



miR482 ve Bitkilerdeki İzofomları

Abdil Hakan EREN¹, Emre İLHAN^{2*}, Behcet İNAL³

¹T.C. Gençlik ve Spor Bakanlığı, Hatay Gençlik Hizmetleri ve Spor İl Müdürlüğü, Kırıkhan Gençlik Hizmetleri ve Spor İlçe Müdürlüğü, Kırıkhan-Hatay, TÜRKİYE

²Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE

³Siirt Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Siirt, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 16.02.2016

Kabul Tarihi/Accepted: 15.04.2016

*Sorumlu yazar/Corresponding author: emre.ilhan@erzurum.edu.tr

Özet: Bitkilerdeki miR482 aile üyeleri genelde 22 nükleotid uzunluğunda diğer mikroRNA (miRNA) ailelerinden daha değişken ve sıra dışı dizilere sahiptir. Çalışmalar miR482'nin hastalık direnciyle ilişkili nükleotit-bağlayıcı lōsine zengin tekrarlı (Nucleotide binding-site leucine-rich repeat, NB-LRR) genlerle ilgili olduğunu göstermektedir. Bitki genomlarında kodlanmış çeşitli NB-LRR'ler birçok patojen tanımayı sağlayan bir çeşit bağışıklık sistemidir. NB-LRR proteinleri normal patojenlere karşı efektör-tetikleme bağışıklıklığı ile ilişkilidir. Bitkide temelden gelen bağışıklık reseptörleri tanıyıcı reseptör yapıları (Pattern recognition receptor, PRR) ve direnç (Resistance, R) proteinleridir. R genlerinin çoğu NB-LRR etki ile hücrede bağışıklık proteinlerini kodlarlar. miR482, miR1448, slmiR2118 ve ath-miR472 hastalık direnci ile ilişkili miRNA'lardır. Yapılan bazı çalışmalarda ise miR482'nin miR1448 homoloğu olduğu bildirilmiş ve filogenetik analizler miR482'nin tandem duplikasyon ürünü miR1448 olabileceğini göstermektedir. Evrimsel süreçte bu miRNA'lar aynı transkripti hedeflemişlerdir. miR482 izofomlarının baskılanması bitkiyi patojene karşı hassaslaştırırken miR482'nin soyada nodülasyon oluşumunda ve mikorizaların çalışma prensibinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Giderek artan kanıtlar miRNA482'nin patojen saldırısında hastalık direnci tepkilerinde kritik roller oynadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: miR482 ailesi, NB-LRR, R geni, nodülasyon

miR482 and Its Isoforms in Plants

Abstract: In plants, miR482 family members are generally 22-nucleotide long, distinguishing from other microRNA (miRNA) families by their extraordinary and diverse sequence structures. Studies showed that miRNA482 is related to NB-LRR (Nucleotide binding-site leucine-rich repeat) genes conferring resistance to disease in plants. There are different coded NB-LRR genes which are considered as the part immune response assisting the recognition of pathogens in plant genomes. NB-LRR proteins are mostly related to effector – triggering immune system against pathogens. The main immune receptors in plants are PRR (Pattern recognition receptor) and R (Resistance) proteins. R proteins code for immune system proteins by NB-LRR activity. miR482, miR1448, slmiR2118 and ath-miR472 are disease resistance related miRNAs. In several studies, miR482 was found to be a homolog of miR1448 and phylogenetic analyses showed that miR1448 is formed by tandem duplication of miR482. While suppression of miR482 results in plant susceptibility to pathogens, miR482 was considered to play role in nodulation and mycorrhizal processes of soya roots. Increasing evidences exhibit that miR482 is critical in disease resistance against pathogen attacks.

Keywords: miR482 family, NB-LRR, R gene, nodulation

1. Giriş

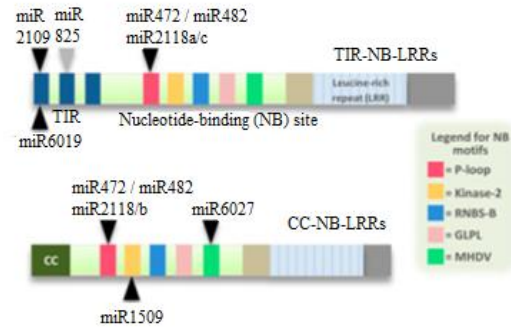
Bitkide küçük Ribonükleikasit (RNA)'lar ~21-24 nükleotid uzunluğundadır. Bu kısa RNA'lar,

işlenmiş transkript geliştirme, bitki savunma ve epigenetik değişiklikler gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Bitkilerde küçük RNA'lar mikroRNA (miRNA) dâhil olmak

üzere siRNA'lar (Small interfering RNAs), phasiRNA'lar (Phased, secondary, small interfering RNAs) ve NAT-siRNA (Natural antisense transcript small interfering RNAs) gibi birçok ana grupta sınıflandırılabilirler. Bu sınıflar transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzeyde fonksiyonları ile kendi kökeni ve biogenezine göre tanımlanırlar. Pek çok bitki miRNA'sının hedef genleri NB-LRR (Nucleotide binding-site leucine-rich repeat) motiflerini kodlamaktadır (Fei ve ark., 2013). NB-LRR bitkilerde direnç (R) genleri ve PRR (Pattern recognition receptor) ilişkili olduğu bilinmektedir (Eckardt, 2012). Bitkilerde doğal bağışıklık reseptörleri, PRR ve R proteinleridir (Chisholm ve ark., 2006; Jones ve Dangl, 2006). Patojen saldırısında, bitki tanıma reseptörleri tarafından patojen ile ilişkili molekülerin tanınması, hormon değişimi ve metabolit seviyelerinde değişiklikler gen ifadesi ile tetiklenen bağışıklığa (Post transcriptional initiation, PTI) neden olur (Boller ve Felix, 2009). Patojenler ise PTI'yi baskı altına almak için efektörler geliştirmişlerdir. Fakat bitkilerde buna karşılık, hastalık R genleri vardır (Jones ve Dangl, 2006). PRR'ler, patojenle ilgili moleküler yapıları (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP) tanıyarak ve PAMP-PTI tetiklenen bağışıklığı harekete geçirmek, R proteinleri ise farklı patojen efektörleri tanımak ve hipersensitif hücre ölümü şeklindeki direnç tepkisini tetikleyebilir (Li ve ark., 2012).

Bitki genomları, hücre yüzeyi LRR ve hücre içi NB ile R'ye özgül patojen efektörleri tanımak ve direnç tepkilerini tetiklemek için LRR bağışıklık genleri tarafından kodlanan çok sayıda reseptör içerir. NB-LRR genlerinin düzensiz ifadesi patojen enfeksiyonu yokluğunda otoimmüniteyi başlatabilir ve bitki büyümesini engelleyebilir. Tarımsal üretimde ciddi potansiyel sonuçlarına rağmen, R gen ifadesini düzenleyen mekanizma henüz anlaşılabilmiştir (Li ve ark., 2012). Patojenlere karşı savunma seçimi ve NB-LRR savunma ile ilgili önemli molekülleri kodlayan bitki genlerinin de varyasyonu yüksek düzeyde çeşitlendirilmesi güçlü bir evrimsel ihtiyaç olarak kabul edilir. Konukçudaki NB-LRR spesifik proteini, patojen çeşitleri tarafından kodlanan bir efektör patogenezi tanınmasına aracılık eder. NB-LRR proteinleri ise normal olarak, ırka özgü efektör ile tetiklenen bağışıklık ilişkili olduğu bilinmektedir. Bitki genomlarında bulunan NB-LRR proteinleri ile birçok patojen tanınmakta ve doğal bağışıklık sistemini oluşturmaktadır (Meyers ve ark., 2003). Birçok bitki türü göz önüne alındığında, NB-LRR'ler birden fazla kodlanmış motifleri yani Toll/İnterlökin-1 Reseptör (TIR1), TIR2, P-döngü, Kinaz-2 ve NBS geni içerisindeki

en son korunmuş motif olan MHDV (Meyers ve ark., 2003) motiflerini (Şekil 1) hedeflenmektedir (Fei ve ark., 2013). NB-LRR proteinleri patojen saldırısı yokken ifade seviyesi düşük, saldırı meydana geldiğinde ise hızla artan bir ifade seviyesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Doğal bağışıklıkla miRNA düzenlemesi, bitkilerde savunma mekanizmaları için ilave bir savunma aracı olarak kabul edilmektedir (Eckardt, 2012). Küçük RNA moleküllerinin en büyük hedef genlerini geniş bir gen ailesi olan NB-LRR kodlayan genler oluşturmaktadır (Fei ve ark., 2013). NB-LRR'ler N-terminal etkiye göre TIR (TIR-NB-LRR) ve sarmal-bobin (coiled-coil, CC) CC-NB-LRR olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir (Şekil 1). Solanaceae familyasında CC-NB-LRR'leri hedefleyen miR482, miR472, miR2118 ve miR5300 de içeren en az 4 miRNA ailesi vardır.



Şekil 1. Çeşitli miRNA ailesinin TIR-NB-LRRs ve CC-NB-LRRs hedefleri [Fei ve ark. (2013)'dan kısaltılmıştır]

Bitki miRNA genlerinin evrimsel sürecine bakıldığında ekzon genleri gibi miRNA genleri de delesyon, insersiyon, dublikasyon, rekombinasyon ve doğal seleksiyon gibi süreçlere tabiidir (Barrera-Figueroa ve ark., 2013; Koptekin ve Aktaş, 2013). Yeni miRNA oluşumunun, transpozonların, protein kodlayan genlerin ve genomik saç tokası yapılarının duplikasyonu sonucu meydana geldiği ileri sürülmüş, ifadesi protein olan gen ile insersiyonlu miRNA'nın, protein üreten genin transkriptiyle eşleşmesi ve gen ifadesini durdurması miRNA'ların evrimsel süreçlerinin açıklaması bakımından oldukça ilginç görünmektedir (Allen ve ark., 2004; Rajagopalan ve ark., 2006; Fahlgren ve ark., 2007, 2010; Nozawa ve ark., 2012; Koptekin ve Aktaş, 2013). miRNA genlerinin evrimsel kökeni ile ilgili olarak, birkaç farklı mekanizma önerilmektedir. Bu nedenle, bitkilerde miRNA genlerinin kökeni hakkında genel bir fikir elde etmek için uzaktan akraba türleri karşılaştırarak daha detaylı miRNA genlerinin analiz etmek gerekir (Nozawa ve ark., 2012). Evrimsel gelişim sürecinde monokotil ve

dikotil bitkiler arasında en çok korunmuş 21 miRNA gen ailesi içerisinde miR482'de bulunmakta ve miRBase'de yerini almıştır (Cuperus ve ark., 2011; Xiao ve ark., 2013). Bitkilerde miRNA'lar türler arasında hedef dizilerdeki bağlanma bölgeleri ile filogenetik dağılımda yüksek oranda benzerlik göstermektedirler. Korunmuş miRNA'ların çoğu farklı bitki türlerinin her birinde homolog genler ile düzenlenmektedir. Çoğu bitki türünde miRNA'lar ve hedef genlerinin korunmuş olması (Jones-Rhoades, 2012), miRNA'lar ile hedefledikleri genlerin evrimsel süreç içerisinde etkileşim içerisinde olduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Zhang ve ark., 2009; Koptekin ve Aktaş, 2013).

2. miR482 İzoformları ve Stres Faktörleri

Bitkide miRNA'lar yaprak morfolojilerinden polarite, çiçek yapısı ve stres yanıtları gibi zorunlu biyolojik süreçlerde önemli rol oynar (Eldem ve ark., 2013). Bir miRNA birden fazla geni hedefleyebilmektedir. Bu yönü ile miRNA'lar gen düzenlenmesinde görev alabilmektedir (Shivaprasad ve ark., 2012). Bitkiler yaşamı

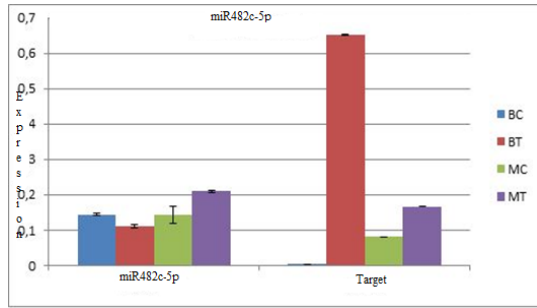
boyunca birçok stres faktörü ile karşı karşıyadır. Stres etmenini tolere etmede, bitkinin büyüme ve gelişimsel süreçlerinde yapılan çalışmalar miRNA'ların çok çeşitli fonksiyonlarının olduğunu göstermektedir. Özellikle miR482 ailesi birçok bitkide çeşitli stres faktörlerinde ifade olmuştur. PMTED (Plant microRNA target expression database) veri tabanında mısır (Zhang ve ark., 2009), pamuk (Qiu ve ark., 2007), kavak (Lu ve ark., 2008) ve portakal (Xu ve ark., 2010) bitkilerinde tespit edilen olgun miR482 ailesi ve sekansları bulunmaktadır. miR482 aile üyeleri 21 nükleotitten ziyade 22 nükleotid uzunluğunda diğer miRNA ailelerinden daha değişken ve sıra dışı dizileri vardır. Farklı bitki türünde, miR482 sekansları dokuz konumda değişir ve en az 31 izoformu (Şekil 2) vardır (Shivaprasad ve ark., 2012). Zhao ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada ise, miR482'nin miR1448 homoloğu olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar miR482'nin NB-LRR hastalık direnci ile ilgili olduğunu göstermektedir (Zhai ve ark., 2011; Fei ve ark., 2013). Bitkilerde NB-LRR proteinlerinin bilinen tek işlevi savunma sırasında patojenin tanınmasıdır (Eitas ve Dangl, 2010).

slmiR 482b	uc <u>u</u> g <u>cc</u> aa <u>u</u> accgccc <u>au</u> ucc	22	<i>Solanum lycopersicum'</i> da tespit edilen miR482 aile dizileri	
slmiR 482a	uc <u>u</u> g <u>cc</u> uac <u>a</u> ccgccc <u>au</u> gcc	22		
slmiR 482d	ucuu <u>cc</u> uacucc <u>cc</u> auccc	22		
slmiR 482c	ucuu <u>cc</u> uacucc <u>cc</u> uacc	22		
slmiR 482e	ucuu <u>cc</u> uacucc <u>cc</u> ugcc	22		
slmiR482f	ucuu <u>cc</u> uacucc <u>cc</u> auacc	22		
csmir482a	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> a <u>g</u> ccucc <u>au</u> ucc	22		Bilinen tüm miR482 ailesine ait izoformların dizileri
pabmiR482b	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> auucc <u>cc</u> auucc	22		
ptmiR482c	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> auucc <u>cc</u> auucc	22		
grmiR482	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> auucc <u>cc</u> auucc	22		
mdmiR482	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> a <u>g</u> ccgccc <u>au</u> ucc	22		
gmimR482a	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> auuccgccc <u>au</u> ucc	22		
pvmiR482	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> auuccgccc <u>au</u> ucc	22		
stumiR482	uc <u>u</u> g <u>cc</u> aa <u>u</u> accgccc <u>au</u> ucc	22		
slmiR482b	uc <u>u</u> g <u>cc</u> aa <u>u</u> accgccc <u>au</u> ucc	22		
ptmiR482a/b	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> auucc	22		
ptamiR482a/b	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> auucc	22		
pabmiR482a	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> auucc	22		
ptmiR482d	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> auucc	22		
gsmiR482a/b	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> ac <u>a</u> cc <u>cc</u> auacc	21		
gmamiR482b	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> ac <u>a</u> cc <u>cc</u> auacc	22		
csmiR482b	uc <u>u</u> g <u>cc</u> uacucc <u>cc</u> augcc	22		
agmiR482a/b/c	uc <u>u</u> g <u>cc</u> gacucc <u>cc</u> auacc	22		
ghmiR482b	uc <u>u</u> g <u>cc</u> uac <u>u</u> cc <u>cc</u> augcc	22		
slmiR 482a	uc <u>u</u> g <u>cc</u> uac <u>a</u> ccgccc <u>au</u> gcc	22		
pabmiR482c	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> auucc	22		
vvmiR482	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> auucc	22		
slmiR482d	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> auccc	22		
slmiR482f	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> auacc	22		
ghmiR482a	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> auacc	22		
slmiR482c	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> uacc	22		
slmiR482e	uc <u>u</u> ucc <u>u</u> acucc <u>cc</u> ugcc	22		

Şekil 2. Domatesteki miR482 ailesi ve diğer bilinen tüm miR482 ailesine ait izoformların dizileri (Shivaprasad ve ark., 2012)

2.1. Buğdayda miR482 ailesi

Buğdayda çoklu patojen (*Bipolaris sorokiniana* ve *Fusarium culmorum*) uygulaması sonucu gma-miR482e'nin ifade seviyesinde değişme olduğu gözlemlenmiş; enfeksiyon sonucu ifade seviyesinde artış olduğu tanımlanmış, ama dirençli buğday çeşidinde patojene karşı ifadesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir (İnal ve ark., 2014). Aynı çalışmada *F. culmorum* uygulaması sonucu miR482c-5p (Origin recognition complex subunit 4-like) dayanıklı çeşitte ifade azalışı olurken, hassas çeşitte ifade artışı gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak miR482c-5p'nin hedeflediği genlerdeki ifadeler Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. miR482c-5p ve tar482c-5p'nin analizi (İnal ve ark., 2014)

BC: Bezotaja kontrol, BT: Bezotaja uygulama, MC: Mızrak kontrol, MT: Mızrak uygulama

Eren ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada; tuz stresi altındaki buğday çeşitlerinde Zma-miR482-5p (f-box LRR-repeat protein 3-like) uygulamaya bağlı olarak dayanıklı çeşidin ifadesinde artış gösterirken, hassas çeşitte ise ifadesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Zma-miR482-5p'nin buğdaydaki hedefi su ile ilişkili bir dehidrin proteinini kodlayan ve absisikasit (ABA) duyarlı *rab15B* geni olduğu belirlenmiştir (King ve ark., 1992; Hassan ve ark., 2015). Tuz stresi altında dirençli çeşitte miR482 ifadesinde meydana gelen artış; miR482'nin sadece biyotik stres şartlarında değil, aynı zamanda abiyotik stres şartlarında da önemli görevler üstlendiğini göstermektedir.

2.2. Domateste miR482 ailesi

NB-LRR proteinleri patojenlere karşı efektör-tetikleme bağımsızlığı ile ilişkilidir. Bu yaklaşımda sRNA'lar dönüştürüldüğü transkripsiyon sonrası gen susturmayla ilişkili olan konukuların savunma mekanizmasını tetiklemektedir (İlhan ve ark., 2013). Patojen *Pseudomonas syringae* ile inoküle domateste miR482 hedefinin NB-LRR transkripleri olduğu bildirilmiştir. Domateste yapılan bu çalışmalarda; virüs ve bakteri ile enfekte olmuş dokular miR482 (NB-LRR mRNA'sı) aracılığı ile susturulduğu,

bunun nedeninin ise büyük olasılıkla patojen tarafından kodlanmış proteinlerin aktivitesini kaybetmesi olduğu ileri sürülmüştür (Shivaprasad ve ark., 2012). Domateste miR482 üyesi miR482f dizinde iki nükleotid farkı ile Arabidopsis miR472 ile aralarında bir varyasyon vardır (Şekil 4) (Shivaprasad ve ark., 2012). Bu izoformik diziler bitkilerde direnç genlerini hedeflemektedirler.

slmiR482f	UCUUUCCUACUCCUCCCAUACC 22
athmiR472	UUUUUCCUACUCCGCCAUACC 22
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *

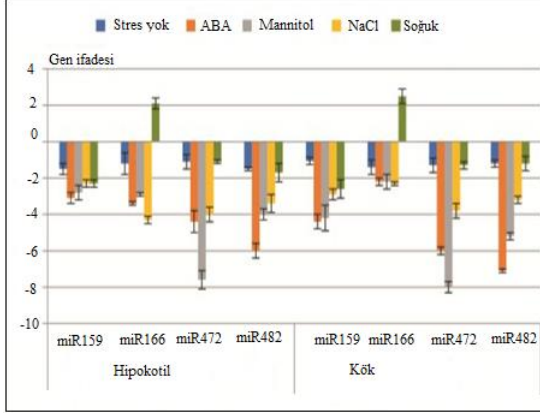
Şekil 4. Domateste miR482f izoformu At-miR472 dizisi (Shivaprasad ve ark., 2012)

Bu bağlamda, Solanaceae ve Fabaceae üyelerinde alışılmadık ve çok dikkat çekici şekilde NB-LRR genlerinin NB-LRR hedefli mesajcı RNA (mRNA)'lardan miR482/2118 tarafından düzenlendiği gözlemlenmiştir. miR2118b izoformu, miR482 gibi CNL-NB-LRR mRNA'larını hedeflemektedir. Bununla birlikte, *Medicago truncatula* miR2118a ve c izoformlarında olduğu gibi domateste de miR482, TIR ve CNL-NB-LRR proteinlerinin her ikisini de hedeflemektedir. Bu benzer hedefleme tahminen *Medicago truncatula* miR2118a ile slmiR482 (slmiR2118) arasındaki yüksek dizi homolojisinden kaynaklanabilir (Shivaprasad ve ark., 2012).

Mavi ışık altında mutant ve yabancı domates bitkilerinde ABA, mannitol, tuz ve soğuk stresi uygulamalarında hipokotil ve kökten alınan örneklerde miRNA ifade profilleri tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre miR5300, miR5301 ve miR2916'da ifade seviyesi artarken; miR159, miR166, miR472 ve miR482'nin ifade seviyesinde azalış olduğu rapor edilmiş ve bu stres şartlarında miRNA'ların gen ifadesi Şekil 5'te verilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre mutant ve yabancı tip domateslerin hipokotil ve köklerindeki miR472 ve miR482'nin TIR-NB-LRR ve CC-NB-LRR genlerini hedeflediğini rapor etmiştir. Bununla birlikte bu genlerin fonksiyonel karakterizasyonunun yapılması bitki savunma sistemindeki oynadığı rolü ortaya çıkaracaktır (Omidvar ve ark., 2015). Yine yapılan çeşitli çalışmalarda bitkilerde kuraklık ve tuz stresi gibi abiyotik streslerde miR472 ve miR482'nin ifade seviyelerinde artış olduğu rapor edilmiştir (Lu ve ark., 2008; Shuai ve ark., 2013).

Wan ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada; biber (*Capsicum annuum* L.)'e ABA uygulaması ile miR482'nin ifade artışı tespit edilmiş, buna bağlı

olarak birkaç NB-LRR proteinleri belirlenmiştir. Korunmuş miRNA'ların hedefleri türler arasında korunmuş gibi görünüyorsa da, ilgi çekici bazı miRNA aile üyeleri benzer etmenlere yanıt olarak farklı dokular ya da türlerde farklı ifade seviyelerine sahip olabilmektedir (Omidvar ve ark., 2015).



Şekil 5. Farklı stres şartlarında domatestede miRNA'ların gen ifadesi (Omidvar ve ark., 2015)

Fusarium oxysporum çok sayıda bitkiye enfekte olan bir mantar patojenidir. Ouyang ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*'ye dayanıklı ve hassas domates çeşitlerinde miRNA dizileme çalışması yapılmış ve fungus enfeksiyonu sırasında dayanıklı çeşitte ifade seviyesi azalan özellikle iki miRNA (slmiR482f ve slmiR5300) tespit edilmiştir. Yapılan gen susturma çalışmasında ise slmiR482f ve slmiR5300'ün dört farklı geni hedeflediği ve bu hedeflerin dayanıklı domates çeşidinde ifade seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Domatestede miR5300 yeni bir miRNA olarak tespit edilmiş, fakat miR5300'ün hedeflediği genler henüz tespit edilememiştir (Mohorianu ve ark., 2011; Karlova ve ark., 2013).

2.3. Pamukta miR482 ailesi

MYB (myeloblastosis) gibi transkripsiyon faktörleri ve fitohormonlar miRNA'ların hedefleri arasındadır. Pamukta lif oluşumunu başlatma ve uzama doğrudan bitki hormonlarının etkisiyle olmaktadır. Oksin ve gibberellinlerin lif oluşumunun başlatılması ve gelişmesini teşvik ettiği bilinmektedir (Zhu ve ark., 2013). Pamukta miR482 ailesinin ilk üyesi *Gossypium hirsutum*'da tespit edilmiş (Kwak ve ark., 2009), daha sonra bu ailenin üç üyesi; *G. raimondii*'de ghr-miR482a, *G. hirsutum*'da ghr-miR482b ve gra-miR482, tespit edilmiştir (Pang ve ark., 2009). Yapılan başka bir çalışmada ghr-miR482a.2'nin homologu yanında gra-miR482b.2, gra-miR482d.2, gra-miR482e.2, gra-miR482f.2, gra-miR482g.2, gra-miR482h.2 ve

gra-miR482i.2 de *G. raimondii* genomunda bulunmuştur (Şekil 6) (Zhu ve ark., 2013). Pamuk ghr-miR482a/miR482b NB-LRR proteinini kodlayan tek EST (GeneBank ID: NP673173) hedef olarak tahmin edilmiştir (Pang ve ark., 2009).

ghr mir482a	CCATACCCTCCTCATCCTTTCT	5'
ghr mir482b	CCGTACCCACCTCATCCGTTCT	5'
ghr mir482c	CCTTACCCTCCTCATCCTTTCT	5'
ghr mir482d	CCTTACCCTCCTTAACCTTTCT	5'
ghr mir482b.2	CACCGTACCCACCTCATCCGTT	5'
ghr mir482d.2	CACCTTACCCACCTTAACCGTT	5'
ghr mir482e.2	ATCCGTACCCACCTTATGCGTT	5'

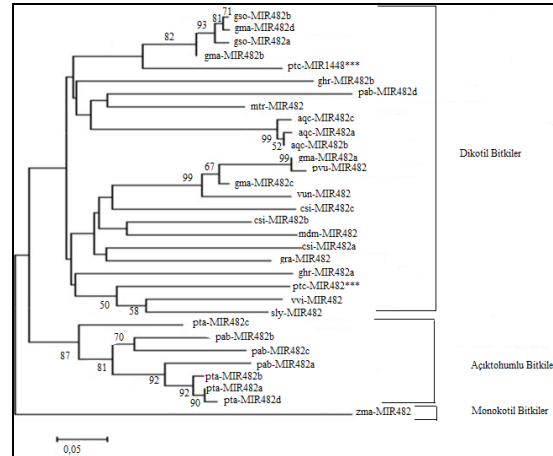
Şekil 6. *G. hirsutum* de tespit edilen miR482 / miR482.2 üyeleri

2.4. Asmada miR482 ailesi

Yeni nesil dizileme sistemi ile asma bitkisinin meyvelerinin 3 farklı gelişme döneminde uygulanan gibberalitik asit (GA₃) ve su kullanılarak elde edilen kontrollerinden iki miRNA kütüphanesi elde edilmiş, bunlardan 4.265.160 (GA₃ uygulamasında) ve 4.326.915 (kontrol) adet açık okuma elde edilmiştir. Kontrol grubuna göre, Vvi-miR482 GA₃ uygulamasında ifade azalması olduğu tespit edilmiştir (Han ve ark., 2014).

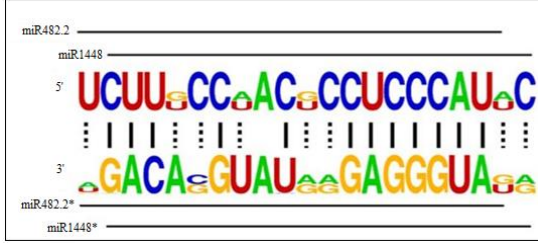
2.5. Kavakta miR482 ailesi

Kavakta (*Populus* sp.) yapılan çalışmada miR482 ve miR1448 hastalık direnci ile ilgili olduğu gözlemlenmiştir. Kavak miR1448 öncül ve olgun dizilerinin miR482 ile benzerlik gösterdiği ve bu benzerliğin yapılan filogenetik (Şekil 7) çalışmalar neticesinde miR1448'in miR482'nin tandem bir duplikasyonu olması nedeniyle bu iki miRNA bir polisistronik mRNA olarak nitelendirilmektedir (Zhao ve ark., 2012).



Şekil 7. Tohumlu bitkilerinde pre-miR482 dizilerinin filogenetik analizi ve *P. trichocarpa* pre-miR1448 filogeni, diğer bitkilerde pre-miR482 sekansları ile karşılaştırılması (Zhao ve ark., 2012)

Ayrıca miR1448'in türe özgü olduğu ve diğer bitki türlerinde bulunmadığı, ancak ortoloji gösterdikleri bildirilmiştir (Allen ve ark., 2004; Zhao ve ark., 2012). miRNA482 ailesinden miR482.2 ile miR1448 nükleotid dizileri arasında çift yönlü yüksek ölçüde korunmuş olduğunu gözlemlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Kavaktaki miR482 ve miR1448 nükleotid dizileri bölgesi (miRNA * dupleks) (Zhao ve ark., 2012)

2.6. Nodülasyon ve miR482 ailesi

Soya allotetraploid bir türdür (Goettel ve ark., 2014). Son 10 yılda, bitkilerde küçük RNA'ların işlevleri yoğun olarak araştırılmış ve miRNA'ların nodülasyon oluşumu ile bağlantıları tespit edilmeye çalışılmıştır (Li ve ark., 2010). miRNA'ların nodülasyon sırasında ifade değişiklikleri gösterdiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada miR482, miR1512 ve miR1515'in analizleri sonucunda ifade değişiklikleri tespit edilmiş ve bu miRNA'ların özellikle soya ile *Bradyrhizobium japonicum* arasındaki etkileşimler sırasında indüklendiği gözlemlenmiştir. Böylece, nodülasyon oluşması için bağımsız tepkilerini önlemek için miRNA'ların konak savunmasını bastırması şeklinde etki gösterdiği düşünülmektedir. Örneğin, soya fasulyesinde klasik yöntemlerle tanımlanmış, lokal rhizobiyal ırklar ile nodülasyonu kısıtlayan RJ2 ve Rfg1 alelleri TIR-NB-LRR proteinini kodlamaktadır (Yang ve ark., 2010). miR482, miR1512 ve miR1515'in transgenik bitkilerdeki ifadeleri, nodülasyonda önemli artışlara yol açmaktadır. miR482'nin aşırı ifade ettirildiği transgenik soya bitkisi köklerinde, kontrol vektör köklerine göre olgun nodül sayısında 2 katlık bir artış olduğu gözlemlenmiştir. miR482'nin ya nodüle özgü hatalı ifadesi ya da aşırı ifadesi nodülasyonda bir artışa yol açmaktadır (Li ve ark., 2010).

2.7. Patateste miR482 ailesi

Yang ve ark. (2015), patateste *verticillium* solgunluğuna yanıt mekanizmasında ortaya çıkan miRNA'ları tespit ettikleri çalışmalarında, *Verticillium dahliae* enfeksiyonuna karşı patateste miR482 süper ailesinin dizisi değişken üyelerinin karşı savunmada rol alabildiğini rapor etmişlerdir.

Ancak tüm varyantlar NB ve LRR motifleri ile hastalık-direnç proteinlerini hedeflemektedir. Bu da miR482 kaynaklı susturma proteinleri ile karakterize edilebilir. Yapılan bu çalışmada miR482e'yi seçmiş ve miR482e ifadesini doğrulamak için *V. dahliae* patojenine maruz bırakılmış patatesten çeşitli zaman aralıklarında örnekler alınmıştır. miR482e ifade seviyeleri kontrol (0 saat) ile karşılaştırıldığında, aşılama sonrası 6 ila 24 saat içinde belirgin azalma olduğu gözlemlenmiş ve miR482 sentezlemesi patojen aşılama sonrası 24 saat sonra çok belirgin bir şekilde bastırılmıştır. miR482e aşırı ifade ettirildiği transgenik bitkilerde ise kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında, transgenik patatesin *V. dahliae* patojenine karşı duyarlılığının arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak miR482e patates bitkisinde *V. dahliae*'ye karşı yanıt mekanizmasında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir.

3. Sonuçlar

Biyotik ve abiyotik stres etmenlerine bağlı olarak çeşitli bitkilerde yapılan çalışmalarda miR482 ailesinin ifade seviyelerinde farklılıklar olduğu tespit edilmiş ve bu farklılıklar morfolojik ve fizyolojik bazı değişimlerle ilişkilendirilmiştir. miR482 aile üyelerinin çoğunun NB-LRR genlerini hedeflediği ve bunlarında hastalık direnç proteinlerini kodladığı gözlemlenmiştir. Bitkiler doğal olarak sahip olduğu bu genleri evrimsel süreç boyunca muhafaza etmiş ya da bitki türlerinde değişikliğe maruz kalmasına rağmen aynı geni hedeflemeyi amaçlamıştır. miR482 ailesi özellikle simbiyotik etkileşimler ile ilişkili sinyal yolların düzenlenmesi ve evrimi sırasında nodülasyonun yeni fonksiyonları için yollar oluşturmayı, farklı izoformik yapılar ve homologlar için aynı genleri hedeflemişlerdir. miR482 ile slmiR2118, ath-miR472 ve miR1148'in dizi homolojisinin tutarlılığı gözlemlenmiş ve bu bağlamda bitkilerde sRNA'ların ifade seviyesindeki farklılıkların analizi, en son sRNA dizi verileri ile karşılaştırma yapılarak bitkilerdeki miR482'ye ait bilinmeyen ve farklı izoformları ile homologlarının tespiti hızla devam etmektedir. Gelişen teknolojiyle gelecekte yapılacak olan çalışmalarla miR482 ailesinin üyelerinin yeni fonksiyonlarının tespiti mümkün olabilecektir.

Bitkilerde diğer miRNA'larda olduğu gibi miR482'nin yeni üyelerinin belirlenmesi ve bu miRNA ailesinin üyelerinin yeni fonksiyonlarının belirlenmesi bu moleküllerin etki bir fonksiyonel markör olarak kullanılması yönünden faydalı olabilir. Taksonomik çalışmalarda RNA'lar moleküler markör olarak kullanılmaktadır.

Özellikle miR482 gibi diğer miRNA'ların yüksek bitkilerde korunmuş olması miRNA'nın patojenlere karşı bitkilerinin korunması için geniş uygulanabilirliğe sahiptir.

Bunun dışında genel olarak, miRNA'ların moleküler markör olarak kullanılmasında bazı potansiyel riskler de vardır. Kullanılan miRNA'ların 21-22 ya da 23-24 uzunluğuna bağlı olarak transgenik bitkilerde miRNA'ların ifadesi hedef dışı etki gösterebilir. Ayrıca patojenden türetilmiş transgen ile hedef olmayan gen arasında gerçekleşen rekombinasyonla yeni riskler oluşturulabilir. Fakat bitkilerde çapraz polinasyonda oluşan gen akışı dışında, miRNA tüm endişeleri giderebilir. Gelişen dizilme teknolojileri ve yazılımlar yeni miRNA'ların keşfedilmesine imkân sağlayacak olup bu sistemin seleksiyon markörü olarak kullanılmasının verimli, kaliteli, hastalık ve zararlılara dayanıklı ürün çeşitlerinin ıslahı yönünden önemli olacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., Sung, G.H., Spatafora, J.W., Carrington, J.C., 2004. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 36(12): 1282-1290.
- Barrera-Figueroa, B.E., Wu, Z., Liu, R., 2013. Abiotic stress-associated microRNAs in plants: Discovery, expression analysis, and evolution. *Frontiers in Biology*, 8(2): 189-197.
- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, (60): 379-406.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J., 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4): 803-814.
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N., Carrington, J.C., 2011. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell*, 23(2): 431-442.
- Eckardt, N.A., 2012. A MicroRNA cascade in plant defense. *Plant Cell*, 24(3): 840-840.
- Eitas, T.K., Dangl, J.L., 2010. NB-LRR proteins: Pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4): 472-477.
- Eldem, V., Okay, S., Ünver, T., 2013. Plant microRNAs: New players in functional genomics. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(1): 1-21.
- Eren, H., Pekmezci, M.Y., Okay, S., Türkteş, M., İnal, B., İlhan, E., Atak, M., Erayman, M., Ünver, T., 2015. Hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) root miRNome analysis in response to salt stress. *Annals of Applied Biology*, 167(2): 208-216.
- Fahlgren, N., Howell, M.D., Kasschau, K.D., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A., Law, T.F., Grant, S.R., Dangl, J.L., Carrington, J.C., 2007. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: Evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *Plos One*, 2(2): 1-14.
- Fahlgren, N., Jogdeo, S., Kasschau, K.D., Sullivan, C.M., Chapman, E.J., Laubinger, S., Smith, L.M., Dasenko, M., Givan, S.A., Weigel, D., Carrington, J.C., 2010. MicroRNA gene evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 22(4): 1074-1089.
- Fei, Q.L., Xia, R., Meyers, B.C., 2013. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *The Plant Cell*, 25(7): 2400-2415.
- Goettel, W., Xia, E., Upchurch, R., Wang, M.L., Chen, P.Y., An, Y.Q.C., 2014. Identification and characterization of transcript polymorphisms in soybean lines varying in oil composition and content. *Bmc Genomics*, 15(1): 1-17.
- Han, J., Fang, J.G., Wang, C., Yin, Y.L., Sun, X., Leng, X.P., Song, C.N., 2014. Grapevine microRNAs responsive to exogenous gibberellin. *Bmc Genomics*, 15(1): 111.
- Hassan, N.M., El-Bastawisy, Z.M., El-Sayed, A.K., Ebeed, H.T., Alla, M.M.N., 2015. Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. *Journal of Advanced Research*, 6(2): 179-188.
- İlhan, E., Eren, A.H., Erayman, M., 2013. Serin iklim tahıllarında virüs kaynaklı gen susturma: BSMV kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 44(1): 91-97.
- İnal, B., Türkteş, M., Eren, H., İlhan, E., Okay, S., Atak, M., Erayman, M., Ünver, T., 2014. Genome-wide fungal stress responsive miRNA expression in wheat. *Planta*, 240(6): 1287-1298.
- Jones-Rhoades, M.W., 2012. Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1): 3-16.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117): 323-329.
- Karlova, R., Van Haarst, J.C., Maliepaard, C., Van de Geest, H., Bovy, A.G., Lammers, M., Angenent, G.C., De Maagd, R.A., 2013. Identification of microRNA targets in tomato fruit development using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Journal of Experimental Botany*, 64(7): 1863-1878.
- King, S.W., Joshi, C.P., Nguyen, H.T., 1992. DNA-Sequence of an aba-responsive gene (Rab-15) from water-stressed wheat roots. *Plant Molecular Biology*, 18(1): 119-121.
- Koptekin, D., Aktaş, L.Y., 2013. Bitki mikroRNA'ları: Biyogenezi, köken ve evrimi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2): 140-148.
- Kwak, P.B., Wang, Q.Q., Chen, X.S., Qiu, C.X., Yang, Z.M., 2009. Enrichment of a set of microRNAs during the cotton fiber development. *Bmc Genomics*, 10(1): 1-11.
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H.Y., Kumar, P., Baker, B.,

2012. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5): 1790-1795.
- Li, H., Deng, Y., Wu, T.L., Subramanian, S., Yu, O., 2010. Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation. *Plant Physiology*, 153(4): 1759-1770.
- Lu, S.F., Sun, Y.H., Chiang, V.L., 2008. Stress-responsive microRNAs in populus. *The Plant Journal*, 55(1): 131-151.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H.H., Michelmore, R.W., 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(7): 1683-1683.
- Mohorianu, I., Schwach, F., Jing, R.C., Lopez-Gomollon, S., Moxon, S., Szitty, G., Sorefan, K., Moulton, V., Dalmay, T., 2011. Profiling of short RNAs during fleshy fruit development reveals stage-specific sRNAome expression patterns. *The Plant Journal*, 67(2): 232-246.
- Nozawa, M., Miura, S., Nei, M., 2012. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biology and Evolution*, 4(3): 230-239.
- Omidvar, V., Mohorianu, I., Dalmay, T., Fellner, M., 2015. MicroRNA Regulation of abiotic stress response in 7B-1 male-sterile tomato mutant. *Plant Genome*, 8(3): 878-835.
- Ouyang, S.Q., Park, G., Atamian, H.S., Han, C.S., Stajich, J.E., Kaloshian, I., Borkovich, K.A., 2014. MicroRNAs suppress NB domain genes in tomato that confer resistance to *Fusarium oxysporum*. *Plos Pathog*, 10(10): 1-15.
- Pang, M.X., Woodward, A.W., Agarwal, V., Guan, X.Y., Ha, M., Ramachandran, V., Chen, X.M., Triplett, B.A., Stelly, D.M., Chen, Z.J., 2009. Genome-wide analysis reveals rapid and dynamic changes in miRNA and siRNA sequence and expression during ovule and fiber development in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genome Biology*, 10(11): 1-21.
- Qiu, D.Y., Xiao, J., Ding, X.H., Xiong, M., Cai, M., Cao, C.L., Li, X.H., Xu, C.G., Wang, S.P., 2007. OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(5): 492-499.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., Bartel, D.P., 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 20(24): 3407-3425.
- Shivaprasad, P.V., Chen, H.M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A.C.M., Baulcombe, D.C., 2012. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell*, 24(3): 859-874.
- Shuai, P., Liang, D., Zhang, Z.J., Yin, W.L., Xia, X.L., 2013. Identification of drought-responsive and novel *Populus trichocarpa* microRNAs by high-throughput sequencing and their targets using degradome analysis. *Bmc Genomics*, 14(1): 1-14.
- Wan, H.J., Yuan, W., Ye, Q.J., Wang, R.Q., Ruan, M.Y., Li, Z.M., Zhou, G.Z., Yao, Z.P., Zhao, J., Liu, S.J., Yang, Y.J., 2012. Analysis of TIR- and non-TIR-NBS-LRR disease resistance gene analogous in pepper: Characterization, genetic variation, functional divergence and expression patterns. *Bmc Genomics*, 13(1): 1-15.
- Xiao, Y., Xia, W., Yang, Y.D., Mason, A.S., Lei, X.T., Ma, Z.L., 2013. Characterization and evolution of conserved microRNA through duplication events in date palm (*Phoenix dactylifera*). *Plos One*, 8(8): 1-10.
- Xu, Q., Liu, Y.L., Zhu, A.D., Wu, X.M., Ye, J.L., Yu, K.Q., Guo, W.W., Deng, X.X., 2010. Discovery and comparative and profiling of microRNAs in a sweet orange red-flesh mutant and its wild type. *Bmc Genomics*, 11(246): 1-17.
- Yang, L., Mu, X.Y., Liu, C., Cai, J.H., Shi, K., Zhu, W.J., Yang, Q., 2015. Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(12): 1078-1088.
- Yang, S.M., Tang, F., Gao, M.Q., Krishnan, H.B., Zhu, H.Y., 2010. R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43): 18735-18740.
- Zhai, J.X., Jeong, D.H., De Paoli, E., Park, S., Rosen, B.D., Li, Y.P., Gonzalez, A.J., Yan, Z., Kitto, S.L., Grusak, M.A., Jackson, S.A., Stacey, G., Cook, D.R., Green, P.J., Sherrier, D.J., Meyers, B.C., 2011. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes & Development*, 25(23): 2540-2553.
- Zhang, L.F., Chia, J.M., Kumari, S., Stein, J.C., Liu, Z.J., Narechania, A., Maher, C.A., Guill, K., McMullen, M.D., Ware, D., 2009. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *Plos Genetics*, 5(11): e1000716. (doi:10.1371/journal.pgen.1000716).
- Zhao, J.P., Diao, S., Zhang, B.Y., Niu, B.Q., Wang, Q.L., Wan, X.C., Luo, Y.Q., 2012. Phylogenetic analysis and molecular evolution patterns in the MIR482-MIR1448 polycistron of *Populus* L. *Plos One*, 7(10): e4781110.
- Zhu, Q.H., Fan, L.J., Liu, Y., Xu, H., Llewellyn, D., Wilson, I., 2013. miR482 regulation of NBS-LRR defense genes during fungal pathogen infection in cotton. *Plos One*, 8(12): e8439010.