

MICRORNA’LARIN DOMATES BİTKİSİNDE ABİYOTİK STRES FAKTÖRLERİNE KARŞI TOLERANTLIĞA ETKİSİ

Halim Can KAYIKÇI^{1*}, Adem KABA², İnanç SOYLU³, Nedim MUTLU⁴

1. Zir. Yük. Müh., Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya; ORCID: 0000-0003-1587-8601
2. Yük. Mol. Biyolog, Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya; ORCID 0000-0003-3362-0997
3. Dr., Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya; ORCID: 0000-0001-6546-4242
4. Prof. Dr., Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya; ORCID: 0000-0001-7252-5883

ÖZ

21-24 nt uzunluğunda kodlanmayan RNA’lar arasında bulunan mikro RNA’lar çeşitli gen regülasyonların da aktif bir şekilde rol almaktadırlar. Bu husus özellikle stres anlarında meydana gelmekte olup bitki tolerantlığında/dayanımında olumlu veya olumsuz olarak rol oynamaktadırlar. Bu sebeple bitki ıslahında kullanımı önemli bir potansiyele sahiptir. Özellikle biyoteknolojinin de gelişmesiyle mikro RNA aracılığı ile genomda çeşitli düzenlemeler yapılabilmekte olup CRISPR, Prime editing gibi teknolojiler ile beraber direkt olarak MIR geneleri hedeflenip düzenleme de yapılabilmektedir. Bu sayede model bitkilerin yanında ekonomik değeri yüksek bitkilerin ıslahında da önemli bir araç olarak da kullanılabilmektedir. Dünya üzerinde en çok üretilen sebzelerin başında gelen domates bu türlerden birisidir. Bu makalede mikro RNA moleküllerinin abiyotik stres faktörleri özelinde domates bitkisinde kullanım olanakları tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Domates, abiyotik stres faktörleri, mikro RNA, kısa kodlanmayan RNA’lar

THE EFFECTS OF MicroRNAs ON TOLERANCE OF ABIOTIC STRESS FACTORS IN TOMATO PLANT

ABSTRACT

Micro RNAs are among the 21-24 nt long non-coding RNAs, playing an active role in various gene regulation. This happens especially when plants are exposed to stress factors, leading to positive or negative regulations. Therefore, miRNAs have an important potential. Nowadays, micro RNA based gene regulation can be manipulated in the genome. Furthermore, through the today’s technological tools such as CRISPR and prime editing, Micro RNA coding genes (MIR) can be up or down regulated. Thus, in addition to model crops, economically important crops can also be improved easily thanks to these tools. Tomato, one of the most produced vegetable is among these plants. In this article, the possibilities of using micro RNA molecules in tomato plants will be discussed in terms of abiotic stress factors.

Keywords: Tomato, abiotic stress factors, micro RNAs, small non-coding RNAs

GİRİŞ

Domates Dünyada en çok üretilen sebzelerden bir tanesi olup yoğun temel araştırmaya konu olan ekonomik önemi çok yüksek bir tarımsal üründür. Bu çalışmaların yelpazesi çok geniş olup çeşitli stres faktörlerine karşı dayanım konusu bu çalışmalar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmalar biyotik ve abiyotik stres faktörleri olarak ikiye ayrılabilirler. Biyotik stres faktörleri olarak; virüsler, funguslar, bakteriler ve nematodlar sayılabilirken abiyotik stres faktörleri olarak; sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve ağır metaller sayılabilir [15].

Domates bitkisine yönelik stres faktörlerine dayanıklılık veya toleranslık konularında birçok çalışma bulunmaktadır. Klasik ıslah yöntemleri kullanılarak elde edilen gelişmeler farklı stres faktörleri ile farklı mücadele imkânı sunmuştur.

Biyoteknolojinin gelişmesi ve moleküler biyoloji alanındaki yenilikler klasik bitki ıslahına büyük ivme kazandırmıştır. Özellikle klasik bitki ıslahının gelişmiş biyoteknolojik metotlar ile kombine edilmesi bu alanda büyük bir avantaj sağlamış olup seleksiyon konusunda ve zaman tasarrufunda büyük adımların atılmasına vesile olmuştur.

Özellikle gen haritalama çalışmaları ve majör genler için güvenilir moleküler markırların geliştirilmesi yaygın hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı çeşit geliştirilmesini kolaylaştırmış ve moleküler markır destekli ıslah yaygın bir kullanıma ulaşmıştır. Yeni nesil biyoteknolojik yöntemler; CRISPR, TALENs, ZFN ve RNAi gibi teknolojiler bitki ıslahına büyük yenilik getirmiştir. Bu teknolojiler istenen gen bölgesinde genom düzenlemesi yapılmasına olanak sağladığı gibi çeşitli biyolojik yolların nasıl çalıştığının

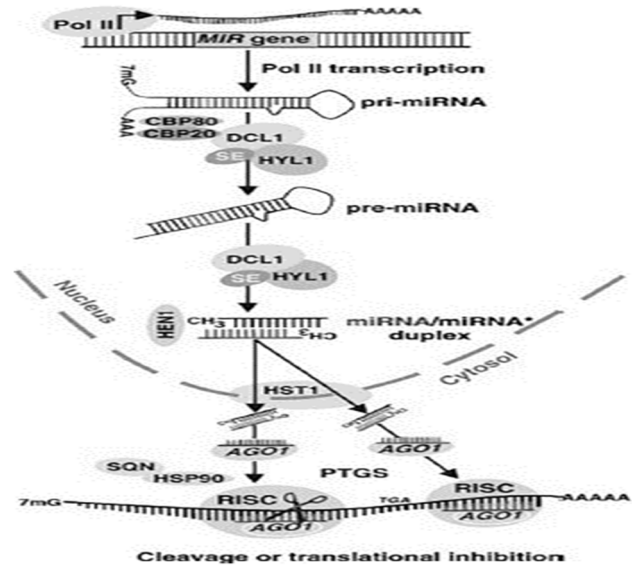
*Sorumlu yazar / Corresponding author: halimcan.kayikci@tarimorman.gov.tr

aydınlatılmasında önemli bir araç olmuştur. Bu ve benzeri teknolojiler sayesinde bitki moleküler biyolojisinde birçok mekanizmadan haberdar olunmuş olup bu mekanizmaların ıslah çalışmalarına entegrasyonu sağlanmıştır. Bu mekanizmalar arasında gen ifadesinde önemli bir yer tutan epigenetik faktörler, transkripsiyonel faktörler ve kodlanmayan RNA'lar sayılabilir. Bu faktörler bitki ıslahının geleceğinde önemli bir yere sahip olup aynı zamanda bitkilerin çeşitli stres faktörlerine karşı cevap mekanizmalarında önemli roller üstlenmeleri nedeniyle aydınlatılması önem kazanmıştır.

Bu faktörler arasında mikro RNA'lar önemli bir yer tutmaktadır. Mikro RNA'lar kodlanmayan RNA'lar olup genlerin transkripsiyonuna mRNA düzeyinde etki etmektedir. Özellikle stres faktörlerine cevap mekanizması olarak nitelendirilebilecek transkripsiyonel faktörlerin düzenlenmesinde ve aktivasyonunda da önemli bir yer tutmaktadırlar. Bu sebeple MIR genlerinin veya miRNA'ların düzenlenmesi ekonomik öneme sahip tarımsal ürünlerde abiyotik veya biyotik streslere dayanıklılık geliştirmek için güçlü bir biyoteknolojik stratejidir. Özellikle genom düzenleme metotları ile yapılacak yukarı veya aşağı regülasyonlar bitkilerde hem stres faktörlerine karşı olan dayanıklılık/toleransı artırabileceği gibi çeşitli agronomik özelliklerin düzenlenmesinde de aktif bir şekilde kullanımı sağlayabilir. Fakat günümüzde mikro RNA'lar ile yapılabilecek şeyler nihai noktaya ulaşmamış olup potansiyelleri tam olarak biliniyor denemez [3].

Bitki miRNA'ları, yaklaşık 20-24 nükleotid uzunluğunda ve MIR genleri tarafından kodlanan bir tür küçük RNA'dır. Micro RNA'lar ökaryotlarda gen ekspresyonunun negatif düzenleyicisi olarak rol oynadıkları gibi protein biyosentezinde de rol oynamaktadırlar. Bu durum protein-protein interaksiyonlarının meydana gelmesi ile rekombinasyona sebep olabilir. Bitki miRNA'larının aktivasyonu çekirdekte gerçekleşir. Bitki MiRNA'larını kodlayan spesifik genleri ve Pri-miRNA'lar oluşturmak için RNA polimeraz II enzimi tarafından işlenir. Pri-miRNA'lar ve Pre-miRNA'lar olarak adlandırılan kısa tamamlanmamış çift sarmallı yapı oluşturulması için DCL1 tarafından Pre-miRNA'ya çevrilir. Daha sonra DCL1 veya DCL4 tarafından bölünüp miRNA × miRNA dimeri oluşturulur ardından HEN1 tarafından 3'ucundan metillenir ve HASTY çift sarmallı dimer I sitoplazmaya taşır. Son olarak AGO proteini ile beraber mRNA'ya bağlanarak RISC yapısını oluşturulur ve bu sayede mRNA'nın degrade olması ya da ifadesinin kısıtlanması sağlar [8]. Micro RNA'ların mekanizması Şekil 1'de gösterilmektedir.

Arabidopsis thaliana bitkisi kullanılarak, miRNA'nın promotörleri düzenleyebildiği ve bazı durumlarda, genin promotörüne doğrudan bağlanarak belirli genlerin ekspresyonunu aktive ettiği de gösterilmiştir [18]. miRNA'lar DNA metilasyonu gibi epigenetik değişiklikleri yönlendirerek gen ekspresyonunu düzenleyebilmektedir [17, 2, 9]. Histon asetiltransferazın miRNA geninin biyogenezine müdahale edebileceği ve böylece miRNA üretimini modüle edebileceği [10] tarafından da gözlemlenmiştir. Ayrıca miRNA transkripsiyonunun, miRNA genlerini çevreleyen epigenetik işaretler tarafından değiştirildiği de rapor edilmiştir [14]. MiRNA'lar, bitkilerde genom bütünlüğünün, gelişimin, metabolizmanın korunmasını içeren çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesine yardımcı olur ve çevresel streslere karşı uyarlanabilir tepkiler verir [6].



Şekil 1. Mikro RNA'ların mekanizması [8]

MİCRO RNA'LARA DAYALI BİTKİ ISLAHI STRATEJİLERİ

Mikro RNA'ların fonksiyonları anlaşıldıkça onların manipülasyonları sonucu bitki ıslahı bakımından önemli sonuçlar alınmıştır. Bu alanda birçok çalışma bulunmasına karşın özellikle çeşitli stres faktörlerine yönelik biyoteknolojik metotlar kullanılmış ve olumlu sonuç alınmıştır.

Micro RNA'ların aşırı ekspresyonu

Yüksek miktarda olgun miRNA'nın üretilmesiyle, negatif düzenleyici genlerin ifadeleri stres altında bastırılır ve bu da sonunda bitkileri strese dirençli hale getirir. Günümüzde bu stratejilere dayalı olarak birçok başarılı transgenik bitki üretilmektedir. Ancak bazı durumlarda miRNA genlerinin aşırı ekspresyonu nedeniyle bazı yan etkiler ortaya çıkabilir. Bu tür bir

problemden kaçınmak için RNA enterferansı (RNAi) teknolojisi faydalı olabilir. RNAi tarafından miRNA hedef genlerinin baskılanması, miRNA'nın aşırı ekspresyonu nedeniyle bulunan pleiotropik etkileri önlenabilir [20].

Micro RNA'ların Aşağı Regülasyonu

Bilindiği üzere miRNA'lar hedef genler açısından negatif düzenleyici olarak görev almaktadırlar. Bunun anlamı hedef bölgeler stresin veya üstün özelliklerin pozitif düzenleyicileri olduğunda, miRNA'nın aşağı regülasyonu hedef gen/genlerinin yukarı regülasyonuna sebebiyet verir ve üstün karakterlerin elde edilmesine katkıda bulunabilir [11].

MİCRO RNA LARIN DOMATES BİTKİSİNDE STRES FAKTÖRLERİNE KARŞI MEKANİZMASI

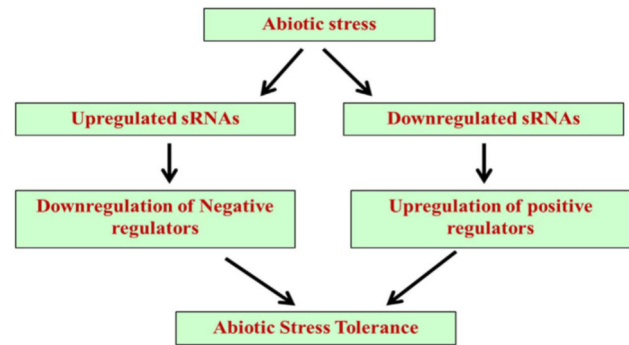
MiRNA genlerinin ekspresyonu, abiyotik (kuraklık, sıcaklık, tuzluluk) ve biyotik (virüsler, bakteriler ve mantarlar gibi patojenler) stresler dahil olmak üzere dış uyaranlarla düzenlenir. Patojen saldırısı sırasında, bitki deseni tanıma reseptörleri tarafından microbe-associated molecular patterns (MAMP'ler) tanınması, pattern-triggered immunity (PTI) yol açar ve bu da gen ekspresyonunda, hormon ve metabolit düzeylerinin değişmesiyle sonuçlanacak değişikliklere neden olur. Patojenler, PTI'yi sabote etmek için efektörler geliştirmiştir. Buna karşılık bitkiler, doğrudan veya dolaylı olarak spesifik efektörlerin varlığını veya etkisini tanımak ve hızlı ve güçlü bir bağışıklık şekli olan effector-triggered immunity (ETI) aktive etmek için dayanıklılık genlerine (R) sahiptir.

Bitki savunması için önemli olan genlerin düzenlenmesinde miRNA'ların bir rolü, birkaç patojene yanıt için belirlenmiştir. Domateste (*Solanum lycopersicum*), miR319/miR159 ve miR172 seviyeleri, Domates yaprak kıvrılması Yeni Delhi virüsü (ToLCNDV) hastalığının ilerlemesi sırasında indüklenir. miR393, miR160 ve miR167, virülant bakteriyel patojen *Pseudomonas syringae* pv. ile enfekte edilen yapraklarda yukarı regülasyon gözlemlenmiştir [12].

MİCRO RNA LARIN DOMATES BİTKİSİNDE ABİYOTİK STRES FAKTÖRLERİNE KARŞI YANITI

Kuraklık, tuzluluk, soğuk, oksidatif stres ve ısı gibi abiyotik stresler, tarımsal ürünlerde ciddi verim kaybına neden olarak dünya çapında her yıl büyük ekonomik kayıplara neden olur. Sabit organizmalar

olarak bitkiler, çevrelerindeki bu stresler ve değişikliklerle mücadele etmek için çeşitli koruyucu mekanizmalar geliştirmiştir. Su stresi ve kuraklık sırasında bitkiler stomalarını kapatarak yaprak yüzeyinden terlemeyle su kaybını en aza indirirler. Absisik asit (ABA), terlemeyi önleyici olarak görev yapan ve stoma kapanmasını indükleyen ve terlemeyle su kaybını azaltan bir bitki hormonudur [16]. Moleküler düzeyde, gen ekspresyonunun etkili bir şekilde yeniden programlanmasına yol açan ilgili genlerin yukarı veya aşağı düzenlenmesi, çeşitli abiyotik streslere karşı uygun direnç sağlamada önemlidir özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar açıkça göstermiştir ki küçük kodlanmayan RNA'lar (sRNA) bitkilerin stres faktörlerine karşı verdiği yanıtlarda önemli görevler üstlenmektedir. sRNA'lar genellikle 20-30 nükleotit uzunluğundadır ve bir grup olarak bunlar bir hücredeki genlerin %30'undan fazlasının düzenlenmesinde doğrudan rol oynayabilir. Şekil 2'de Mikro RNA'ların abiyotik stres faktörlerine karşı verdiği yanıtın diyagramı verilmiştir.



Şekil 2. Mikro RNA'ların abiyotik stres faktörlerine karşı verdiği yanıtın diyagramı [1]

Küresel iklim değişikliği birçok ürünün yetiştiriciliğinde negatif bir etkiye sahiptir. Domates bitkisi gibi birçok ürün iklim değişikliğinden direkt olarak etkilenmektedir. Tanımlanmış bazı mikro RNA bitkinin abiyotik stres faktörlerine karşı toleranslığında olumlu ya da olumsuz yönde etkiye sahiptir. Örnek vermek gerekirse miR396'nın aşağı regülasyonunda bitkide transpirasyon azalmakta olup bu durum su kullanım etkinliğini arttırmaktadır [4].

Bir başka mikro RNA olan miR169'un aşağı regülasyonu farklı türlerde farklı sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu molekül *Arabidopsis thaliana*'da kuraklığa karşı pozitif regülatör olarak görev alırken domates bitkisinde bu durum tam tersidir. Bu durumun temel sebebi miR169 arabidopsis bitkisinde kuraklığa toleranslıkta rol oynayan NFYA 5 düzenleyicilerinin yukarı regülasyonunu sağlamasına karşı domates bitkisinde bu durumun tam tersi olduğu ileri sürülmüştür [13].

Bununla beraber bazı mikro RNA'lar bitkide bulunan bazı stres hormonlarının birikiminde de rol oynamaktadırlar. Örneğin miR399 ve miR165/166 gibi bu RNA molekülleri ABA yolağında aktif rol üstlenmiş olup bitkinin stres anında oksidatif stresten korunmasını ve stoma açıklığının düzenlenmesini sağlayan Jasmonic asit ve farklı abiyotik stres koşulları altında farklı roller oynayan GABA'nın birikiminde rol oynamaktadır [19, 5]

Aynı şekilde miR319 ve miR156'da JA yolağında aktif olarak rol oynamaktadırlar. Bununla beraber büyüme düzenleyici faktörlerde (GRF) rol oynayan miR396'nın keza aynı şekilde JA yolağında rol üstlendiği belirlenmiş olup bu micro RNA'nın aşağı regülasyonunda arabidopsis bitkisinde bir dizi R geninin ifadesinde aktif olduğu gözlemlenmiştir [7].

SONUÇ

Sonuç olarak mikro RNA'lar bitkilerde birçok biyolojik süreçte önemli bir yer tutmakta olup gerek moleküler biyolojide biyogenesis araştırmaları için gerekse domates gibi ekonomik değeri yüksek bitkilerin ıslahında önemli bir yer tutmaktadır. Bu noktadan hareketle denebilir ki mikro RNA'ların potansiyeli bu moleküllerin işlevleri çözüldükçe artacaktır. Fakat günümüzde bu çalışmalar hala devam etmekte olup mikro RNA'ların potansiyeli tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu nedenden dolayı görece yeni sayılabilecek bu moleküllerin fonksiyonu hakkında hem birçok araştırma potansiyeli bulunmakta olup, hem de bu moleküllerin düzenlenmesi bitki ıslahı alanında önemli fırsatlar sunabilir.

KAYNAKLAR

1. Banerjee, S., Sirohi, A., Ansari, A.A., Gill, S.S. 2017. Role of small RNAs in abiotic stress responses in plants. *Plant Gene*, 11:180-189.
2. Bao, N., Lye, K.W., Barton, M.K., 2004. MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev. Cell* 7:653-662. (<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.003>).
3. Basso, M.F., Ferreira, P.C.G., Kobayashi, A.K., Harmon, F. G., Nepomuceno, A. L., Molinari, H. B.C., Grossi-de-Sa, M.F. 2019. Micro RNAs and new biotechnological tools for its modulation and improving stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 17(8):1482-1500.
4. Cao, D., Wang, J., Ju, Z., Liu, Q., Li, S., Tian, H., Fu, D., Zhu, H., Luo, Y., Zhu, B. 2016. Regulations on growth and development in tomato cotyledon, flower and fruit via destruction of miR396 with short tandem target mimic. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* 247:1-12 (<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.012>).
5. Cardoso, T.C.D.S., Alves, T.C., Caneschi, C.M., Santana, D.D.R.G., Fernandes-Brum, C.N., Reis, G.L.D., ... de Souza Gomes, M. 2018. New insights into tomato microRNAs. *Scientific Reports* 8(1):1-22.
6. Djami-Tchatchou, A.T., Sanan-Mishra, N., Ntushelo, K., Dubery, I.A., 2017. Functional roles of microRNAs in Agronomically important plants-potential as targets for crop improvement and protection. *Front. Plant Sci.* 8 (<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00378>).
7. Fracasso, A., Vallino, M., Staropoli, A., Vinale, F., Amaducci, S., Carra, A. 2021. Increased water use efficiency in miR396-downregulated tomato plants. *Plant Science* 303:110729.
8. Kar, M.M., Raichaudhuri, A. 2021. Role of microRNAs in mediating biotic and abiotic stress in plants. *Plant Gene* 26:100277.
9. Khraiweh, B., Arif, M.A., Seumel, G.I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R., Frank, W., 2010. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 140:111-122 (<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.023>).
10. Kim, W., Benhamed, M., Servet, C., Latrasse, D., Zhang, W., Delarue, M., Zhou, D.X., 2009. Histone acetyltransferase GCN5 interferes with the miRNA pathway in Arabidopsis. *Cell Res.* 19:899-909 (<https://doi.org/10.1038/cr.2009.59>).
11. Mandal, K., Boro, P., Chattopadhyay, S. 2021. Micro-RNA based gene regulation: A potential way for crop improvements. *Plant Gene* 27:100312.
12. Ouyang, S., 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 Pathogens* 10(10):e1004464.
13. Rao, S., Balyan, S., Jha, S., Mathur, S. 2020. Novel insights into expansion and functional diversification of MIR169 family in tomato. *Planta* 251(2):1-17.
14. Rodriguez-Enriquez, J., Dickinson, H.G., Grant-Downton, R.T., 2011. MicroRNA misregulation: an overlooked factor generating soma clonal variation? *Trends Plant Sci.* 16:242-248 (<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.002>).
15. Wang, W., Luan, Y. 2015. The advance of tomato disease-related microRNAs. *Plant Cell Reports*, 34(7):1089-1097.

16. Wilkinson, S., Kudoyarova, G.R., Veselov, D.S., Arkhipova, T.N., Davies, W.J. 2012. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of Experimental Botany* 63(9):3499-3509.
17. Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C., Qi, Y., 2010. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol. Cell* 38:465-475. (<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.008>).
18. Yang, G., Li, Y., Wu, B., Zhang, K., Gao, L., Zheng, C., 2019. MicroRNAs transcriptionally regulate promoter activity in *Arabidopsis thaliana*. *J. Integr. Plant Biol.* 61:1128-1133. (<https://doi.org/10.1111/jipb.12775>).
19. Yang, X., Luan, Y.S. 2021. Preliminary study of Sly-miR399 in tomato resistance to late blight. *China Biotechnology* 41(11):23-31.
20. Zhou, M., Li, D., Li, Z., Hu, Q., Yang, C., Zhu, L., Luo, H., 2013. Constitutive expression of a miR319 gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant Physiol.* 161(3):1375-1391 (<https://doi.org/10.1104/pp.112.208702>).