
P.indica-m0050_5p	Membrane protease subunits	Citrus clementina
P.indica-m0004_5p	Nucleoside diphosphate kinase	Manihot esculenta
P.indica-m0038_3p	Papain family cysteine protease containing protein	Triticum aestivum
P.indica-m0023_5p	Peroxidase 65 precursor	Citrus clementina
P.indica-m0023_5p	Peroxidase 65 precursor	Citrus clementina
P.indica-m0023_5p	Peroxidase 65 precursor	Citrus clementina

P.indica-m0023_5p	Peroxidase 65 precursor	Citrus clementina
P.indica-m0023_5p	Peroxidase 65 precursor	citrus sinensis
P.indica-m0005_3p	Peroxisomal acyl-CoA oxidase 1A	Petunia hybrida
P.indica-m0028_5p	PfkB type carbohydrate kinase protein family-like	Lotus japonicus
P.indica-m0044_5p	Phosphatidylinositol 3-kinase	Brachypodium distachyon
P.indica-m0005_3p	Phosphoglycerate kinase	Saccharus officinarum
P.indica-m0038_3p	Plasma membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPase	Zea mays
P.indica-m0028_5p	Plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	Carica papaya
P.indica-m0028_5p	Plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	Coffea canephora
P.indica-m0038_3p	Probable calcium-transporting ATPase 4	Oryza sativa
P.indica-m0038_3p	Probable calcium-transporting ATPase 4	Oryza sativa
P.indica-m0038_3p	Probable calcium-transporting ATPase 4	Oryza sativa
P.indica-m0044_5p	Probable serine acetyltransferase 5	Musa acuminata
P.indica-m0005_3p	Proline-rich protein	Helianthus annuus
P.indica-m0030_3p	Protein kinase family protein	Oryza sativa
P.indica-m0005_3p	protein kinase xa21	Phoenix dactylifera
P.indica-m0023_5p	Protein kinase:Protein phosphatase 2C-like protein	Ectocarpus siliculosus
P.indica-m0030_3p	protein kinase-related	Arabidopsis thaliana
P.indica-m0004_5p	Pyruvate kinase	Populus trichocarpa
P.indica-m0005_3p	Receptor like kinase, RLK	Solanum Lycopersicon
P.indica-m0053_5p	Receptor like protein kinase	Solanum Lycopersicon
P.indica-m0038_3p	Respiratory burst oxidase 1	Lotus japonicus
P.indica-m0038_3p	Response regulator receiver:ATP-binding region	Picea
P.indica-m0004_5p	Reverse transcriptase-like protein	Brassica napus
P.indica-m0004_5p	Ribosomal protein	Hordeum vulgare
P.indica-m0023_5p	Ribosomal protein L19	Striga hermonthica
P.indica-m0044_5p	Ribosomal protein L2	Vitis vinifera
P.indica-m0004_5p	Ribosomal protein l34	Triticum aestivum
P.indica-m0004_5p	Ribosomal protein l34	Triticum aestivum
P.indica-m0004_5p	Ribosomal protein l34	Triticum aestivum
P.indica-m0004_5p	Ribosomal protein l34	Triticum aestivum
P.indica-m0038_3p	Ribosomal protein S10	Oryza sativa
P.indica-m0044_5p	Ribulose biphosphate carboxylase	Solanum Lycopersicon
P.indica-m0044_5p	Ribulose biphosphate carboxylase	Solanum Lycopersicon
P.indica-m0044_5p	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	Lotus japonicus
P.indica-m0044_5p	Ribulose-1 5-bisphosphate carboxylase	Solanum Lycopersicon
P.indica-m0004_5p	senescence-induced receptor-like serine	Oryza sativa
P.indica-m0038_3p	Serine carboxypeptidase 1	Solanum Lycopersicon
P.indica-m0028_5p	Serine carboxypeptidase family protein	Brachypodium distachyon
P.indica-m0050_5p	Serine carboxypeptidase-like 17 precursor	Aquilegia
P.indica-m0005_3p	Serine carboxypeptidase-like 45 precursor	Saccharus officinarum
P.indica-m0030_3p	Serine carboxypeptidase-like 51 precursor	Arabidopsis thaliana
P.indica-m0030_3p	Serine carboxypeptidase-like 51 precursor	Arabidopsis thaliana
P.indica-m0038_3p	Serine/threonine protein kinase	Citrus clementina
P.indica-m0030_3p	Serine/threonine-protein kinase AFC2	Glycine max
P.indica-m0005_3p	Shikimate kinase	Picea
P.indica-m0038_3p	Subtilisin-like protease	Triphysaria
P.indica-m0005_3p	Transcription factor bZIP63	Quercus
P.indica-m0050_5p	Transcription factor EREBP-like protein	Glycine max
P.indica-m0023_5p	transcription factor jumonji (jmjC) domain-containing protein	Nicotiana tabacum
P.indica-m0038_3p	Transcription factor MYB22	Glycine max
P.indica-m0005_3p	Transcriptional regulator, TetR family	Glycine max
P.indica-m0053_5p	Two-component system sensor kinase	Populus trichocarpa
P.indica-m0005_3p	wall-associated kinase 4	Arabidopsis thaliana
P.indica-m0005_3p	wall-associated kinase protein family	Arabidopsis thaliana
P.indica-m0004_5p	wall-associated receptor kinase-like 2 precursor	Oryza sativa
P.indica-m0008_5p	zinc finger (CCCH-type) family protein	Solanum Lycopersicon
P.indica-m0004_5p	zinc finger protein-related	Arabidopsis thaliana

#### 4. Sonuç

Literatürde daha önce *P. indica*'nın mikroRNA'larının (miRNA) araştırılmasına yönelik bir çalışma bulunmamıştır. Projemizin amacı olan *P. indica*'nın mikroRNA'larının ya da mikroRNA benzer kısa RNA sekanslarının (miRNA) bulunması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bulunan aday miRNA'ların *P. indica*'nın clamidosporlarının olduğu aşamada anlatım düzeyleri de okuma sayılarının bilinmesi sayesinde bulunmuştur. İlk kez *P. indica*'da miRNA ve benzeri kısa RNAların olduğu ve mature olmuş miRNA jenerasyon mekanizmasının belki de bilinen mekanizmalardan farklı olabileceğini de saptanmıştır. Ayrıca bitkilerde olası hedef genlerin bulunması da ayrıntılı biyoenformatik analizlerle incelenmiş ve çalışılacak olası aday hedef genler bulunmuştur. Bu sayede organizmanın bitkinin genlerini *P. indica*'nın miRNA'ları ile nasıl düzenlediğine (regule ettiğine) dair çalışılmanın yapılmasına imkan veren sonuçlar alınmıştır. Arpa ve buğday gibi ülkemiz için de çok önemli olan tahıl bitkilerinde *P. indica* bulaştırıldıktan ve mikohriza oluşumu gerçekleştikten sonra aday hedef genlerin anlatım düzeyleri çalışılacaktır. Bu çalışmalar için gerekli ek kaynak bulunduğunda, bu projenin sonuçları ile birlikte en kısa zamanda SCI'de yer alan bir bilimsel dergide elde edilen "novel" miRNA'lar ve konukçu organizmadaki rolleri yayınlanacaktır.

## Kaynaklar:

- Achatz, B., Kogel, K.-H., Franken, P., & Waller, F. (2010). Piriformospora indica mycorrhization increases grain yield by accelerating early development of barley plants. *Plant signaling behavior*, 5(12), 1685-1687. Landes Bioscience.
- Camehl, I., Drzewiecki, C., Vadassery, J., Shahollari, B., Sherameti, I., Forzani, C., Munnik, T., et al. (2011). The OXI1 kinase pathway mediates Piriformospora indica-induced growth promotion in Arabidopsis. (F. M. Ausubel, Ed.) *PLoS Pathogens*, 7(5), e1002051. Public Library of Science.
- Cheng, P., Q. He, L. Wang, and Y. Liu. 2005. Regulation of the Neurospora circadian clock by an RNA helicase. *Genes Dev.* 19:234–241.
- Dai, X., & Zhao, P. X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W155–9. doi:10.1093/nar/gkr319
- Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1148-1155. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724934>
- Deshmukh S, Huckelhoven R, Schäfer P, Imani J, Sharma M, et al. (2006) The root endophytic fungus Piriformospora indica requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18450–18457.
- Emanuel A. Devers, Anja Branscheid, Patrick May, Franziska Krajinsk, *Plant Physiol.* 2011 August; 156(4): 1990–2010. Published online 2011 May 13. doi: 10.1104/pp.111.172627
- Gu, M., Xu, K., Chen, A., Zhu, Y., Tang, G., & 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. John Wiley & Sons.
- Imani, J., Li, L., Schäfer, P. and Kogel, K.-H. (2011), STARTS – A stable root transformation system for rapid functional analyses of proteins of the monocot model plant barley. *The Plant Journal*, 67(4):726-35.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57: 19–53

- Li, L., Chang, S.-shin, & Liu, Y. (2010). RNA interference pathways in filamentous fungi. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 67(22), 3849-3863. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20680389>
- Molitor, A., Zajic, D., Voll, L. M., Pons-K Hnemann, J., Samans, B., Kogel, K.-H., & Waller, F. (2011). Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*- Mediated systemic induced resistance to powdery mildew. *Molecular Plant Microbe interactions MPMI*, 24(12), 1427-39. Scientific Societies.
- Sahay, N., Bütchorn, B., & Franken, P., with Varma, A., Savita Verma & Sudha. (1999). *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2741-2744. American Society for Microbiology.
- Schäfer, P., Pfiffi, S., Voll, L. M., Zajic, D., Chandler, P. M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U. and Kogel, K.-H. (2009), Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *The Plant Journal*, 59: 461–474. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03887.x
- Smith, T. F., & Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*, 147(1), 195–197. doi:10.1016/0022-2836(81)90087-5
- Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.-H., & Waller, F. (2008). Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant cell physiology*, 49(11), 1747-1751. Jpn Soc Plant Physiol.
- Vadassery J., Ranf S., Drzewiecki C., Mithöfer A., Mazars C., Scheel D., Lee J., Oelmüller R. (2009b) A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *The Plant Journal* 59: 193-206
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., et al. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13386-13391. National Academy of Sciences.
- Wang, Q.-L., & Li, Z.-H. (2007). The functions of microRNAs in plants. *Frontiers in bioscience a journal and virtual library*, 12, 3975-3982.

Zhang, B., Stellwag, E. J., & Pan, X. (2009). Large-scale genome analysis reveals unique features of microRNAs. *Gene*, 443(1-2), 100–109. doi:10.1111/mono.12118

Zuccaro A, Lahrmann U, Güldener U, Langen G, Pfiffi S, et al. (2011) Endophytic Life Strategies Decoded by Genome and Transcriptome Analyses of the Mutualistic Root Symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathog* 7(10): e1002290. doi:10.1371/journal.ppat.1002290

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No: 113Z038</b>
<b>Proje Başlığı:</b> Mutualist kök simbiyozu olan endofitik arbusküler mikorhiza <i>P. indica</i> 'nın mikro-RNalarının ilk kez saptanması
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Mahinur S. Akkaya, Ayşe Andaç, Zemran Mustafa, Fatih Ölmez, Hasan Oğul, Kübra Narcı, Burak Demiralay
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Bitki Fonksiyonel Genomik Laboratuvarı. Lab B20 Kimya Bölümü ODTÜ; Üniversiteler Mahallesi, Dumlupınar Bulvarı No:1; 06800 Çankaya Ankara/TURKEY
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> TÜBİTAK; Tunus Caddesi No:80, 06100 Kavaklıdere Ankara
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 1 Temmuz 2013 – 1 Ağustos 2014
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Projemizin amacı olan <i>P. indica</i> 'nın mikroRNA'larının ya da mikroRNA benzer kısa RNA sekanslarının (miRNA) bulunması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bulunan aday miRNA'ların <i>P. indica</i> 'nın clamidosporlarının oluştuğu aşamada anlatım düzeyleri de okuma sayılarının bilinmesi sayesinde bulunmuştur. İlk kez <i>P. indica</i> 'da miRNA ve benzeri kısa RNAların olduğu saptanmıştır. Konukçu bitkinin olası hedef genlerini, <i>P. indica</i> 'nın miRNA'ları ile nasıl düzenlediğine (regule ettiğine) dair çalışılmanın yapılmasına imkan verecek olan sonuçlar alınmıştır.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> <i>Piriformospora indica</i> , ortak-yaşar organizma, bitki-fungus ilişkisi, mikroRNA (miRNA).
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu</b> Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> X Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> Kübra Narcı , Hasan Oğul and Mahinur S. Akkaya, <b>Sequence-based microRNA Clustering</b> . Bioinformatics 2016, 7th International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms, 21-23 Feb 2016, Rome, Italy konferansında sunulmak üzere "proceedings" olarak gönderilmiştir. Kübra Narcı, Ahmet Çağlar Özketen, Ayşe Andaç, Burak Demiralay, Bala Gür Dedeoğlu, Yasemin Öztemur, Mahinur Akkaya, <b>Hunting down of the endogenous miRNA like small RNAs in plant pathogenic and symbiotic fungi</b> . 2014, XVI IS-MPMI 2014, July, Rodos, Greece (Uluslararası Kongre). COST-Fa1208 meeting 2014, Poland
<b>Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.</b>



<b>Proje Adı</b>	<b>Proje Yürütücüsü</b>
<p align="center"><b>(PROJE ŞEKİL/GRAFİK/ FOTOĞRAF)</b></p> <p align="center"><i>(En fazla 4 tane – jpg formatında, 35 x 35 cm (300 dpi)):</i></p> <p><i>İsimleriyle ve şekil altı açıklamalarıyla birlikte sıralanmış olarak formda belirtilmesi ve 300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyaları halinde formun ekleri olarak gönderilmesi gerekmektedir.</i></p>	<b>Proje No</b>
	<b>Destek Miktarı (TL)</b>
	<b>Proje Başlama-Bitiş Tarihi</b>
	<b>Yürütücü Kuruluş</b>
	<p align="center"><b>(PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ FOTOĞRAF)</b></p> <p align="center"><i>300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyası olarak forma eklenmelidir.</i></p>
<b>Projenin Amacı ve Önemi</b> <i>(En fazla 150 kelime)</i> (Maddeler halinde sıralayınız)	
<b>Proje ile Elde Edilen veya Beklenen Bilimsel, Teknolojik, Ekonomik ve Sosyal Kazanımlar</b> <i>(En fazla 200 kelime)</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Projeden uluslararası, etki faktörü yüksek dergilerde yapılan yayın(lar)-(etki faktörünü de veriniz)</li> <li>• Proje kapsamında elde edilen ürün, buluş, çıktı vb. için alınacak/alınmış patentler ve/veya gerçekleştirilmiş/gerçekleştirilecek teknolojik/ticari uygulama(lar)</li> <li>• Proje kapsamında alınan ödüller/ödül adaylıkları</li> <li>• Projenin ülkenin bilimsel ve teknolojik araştırma gücüne, bilim insanı yetiştirilmesi ve yeni yetenekler kazanılmasına sağladığı katkılar</li> </ul>	
<b>Proje için TÜBİTAK Desteğinin Önemi</b> <i>(En fazla 150 kelime)</i>	

### ARDEB BAŞARI ÖYKÜSÜ

**1. Proje yürütücüsü iletişim bilgileri:**

Adı – Soyadı :

Unvanı :

Telefon :

E-posta adresi :

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. MAHİNUR AKKAYA
Proje No:	113Z038
Proje Başlığı:	Mutualist Kök Simbiyozu Olan Endofitik Arbüsküler Mikorhiza <i>P. indicum</i> 'ın Mikro-Rnalarının İlk Kez Saptanması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. BIYOTEKNOLOJİ ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/07/2013 - 01/07/2014
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29877.0

TÜBİTAK

<p>Öz:</p>	<p>Tarımda yaşanan kayıpların büyük bir bölümü elverişsiz iklim koşulları yüzünden oluşan abiyotik ve biyotik stres, haşereler ve bitki hastalıklarına neden olan patojen kaynaklıdır. Çevre üzerinde birçok zararlı etkisi olsa da bu kayıpları önlemek ve bitkinin verimliliğini artırmak, aşırı kimyasal kullanımına dayanmaktadır. Bitkilerde biyotik ve abiyotik strese karşı toleransı 80%?lere varan düzeylerde faydaya dayalı ilişki gösteren endofitik arbusküler mikorhiza mantarlar gibi mikroorganizmalar da sağlayabilmektedir. Böylece kimyasal kullanımın görece azalması çevreye verilen zararı da azaltılabilmektedir. Arpa ve Arabidopsis thaliana?da yapılan çalışmalarda, bir endofitik arbusküler mikorhiza olan Piriformospora indica?nın konağına, büyüme destekleyici aktivite sağladığı, tuz stresinde bitkinin tolerans düzeyini arttırdığı ve belirli yaprak ve kök patojenlerine karşı bitkinin dayanıklılığını artırdığı rapor edilmiştir (Waller ve ark., 2005). Ayrıca bu mantar bitkinin büyümesine ve tohum üretimine yardım etmesiyle birlikte, nitrat ve fosfat alımını da harekete geçirmektedir (Camehl ve ark., 2011).</p> <p>Piriformospora indica birçok bitki çeşidinin kökünde kolonileşebilen, bitkinin büyümesinde, belirli çevresel stres (abiyotik) koşullarına uyumda ve bazı patojenlere (biyotik stres) karşı direnç sağlamakta etkili olan endofitik bir mantar çeşididir. P. indica başlangıçta Hint Thar çölünde çalıkların kök yüzeyinde tespit edilmiştir; fakat özellikle tahıl bitkileri de dahil olmak üzere tek ve iki çenekli bitkilerin de köklerinde kolonileştiği ortaya çıkmış, yeni tanımlanmış bir organizmadır (Achatz ve ark., 2010). P. indica?nın çeşitli streslere karşı biyolojik savaşta yoğun olarak kullanılma potansiyeline ek olarak kolay kültüre alınabilmesi ve geniş bir konakçı grubu olması nedeniyle de bitki ve mikrop ilişkisini çalışılmasına olanak sağlayan bir model organizma olarak düşünülmektedir. Ayrıca bitki üretme sistemlerinin geliştirilebilmesi için yeni bir araç olarak kullanılacağı savunulmaktadır (Varma ve ark., 1999).</p> <p>Mutualist kök simbiyozu (ortak-yaşar) olan P. indica?nın genom ve transkriptom analizi daha önce Zuccaro ve meslektaşları tarafından 2011?de rapor edilmiştir. 25 Mb?lık genom uzunluğuna sahip P. indica?nın genomunun sekanslanması, canlı ve ölü arpa kökü üzerindeki kolonizasyonunu sağlayan transkriptom çıktılarının global karakterizasyonu, mantarın yaşam döngüsüyle ilişkili genomik adaptasyonlarını bulmakta önemli rol oynamaktadır (Zuccaro ve ark., 2011).</p> <p>Şimdiye kadar rapor edilen bilgilerde, P. indica?nın mikroRNA?larının araştırılmasına yönelik bir çalışma bulunamamıştır; fakat diğer arbusküler mikorhiza mantarları ile bitki arasındaki simbiyoz ilişkide yer alan mikroRNA?lar çalışılmış ve simbiyoz ilişkisinin oluşmasında önemli rolleri olduğu görülmüştür (Emanuel ve ark., 2011).</p> <p>Projemizin amacı, özellikle de tahıllarda yaşanan ürün kayıplarının bir kısmını kapatabilecek üstün nitelikte olan bu mantarın mikro-RNA?larının (miRNA) saptanmasıdır. Bulunan miRNA?lar sonraki çalışmalarda buğday ve/veya arpa gibi tahıllarda biyotik strese karşı fayda sağlama amaçlı rolleri taranabilir. Aday mikro-RNA?ların bulunmuş olması organizmanın miRNA jenerasyon mekanizmasının anlaşılması sağlayabilir bu sayede de uygulamaya yönelik stratejiler belirlemede yararlı olabilir.</p> <p>Henüz literatürde P. indica?ya ait kısa RNA okumalarının sunulduğu bir makaleye rastlanmamıştır. Çalışmalarımızın sonuçları makale olarak hazırlanmaktadır. İlk kez yapılan bir çalışma olacağı için ilgi gösterilecek bir yayın olacaktır.</p>
<p>Anahtar Kelimeler:</p>	<p>Piriformospora indica, ortak-yaşar organizma, bitki-fungus ilişkisi, mikroRNA</p>
<p>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:</p>	<p>Hayır</p>